

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Atividade Cicatrizante do Óleo da Polpa da Bocaiúva  
(*Acrocomia aculeata*).

Autora: Patrícia Linares da Costa  
Orientadora: Prof. Dra. Susana Elisa Moreno

Campo Grande  
Mato Grosso do Sul  
Janeiro – 2014

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Atividade Cicatrizante do Óleo da Polpa da Bocaiúva  
(*Acrocomia aculeata*).

Autora: Patrícia Linares da Costa  
Orientadora: Prof. Dra. Susana Elisa Moreno

“Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco – Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à saúde”

Campo Grande  
Mato Grosso do Sul  
Janeiro – 2014

---

Ficha catalográfica

Costa, Patrícia Linares da  
C837a Atividade cicatrizante do óleo da polpa da bocaiúva (*Acrocomia aculeata*) / Patrícia Linares da Costa ; orientação Susana Elisa Moreno.  
2014  
76 f.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2014.

1. Óleos vegetais 2. Ácidos graxos 3. Tocoferol 4. Cicatrização de feridas I. Moreno, Susana Elisa II. Título

CDD – 660.6



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
Valorizando talentos

### **Atividade Cicatrizante do Óleo da Polpa da Bocaiúva**

Autora: Patricia Linares da Costa

Orientadora: Profa. Dra. Susana Elisa Moreno

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

APROVADA em 31 de janeiro de 2014.

---

Profa. Dra. Susana Elisa Moreno - UCDB  
(orientadora)

---

Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho – UCDB

---

Profa. Dra. Gisele Brazilliano de Andrade - UCDB

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por abençoar a minha trajetória e permitir que eu chegasse até aqui.

À minha orientadora, professora Doutora Susana Elisa Moreno, por todo conhecimento, empenho, acolhimento e auxílio que sempre disponibilizou.

À Universidade Católica Dom Bosco, por me conceder a oportunidade de participar do programa de mestrado em Biotecnologia.

Ao professor Doutor Marco Andrey Cipriani Frade, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e aos alunos Guilherme Ferreira Caetano, Marcel Nani e Thiago Moretti de Andrade, por terem me recebido de portas abertas e contribuído apreciavelmente para a minha formação.

Aos professores da pós-graduação, pelos conhecimentos compartilhados.

À equipe do laboratório de inflamação da Universidade Católica Dom Bosco, em especial à colega Danielli Fernanda Buccini, pela ajuda, dedicação e amizade dispensadas.

Aos meus colegas: Suellen Soares, Gabriel Pinheiro dos Santos e Tarcila Sandim, pelo apoio e companheirismo.

A todos os técnicos e funcionários que deram suporte à execução deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos meus familiares e amigos que indiretamente contribuíram para tornar esta realização possível.

## BIOGRAFIA

Patrícia Linares da Costa, filha de Leshen Luiz Cabral da Costa e Priscila Linares da Costa, nasceu em Ponta Porã, Mato Grosso do Sul, no dia 12 de Março de 1990.

Em dezembro de 2011, concluiu o curso de graduação em Biomedicina pelo Centro Universitário da Grande Dourados.

Em Fevereiro de 2012, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, nível Mestrado, área de concentração Biotecnologia Aplicada à Saúde, na Universidade Católica Dom Bosco, realizando estudos na área de cicatrização.

No dia 31 de Janeiro de 2014, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	.vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	.ix
ABSTRACT .....	. x
INTRODUÇÃO .....	. 1
<b>1 Morfofisiologia da pele .....</b>	<b>. 1</b>
<b>1.2 Epiderme.....</b>	<b>. 3</b>
<b>1.3 Derme.....</b>	<b>. 4</b>
<b>1.4 Tecido subcutâneo .....</b>	<b>. 5</b>
<b>1.5 Cicatrização: aspectos gerais.....</b>	<b>. 6</b>
<b>1.5.1 Coagulação/Hemostasia.....</b>	<b>. 7</b>
<b>1.5.2 Fase inflamatória .....</b>	<b>. 8</b>
<b>1.5.3 Fase proliferativa .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5.3.1 Fibroblastos e síntese de colágeno .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5.4 Angiogênese .....</b>	<b>13</b>
<b>1.5.5 Reepitlização .....</b>	<b>13</b>
<b>1.5.6 Remodelação tecidual .....</b>	<b>15</b>
<b>1.6 Úlceras cutâneas .....</b>	<b>16</b>
<b>1.6.1 Úlceras cutâneas agudas e crônicas .....</b>	<b>17</b>
<b>1.6.2 Tratamento de úlceras.....</b>	<b>19</b>
<b>1.7 Bocaiúva (<i>Acrocomia aculeata</i>).....</b>	<b>21</b>
<b>1.7.1 Frutos da <i>Acrocomia aculeata</i>: propriedades farmacológicas...</b>	<b>22</b>
<b>1.8 Referências.....</b>	<b>24</b>
OBJETIVOS GERAIS.....	33
Objetivos específicos .....	33

<b>Atividade Cicatrizante do Óleo da Polpa da Bocaiúva (<i>Acrocomia aculeata</i>).</b>	<b>34</b>
.....	
RESUMO.....	35
ABSTRACT .....	36
INTRODUÇÃO .....	37
MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
<b>Obtenção do óleo da polpa da bocaiúva .....</b>	<b>38</b>
<b>Animais.....</b>	<b>39</b>
<b>Confecção das pomadas.....</b>	<b>39</b>
<b>Padronização dos grupos .....</b>	<b>40</b>
<b>Procedimento cirúrgico: úlceras cutâneas dorsais.....</b>	<b>40</b>
<b>Coleta do material para estudo.....</b>	<b>41</b>
<b>Avaliação do índice de cicatrização das úlceras pelo ImageJ.....</b>	<b>43</b>
<b>Estudo histológico.....</b>	<b>43</b>
<b>Avaliação quantitativa por imagem quanto ao infiltrado inflamatório, angiogênese e fibroplasia .....</b>	<b>43</b>
<b>Avaliação quantitativa por imagem da colagênese .....</b>	<b>44</b>
<b>Determinação do infiltrado neutrofílico .....</b>	<b>45</b>
<b>Análise quantitativa da colagênese .....</b>	<b>45</b>
<b>Análise dos resultados.....</b>	<b>46</b>
RESULTADOS .....	48
<b>Avaliação do infiltrado inflamatório total.....</b>	<b>48</b>
<b>Determinação do infiltrado neutrofílico .....</b>	<b>50</b>
<b>Avaliação da fibroplasia.....</b>	<b>50</b>
<b>Avaliação por imagem da colagênese .....</b>	<b>51</b>
<b>Análise quantitativa da colagênese .....</b>	<b>53</b>
<b>Avaliação da angiogênese .....</b>	<b>54</b>
<b>Avaliação da reepitelização das úlceras (ICU) .....</b>	<b>54</b>
DISCUSSÃO .....	56
REFERÊNCIAS.....	64



## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> - Representação esquemática das camadas da pele.....	2
<b>Figura 2</b> - Confeção de duas úlceras cutâneas no dorso de cada animal .....	40
<b>Figura 3</b> - Tratamento e curativo oclusivo aplicados aos animais .....	41
<b>Figura 4</b> - Suporte utilizado para a aquisição das imagens .....	42
<b>Figura 5</b> - Coleta das amostras da úlcera/cicatriz de cada animal para análise ... .....	42
<b>Figura 6</b> - Fotomicrografia da área ulcerada de ambos os grupos ao longo do seguimento.....	49
<b>Figura 7</b> - Infiltrado inflamatório total nas úlceras cutâneas de ambos os grupos ao longo do seguimento .....	49
<b>Figura 8</b> - Quantificação do infiltrado neutrofílico por meio da dosagem de mieloperoxidase nas úlceras cutâneas de ambos os grupos ao longo do seguimento.....	50
<b>Figura 9</b> - Fibroplasia nas úlceras cutâneas de ambos os grupos ao longo do seguimento.....	51
<b>Figura 10</b> - Produção colagênica no grupo controle (GC) e no grupo tratado com a pomada contendo o óleo da polpa da bocaiúva (GB).....	52
<b>Figura 11</b> - Quantificação do colágeno nas úlceras do grupo controle (GC) e do grupo tratado com o creme contendo o óleo da polpa da bocaiúva (GB) .....	52
<b>Figura 12</b> - Análise quantitativa da colagênese por meio da dosagem de Hidroxiprolina nas úlceras cutâneas de ambos os grupos ao longo do seguimento.....	53
<b>Figura 13</b> - Angiogênese nas úlceras cutâneas de ambos os grupos ao longo do seguimento.....	54
<b>Figura 14</b> - Reepitelização das úlceras cutâneas nos dois grupos experimentais ao longo do seguimento .....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CTAP – III - peptídeo ativador de tecidos conectivos III

CINC-2a/b – Químioatraente para neutrófilos 2a/b

EGF - Fator de crescimento epidérmico

FGF - Fator decrescimento de fibroblastos

FMRP – USP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

GAGs – Glicosaminoglicanas

GB - Grupo bocaiúva

GC - Grupo controle

GRO- $\alpha$  - fator de crescimento relacionado ao oncogene

HE – Hematoxilina Eosina

HGF - fator de crescimento de hepatócitos

ICU – Índice de cicatrização das úlceras

IL-1 - interleucina 1

IL-1  $\beta$  – Interleucina 1  $\beta$

IL-1 $\beta$  - interleucina-1 $\beta$

IL-6 – Interleucina 6

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - interleucina 8

KGF - fator de crescimento de queratinócitos

KGF-1- fator de crescimento de queratinócitos 1

KGF-2 - fator de crescimento de queratinócitos 2

MCP-1 - proteína quimiotática para monócito 1

MEC - matriz extracelular

MIP-1 $\alpha$  – proteína inflamatória de macrófagos -1 $\alpha$

MIP-1 $\beta$  - proteína inflamatória de macrófagos -1  $\beta$

MMPs - Matriz metaloproteinases

MPO – Mieloperoxidase

NF-k $\beta$  - fator nuclear Kappa- $\beta$

OHP – Hidroxiprolina

OMS – Organização mundial da saúde

PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PSGL-1 – Glicoproteína ligante de P selectinas 1

TGF- $\beta$  - Fator de transformação de crescimento –  $\beta$

TIMPs - inibidores teciduais de metaloproteinases

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alpha

VEGF - fator de crescimento vascular endotelial

## RESUMO

A cicatrização de feridas é um fenômeno complexo no qual estão envolvidos diversos eventos celulares e moleculares. As úlceras cutâneas crônicas são um problema frequente na prática médica, com consequências sociais e alto custo com cuidados médicos. A busca por substâncias terapêuticas capazes de melhorar o processo cicatricial é imperativa. Dadas as propriedades químicas do óleo da polpa da bocaiúva (*Acocomiaaculeata*), rico em tocoferóis, beta-carotenos e ácidos graxos poli-insaturados, assume-se que esse composto tenha grande aplicação terapêutica, porém, pouco ainda têm-se estudado em relação ao seu papel na cicatrização. O presente estudo objetivou avaliar o efeito do óleo da polpa de bocaiúva (OPB) na evolução da cicatrização de úlceras cutâneas em ratos Wistar. Foram feitas duas excisões cirúrgicas na pele de cada animal com o emprego de um *punch* histológico, atingindo todas as camadas da pele. Os grupos experimentais consistiram em animais com as úlceras tratadas com a pomada veículo e animais com as úlceras tratadas com a pomada contendo o óleo da polpa da bocaiúva a 20%. Após 2, 7 e 14 dias do procedimento cirúrgico, cinco animais/grupo foram eutanasiados e avaliou-se a reepitelização por meio do índice de cicatrização das úlceras. Uma biópsia de úlcera/cicatriz de cada animal foi coletada, fixada e corada com hematoxilina/eosina e tricrômio de Masson para quantificação de infiltrado inflamatório, fibroblastos, vasos sanguíneos e colagênese. A biópsia da outra úlcera foi utilizada para a dosagem de mieloperoxidase (MPO), para avaliar o infiltrado neutrofílico no tecido lesado, e dosagem de hidroxiprolina (OHP) para avaliar a colagênese. Os resultados demonstraram que no 2º dia, o OPB foi capaz de induzir o aumento do recrutamento de células inflamatórias para a lesão em relação ao grupo controle, representadas principalmente por neutrófilos. No 7º dia, houve redução das células inflamatórias no grupo tratado com OPB em relação ao 2º dia. Nesse período não foram observadas alterações no grupo controle. No 7º dia, observou-se importante redução do infiltrado neutrofílico na pele dos animais tratados com OPB, sugerindo que o OPB tenha papel pró-inflamatório inicial, aumentando o recrutamento celular no início do processo cicatricial e agindo de forma reguladora posteriormente. A fibroplasia observada na pele dos animais tratados com OPB foi mais intensa em relação ao grupo controle, no 14º dia de avaliação. Por outro lado, a diferença observada na colagênese entre os grupos de tratamento quando avaliada pela determinação da concentração de hidroxiprolina, ocorreu apenas no grupo controle do 7º para 14º dia. Entretanto, a coloração com tricrômio de Masson indicou aumento no conteúdo de colágeno no grupo controle do 2º para o 7º dia. As úlceras do grupo tratado com o OPB apresentaram-se mais reepitelizadas no 7º dia, quando comparadas ao grupo controle. Assim, os dados permitem sugerir que a pomada contendo o óleo da polpa da bocaiúva estimula de modo favorável a fase inflamatória da cicatrização, acelerando o processo e contribuindo para a melhor qualidade da cicatriz.

**Palavras chave:** óleo vegetal, ácidos graxos, beta-caroteno, tocoferol.

## ABSTRACT

Wound healing is a complex phenomenon which is involved several cellular and molecular events. Chronic skin wounds are a frequent problem in medical practice, which social consequences and high costs to medical care. The research about therapeutic substances able to improve the healing process is imperative. Due the chemical properties of the bocaiuva (*Acocomia aculeata*) pulp oil, that is rich in tocopherols, beta -carotene and polyunsaturated fatty acids, it is assumed that this compound has significant therapeutic application , however, few information about the role le in healing could be found. The present study aimed to evaluate the effect of bocaiuva pulp oil (BPO) on the healing process of skin ulcers in rats. Two surgical excisions were made in the skin of each animal, using a histological punch, reaching all the skin layers. The experimental groups consisted of animals with ulcers treated with the ointment vehicle and animals with that ulcers were treated with the ointment containing 20% of the BPO. After 2, 7 and 14 days post surgery, five animals / group were euthanized and reepithelialization was evaluated through the rate of healing of ulcers. A biopsy of the ulcer/scar from each animal was collected, fixed and stained with hematoxylin/eosin and Masson trichrome for quantification of inflammatory infiltrate , fibroblasts , blood vessels and collagenasis. The biopsy of other ulcer was used for the estimation of myeloperoxidase (MPO) in order to evaluate the neutrophil infiltration in the injured tissue, and hidroxyprolin determination (OHP) was used to assess collagenasis . The results showed that on the 2nd day, the BPO was able to induce an increase in the recruitment of inflammatory cells to the lesion compared to the control group, mainly represented by neutrophils. On the 7th day, there was decrease of inflammatory cells in the BPO in treated group compared to 2nd day . During this period no changes were observed in the control group. On the 7th day, there was significant reduction of neutrophil infiltration in the skin of animals treated with BPO, suggesting a initial pro- inflammatory role by increasing cell recruitment at the beginning of healing process and acting in a regulatory fashion later. The fibroplasia observed in the skin of animals treated with OPB was more intense than in the control group on 14th day of evaluation. Moreover, the difference observed in collagenasis between groups assessed by determining the concentration of hydroxyproline, happened only in the control group on the 7th to 14th day. However, Masson staining showed increased collagen content in the control group on the 2nd to 7th day. Ulcers of the OPB treated group were more epithelized at day 7 compared to the control group. The findings suggested that the ointment containing the BPO favorably stimulates the inflammatory phase of wound healing by accelerating the process and contributing to improving the quality of the scar.

**Key Words:** vegetal oil, fatty acids, beta-carotene, tocopherol

## INTRODUÇÃO

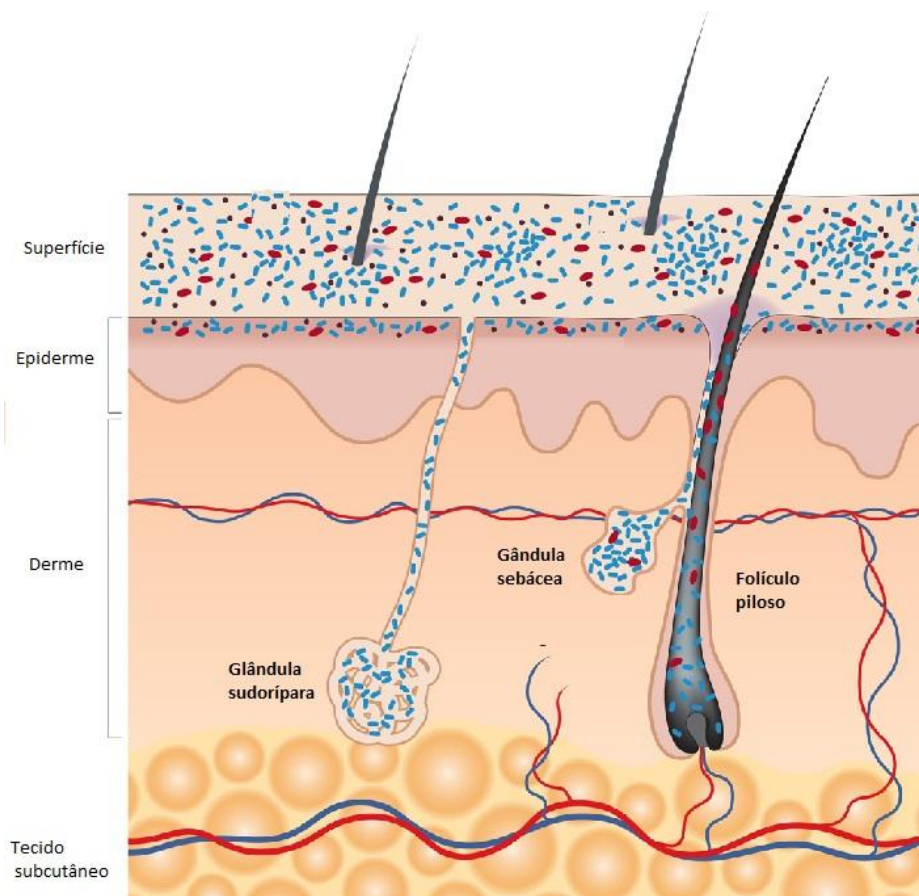
A cicatrização de feridas é um fenômeno complexo no qual estão envolvidos diversos eventos celulares e moleculares. Seu desencadeamento se dá na presença de ruptura da estrutura tissular, objetivando a reorganização e restabelecimento da homeostase da estrutura onde ocorre, por meio do preenchimento das lesões com tecido cicatricial. Úlceras cutâneas crônicas são um problema freqüente na prática médica e requirem um longo tempo de tratamento, resultando em alterações na saúde do acometido, assim como conseqüências sociais e alto custo com cuidados médicos. Assim, a busca por substâncias terapêuticas cicatrizantes de fácil acesso à população tem ganhado importância. Muitas plantas nativas do Brasil são fontes de óleos, sobre os quais ainda não há estudos sistematizados quanto à sua composição e propriedades cicatrizantes. A bocaiúva (*Acocomia aculeata*) é uma palmeira presente no território nacional, cujos frutos exibem em sua composição substâncias como os ácidos graxos insaturados e carotenoides. Ensaio farmacológicos têm associado a utilização do óleo da polpa a efeitos benéficos no processo inflamatório, tornando válida e promissora a avaliação de seu papel em relação à cicatrização de úlceras cutâneas (PADGET, MARUCHA, SHERIDAN, 2007; RAMOS *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010; TABATABAI, EBY, SINGH 2010; MUNHOZ *et al.*, 2012).

### 1.1 Morfofisiologia da pele

A pele recobre toda a superfície do corpo humano e por exercer funções cruciais em diversos processos biológicos, é considerada um órgão complexo e de suma importância nos mecanismos homeostáticos, razão pela qual visa-se a manutenção de sua integridade física e funcional. Destacam-se como funções relevantes da pele a proteção contra agressões do meio externo (como os raios

ultravioleta), manutenção do equilíbrio hídrico, absorção, excreção de substâncias, termo-regulação, resposta imunológica, além de ser um órgão sensorial especializado (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004; BARTHEL, ABERDAM, 2005; EHRENREICH, RUSZCZAK, 2006; CLARK, GHOSH, TONNESEN, 2007; THEORET, 2009; GÁL *et al.*, 2011).

A pele é constituída por duas camadas: a epiderme, porção epitelial composta por queratinócitos, e a derme, porção conjuntiva integrada majoritariamente pela associação complexa entre fibroblastos e matriz extracelular (MEC), além dos apêndices cutâneos (pelos, glândulas sudoríparas e sebáceas), fibras nervosas e vasos sanguíneos. A epiderme e a derme são separadas por uma fina camada comumente denominada membrana basal. Subjacente à derme encontra-se a hipoderme, uma camada frouxa de tecido adiposo cuja função é ancorar as demais camadas da pele e servir como conexão entre os tecidos e órgãos mais profundos (BARANOSKI, AYELLO, 2004; GOSAIN, DIPIETRO 2004; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004; EHRENREICH, RUSZCZAK, 2006).



**Figura 1:** Representação esquemática das camadas da pele. (Adaptada de GRICE; SEGRE, 2011).

## 1.2 Epiderme

É uma porção epitelial fina que compõe a parte mais externa da pele, sendo constituída por células especializadas como os queratinócitos, responsáveis pela produção da queratina, os melanócitos, responsáveis pela produção da melanina, pigmento da pele que age como protetor natural contra os efeitos nocivos de raios ultravioleta, transferida progressivamente para os queratinócitos. Também estão presentes na epiderme as células de Langerhans que atuam na resposta imunológica e as células de Merkel que desempenham papel de mecanoreceptores (WATT, 1988; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004; EHRENREICH, RUSZCZAK, 2006).

Histologicamente, a epiderme é formada por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, não contendo vasos sanguíneos ou terminações nervosas, e recebendo nutrientes por difusão a partir dos vasos sanguíneos presentes na derme. Sua espessura e estrutura variam de acordo com o local do corpo onde é encontrada. A epiderme está organizada em camadas e à medida que as mais superficiais são eliminadas, as camadas mais profundas são restauradas por divisão celular. (ABRAHAMMS, CRAVEN, LUMLEY, 2005; EDWARDS, 2005).

A camada basal, estrato basal ou camada germinativa é uma camada única de células com formato cúbico, situada na região mais profunda da epiderme, estabelecendo limite com a derme. Nesta, ocorre a divisão celular para formar os queratinócitos, os quais são morfológicamente e bioquimicamente modificados durante o processo de queratinização ou diferenciação epidérmica. Este processo avança através das outras camadas da epiderme até a camada mais externa, a camada córnea. As células basais são mitoticamente ativas, mas perdem este potencial conforme ocorre a migração celular em direção à superfície cutânea no processo de diferenciação terminal (REHDER *et al.*, 2004; BARTHEL, ABERDAM, 2005; EDWARDS, 2005).

A camada espinhosa ou estrato espinhoso situa-se logo acima da camada basal e é mais espessa, contendo, além das células de Langerhans, várias camadas de células com formato poligonal, conectadas por meio de prolongamentos denominadas desmossomos. Estes, são responsáveis por promover adesão intercelular e resistência a forças mecânicas (HABIF, 1996; EDWARDS, 2005; WYSOCKI, 2012).



A camada granulosa ou estrato granuloso é constituída por células portadoras de grânulos citoplasmáticos ricos em ceratohialina, substância que contribui para a formação da queratina. As células contêm um glicolípídeo hidrofóbico que é secretado no espaço extracelular e diminui a perda de água transepidérmica. Tal camada é também responsável pela síntese de lipídios armazenados em corpos lamelares e excretados com a finalidade de serem incorporados na camada córnea, tornando a pele impermeável à água e impedindo a desidratação (ELIAS, MENON, 1991; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004; EDWARDS, 2005; HOUBEN, DE PAEPE, ROGIERS, 2007; KIM, YUN, CHO, 2011).

A camada lúcida ou estrato lúcido, é uma camada de células achatadas que está presente apenas em determinadas áreas, onde a epiderme é mais espessa, como na palma das mãos e na sola dos pés. Devido ao fato de que o núcleo, as organelas e membranas celulares não se apresentam visíveis nestas células, histologicamente esta camada aparece translúcida ou clara. As células desta camada contêm eleidina, uma substância gelatinosa, que também participa da formação da queratina (GRAAF, FOX, 1989; EDWARDS, 2005; WYSOCKI, 2012).

A camada córnea é a mais superficial, sendo constituída por células mortas, achatadas e anucleadas com citoplasma repleto de queratina (corneócitos), que formam uma superfície resistente protegendo as células presentes nas camadas mais profundas. Tais células estão constantemente sendo eliminadas da superfície da pele pelo processo de descamação ou esfoliação (EDWARDS, 2005).

### **1.3 Derme**

A derme é uma camada elástica de tecido conjuntivo vascular firmemente ligada à epiderme em sua porção superior, e ao tecido subcutâneo, em sua porção mais profunda. É a parte mais espessa da pele, sendo composta por fibroblastos, colágeno, fibras elásticas e glicosaminoglicanas (GAGs), conferindo estrutura, apoio, consistência física e elasticidade à pele. É dotada de vascularização e inervação, além de conter vasos sanguíneos e linfáticos, folículos pilosos, músculos eretores de pelo e glândulas (sebáceas e sudoríparas). A derme é também responsável pela nutrição da epiderme e de apêndices cutâneos por meio da difusão de pequenas

moléculas (REN, QIN, 1998; JUNQUEIRA, CARNEIRO 2004; HUANG, PAUL, SHARMA, 2004; EHRENREICH, RUSZCZAK, 2006; THEORET, 2009).

A derme é formada por duas camadas, a reticular (mais profunda), e a papilar (mais superficial). A camada reticular ou derme reticular encontra-se em contato com o tecido subcutâneo e é composta por um tecido conjuntivo denso (fibroblastos e espessos feixes de fibras colágenas e elásticas) no qual as fibras de colágeno se dispõem em organização paralela à superfície da pele. A camada papilar, ou derme papilar situa-se acima da camada reticular, estabelecendo limites com a epiderme por meio de diversas saliências conhecidas como papilas dérmicas. É constituída por tecido conjuntivo frouxo (fibroblastos e delgadas fibras colágenas e elásticas), onde as fibras colágenas apresentam menor grau de organização, estando dispostas aleatoriamente. A delimitação entre as duas camadas não é clara, já que a mudança na conformação dos componentes de cada uma modifica-se gradualmente ao longo das mesmas (HABIF, 1996; GOSAIN, DIPIETRO, 2004; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004; EDWARDS, 2005; EHRENREICH, RUSZCZAK, 2006; WYSOCKI, 2012)

Os fibroblastos são células alongadas com formato fusiforme que, na derme, situam-se entre os feixes de colágeno e são responsáveis pela síntese de componentes importantes da matriz extra celular. Dentre tais componentes, estão o colágeno tipo I e tipo III, elastina, glicosaminoglicanas, fibronectinas. Estas células também contribuem para formação da membrana basal (laminina e colágeno tipo IV), são fonte de proteinases como as matriz metaloproteinases (MMPs), participam da regulação da diferenciação epitelial, secreção de fatores de crescimento, reparação tecidual, contração na cicatrização, entre outros (RODEMANN, MULLER, 1991; SIMIAN *et al.*, 2001; TOMASEK *et al.*, 2002; WISEMAN, WERB, 2002; CHANG *et al.*, 2002; GOSAIN, DIPIETRO, 2004; PARSONAGE *et al.*, 2005).

#### **1.4 Tecido subcutâneo**

O tecido subcutâneo ou hipoderme, é uma camada situada abaixo da pele, formada principalmente por tecido adiposo vascularizado. Suas principais funções são o isolamento térmico, a absorção de choques mecânicos e proteção dos órgãos internos. Também constitui uma importante fonte de triglicerídeos para o corpo, já

que a maior parte da gordura corporal é armazenada neste tecido (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004; PAUL, SHARMA, 2004; EDWARDS, 2005).

### **1.5 Cicatrização: aspectos gerais**

A cicatrização é um processo complexo, ocorrido na presença de uma lesão onde há rompimento na continuidade anatômica e funcional de um tecido vivo. Tal processo implica na restauração do tecido lesado, envolvendo diversos eventos celulares e moleculares que visam restabelecer a homeostase e desencadeiam a formação de uma cicatriz após o reparo (THAKUR *et al.*, 2010).

Define-se como um tecido cicatrizado aquele que tem as estruturas, inicialmente danificadas, completamente reepitelizadas e reparadas com o retorno da homeostase do tecido onde ocorre, sem que haja necessidade de drenagens contínuas ou curativos. De acordo com a extensão de tecido perdido com a injúria, pode-se classificar a cicatrização em dois tipos: por primeira e por segunda intenção (ENOCH, LEAPER, 2005).

A cicatrização por primeira intenção, ou primária, ocorre em lesão considerada limpa e realizada cirurgicamente, cujas bordas são aproximadas com auxílio de suturas, colas teciduais ou outros dispositivos mecânicos. Há um equilíbrio entre as fases desse processo, fazendo com que o mesmo ocorra de forma eficiente e rápida. A cicatrização por segunda intenção, ou secundária, ocorre em lesões com maior perda tecidual, e conseqüentemente, envolve um sistema mais complexo de restauração com a presença de estruturas como o tecido de granulação (GANTWERKER, HOM, 2012).

Os diversos fenômenos envolvidos na cicatrização podem ser separados em quatro fases: Coagulação/hemostasia, fase inflamatória, proliferativa e de remodelação, as quais se sobrepõem temporal e continuamente (GOLDBERG, DIEGELMAN, 2010).

### 1.5.1 Coagulação/Hemostasia

O primeiro evento ocorrido após uma injúria tecidual é o extravasamento de sangue devido ao rompimento do endotélio. Isto provoca o influxo passivo de plasma, plaquetas e diversas células sanguíneas ao sítio da lesão, acarretando o início do processo de coagulação e formação do tampão hemostático (SHERRATT, DALLON, 2002; BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005).

Logo após a ocorrência da lesão, ocorre uma rápida constrição dos vasos danificados devido ao mecanismo de reflexo neural. Em poucos segundos essa constrição cessa, em razão de condições como hipóxia, acidez da parede da úlcera e liberação local de mediadores químicos, que causam relaxamento das células da musculatura lisa, permitindo novamente a vasodilatação e aumentando a permeabilidade dos vasos (LAWRENCE, 1998; STRECKER-MCGRAW, JONES, BAER, 2007; TAZIMA *et al.*, 2008; VELNAR, BAILEY, SMRKOLJ, 2009).

As plaquetas e outros componentes do sangue presentes no local da lesão entram em contato com o colágeno exposto (receptores glicoprotéicos específicos GPIIb/IX/V) e componentes da matriz extracelular do tecido ao redor. O contato das plaquetas com esses componentes é responsável por acionar a cascata de coagulação, com a consequente liberação dos fatores envolvidos na mesma, e por provocar a agregação, ativação e degranulação plaquetária. Estes eventos culminam na formação de um coágulo, também denominado tampão hemostático, composto por plaquetas, fibrina e fibronectina, que passa a capturar eritrócitos circulantes, ocluindo os vasos rompidos e contendo o sangramento (LAWRENCE, 1998; RUGGERI, 2002; SHERRATT, DALLON, 2002; BEANES *et al.*, 2003; BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; BROUGHTON II, JANIS, ATTINGER, 2006; CAMPOS, GROTH, BRANCO, 2008; VELNAR, BAILEY, SMRKOLJ, 2009).

O tampão formado fornece hemostasia temporária por meio da limitação da perda de constituintes circulatórios para os interstícios, fornecimento de uma barreira física contra agentes infecciosos e pela formação de uma matriz temporária, que servirá como base para a migração celular (monócitos, neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais) em estágios futuros. O coágulo e o tecido subjacente liberam diversas citocinas e fatores de crescimento, incluindo o TGF- $\beta$  (fator de transformação de crescimento –  $\beta$ ), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), FGF (fator decrescimento de fibroblastos) e EGF (fator de crescimento

epidérmico) (WITTE, BARBUL, 1997; MENDONÇA, COUTINHO-NETTO, 2009; GUO, DIPIETRO, 2010).

### **1.5.2 Fase inflamatória**

Ao final da formação do coágulo, inicia-se a fase inflamatória, na qual as principais células envolvidas são os neutrófilos e os macrófagos. Nesta fase ocorrem fenômenos de grande importância, como o desbridamento da lesão e a preparação do local afetado para o crescimento de novo tecido. Para tanto, diversos fatores de crescimento e citocinas são liberados no local da úlcera para que neutrófilos sejam quimiotaticamente atraídos (HART, 2002; ABREU, MARQUES, 2005; BROUGHTON II, JANIS, ATTINGER, 2006).

Os neutrófilos são os leucócitos mais comuns e as menores células inflamatórias. Representam a primeira linha de defesa nessa fase e são importantes pela sua atividade microbida, mediada principalmente pela liberação de enzimas proteolíticas tal como a mieloperoxidase (SWAIN, ROHN, QUINN, 2002; STRONCEK, BELL, REICHERT, 2009).

Inicialmente, os neutrófilos chegam ao sítio da lesão de forma passiva e em conjunto com outras células, devido ao extravasamento de sangue. Na fase inflamatória, são as primeiras células a responderem a estímulos gerados por mediadores químicos e a serem, de fato, atraídas para o local. Neste momento, seu recrutamento é regulado por diversos quimioatraentes, como o PDGF, TGF- $\beta$ , GRO- $\alpha$  (fator de crescimento relacionado ao oncogene) e a NAP – 2 (citocina peptídica ativador de neutrófilos), derivada da conversão proteolítica do CTAP – III (peptídico ativador de tecidos conectivos III) por neutrófilos aderidos ao coágulo inicialmente formado (GILLITZER, GOEBELER, 2001; LOPES *et al.*, 2005).

Outras citocinas importantes que atuam na fase inflamatória são o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) e a IL-1 (interleucina 1), cuja produção se dá a partir de estímulos gerados por determinados componentes de patógenos, condição de hipóxia e rompimento da barreira epidérmica. Estas citocinas, além de estimular a expressão de moléculas de adesão para leucócitos na superfície de vasos sanguíneos circundantes, são as principais indutoras da produção de IL-8 (interleucina 8) por células situadas logo abaixo da lesão. A IL-8 participa da atração

de neutrófilos para sítios profundos da lesão (GILLITZER, GOEBELER, 2001; BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; KONDO, ISHIDA, 2010).

As alterações na expressão de moléculas de adesão promovem o processo de marginação dos neutrófilos nos vasos sanguíneos, evento que antecede a transmigração dessas células pelo endotélio em direção ao sítio da lesão, sendo denominado diapedese. Durante a marginação, a aderência às células endoteliais faz-se por meio do receptor dos leucócitos PSGL-1 (glicoproteína ligante de P selectinas 1) que se liga a P-selectinas expressas em plaquetas e células endoteliais. Como essas ligações são fracas, os leucócitos rolam na superfície do endotélio puxados pelo fluxo sanguíneo. O fator IV de plaquetas e o fator de ativação de plaquetas aumentam a expressão de CD8/CD11b, integrinas na superfície de neutrófilos promovendo a fixação da célula ao endotélio e impulsionando a diapedese (MONACO, YAGER, NWOMEH, 1999; HART, 2002; LAWRENCE, 2003; HENG, 2011).

Conforme os mediadores inflamatórios se acumulam, moléculas de adesão são expressas e os vasos sanguíneos próximos ao local da lesão dilatam, forma-se um gradiente quimiotático e o tráfico celular como, por exemplo, o tráfico de neutrófilos para a área lesada passa a ser otimizado (DIEGELMANN, EVANS, 2004; BAUM, ARPEY, 2005; BROUGHTON II, JANIS, ATTINGER, 2006).

Durante as primeiras fases do processo inflamatório no reparo tecidual, a identificação de partículas pelas células para gerar os mediadores que participam da inflamação, é feita a partir de receptores realacionados à resposta imune inata. Estes, são capazes de reconhecer uma gama de moléculas essenciais à patogenicidade e compartilhadas por diversas classes de microrganismos, os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (TSIROGIANNI, MOUTSOPOULOS, 2006).

Dentre os principais receptores sinalizadores, ou seja, que desencadeiam a transcrição de genes associados à resposta inflamatória, estão os receptores Toll-Like. Estes, ao reconhecerem componentes oriundos de patógenos, iniciam a ativação de fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B fator nuclear KappaB. Ao adentrar o núcleo, o NF- $\kappa$ B regula a expressão de genes essenciais no processo inflamatório, como os de citocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento e principalmente o TNF- $\alpha$  e IL-1 (TSIROGIANNI, MOUTSOPOULOS, 2006; FRANCO, 2010).

Os neutrófilos são responsáveis pela destruição dos patógenos por meio do reconhecimento, englobamento e destruição de partículas estranhas. Este reconhecimento é feito através de receptores endocíticos, e sua posterior destruição é realizada por intermediários reativos de oxigênio, óxido nítrico, e enzimas proteolíticas (ENOCH, LEAPER, 2005; TSIROGIANNI, MOUTSOPOULOS, 2006).

Uma vez que os patógenos são removidos, a atividade neutrofílica diminui gradualmente, os neutrófilos entram em processo de apoptose e monócitos circulantes são atraídos para o local da lesão. A atração é feita por diversos quimioatraentes como quimiocinas, citocinas, componentes da coagulação e produtos da degradação de colágeno, elastina e fibronectina, originados da MEC (matriz extracelular) destruída na lesão. Dentre as quimiocinas e citocinas envolvidas, encontram-se a MCP-1 (proteína quimiotática para monócito 1), MIP-1 $\alpha$  (proteína inflamatória de macrófagos -1 $\alpha$ ) e MIP-1 $\beta$  (proteína inflamatória de macrófagos -1  $\beta$ ), PDGF e TGF- $\beta$  (FUKAI *et al.*, 1991; HART, 2002; PIERCE *et al.*, 1991; RAMASASTRY, 2005; STRONCEK, BELL, REICHERT, 2009).

Um dos principais mediadores envolvido no recrutamento de monócitos é a MCP-1 produzida por algumas células como queratinócitos que circundam a ferida e células endoteliais. Além da atração de monócitos, a MCP-1 também participa de diferentes fases do processo de recrutamento de mastócitos e linfócitos para o local (GILLITZER, GOEBELER, 2001; ENOCH, LEAPER, 2005).

Ao adentrarem o tecido lesado, os monócitos sofrem uma mudança fenotípica e se convertem em macrófagos teciduais, agindo como células fagocíticas e produtores de fatores de crescimento. Ou seja, os macrófagos auxiliam na fase final de eliminação de partículas estranhas, fagocitam e processam os corpos apoptóticos de neutrófilos que perdem a função e outros fragmentos teciduais, além de produzir e secretar mediadores lipídicos, peptídicos e proteínas relacionadas ao reparo. A adesão à matriz presente no leito da ferida estimula os macrófagos a expressar o TNF- $\alpha$ , PDGF, TGF- $\alpha$  e IL-1, que desempenharão papel importante em fases seguintes do processo. Diversos estudos têm demonstrado que, em estado de depleção de macrófagos, ocorrem graves alterações na cicatrização, como desbridamento deficiente da ferida, proliferação tardia de fibroblastos e angiogênese inadequada (SINGER, CLARK, 1999; BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005; ENOCH, LEAPER, 2005; TSIROGIANNI, MOUTSOPOULOS, 2006).

Os linfócitos, últimas células a participar da resposta inflamatória, são atraídos pela MCP-1 e por outras citocinas, como IL1- $\beta$  (Interleucina 1  $\beta$ ), que têm como principal fonte os macrófagos. Embora a função dos linfócitos no processo de cicatrização não esteja completamente elucidada, parece estar relacionada a mecanismos efetores da imunidade e produção de fatores de crescimento (HART, 2002; ENOCH, LEAPER, 2005; BROUGHTON II, JANIS, ATTINGER, 2006; GUO, DIPIETRO, 2010).

### **1.5.3 Fase proliferativa**

A fase proliferativa é um estágio construtivo de reparo no qual estão envolvidos os processos de: formação de tecido de granulação, neoangiogênese, deposição de matriz extracelular e reepitelização. O tecido de granulação, que durante a progressão da fase proliferativa, passa a substituir a matriz provisória, é designado histologicamente pela presença de fibroblastos em proliferação, células inflamatórias (principalmente macrófagos), vasos sanguíneos neoformados e matriz extracelular frouxamente agregada. Tais componentes são responsáveis pelo aspecto granular do tecido, quando observado a olho nu. Concomitante à construção deste tecido, ocorre a degradação de proteínas da matriz extracelular provisória por meio de enzimas proteolíticas, facilitando o avanço dos novos vasos através da ferida (BEANES *et al.*, 2003; BAUM, APREY, 2005; CLARK, GHOSH, TONNESEN, 2007; SCHREML *et al.*, 2010; TELLER, WHITE, 2011).

#### **1.5.3.1 Fibroblastos e síntese de colágeno**

No momento da lesão, fibroblastos do tecido circunjacente são estimulados à proliferação. Alcançada a hemostasia e livre de infecção, os fibroblastos são atraídos à úlcera, tornando-se os principais componentes do tecido de granulação. A migração e ativação de fibroblastos ocorre a partir de estímulos gerados por produtos derivados de outras populações de células presentes no local em fases anteriores, incluindo o EGF, PDGF e TGF- $\beta$ , liberados por células inflamatórias e plaquetas. O PDGF é, além de um fator quimiotático, um estimulador de mitogênese.



Mais adiante, a atração de fibroblastos também é direcionada por diversos fatores originários de macrófagos e dos próprios fibroblastos. Com o advento da proliferação devido ao estímulo pelo PDGF e TGF- $\beta$ , inicia-se a produção de matriz metaloproteinases (MMPs), assim como de colágeno e outros componentes que darão origem à matriz extracelular (RAMASASTRY, 2005; CAMPOS, GROTH, BRANCO, 2008; GUO, VELNAR, BAILEY, SMRKOLJ, 2009; DIPIETRO, 2010; TELLER, WHITE, 2011).

Os fibroblastos sintetizam grande parte da matriz extracelular que compõe o tecido conjuntivo. Na derme, eles são importantes por secretar proteoglicanos, fibronectina, elastina, laminina e colágeno, principal componente da pele, constituindo a maior parte de seu peso seco e a base de sua estrutura e resistência. No leito da lesão, estes elementos auxiliam no restabelecimento da continuidade do tecido entre as bordas da ferida e funcionam como um novo arcabouço para a migração celular e formação de novos vasos sanguíneos, substituindo a matriz provisória inicialmente formada. Durante a formação da nova matriz, a regulação da atividade de proteinases, o aumento da atividade de inibidores teciduais de metaloproteinases e o aumento da atividade de proteínas de adesão celular são regulados pelo TGF-  $\beta$  (TAZIMA *et al.*, 2008; ISAAC *et al.*, 2010; TELLER, WHITE, 2011).

O colágeno, principal proteína do tecido conjuntivo, é importante em todas as fases da cicatrização, por proporcionar integridade e força aos tecidos. Tem estrutura helicoidal composta por glicina, prolina e hidroxiprolina. Diferenças em sua estrutura química determinam seu papel biológico. O tipo I é a mais frequente forma encontrada, presente principalmente em ossos e tendões. O tipo III é mais fino, imaturo e desorganizado, está presente em vasos sanguíneos, fáscia e na derme, juntamente com o tipo I. Em um tecido intacto, encontra-se 80% do tipo I e 20% do tipo III. Já em um tecido de granulação, encontra-se 40% do tipo III (ROBSON, STEED, FRANZ, 2001; BAUM, APREY, 2005; CAMPOS, GROTH, BRANCO, 2008).

Na presença de rompimento tecidual, o colágeno é necessário para reparar a perda e restaurar a estrutura normal. Se um excesso de colágeno for depositado no local da lesão, a estrutura anatômica normal da pele será perdida e ocorrerá fibrose. Por outro lado, se uma quantidade insuficiente for depositada, a úlcera, e consequentemente a cicatriz, serão frágeis. A síntese adequada de colágeno é um

processo fundamental para a cicatrização das úlceras cutâneas (MONACO, LAWRENCE, 2003; DIEGELMANN, EVANS, 2004; CORSETTI *et al.*, 2009).

Em razão do estímulo gerado pelo PDGF e TGF- $\beta$ , após abundante síntese de matriz extracelular o fenótipo dos primeiros fibroblastos a migrar sofre uma modificação, transformando-se em miofibroblastos. Estes, possuem capacidade de se contrair e se expandir por expressar  $\alpha$  actina de músculo liso, permitindo assim sua movimentação através da ferida. Deste modo, os miofibroblastos, que se encontram aderidos firmemente às bordas da lesão, se ligam às fibras de colágeno de maior espessura puxando-as em direção a eles provocando a contração da ferida (WILLIAMSON, HARDING, 2004; ISAAC *et al.*, 2010).

#### **1.5.4 Angiogênese**

Concomitante aos fenômenos já citados, ocorre a angiogênese, processo que visa reparar danos vasculares que acometem o tecido. Neste, as células endoteliais de vasos que circundam a lesão migram e degradam a matriz provisória, conectando-se a outras células, onde por meio de brotamento originam novos vasos. Deste modo, conseguem formar uma rede vascular mínima que permite a circulação sanguínea e assim nutrir as células que chegam ao local da lesão. A migração acontece por meio de estímulos, gerados por fatores angiogênicos, incluindo o PDGF, FGF, TNF- $\alpha$ , e VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), originários de células como queratinócitos e macrófagos (GILLITZER, GOEBELER, 2001; BARANOSKI, AYELLO, 2004; TELLER, WHITE, 2011).

#### **1.5.5 Reepitelização**

O processo de reepitelização apresenta capacidade de ocorrer desde as fases iniciais da cicatrização. As células epiteliais são dotadas de potencial mitótico, que permanece latente devido à inibição por contato existente entre elas no tecido íntegro. Na presença da lesão, em razão do afastamento das células da epiderme, estas são submetidas ao “efeito de vizinhança livre”, que ativa novamente seu potencial mitótico. Porém, para que a proliferação das células ocorra, é necessário

que o tecido de granulação atinja o nível da epiderme para fornecer substrato à consolidação da reepitelização (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005).

A reepitelização busca restabelecer as funções da epiderme que foram perdidas em decorrência da lesão, tais como regulação da temperatura local, proteção mecânica, defesa contra perda excessiva de fluidos e invasão de microrganismos. Para que esse restabelecimento ocorra, é necessária a restauração dos estratos epidérmicos, que são constituídos essencialmente de queratinócitos (95%). Tais células passam a recompor a epiderme a partir de estímulos gerados por diversas citocinas, produzidas por macrófagos, fibroblastos e células epiteliais, tais como: HGF (fator de crescimento de hepatócitos), FGFs, EGF e KGF (fator de crescimento de queratinócitos). Algumas citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$  (interleucina-1 $\beta$ ) e TNF- $\alpha$ , estimulam fibroblastos a sintetizar e secretar KGF-1 (fator de crescimento de queratinócitos 1), KGF-2 (fator de crescimento de queratinócitos 2) e IL-6 (Interleucina 6), por exemplo, os quais estimulam a proliferação, diferenciação e migração de queratinócitos (BAUM, APREY, 2005; BROUGHTON II, JANIS, ATTINGER, 2006; STOJADINOVIC *et al.*, 2008; STRONCEK, BELL, REICHERT, 2009; ISAAC *et al.*, 2010; GANTWERKER, HOM, 2012).

O início do processo se dá a partir da ruptura da ligação entre hemidesmosomos (moléculas de adesão célula-lâmina basal) das células basais e a laminina da lâmina basal, possibilitando a migração dos queratinócitos. Sua mobilidade é facilitada pela expressão de integrinas, as quais interagem com diversos componentes da matriz extracelular, como fibronectina, fibrina e colágeno. As células migram e proliferam até que encontram outras células vindas de outras direções executando o mesmo procedimento, promovendo então a formação de uma monocamada de epitélio. Estes eventos ocorridos na epitelização, além de serem regulados por diversos fatores de crescimento e citocinas, são também influenciados pelo ambiente da ferida (TSIROGIANNI, MOUTSOPOULOS, 2006; TELLER, WHITE, 2011).

A migração dos queratinócitos e a contração da úlcera resultam na reepitelização da área lesada. O resultado final da fase proliferativa é vitalmente importante para a cicatrização, pois estabelece as condições necessárias para reconstruir o tecido danificado (HARDING, PATEL, 2002; STRONCEK, BELL, HEICHEERT, 2009).

### 1.5.6 Remodelação tecidual

A fase de remodelação é caracterizada pela reorganização da matriz extracelular, onde a arquitetura da pele é reestruturada com o intuito de retorno à estrutura tecidual normal. Ocorre a partir da degradação do colágeno imaturo e instável e formação de um colágeno estável e organizado, por meio da ação das collagenases, metaloproteinases e fatores inibitórios. Nesta fase, todos os processos ativados no início da lesão são cessados progressivamente e a população celular (células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos) começa a sofrer apoptose, permanecendo apenas grande quantidade de colágeno, elementos da matriz e poucas células (GOSAIN, DIPIETRO, 2004; CAMPOS, GROTH, BRANCO, 2008; GURTNER *et al.*, 2008).

Os eventos ocorridos nessa fase promovem a substituição do tecido de granulação anteriormente formado para dar origem à cicatriz. As fibras de colágeno tipo III, inicialmente depositadas aleatoriamente no sítio da lesão, passam a ser substituídas por colágeno do tipo I e reorganizadas, conferindo mais resistência ao tecido então formado. Para que tal reestruturação ocorra, é necessária uma regulação delicada entre síntese e degradação de colágeno. Nesse contexto, o TGF- $\beta$  atua estimulando a maior produção do colágeno tipo I e sua menor degradação por aumentar a expressão de TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinases) e diminuir a de MMPs. O equilíbrio entre a constante produção e degradação suporta a formação de uma cicatriz normal (ISAAC *et al.*, 2010, KONDO, ISHIDA, 2010; WILD, *et al.* 2010).

Os macrófagos começam a desaparecer junto com a redução da angiogênese, de forma que a densidade vascular da ferida volte ao normal. Os miofibroblastos remanescentes no tecido, juntamente com as fibras de colágeno, tornam-se orientados paralelamente ao leito da lesão, resultando em uma aparência estriada, diferente do tecido observado na pele intacta (GURTNER *et al.*, 2008; STOJADINOVIC *et al.*, 2008; STRONCEK, BELL, REICHERT, 2009).

O remodelamento tecidual se estende por 1 ou 2 anos e conforme o paciente e tipo da úlcera, pode perdurar ainda por mais tempo. Estruturas dérmicas, como folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, que foram perdidas durante a lesão não são regeneradas. Acredita-se que ao longo desse processo, a ferida ainda sofra outras contrações físicas pelo aparecimento de novos miofibroblastos

(GOSAIN, DIPIETRO, 2004; BAUM, APREY, 2005; CAMPOS, GROTH, BRANCO, 2008; STRONCEK, BELL, REICHERT, 2009).

A incidência de úlceras cutâneas de difícil cicatrização ainda se mantém elevada, tornando a cicatrização de feridas é uma área de pesquisa de grande relevância. O processo cicatricial inadequado de uma injúria cuja extensão seja substancial pode causar alterações em toda a saúde do indivíduo, além de repercutir em altos custos e consequências sociais. Portanto, o estudo científico para melhor compreensão dos fatores envolvidos e de novas alternativas terapêuticas torna-se fundamental para oferecer novas possibilidades em relação à otimização do tratamento das úlceras cutâneas (PADGET *et al.*, 2007; SEHN *et al.*, 2009; TABATABAI, EBY, SINGH, 2010).

## **1.6 Úlceras cutâneas**

Úlceras cutâneas são definidas como um rompimento da continuidade anatômica e funcional da pele (podendo envolver derme e/ou epiderme). Podem ser tanto lesões superficiais na integridade do tecido cutâneo (epiderme e derme) como alcançar regiões mais profundas (hipoderme, músculos e ossos), provocando exposição das células e tecidos ao meio externo (FRANZ, 2001; DIEGELMANN, EVANS, 2004; EHRENREICH, RUSZCZAK, 2006; KOKANE *et al.*, 2009; ROBSON, STEED, SCHMIDT *et al.*, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2009; HENG, 2011).

Existem diversos tipos de úlceras, que podem ser classificadas de acordo com a etiologia, incluindo as úlceras venosas, arteriais, úlceras de pressão, anêmicas, associadas a doenças auto-imunes dentre outras. Podem também ser classificadas conforme sua profundidade, em úlceras de espessura parcial (derme incompleta) e úlceras de espessura total (derme completa, podendo atingir o tecido subcutâneo) ou, ainda, de acordo com o tempo necessário para o fechamento da lesão, em úlceras agudas e crônicas (MANDELBAUM, DI SANTIS, 2003; FALANGA, 2005).

As úlceras constituem um importante problema de saúde pública, já que são muito freqüentes na prática clínica e têm sofrido aumento em sua ocorrência de acordo com o aumento da expectativa de vida da população mundial. Aliado a isto, existe o fato de que algumas são de difícil cicatrização devido a diversos fatores

intrínsecos e extrínsecos, o que provoca uma diminuição da qualidade de vida das pessoas acometidas (PHILLIPS, DOVERS, 1991; FALANGA, 2005; GARY-SIBBALD, WOO, 2008).

### **1.6.1 Úlceras cutâneas agudas e crônicas**

As úlceras cutâneas podem ser clinicamente divididas em úlceras agudas e crônicas, de acordo com o tempo necessário para o processo cicatricial. As úlceras agudas são aquelas cujo reparo tecidual ocorre de maneira ordenada e eficaz, dentro de tempo oportuno, progredindo para a restauração da pele. O tempo da cicatrização nesse tipo de úlcera geralmente varia de 5 a 10 dias, podendo chegar até 30 dias. Mais frequentemente, são de origem traumática ou oriundas de processos cirúrgicos, não existindo presença de contaminações e complicações para o paciente (LAZARUS *et al.*, 1994; ROBSON, STEED, FRANZ, 2001; VELNAR, BAILEY, SMRKOLJ, 2009).

As úlceras crônicas são aquelas que falham em progredir para as fases normais subsequentes do processo cicatricial. Não existe uma consideração absoluta quanto ao tempo de cicatrização em úlceras crônicas, porém, assim são consideradas as que de não atendem ao tempo de fechamento de 6 semanas a 4 meses, sem indícios de cicatrização. As úlceras crônicas são geralmente originárias de comprometimento vascular, danos repetitivos ao tecido, inflamação crônica e infecções. Os tipos mais comuns de úlceras crônicas incluem úlceras venosas, arteriais, neuropáticas e úlceras por pressão (BELLO, PHILLIPS, 2000; WHITNEY, 2005; RONDÁN-MARÍM *et al.*, 2009; DOUGHTY, SPARKS-DeFRIESE, 2012).

A patogênese das úlceras, sua extensão, características físicas e funcionais dos tecidos envolvidos estão intimamente relacionadas com a complexidade do processo cicatricial. Portanto, existem diversas condições que podem tornar este processo de difícil resolução, impedindo ou retardando a cicatrização efetiva, provocando assim as úlceras crônicas (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005; BROUGHTON II, JANIS, ATTINGER, 2006).

Pode-se citar como fatores prejudiciais à cicatrização, diversas doenças de base, como insuficiência vascular arterial e venosa, insuficiência nutricional, imunodeficiência e exacerbação de comorbidades como diabetes, insuficiência

cardíaca e infecção. Tais condições prejudicam a integridade cutânea tornando propício o desenvolvimento das úlceras. Uma vez que a pele é rompida, a lesão pode progredir rapidamente até que se torne uma úlcera profunda, extensa e de difícil cicatrização (JAUL, 2009).

As condições crônicas de saúde apresentam-se em crescente prevalência e os principais determinantes sociais apontados são o aumento da expectativa de vida e o rápido incremento da população idosa. Diante disto, as úlceras cutâneas crônicas destacam-se por estarem relacionadas a doenças crônico-degenerativas associadas à idade, como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e artrite reumatóide (LIMA E COSTA *et al.*, 2000).

Na maior parte dos casos, as úlceras crônicas são causadas por isquemia secundária a estase venosa, diabetes mellitus, e pressão. Úlceras que não cicatrizam, principalmente em pacientes idosos, geralmente causam inabilidades físicas e são caracterizadas por recidivas freqüentes, logo podem tornar-se crônicas por anos e até mesmo levar os pacientes a óbito (MENKE *et al.*, 2007; JAUL, 2009; ROLDÁN-MARÍN *et al.*, 2009).

Inúmeras são as conseqüências incidentes aos portadores de úlceras crônicas. Quando uma úlcera não cicatriza, ocorre diminuição da qualidade de vida devido ao desconforto, mau odor, presença de secreção, além de danos estéticos, que provocam o isolamento social do acometido. Outras complicações incluem limitações funcionais (como dificuldade de locomoção), dor crônica, infecções (celulite, formação de abscessos, osteomielite e mesmo sepse), potencial para malignidade (por exemplo, úlcera de Marjolin) e amputação (MENKE *et al.*, 2007; JAUL, 2009).

Outro problema importante associado às úlceras cutâneas crônicas são as perdas econômicas. Estas são imensuráveis, já que além do custo gerado ao sistema de saúde para o cuidado dos acometidos, existem os custos ocasionados pela perda de trabalho, diminuição da produtividade, e reabilitação. Além disso, também existe o dano psicológico resultante aos pacientes e seus familiares. Assim, a soma desses elementos combinada à baixa qualidade de vida enfrentada pelos indivíduos com úlceras crônicas, implica em diversos custos indiretos, o que dificulta a avaliação dos custos totais gerados (CLARK, GOSH, TONESSEN, 2007; MENKE *et al.*, 2007).

### 1.6.2 Tratamento de úlceras

O tratamento das úlceras cutâneas crônicas requer uma conduta holística, já que as mesmas não ocorrem de maneira independente. Portanto, é necessária uma avaliação completa do paciente para estabelecer a estratégia de tratamento mais adequada e evitar maiores danos teciduais posteriormente. A avaliação deve levar em conta a determinação da etiologia da úlcera (insuficiência arterial, drenagem venosa insuficiente, pressão mecânica, neuropatia, malignidade de base, infecção ou imunidade comprometida), além de fatores locais e sistêmicos que contribuem para a debilidade da cicatrização. Portanto, deve-se definir a influência da doença de base na cicatrização e tratá-la, além de registrar a duração, localização, tamanho, odor, aparência da úlcera, e características do tecido ao redor afim de corrigir a anormalidade. (HARDING, PATEL, 2002; MENKE *et al.*, 2008; STOJADINOVIC *et al.*, 2008; ROLSTAD, BRYANT, NIX, 2012).

O conhecimento da fisiopatologia do processo cicatricial, e dos produtos utilizados para promover a cicatrização são de fundamental importância na escolha do tratamento. As úlceras encontra-se constantemente em um processo fisiológico dinâmico, onde em cada etapa requerem condições diferentes para que o reparo evolua. Nem todos os tratamentos e curativos são indicados ou apropriados para serem usados continuamente até o fechamento da úlcera. O tratamento deve ser reavaliado e readequado considerando as características da lesão e resposta do paciente, já que a maioria das úlceras requer numerosas alterações conforme suas características variam ao longo do tempo (ABREU, MARQUES, 2005; ROLSTAD, BRYANT, NIX, 2012).

Incontáveis são os avanços no conhecimento científico adquiridos nos últimos séculos e nas décadas recentes. Estes, ocasionaram diversas mudanças quanto às abordagens atualmente aceitas no tratamento de úlceras cutâneas e quanto ao processo cicatricial (SHAI, MAIBACH, 2005).

O tratamento tópico é uma das condutas empregadas no cuidado com as úlceras há muito tempo. Existem antigas orientações por meio de registros que coincidem com a existência do homem, demonstrando a importância de proteger as lesões cutâneas de forma a evitar complicações ao paciente. Atualmente, sabe-se que o tratamento tópico tem como finalidade a restauração do ambiente fisiológico no leito da lesão, visando manter uma umidade adequada, controle de temperatura,



regulação de pH, controle da carga bacteriana, remoção do tecido não-viável, controle do odor, minimização de dor e proteção da pele na região afetada. A partir do momento em que estas condições são ajustadas, as mesmas contribuirão para o reparo e restauração da função tecidual. Porém, é essencial ressaltar que qualquer tratamento tópico precisa também da correção da condição patológica do indivíduo, quando presente, para apresentar a devida eficácia (SHAI, MAIBACH, 2005; ROLSTAD, BRYANT, NIX, 2012).

Algumas características são desejáveis aos produtos destinados ao tratamento tópico de úlceras cutâneas, por contribuírem para uma maior aderência ao tratamento assim como para resultados mais satisfatórios. Dentre tais propriedades pode-se citar: facilidade de aplicação e remoção, conforto ao paciente, manutenção de umidade adequada no leito da úlcera, entre outras (MANDELBAUM, DI SANTIS, 2003).

Existem diversas alternativas para o tratamento de úlceras cutâneas e para tal finalidade, muitas plantas têm apresentado substâncias com potencial terapêutico. Os princípios ativos isolados de plantas medicinais há muito tempo vêm sendo incluídos no tratamento de doenças e um grande número de metabólitos secundários de plantas são utilizados como drogas. Isto pode ser atribuído, em parte, à grande variedade de espécies (250-500 mil) de plantas existentes na flora mundial (PAIVA *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2006; SCHMIDT *et al.*, 2009).

As plantas também são amplamente empregadas como primeiro recurso terapêutico em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, é estimado que uma alta parcela da população mundial utilize plantas medicinais como alternativa aos medicamentos sintéticos devido à falta de acesso aos mesmos (SOUZA-JÚNIOR *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2006).

Na medicina popular existem vários exemplos de plantas utilizadas para diversas finalidades, tendo-se verificado aumento nos estudos que comprovam o que se conhece empiricamente. Os óleos de origem vegetal provenientes da flora brasileira possuem potencial de oferecer vantagens tanto econômicas, para o país, como para o paciente, quanto em termos de eficácia. O óleo da polpa da bocaiúva (*Acrocomia aculeata*) é um exemplar de grandes perspectivas quanto ao uso medicinal (BANDEIRA *et al.*, 1999; SILVA, CECHINEL FILHO, 2002; DATTNER, 2003).

### 1.7 Bocaiúva (*Acrocomia aculeata*)

A palmeira bocaiúva é uma planta nativa das florestas tropicais presente no território brasileiro. Pertence ao gênero *Acrocomia* da família Arecaceae, o qual é composto por duas espécies - *aculeata* (Jacq) Lodd. ex Mart. e *A. totai* Mart., que se distinguem essencialmente pelo tamanho dos indivíduos, sendo a primeira de maior porte (LORENZI *et al.*, 2006).

A *Acrocomia aculeata* é considerada a palmeira de maior dispersão no território nacional, distribuindo-se geograficamente desde os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, passando por Minas gerais e por todo o Centro Oeste, Nordeste e Norte do Brasil. Suas maiores concentrações estão localizadas em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo amplamente dispersas em áreas de Cerrado (HENDERSON *et al.*, 1995; AQUINO *et al.*, 2008).

A palmeira pode atingir de 10 a 15 metros de altura e 20 a 30 centímetros de diâmetro com a região dos nós coberta por espinhos de cerca de 10 centímetros de comprimento. Suas folhas são verdes podendo variar de 4 a 5 metros de comprimento com cerca de 130 folíolos de cada lado, separados por um centro espinhoso (KOPPER, 2009).

Os frutos são conhecidos como bocaiúva, macaúba, coco-baboso ou coco de espinho. Consistem em drupas globosas comestíveis, com diâmetro variando de 2,5 a 5,0 cm compostos por epicarpo cartáceo (casca); mesocarpo fino, mucilaginoso e fibroso de coloração amarelo alaranjada (polpa) e endocarpo duro e denso (tegumento), contendo uma semente (amêndoa). O epicarpo rompe-se facilmente quando maduro. O mesocarpo é fibroso, mucilaginoso, de sabor adocicado, rico em glicerídeos, de coloração amarelo ou esbranquiçado e comestível. O endocarpo é fortemente aderido à polpa (mesocarpo), com parede enegrecida e a amêndoa oleaginosa, é comestível e revestida de uma fina camada de tegumento (LORENZI *et al.*, 1996, TEIXEIRA, 1996; MIRANDA *et al.*, 2001; KOPPER, 2009; ARGANDOÑA, CHUBA, 2011).

As diferentes partes da palmeira podem ser aproveitadas para diversas finalidades, como por exemplo, a madeira, que é utilizada para a produção de estirpes e estacas, as folhas, como forragem animal e todas as partes dos frutos (casca, polpa e amêndoa), podem ser integralmente aproveitadas para. A polpa e a farinha de bocaiúva podem ser usadas em vitaminas, fabricação do sorvete, bolos e

pães, agregando maior valor nutritivo à merenda escolar, pois são também produtos ricos em cálcio e potássio. Além do emprego alimentício dos frutos, o óleo extraído das amêndoas pode ser utilizado como matéria prima para a produção de combustível. Devido às diversas possibilidades de utilização dos produtos da bocaiúva, esta apresenta grande mercado potencial, inclusive para outros estados do Brasil (SALIS, JURACY, 2005; ROSCOE *et al.*, 2007).

As nozes (amêndoas) da bocaiuva também apresentam elevado teor de proteínas, assim, tratando-se de um recurso alimentar natural, a espécie *Acrocomia aculeata* mostra ser uma alternativa agrícola que pode atender e/ou suplementar satisfatoriamente dietas nutricionalmente deficientes em proteínas, vitaminas e minerais (HIANE *et al.*, 1992; TOGASHI, SGARBIERI, 1995; VIEIRA, BION, 1998; SOUZA, MENEZES, 2004).

No contexto brasileiro, a *Acrocomia aculeata* apresenta perspectivas de grande importância econômica, dada a possibilidade de seus frutos fornecerem 20 a 30% de óleo, 5% de farinha comestível, 35% de tortas forrageiras e 35% de combustível de alto poder calórico (Silva, 1994). Frente à necessidade atual de fontes alternativas de energia, a bocaiuva é considerada uma das espécies nativas com alta potencialidade de fornecimento de óleo para a produção de biodiesel (ROSCOE *et al.*, 2007).

#### **1.7.1 Frutos da *Acrocomia aculeata*: propriedades farmacológicas**

Os frutos da bocaiúva possuem uma importante composição, devido à presença de várias substâncias consideradas funcionais, como as fibras e minerais imunomoduladores, além de possuir ácidos graxos, proteínas e quantidade considerável de carotenoides, especialmente  $\beta$ -caroteno, quando comparado a outros frutos do cerrado (ESTEVAN *et al.*, 2010; DIMAKOU, OREOPOULOU, 2011).

A polpa vêm sendo largamente utilizada para fins nutricionais, devido aos teores de minerais e lipídios. As amêndoas possuem alto valor protéico, podendo assim, ser utilizadas como suplemento alimentar em dietas nutricionalmente deficientes (SALIS, JURACY, 2005; ROSCOE *et al.*, 2007).

Nos óleos extraídos tanto da polpa quanto da amêndoa, estão presentes os ácidos graxos, principalmente os insaturados como o ácido oleico, linoleico e

linolênico. Os ácidos graxos apresentam três funções principais: compõem a estrutura das membranas biológicas, atuam como precursores de mensageiros intercelulares, e, quando oxidados, geram adenosina trifosfato (ATP). São considerados essenciais os ácidos graxos que não podem ser sintetizados pelos mamíferos, o que ocorre devido à ausência da enzima 9-dessaturase nos mesmos (FERREIRA *et al.*, 2012; MUNHOZ *et al.*, 2012).

Substâncias do grupo dos ácidos graxos insaturados possuem efeitos benéficos diversificados sobre a saúde humana. Várias pesquisas associam o seu consumo a partir da alimentação à redução do colesterol sanguíneo e hepático assim como à diminuição do risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BRANDÃO *et al.*, 2005; MUNHOZ *et al.*, 2012).

Os ácidos graxos insaturados também exibem importante participação na resposta inflamatória, por serem componentes de membranas celulares e atuarem a nível da síntese de mediadores químicos. Desta forma, podem exercer ação moduladora do sistema imunológico, contribuindo para a capacidade de circunscrição de infecções pelo hospedeiro e limitando a resposta inflamatória. Existem estudos demonstrando associação entre o ácido linolênico e a expressão de genes relacionados à inflamação, e também atribuindo ao ácido oleico à capacidade de modular o processo inflamatório no reparo de lesões na pele (GRANDJEAN, 2003; CARDOSO *et al.*, 2011).

Os ácidos graxos essenciais (ácidos linoleico e linolênico) são absolutamente necessários para a manutenção da integridade da membrana celular e da camada de barreira trans-epidérmica. O ácido linoleico também participa do processo inflamatório, proliferação e modulação do crescimento celular, além de atuar como mediador químico, sendo quimiotático e estimulador de neutrófilos (DE NARDI *et al.*, 2004).

Quando utilizados em tratamento tópico de úlceras cutâneas, os ácidos graxos insaturados exibem benefícios importantes, como modulação da resposta inflamatória e formação de barreira protetora contra microorganismos e desidratação tecidual. Outra propriedade importante observada é a obtenção de uma camada sobre a úlcera que impede a aderência do curativo aplicado, proporcionando maior conforto e evitando traumas durante as trocas (FRANCO, GONÇALVES, 2008; BATISTA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Os carotenoides como o  $\beta$ -caroteno, contidos no óleo da polpa da bocaiúva, atuam como antioxidantes. Estes compostos são capazes de bloquear ou atrasar a ação de radicais livres, que são moléculas instáveis, muito reativas e altamente tóxicas associadas ao desenvolvimento de doenças crônicas, inclusive aquelas relacionadas ao envelhecimento. O  $\beta$  - caroteno pode ser considerado um excelente antioxidante, por sequestrar os radicais livres muito eficientemente (BIANCHI, ANTUNES, 1999; CICONINI *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2011).

As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas em diversas doenças, como aterosclerose, câncer, cirrose e diabetes. A variedade de processos degenerativos a que o envolvimento dos radicais livres vem sendo associado nos últimos anos inclui condições inflamatórias agudas e crônicas, tais como as úlceras cutâneas. Os antioxidantes melhoram a cicatrização por reduzirem o dano tecidual causado pelos radicais livres de oxigênio, aumentando assim a viabilidade tecidual (CAMPOS, BORGES-BRANCO, GROTH, 2007; GEETHALAKSHMI *et al.*, 2013).

Devido às propriedades dos ácidos graxos e antioxidantes, estes vêm sendo utilizados no tratamento de feridas cutâneas e, sendo o óleo da bocaiúva uma fonte de ambas as substâncias, estudos investigando seu potencial na cicatrização oferecem novas possibilidades em relação à obtenção de compostos cicatrizantes. O trabalho a seguir foi elaborado segundo as normas do International Journal of Dermatology.

## 1.8 Referências

- ABRAHAMS, P.H.; CRAVEN, J.L.; LUMLEY, J.S.P. The structure of the body – the systems and organs. **Illustrated clinical anatomy**. New York: Oxford University Press, 2005. p.2-20.
- ABREU, E.S.; MARQUES, M.E.A. Histologia da pele normal. In: JORGE, S.A.; DANTAS, S.R.P.E. **Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 17-29.
- AQUINO, F. G. *et al.* Distribuição geográfica das espécies de *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd Ex Mart. E *Caryocar brasiliense* cambess no bioma do cerrado. **IX Simpósio nacional do Cerrado**. Brasília, 2008.
- ARGANDOÑA, E. J. S.; CHUBA, C. A. M. Caracterização biométrica, física e química de frutos da palmeira bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. **Rev. Bras. Frutic.** v.33, n.3, p.1023-1028, 2011.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURTI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.41, n.1, 2005.
- BANDEIRA, M.F.C.L. *et al.* Estudo preliminar da atividade antibacteriana do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba), associados ao óxido

- de zinco e ao hidróxido de cálcio. **Jornal Brasileiro de Clínica e Estética em Odontologia**. v.3, n.17, p. 46-51, 1999.
- BARANOSKI, S.; AYELLO, E. A. **Wound Care Essentials**. 1o Ed. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 487 p.
- BARTHEL, R.; ABERDAM, D. Epidermal stem cells. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. Amsterdam, v.19, p. 405–413, 2005.
- BATISTA, J. S. *et al.* Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum Wittm*) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. **Arq. Inst. Biol.** v.77, n.3, p.441-447, 2010.
- BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic Surgery**. v. 31, n.6, p. 674 –686, 2005.
- BEANES, S. R.; DANG, C.; SOO, C.; TING, K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- $\beta$ . **Expert reviews in molecular medicine**. v.5, p.1-11, 2003.
- BELLO, Y.M.; PHILLIPS, T.J. Recent advances in wound healing. **Journal of the American Medical Association**. Chicago, v.283, n.6, p.716-718, 2000.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.** v.12, n.2, p.123-130, 1999.
- BROUGHTON II, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound healing: An overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v.117, p.1e-S-32e-S, 2006.
- BROUGHTON II, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. A Brief History of Wound Care. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v.117, p.6S-11S, 2006.
- CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD, arq. bras. cir. dig.** v.20, n.1, p.51-58, 2007.
- CAMPOS, A. C.; GROTH, A. K.; BRANCO, A. B. Assessment and nutritional aspects of wound healing. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**. v.11, n. 3, p. 281-288, 2008.
- CARDOSO, C. R. O.; SOUZA, M. A.; FERRO, E. A.; FAVORETO, S. JR; PENA, J. D. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound Repair and Regeneration**. v. 12, n. 2, p. 235–243, 2004.
- CARDOSO, C.R. FAVORETO Jr, S.; OLIVEIRA, L.L.; VANCIMA J.O.; BARBANA,G.B.; FERRAZA, D. B.; SILVA, J.S. Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: A new approach for skin repair. **Immunobiology**. v.216, p.409–415, 2011.
- CHANG, H. Y.; CHI, J.; DUDOIT, S.; BONDRE, C.; RIJN, M. V. D.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. **Proceedings of National Academy of Science**. v. 99, n. 20, p.12877–12882, 2002.
- CICONINI, G.; FAVARO, S. P.; SOUZA, C. F. T.; MIYAHIRA, M. A. M.; CORRÊA, A.; PLEIN, G. S.; SOUZA, J. L. C.; SANTOS, G. P. Óleo de polpa da macaúba: variabilidade das características físico-químicas em plantas do Mato Grosso do Sul. **IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas**. João Pessoa, PB. p. 1910-4, 2010.
- CLARK, R.A.F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M.G. Tissue engineering for cutaneous wounds. **Journal of Investigative Dermatology**. Baltimore, v.127, p.1018–1029, 2007.
- CORSETTI, G.; D'ANTONA, G.; DIOGUARDI, F.S.; REZZANI, R. Topical application of dressing with aminoacids improves cutaneous wound healing in aged rats. **Acta histochemica**. v. 112, n. 5, p. 497-507, 2009.

- DATTNER, A.M. From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to the future. **Dermatologic Therapy**. Copenhagen, v.16, p.106-113, 2003.
- DE NARDI, A.B; RODASKI, S; SOUSA, R. S.; BAUDI, D. L. K.; CASTRO, J. H. T. Cicatrização secundária em feridas dermoepidérmicas tratadas com ácidos graxos essenciais, vitaminas a e e, lecitina de soja e iodo polivinilpirrolidona em cães. **Archives of Veterinary Science**. v. 9, n. 1, p. 1-16, 2004.
- DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**. v. 1, p. 283 – 289, 2004.
- DIMAKOU, C.; OREOPOULOU, V. Antioxidant activity of carotenoids against the oxidative destabilization of sunflower oil-in-water emulsions. **LWT - Food Science and Technology**. v.46, p.393-400, 2012.
- DOUGHTY, D.B; SPARKS-DeFRIESE, B. Wound healing physiology. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. Acute and chronic wounds. **Current management concepts**. 4th ed. Missouri: Elsevier Mosby, 2012. cap.4, p.63-82.
- EDWARDS, S.L. Innate Defences. In: MONTAGE, S.E.; WATSON, R.; HERBERT, R.A. **Physiology for nursing practice**. 3 ed. Espanha: Elsevier, 2005. p.635-683.
- EHRENREICH, M.; RUSZCZAK, Z. Update on Tissue-Engineered Biological Dressings. **Tissue Engineering**. v. 12, n. 9, p. 2407-2424, 2006.
- ELIAS, P. M.; MENON, G. K. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. **Advances in Lipid Research**. v. 24, p. 1-26, 1991.
- ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. **Surgery**. v.23, n.2, p. 37-42, 2005.
- ESTEVAN, A. O; SILVA, M. A.; ARENA, A. C.; ARGANDONA, E. J. S.; BREDAS, C. A.; KASSUYA, C. A. L.. Estudo do potencial antiinflamatório dos extratos de *Acrocomia aculeata* no processo inflamatório agudo e crônico em modelos experimentais. **III Simpósio intercâmbio Brasil-Japão em sustentabilidade: Um desafio da humanidade**. Campo Grande, 6p. 2010.
- FALANGA, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. **Lancet**. v. 366, n. 9498, p. 1736-43, 2005.
- FERREIRA, A. M.; SOUZA, B. M. V.; RIGOTTI, M. A.; LOUREIRO, M. R. D. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. **Rev Esc Enferm USP**. v.46, n.3, p.752-60, 2012.
- FRANCO, D. G. Fator de transcrição nuclear kappa b no sistema nervoso central: do fisiológico ao patológico. **Revista da Biologia**. v.4, 2010.
- FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Rev. Col. Bras. Cir.** v.35, n.3, p. 203-206, 2008.
- FRANCO, E. S.; AQUINO, C. M. F.; MEDEIROS, P. L.; EVÊNCIO, L. B.; GÓES, A. J. S.; MAIA, M. B. S. Effect of a semisolid formulation of *Linum usitatissimum* L.(Linseed) Oil on the Repair of SkinWounds. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Artigo ID 270752, 7p. 2012.
- FUKAI, F. SUZUKI, H.; SUZUKI, K.; TSUGITA, A.; KATAYAMA, T. Rat plasma fibronectin contains two distinct chemotactic domains for fibroblastic cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 266, p. 8807– 13, 1991.
- GÁL, P.; VASILENKO, T.; KOSTELNÍKOVÁ, M.; JAKUBCO, J.; KOVÁČ, I.; SABOL, F.; ANDRÉ, S.; KALTNER, H.; GABIUS, H.; SMETANA JR, K. Open wound healing in vivo: monitoring binding and presence of adhesion/growth-regulatory galectins in rat skin during the course of complete re-epithelialization. **Acta Histochem Cytochem**. v. 44, n. 5, p. 191–199, 2011.
- GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. **Clin Plastic Surg**. v.39, p.85–97, 2012.

- GARY-SIBBALD, R.; WOO, K. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**. v. 24, n. 1, p. 25-30, 2008.
- GEETHALAKSHMI, R.; SAKRAVARTHI, C.; KRITIKA, T.; KIRUBAKARAN, M. A.; SARADA, D. V. L. Evaluation of antioxidant and wound healing potentials of *Sphaeranthus amaranthoides* Burm.f.. **BioMed Research International**. v. 2013, Article ID 607109, 7p. 2013.
- GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 69, 2001.
- GOLDBERG, S.R.; Diegelmann, F.R. Wound Healing. **Primer Surg Clin**. v.90 p.1133–1146, 2010.
- GOSAIN, A.; DIPIETRO, L.A. Aging and wound healing. **World Journal of Surgery**. v. 28, n. 3, p. 321-326, 2004.
- GRAAF, K.M.V.; FOX, S.I. Integumentary system. In: \_\_\_\_\_. **Concepts of human anatomy and physiology**. 2nd ed. Iowa: WM. C. Brown Publishers, 1989. p.178-203.
- GRANDJEAN, D. Tudo o que deve saber sobre estes nutrientes que alimentam previnem e curam cães e gatos. Paris: Royal Canin, 2003. 80p. (Boletim Técnico, 80).
- GREAVES, N.S.; ASHCROFT, K. J.; BAGUNEID, M.; BAYAT, A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of Dermatological Science**. DESC-2572; 12 p. 2013.
- GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nat Rev Microbiol**. v. 9, n.4 p. 244–253, 2011.
- GUO, S.; DIPIETRO L. A. Factors Affecting Wound Healing. **J Dent Res**. v.89, n.3, p. 219-229, 2010.
- GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**. v. 453, p. 314-321, 2008.
- HABIF, T.P. Principles of diagnosis and anatomy. In:\_\_\_\_. **Clinical Dermatology: a color guide to diagnosis and therapy**. 3 ed. Missouri: Von Hoffman Press, 1996. p.1-24.
- HARDING, K.G.; PATEL, M.G.K. Science, medicine and the future: Healing chronic wounds. **British Medical Journal**. London, v.324, p.160-163, 2002.
- HART, J. Inflammation. 1: its role in the healing of acute wounds. **Journal of Wound Care**. v. 11, n. 6, p. 205 –209, 2002.
- HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. Field Guide to the Palms of the Americas. New Jersey: Princeton University, p.166-167, 1995.
- HENG, M. C. Y. Wound healing in adult skin: aiming for perfect regeneration. **International Journal of Dermatology**. n. 50, n. 9, p. 1058–1066, 2011.
- HIANE, P. A.; BALDASSO, P. A.; MARANGONI, S. Chemical and nutritional evaluation of kernels of bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v.26, n.3, 2006.
- HOUBEN, E.; DE PAEPE, K.; ROGIERS, V. A keratinocyte's course of life. **Skin Pharmacology and Physiology**. v. 20, n. 3, p. 141-147, 2007.
- HUANG, Y.; REN, L.; QIN, Y. Observation of cicatricial fibroblasts in culture and its biological properties. **Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi**. v. 12, n.6, p. 332-5, 1998.
- ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; RÊGO, F. M. P.; BORDA, J. C.; FERREIRA, M. A. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Rev Med**. v.89, n.3/4, p.125-31, 2010.



- JAUL, E. Non-healing wounds: the geriatric approach. **Archives of Gerontology Geriatrics**, v. 49, n. 2, p. 224-6, 2009.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10th. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A. 2004. 488 p.
- KIM, J.; YUN, H.; CHO, Y. Analysis of ceramide metabolites in differentiating epidermal keratinocytes treated with calcium or vitamin C. **Nutrition Research and Practice**. v. 5, n. 5, p. 396-403, 2011.
- KOKANE, D.D.; MORE, R.Y.; KALE, M.B.; NEHETE, M.N.; MEHENDALE, P.C.; GADGOLI, C.H. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. **Journal of Ethnopharmacology**. Limerick, v.124, p.311–315, 2009.
- KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Science International**. v.203, p.93–98, 2010.
- KOPPER, A. C. Bebida simbiótica elaborada com farinha de bocaiuva (*acrocomia aculeata*) e *Lactobacillus acidophilus* incorporadas ao extrato hidrossolúvel de soja. **Dissertação**. Paraná, 2009.
- KUMAR, M.S; SRIPRIYA, R.; RAGHAVAN, H. V.; SEHGAL, P. K. Wound healing potential of Cassia fistula on infected albino rat model. **Journal of Surgical Research**. New York, v.131, p. 283-289, 2006.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7 ed. Rio de Janeiro. Saunders. 2005. p. 49-124.
- LAWRENCE, W. T. Physiology of the acute wound. **Clinics in Plastic Surgery**. v. 25, n. 3, p. 321–340, 1998.
- LAZARUS, G. S; COOPER, D. M.; KNIGHTON, D. R.; MARGOLIS, D. J.; PERCORARO, R. E.; RODEHEAVER, G.; ROBSON, M. C. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 2, n. 3, p. 165–170, 1994.
- LIMA E COSTA, M. F.; GUERRA, H. L.; BARRETO, S. M.; GUIMARÃES, R. M. Diagnóstico da situação de saúde da população idosa brasileira: um estudo da mortalidade e das internações hospitalares públicas. **Informe Epidemiológico do SUS**. v. 9, n. 1, p. 23-41, 2000.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Palmeiras do Brasil: exóticas e nativas**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1996. 303p.
- MANDELBAUM, S. R.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **An bras Dermatol, Rio de Janeiro**. v.78, n.4, p.393-410, 2003.
- MANDELBAUM, S. R.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. **An bras Dermatol, Rio de Janeiro**. v.78, n.5, p.525-542, 2003.
- MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **J An Bras Dermatol**. v.84, n.3, p.257-62, 2009.
- MENKE, M. N.; MENKE, N. B.; BOARDMAN, C.H.; DIEGELMANN, R. F. Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing. **Gynecologic Oncology**. New York, v.11, p.S87–S91, 2008.
- MENKE, N. B.; WARD, K.R.; WITTEN, T. M.; BONCHEV, D. G.; DIEGELMANN, R. F. Impaired wound healing. **Clinics in Dermatology, Philadelphia**. v.25, p.19–25, 2007.
- MIRANDA, I. P. A.; RABELO, A.; BUENO, C. R.; BARBOSA, E. M.; RIBEIRO, M. N. S. **Frutos de Palmeiras da Amazônia**. Manaus-AM: Creative, v.1, p.120, 2001.
- MONACO, J. L.; LAWRENCE, T. Acute wound healing an overview. **Clinics in Plastic Surgery**. Philadelphia, v. 30, p. 1-12, 2003.

- RAMASASTRY, S. S. Acute wounds. **Clinics in Plastic Surgery**. v. 32, p. 195 – 208, 2005.
- MUNHOZ, C. L. GUIMARÃES, R. C. A.; NOZAKI, V. T.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; MACEDO, M. L. R. Frutos de bocaiúva: caracterização física e perfil de ácidos graxos dos óleos. **4º Seminário de agroecologia de Mato Grosso do Sul**. Glória de Dourados, 2012.
- OLIVEIRA, A. F.; BATISTA, J. S.; PAIVA, E. S.; SILVA, A. E.; FARIAS, Y. J. M. D.; DAMASCENO, C. A. R.; BRITO, P. D.; QUEIROZ, S. A. C.; RODRIGUES, C. M. F.; FREITAS, C. I. A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.12, n.3, p.302-310, 2010.
- OLIVEIRA, A. P.; FRANCO, E. S.; BARRETO, S. S.; CORDEIRO, D. P.; MELO, R. G.; AQUINO, C. M. F.; SILVA, A. A. R.; MEDEIROS, P. L.; SILVA, T. G.; GÓES, A. J. S.; MAIA, M. B. S. Effect of semisolid formulation of *Persea americana mill* (Avocado) Oil on wound healing in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Artigo ID 472382, 8 p. 2013.
- PADGETT, D. A.; MARUCHA, P. T.; SHERIDAN, J. F. **Psychoneuroimmunology**. v.2, n.4, p.837-850, 2007.
- PAIVA, L.A.F. *et al.* Investigation on the wound healing activity of oleoresin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research, London**. v.16, 737-739, 2002.
- PARSONAGE, G.; FILER, A. D.; HAWORTH, O.; NASH, G. B.; RAINGER, G. E.; SALMON, M.; BUCKLEY, C. D. A stromal address code defined by fibroblasts. **Trends in Immunology**. v. 26, n. 3, p. 150–156, 2005.
- PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**. v. 18, n. 1, p. 18-23, 2004.
- PHILLIPS, T.J.; DOVERS, J.S. Leg Ulcers. **Journal of the American Academy of Dermatology**. Saint Louis, v.25, p.965-987, 1991.
- PIERCE, G. F.; MUSTOE, T. A.; ALTROCK, B. W.; DEUEL, T. F.; THOMASON, A. Role of plateletderived growth factor in wound healing. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 45, n. 4, p. 319–326, 1991.
- QUEGE, G. E.; BACHION, E. M.; JUNIOR, R. S. L.; LIMA, A. B. M.; FERREIRA, P. S.; SANTOS, Q. R.; PIMENTA, F. C. Comparação da atividade de ácidos graxos essenciais e biomembrana na microbiota de feridas crônicas infectadas. **Rev. Eletr. Enf.** v.10, n.4, p.890-905, 2008.
- RADEK, A. K.; RANZER, M. J.; DIPIETRO, L. A. Brewing complications: the effect of acute ethanol exposure on wound healing. *J Leukoc Biol.* v 86, n.5, p.1125–1134, 2009.
- RAMASASTRY, S. S. Acute wounds. **Clinics in Plastic Surgery**. v. 32, p. 195 – 208, 2005.
- RAMOS, M. I. L.; RAMOS FILHO, M. M.; HIANE, P. A.; BRAGA NETO, J. A.; SIQUEIRA, E. M. A. Qualidade nutricional da polpa de bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v.28, p.90-94, 2008.
- RAMOS, D. D.; VIEIRA, M. C.; FORMAGIO, A. S. N.; CARDOSO, C. A. L.; RAMOS, D. D. CARNEVALI, T. O. Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. **Ciência Rural**. v.41, n.8, p.1331-1336, 2011.
- REHDER, J.; SOUTO, L. R. M.; ISSA, C. M. B. M.; PUZZI, M. B. Model of human epidermis reconstructed in vitro with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. **São Paulo Medical Journal**. São Paulo, v.122, n.1, p.22-25, 2004.

- ROBSON, M. C.; STEED, D. L.; FRANZ, M. G. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. **Current Problems in Surgery**. v. 38, n. 2, p. 72–140, 2001.
- RODEMANN, H. P.; MULLER, G. A. Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. **American Journal of Kidney Diseases**. v. 17, p. 684–686, 1991.
- RODERO, P. M.; KHOSROTEHRANI K. Skin wound healing modulation by macrophages. **Int J Clin Exp Pathol**. n. 3, v. 7 p. 643-653, 2010
- ROLDÁN-MARÍN, R. *et al.* Fixed sporotrichosis as a cause of a chronic ulcer on the knee. **International Wound Journal**. Oxford, v.6, n.1, p.63- 66, 2009.
- ROLSTAD, B.S.; BRYANT, R.A.; NIX, D.P. Topical Management. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. Acute and chronic wounds. **Current management concepts**. 4th ed. Missouri: Elsevier Mosby, 2012. cap.18, p.289-306.
- ROSCOE, R.; RICHETTI, A.; MARANHO, E. Análise de viabilidade técnica de oleaginosas para produção de biodiesel em Mato Grosso do Sul. **Revista Política Agrícola**. n.1, p.48-59, 2007.
- RUGGERI, Z. M. Platelets in atherothrombosis. **Nature Medicine**. v. 8, n. 11, p. 1227–1234, 2002.
- SALIS, S. M.; JUARACY, A. R. M. **A utilização da bocaiúva no Pantanal**. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br>> Acesso em: 15 out. 2012.
- SCHMIDT, C.; FRONZA, M.; GOETTERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E. M.; BITTENCOURT, C. F.; ZANETTI, G. D.; HEINZMANN, B. M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**. Limerick, v.122, n.3, p.523-532, 2009.
- SCHREML, S.; SZEIMIES, R. M.; PRANTL, L.; LANDTHALER, M.; BABILAS, P. Wound healing in the 21st century. **J Am Acad Dermatol**. v.63, n.5, p.866-81, 2010.
- SEHN, E.; HERNANDES, L.; FRANCO, S. L.; GONÇALVES, C. C.; BAESSO, M. L. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. **Analytica Chimica Acta**. v. 635, n.1, p. 115-120, 2009.
- SHAI, A.; MAIBACH, H. I. Antibiotics, antiseptics and cutaneous ulcers. In: Wound healing and ulcers of the skin. **Diagnosis and Therapy – the practical approach**. Germany: Springer, 2005. p.135-150.
- SHERRATT, J. A.; DALLON, J. C. Theoretical models of wound healing: past successes and future challenges. **C. R. Biologies**. v.325, p.557–564, 2002.
- SILVA, K.L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero baubinia: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**. v. 25, n. 3, p.449-454, 2002.
- SIMIAN, M.; HIRAI, Y.; NAVRE, M.; WERB, Z.; LOCHTER, A.; BISSELL, M. J. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. **Development**. v. 128, n. 16, p. 3117–3131, 2001.
- SINGER, A. J. E CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**. v.341, n.10, p.738-46, 1999.
- SOUZA-JÚNIOR, O.G. *et al.* Achados macroscópicos na região peritoneal de ratos após aplicação do óleo de copaíba. **Revista Paraense de Medicina**. Belém, v.16, n.1, p.14-18, 2002.
- SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamento de amêndoa e torta de castanha-do-Brasil e farinha de mandioca: parâmetro de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.24, n.1, p. 120- 128, 2004.

- STOJADINOVIC, A.; CARLSON, J. W.; SCHULTZ, G. S.; DAVIS, T. A.; ELSTER, E. A. Topical advances in wound care. **Gynecologic Oncology**. New York, v.111, p.S70–S80, 2008.
- STRECKER-MCGRAW, M.K.; JONES, T. R.; BAER, D. G. Soft tissue wounds and principles of healing. **Emergency Medicine Clinics of North America**. v. 25, n. 1, p. 1 – 22, 2007.
- STRONCEK, J. D; BELL, N; REICHERT, W. M. Instructional powerpoint presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 90A, n. 4, p.1230-1238, 2009.
- SWAIN, S. D.; ROHN, T. T.; QUINN, M. T. Neutrophil priming in host defense: Role of oxidants as priming agents. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 4, n. 1, p. 69-83, 2002.
- TABATABAI, M. A.; EBY, W. M.; SINGH, K. P. Hyperbolic modeling of wound healing. **Mathematical and Computer Modelling**. v.53, p.755–768, 2011.
- TAZIMA, M. F. G. S. *et al.* Biologia da ferida e cicatrização. **Simpósio: Fundamentos em clínica cirúrgica - 1ª parte capítulo II**. v.41, n.3, p.59-64, 2008.
- TEIXEIRA, E. Acrocomia aculeata In: TASSARO, H. **Frutas no Brasil**. São Paulo: Empresa das Artes, 1996, p.15.
- TELLER, P.; WHITE, T. K. The physiology of wound healing: Injury through maturation. **Perioperative Nursing Clinics**. v.6, p.159–170, 2011.
- THAKUR, R.; JAIN, N.; PATHAK, R.; SANDHU, S. S. Practices in Wound Healing Studies of Plants. **Evid Based Complement Alternat Med**. v.2011, p.1-17, 2011.
- THEORET, C. Tissue Engineering in Wound Repair: The three “R”s—Repair, Replace, Regenerate. **Veterinary Surgery**. v. 38, p. 905–913, 2009.
- TOGASHI, M.; SGARBIERI, V. C. Avaliação nutricional da proteína e do óleo do baru (*Dypterix alata* Vog). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.15, n.1, p.66-69, 1995.
- TOMASEK, J. J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R. A. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews*. **Molecular. Cell Biology**. v. 3, p. 349–363, 2002.
- TSIROGIANNI, K. A.; MOUTSOPOULOS, N. M.; MOUTSOPOULOS, H. M. Wound healing: Immunological aspects. **Injury, Int. J. Care Injured**. v.37, p.5-S12, 2006.
- VARGAS, N. R. C.; COELHO, F. S.; MENDIETA, M. C.; SOUZA, A. D. Z.; HAEFFNER, R.; HECK, R. M.; CEOLIN, T.; LOPES, C. V. Plantas medicinais utilizadas para cicatrização de feridas pelos produtores rurais de agricultura de base ecológica do sul do Rio Grande do Sul. **XVIII CIC e XI Enpos**. 2009.
- VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. The **Journal of International Medical Research**. v. 37, n. 5, p. 1528–1542, 2009.
- VIEIRA, R. L.; BION, F. M. Valor biológico de dieta a base de soja (*Glycine hispida*) e algaroba (*Prosopis juliflora*). **Boletim do CEPPA**. v.16, n.1, p.58-98, 1998.
- YAGER, D., NWOMEH, B. The proteolytic environment of chronic wounds. **Wound Repair and Regeneration**. v. 7, p. 433–441, 1999.
- WATT, F. M. The epidermal keratinocyte. **BioEssays**. v. 8, n. 5, p. 163-7, 1988.
- WHITNEY, J. D. Overview: acute and chronic Wounds. **Nursing Clinics of North America**. v. 40, n. 2, p. 191-205, 2005.
- WILD, T.; RAHBARNIA, A.; KELLNER, M.; SOBOTKA, L.; EBERLEIN, T. Basics in nutrition and wound healing. **Nutrition**. v.26, p.862–866, 2010.
- WILLIAMSON, D.; HARDING, K. Wound healing. **Medicine**. v.32, p.4-7, 2004.
- WISEMAN, B. S.; WERB, Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. **Science**. v. 296, n. 5570, p. 1046–1049, 2002.

- WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical clinics of north America**. v.77, n.3, 1997.
- WYSOCKI, A.B. Anatomy and physiology of skin and soft tissue. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. Acute and chronic wounds. **Current management concepts**. 4th ed. Missouri: Elsevier Mosby, 2012. cap.3, p.40-62.
- WYSOCKI, A.B. Anatomy and physiology of skin and soft tissue. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. Acute and chronic wounds. **Current management concepts**. 4 ed. Missouri: Elsevier Mosby, 2012. cap.3, p.40-62.
- YAMAMOTO, M. S. Utilização de ácidos graxos essenciais em deiscências de feridas cirúrgicas em pediatria. **Rev. Esc. Enf. USP**. v.33, n.Especial, 1999.

## OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a eficácia do óleo da polpa da bocaiúva na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos Wistar.

### Objetivos Específicos

- Avaliar a reepitelização por meio do cálculo do índice de cicatrização das úlceras (ICU) em ratos tratados com a pomada contendo o óleo da polpa da bocaiúva;
- Avaliar as alterações histológicas quanto ao infiltrado inflamatório, neovascularização e fibroplasia em cortes histológicos das úlceras, tratadas com a pomada contendo o óleo da polpa da bocaiúva, corados com hematoxilina e eosina (HE);
- Avaliar o infiltrado neutrofílico por meio da dosagem de mieloperoxidase (MPO);
- Avaliar a colagênese por meio da dosagem de hidroxiprolina (OHP);
- Avaliar a colagênese em cortes histológicos corados com tricrômio de masson (TM).

## ARTIGO

Atividade Cicatrizante do Óleo da Polpa da Bocaiúva (*Acrocomia aculeata*)Costa P.L.<sup>1</sup>, Moreno S.E.<sup>1</sup>, Frade M. A. C.<sup>2</sup><sup>1</sup>Mestrado em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco – Campo Grande, MS.<sup>2</sup> Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

Autor para correspondência: \*(67) 3312-3468; e-mail: smoreno@ucdb.br

## RESUMO

A cicatrização de feridas é um fenômeno complexo no qual estão envolvidos diversos eventos celulares e moleculares. As úlceras cutâneas crônicas são um problema frequente na prática médica, com consequências sociais e alto custo com cuidados médicos. A busca por substâncias terapêuticas capazes de melhorar o processo cicatricial é imperativa. Dadas as propriedades químicas do óleo da polpa da bocaiúva (*Acocomiaaculeata*), rico em tocoferóis, beta-carotenos e ácidos graxos poli-insaturados, assume-se que esse composto tenha grande aplicação terapêutica, porém, pouco ainda têm-se estudado em relação ao seu papel na cicatrização. O presente estudo objetivou avaliar o efeito do óleo da polpa de bocaiúva (OPB) na evolução da cicatrização de úlceras cutâneas em ratos Wistar. Foram feitas duas excisões cirúrgicas na pele de cada animal com o emprego de um *punch* histológico, atingindo todas as camadas da pele. Os grupos experimentais consistiram em animais com as úlceras tratadas com a pomada veículo e animais com as úlceras tratadas com a pomada contendo o óleo da polpa da bocaiúva a 20%. Após 2, 7 e 14 dias do procedimento cirúrgico, cinco animais/grupo foram eutanasiados e avaliou-se a reepitelização por meio do índice de cicatrização das úlceras. Uma biópsia de úlcera/cicatriz de cada animal foi coletada, fixada e corada com hematoxilina/eosina e tricrômio de Masson para quantificação de infiltrado inflamatório, fibroblastos, vasos sanguíneos e colagênese. A biópsia da outra úlcera foi utilizada para a dosagem de mieloperoxidase (MPO), para avaliar o infiltrado neutrofílico no tecido lesado, e dosagem de hidroxiprolina (OHP) para avaliar a colagênese. Os resultados demonstraram que no 2º dia, o OPB foi capaz de induzir o aumento do recrutamento de células inflamatórias para a lesão em relação ao grupo controle, representadas principalmente por neutrófilos. No 7º dia, houve redução das células inflamatórias no grupo tratado com OPB em relação ao 2º dia. Nesse período não foram observadas alterações no grupo controle. No 7º dia, observou-se importante redução do infiltrado neutrofílico na pele dos animais tratados com OPB, sugerindo que o OPB tenha papel pró-inflamatório inicial, aumentando o recrutamento celular no início do processo cicatricial e agindo de forma reguladora posteriormente. A fibroplasia observada na pele dos animais tratados com OPB foi mais intensa em relação ao grupo controle, no 14º dia de avaliação. Por outro lado, a diferença observada na colagênese entre os grupos de tratamento quando avaliada pela determinação da concentração de hidroxiprolina, ocorreu apenas no grupo controle do 7º para 14º dia. Entretanto, a coloração com tricrômio de Masson indicou aumento no conteúdo de colágeno no grupo controle do 2º para o 7º dia. As úlceras do grupo tratado com o OPB apresentaram-se mais reepitelizadas no 7º dia, quando comparadas ao grupo controle. Assim, os dados permitem sugerir que a pomada contendo o óleo da polpa da bocaiúva estimula de modo favorável a fase inflamatória da cicatrização, acelerando o processo e contribuindo para a melhor qualidade da cicatriz.

**Palavras chave:** óleo vegetal, ácidos graxos, beta-caroteno, tocoferol.



## ABSTRACT

Wound healing is a complex phenomenon which is involved several cellular and molecular events. Chronic skin wounds are a frequent problem in medical practice, which social consequences and high costs to medical care. The research about therapeutic substances able to improve the healing process is imperative. Due the chemical properties of the bocaiuva (*Acocomia aculeata*) pulp oil, that is rich in tocopherols, beta -carotene and polyunsaturated fatty acids, it is assumed that this compound has significant therapeutic application , however, few information about the role le in healing could be found. The present study aimed to evaluate the effect of bocaiuva pulp oil (BPO) on the healing process of skin ulcers in rats. Two surgical excisions were made in the skin of each animal, using a histological punch, reaching all the skin layers. The experimental groups consisted of animals with ulcers treated with the ointment vehicle and animals with that ulcers were treated with the ointment containing 20% of the BPO. After 2, 7 and 14 days post surgery, five animals / group were euthanized and reepithelialization was evaluated through the rate of healing of ulcers. A biopsy of the ulcer/scar from each animal was collected, fixed and stained with hematoxylin/eosin and Masson trichrome for quantification of inflammatory infiltrate , fibroblasts , blood vessels and collagenasis. The biopsy of other ulcer was used for the estimation of myeloperoxidase (MPO) in order to evaluate the neutrophil infiltration in the injured tissue, and hidroxyprolin determination (OHP) was used to assess collagenasis . The results showed that on the 2nd day, the BPO was able to induce an increase in the recruitment of inflammatory cells to the lesion compared to the control group, mainly represented by neutrophils. On the 7th day, there was decrease of inflammatory cells in the BPO in treated group compared to 2nd day . During this period no changes were observed in the control group. On the 7th day, there was significant reduction of neutrophil infiltration in the skin of animals treated with BPO, suggesting a initial pro- inflammatory role by increasing cell recruitment at the beginning of healing process and acting in a regulatory fashion later. The fibroplasia observed in the skin of animals treated with OPB was more intense than in the control group on 14th day of evaluation. Moreover, the difference observed in collagenasis between groups assessed by determining the concentration of hydroxyproline, happened only in the control group on the 7th to 14th day. However, Masson staining showed increased collagen content in the control group on the 2nd to 7th day. Ulcers of the OPB treated group were more epithelized at day 7 compared to the control group. The findings suggested that the ointment containing the BPO favorably stimulates the inflammatory phase of wound healing by accelerating the process and contributing to improving the quality of the scar.

**Key words:** Vegetal oil, fatty acids, beta-carotene, tocopherol

## INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um fenômeno complexo no qual estão envolvidos diversos eventos celulares e moleculares. Seu desencadeamento se dá na presença de ruptura da estrutura tissular, objetivando a reorganização e restabelecimento da homeostasia da estrutura onde ocorre, por meio do preenchimento das lesões com tecido cicatricial<sup>1</sup>

Desde a antiguidade reconhece-se a necessidade dos cuidados com a cura de feridas a fim de evitar maiores complicações. Este fato é refletido em relatos históricos, que descrevem a tentativa de intervenção humana no processo de cicatrização desde o Egito antigo<sup>2</sup>

A incidência de úlceras cutâneas de difícil cicatrização ainda se mantém elevada. O processo cicatricial inadequado de uma injúria cuja extensão seja substancial pode causar alterações em toda a saúde do indivíduo, além de repercutir em altos custos e consequências sociais.<sup>3,4</sup>

Existem diversos recursos disponíveis para o tratamento das lesões, porém, ainda há a necessidade do desenvolvimento de produtos que exerçam ação cicatrizante de forma cada vez mais eficaz, e que ao mesmo tempo sejam acessíveis. O uso de substâncias derivadas de fontes naturais para otimizar o processo cicatricial vêm sendo estudado, por representar uma possibilidade para este fim<sup>2,5</sup>

Os óleos de origem vegetal são empregados no tratamento de ferimentos principalmente em países da América Latina. Muitas plantas nativas do Brasil são fontes de óleos, os quais ainda não foram profundamente estudados quanto suas propriedades cicatrizantes<sup>6</sup>.

A bocaiúva (*Acocomia aculeata*) é uma palmeira presente no território nacional, cujos frutos são conhecidos como macaúba, coco-baboso ou coco de espinho. A planta como um todo, oferece diversas possibilidades de aproveitamento, porém, destaca-se o potencial de emprego das diferentes partes de seus frutos e seus respectivos óleos no âmbito da saúde humana.<sup>7</sup>

O óleo extraído da polpa do fruto exhibe em sua composição importantes substâncias como os ácidos graxos insaturados e carotenoides. Ensaios farmacológicos têm associado a utilização do óleo a efeitos benéficos em diversos

processos biológicos, como no processo inflamatório. Porém, pouco ainda têm-se estudado em relação ao seu possível papel na cicatrização.<sup>8,9</sup>

O estudo científico para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas torna-se fundamental para oferecer novas possibilidades em relação à otimização do tratamento das úlceras cutâneas.<sup>2</sup> Levando em consideração as propriedades já conhecidas sobre o óleo da polpa da bocaiúva, este pode ser considerado como uma substância de potencial promissor no tratamento das feridas cutâneas, que, por se tratar de um produto de fácil obtenção e derivado de uma matéria prima local, torna-se um recurso acessível.

Diante desse contexto, esta pesquisa objetivou avaliar o efeito do óleo da polpa da bocaiúva na cicatrização de úlceras cutâneas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos envolvendo o uso de animais em experimentação foram realizados de acordo com as normas internacionais de ética em pesquisa com animais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), sob o número de processo 005/11. Todo o estudo teve colaboração e orientação do Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade do Departamento de Clínica Médica, Divisão de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP – USP) e da equipe de seu laboratório de pesquisa.

### **Obtenção do óleo da polpa da bocaiúva**

Este processo teve a colaboração do Laboratório de Matérias Primas da UCDB, que cedeu o óleo para os testes *in vivo*.

Os frutos da bocaiuva, maduros, foram coletados na região de Glória de Dourados – MS, durante os meses de outubro a dezembro da safra de 2010. Após a coleta, foram colocados em estufa com circulação de ar a 60 °C para secagem, sendo posteriormente encaminhados para extração da polpa através de processo

mecânico em despulpadora. A polpa foi submetida ao extrator Soxhlet para obtenção do óleo, utilizando hexano como solvente. Após, o solvente foi removido por rotaevaporação (40 °C) e o óleo obtido foi armazenado a -20 °C até o momento da utilização.

## **Animais**

Todos os animais envolvidos no projeto foram recebidos cinco dias antes do início dos experimentos para aclimação e mantidos em gaiolas coletivas até o dia do experimento. Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, com peso entre 180 e 200 g, obtidos do Biotério Central da FMRP -USP.

Os animais foram mantidos em condições de isolamento durante todo experimento em gaiolas individualizadas, com água e ração *ad libitum* e ciclos alternados de luminosidade a cada 12 horas no Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP.

## **Confecção das pomadas**

Foram utilizadas no experimento dois tipos de pomadas: A pomada para o tratamento do grupo controle, contendo apenas o creme lanette (veículo específico para incorporação de ativos de uso tópico) e a pomada a ser aplicada no grupo bocaiúva, contendo 20% do óleo da polpa de bocaiúva. O óleo foi encaminhado para farmácia de manipulação, onde as pomadas foram elaboradas. Estas foram mantidas sob refrigeração desde sua obtenção até o final do experimento.

## Padronização dos grupos

A distinção dos grupos foi conforme o tratamento utilizado em ambas as úlceras de cada animal:

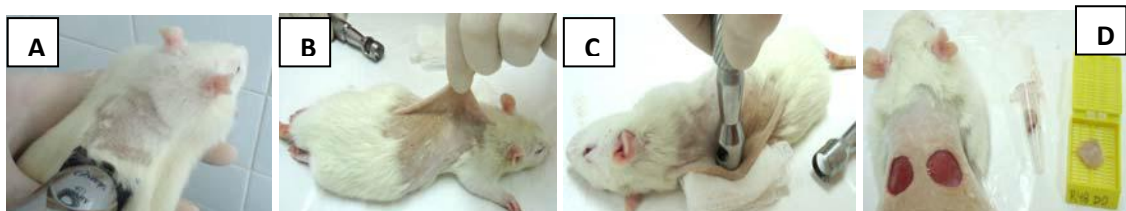
Grupo Controle (**GC**): 15 animais cujas úlceras foram tratadas somente com o creme Lanette e acompanhadas por 2, 7 e 14 dias (n=5 animais por tempo de tratamento);

Grupo bocaiúva (**GB**): 15 animais cujas úlceras foram tratadas com a pomada contendo o óleo da polpa da bocaiúva a 20% e acompanhadas por 2, 7 e 14 dias (n=5 animais por tempo de tratamento).

## Procedimento cirúrgico: úlceras cutâneas dorsais

Os ratos foram pesados, anestesiados por via intraperitoneal com tribromoetanol a 4% na dose de 1.0 mL/100g de peso do animal. Posteriormente, os animais foram tricotomizados, posicionados na mesa operatória em decúbito ventral e após assepsia do dorso com álcool 70%, duas excisões cirúrgicas circulares foram feitas com *punch* 1,5 cm de diâmetro com o animal em decúbito lateral, atingindo a região dermo-epidérmica (Figura 2).

A pele excisada para confecção das úlceras nos animais foi acondicionada em cassetes histológicas e *ependorfs* para posteriores estudos histológicos e bioquímicos respectivamente, representando amostras do dia inicial (dia 0, controle sem tratamento).



**Figura 2:** Confecção de duas úlceras cutâneas no dorso de cada animal. **(A)** Tricotomia do dorso dos. **(B)** Animal em decúbito ventral após assepsia para determinação do local para confecção das úlceras. **(C)** Animal em decúbito lateral para confecção de duas úlceras na região dorsal do rato com punch de 1,5 cm de diâmetro. **(D)** Úlceras confeccionadas e amostras do tecido cutâneo excisados a ser acondicionados.

As pomadas foram passadas em ambas as úlceras de cada animal de acordo com o respectivo grupo e reaplicadas diariamente até a eutanásia. Após a aplicação dos tratamentos, as úlceras de todos os animais receberam curativo oclusivo com gaze e esparadrapo. Os animais de ambos os grupos tiveram o curativo oclusivo trocados diariamente. Após receberem o tratamento, os animais foram colocados em gaiolas individualizadas, onde permaneceram até o dia do sacrifício.



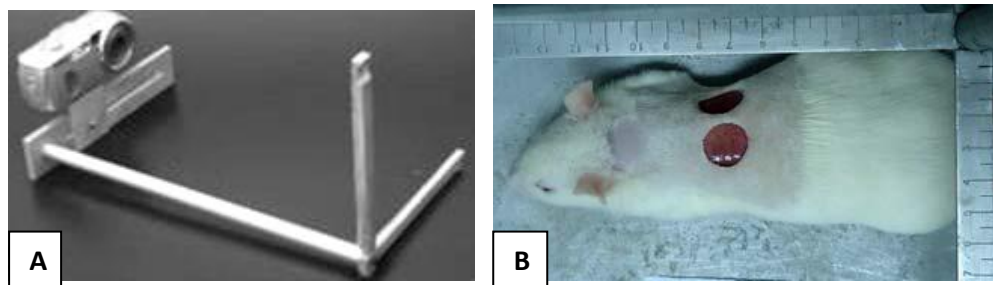
**Figura 3:** Tratamento e curativo oclusivo aplicados aos animais **(A)** Tratamento das úlceras com a pomada contendo apenas o veículo **(B)** Tratamento das úlceras com a pomada contendo o óleo da bocaiúva **(C)** Curativo oclusivo.

### Coleta do material para estudo

Foram eutanasiados 5 animais por grupo e tempo de seguimento (n=10 úlceras), nos dias 2, 7 e 14 em câmara de CO<sub>2</sub>.

Ambas as úlceras de cada animal foram fotografadas separadamente pela câmera digital Sony DSCW320, modo básico (sem flash, sem zoom, resolução de 2 Mega Pixels).

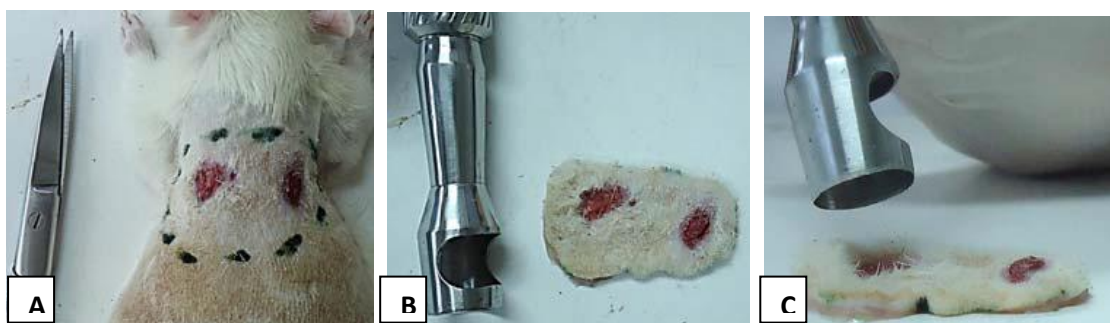
Na aquisição das imagens, foi utilizado um aparato de metal onde a câmera foi fixada numa base de alumínio distando 30 cm de uma régua perpendicular ao animal. Esta régua foi utilizada para a padronização da unidade de área das lesões, em centímetros (figura 4).



**Figura 4** - Suporte utilizado para a aquisição das imagens. **(A)** Suporte utilizado para padronização da fotografia das úlceras e também para aferição das mesmas utilizando o cálculo da área das lesões (em mm<sup>2</sup>). **(B)** Fotografia padronizada da úlcera esquerda de um animal utilizando o suporte.

Em seguida, foram coletadas amostras das úlceras/cicatrices para estudos histológicos (n=5 amostras por tempo e por tratamento) dos animais do grupo GC e GB nos dias 2, 7 e 14. A pele dorsal ao redor das úlceras foi recortada e com o auxílio do *punch* histológico de 1,5 cm de diâmetro foi feita uma biopsia cilíndrica da região de cada úlcera/cicatriz de cada animal (Figura 5).

Uma das amostras de cada animal foi acondicionada em cassetes histológicas, fixada em solução de formaldeído 3,7% e foi seguido processamento habitual para estudo histológico. A outra amostra foi colocada em *ependorf* e imediatamente congelada a -80°C para posterior realização de ensaios bioquímicos para dosagem de hidroxiprolina (OHP) e mieloperoxidase (MPO).



**Figura 5** - Coleta das amostras da úlcera/cicatriz de cada animal para análise **(A)** Região dorsal contendo ambas as úlceras cutâneas. **(B)** Fragmento dorsal recortado contendo ambas as úlceras. **(C)** Excisão circular da úlcera/cicatriz a ser feito com *punch* histológico de 1,5 cm de diâmetro nos dias 2, 7 e 14 nos grupos GC e GB para estudos histológicos e bioquímicos.

### **Avaliação do índice de cicatrização das úlceras pelo ImageJ**

A partir das fotografias, as áreas das úlceras foram calculadas pelo software ImageJ 1.47 e em seguida foi calculado o índice de cicatrização das úlceras (ICU) para análise da reepitelização, cujo valor é equivalente ao quociente entre a diferença das Áreas Inicial e Final e a Área Inicial  $[ICU=(A_i-A_f)/A_i]$ . Valores de ICU maiores que zero representam diminuição da área ulcerada, valores menores que zero representam aumento da área e valores iguais a 1,0 representam reepitelização completa.<sup>10,11,12</sup> área inicial corresponde ao dia do procedimento cirúrgico (dia 0) e a área final corresponde ao dia da eutanásia (dias 2, 7 ou 14 ).

### **Estudo histológico**

As biopsias acondicionadas em cassetes histológicas foram fixadas em solução tamponada de formaldeído 3,7% (pH 7,4) durante 24 horas e posteriormente processados em padrão habitual para o estudo histológico. Após o processamento, os fragmentos foram incluídos em parafina a 60°C e os blocos foram seccionados em cortes histológicos de 3,0 µm e então corados com hematoxilina e eosina para avaliação do infiltrado inflamatório, número de fibroblastos e vasos sanguíneos nas amostras coletadas de cada animal nos diferentes tempos e tratamentos.

### **Avaliação quantitativa por imagem quanto ao infiltrado inflamatório, angiogênese e fibroplasia**

As secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina de cada animal do grupo GC e GB nos diferentes dias de seguimento (n=5 fragmentos por grupo e tempo) foram visualizadas no microscópio óptico LEICA® DM 4000B com câmera LEICA® DFC 280 utilizando o software LAS® - Leica Application Suite - para captura das imagens.

Para a quantificação do infiltrado inflamatório e fibroplasia foram adquiridos 3 campos por lâmina sob aumento de 400x, sendo 1 campo de epiderme e derme



superior, 1 campo de derme inferior 1 campo de hipoderme. Antes do processo de captura das imagens propriamente dito, todas as imagens foram digitalizadas padronizando-se a objetiva, a intensidade da luz do microscópio e a altura do condensador.<sup>13,14</sup>

Para a análise quantitativa da angiogênese foram capturadas imagens em série no sentido epiderme-derme-hipoderme, em aumento de 100x para todos os cortes histológicos. Em seguida, essas imagens foram montadas em série pelo Adobe Photoshop CS5, de modo que a quantificação de vasos sanguíneos fosse realizada por meio de uma imagem que correspondia a toda extensão do tecido cutâneo (epiderme-derme-hipoderme). Foi utilizado o Plugin “Cell Counter” do software ImageJ 1.46 para contagem de células do infiltrado inflamatório, fibroblastos e vasos sanguíneos.

Esse protocolo foi aplicado em 5 amostras diferentes (n=5) de cada tempo e tratamento, sendo o resultado final a média do número de infiltrado inflamatório, fibroblastos e vasos sanguíneos quantificados. A média final encontrada representa a quantidade destas células encontradas em cada uma das 5 amostras estudadas.

### **Avaliação quantitativa por imagem da colagênese**

Para a quantificação histológica da colagênese, foram capturados 6 campos em aumento de 100x de cada lâmina corada com tricrômio de Masson, sendo 3 campos de epiderme e derme superior e 3 campos de derme inferior e hipoderme .

Foi utilizado o Plugin “Colour Deconvolution” do software ImageJ 1.46 para quantificação da porcentagem da cor azul (colágeno) na área total da imagem. Esse protocolo foi aplicado em 5 amostras diferentes (n=5) de cada tratamento e de cada tempo, sendo o resultado final a média da porcentagem de área de colágeno. A média final encontrada representou a quantidade de colágeno em cada uma das 5 amostras estudadas.

### **Determinação do infiltrado neutrofílico**

A densidade do infiltrado neutrofílico na lesão dos animais foi aferida pela dosagem da mieloperoxidase, enzima predominante em grande quantidade nos neutrófilos.<sup>15</sup> Para tanto, as biópsias (n=5 por tempo e por tratamento) dos animais do grupo GC e GB foram acondicionadas em eppendorf's de 2 mL e permaneceram em freezer -80°C até o dia da dosagem, como previamente descrito. Retirados do freezer e mantidos em gelo, os fragmentos foram pesados em balança analítica. Colocou-se 300 µL de tampão 1 (NaPO<sub>4</sub> 0,02M + NaCl 0,1M + Na<sub>2</sub>EDTA 0,015M, pH 4,7) nas amostras para serem totalmente trituradas e homogeneizadas em POLYTRON® PT 3100 a 13000 rpm. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante descartado. O pellet de cada amostra foi ressuspensionado em 1 mL de solução de lise NaCl 2%, homogeneizado no vortex por 30 segundos seguido de nova centrifugação por 15 minutos a 3.000 rpm. Descartado o sobrenadante, o pellet foi ressuspensionado em tampão 2 (NaPO<sub>4</sub> contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio) e centrifugado por 20 minutos a 15.000 rpm, obtendo um sobrenadante final. Em seguida, um volume final de 50 µL (49,5 µL de NaPO<sub>4</sub> e 0,5 µL do sobrenadante das amostras após a última centrifugação) foram colocadas em uma microplaca de 96 poços para o ensaio. Foi feita uma curva padrão de neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal 6 horas após camundongos serem injetados com carragenina. Em cada poço da placa foram adicionados 25 µL de TMB ("3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidine") e em seguida 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A microplaca foi mantida em estufa a 37°C por 5 minutos. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4M e lida em leitor de placas a 450 nm. Os resultados foram expressos em número de neutrófilos x 10<sup>3</sup> /mg de tecido.

### **Análise quantitativa da colagênese**

A análise quantitativa da colagênese por método bioquímico foi realizada por meio da dosagem de hidroxiprolina nas biópsias coletadas dos ratos, mantidas em freezer -80°C, como previamente descrito, seguindo a metodologia proposta por Reddy (1996)<sup>16</sup> e Reddy *et al.* (2008)<sup>17</sup> com algumas modificações.

Para a realização das dosagens de hidroxiprolina, as biópsias foram descongeladas e incubadas em estufa com circulação de ar à temperatura de 60°C em microtubos abertos, overnight (15 horas por amostra). Após a incubação, as amostras foram pesadas em balança analítica até a obtenção de peso constante e então foram transferidas para tubos de ensaio de vidro com tampa. Volumes de ácido clorídrico (HCl) 6N foram adicionados, utilizando-se a proporção de 100 µL de HCl por 1,0 mg de tecido seco. As amostras foram homogeneizadas, por 10 segundos, com o homogeneizador de tecidos Polytron e então submetidas à hidrólise ácida, que consistiu na incubação das amostras em HCl a 130°C durante 4 horas.

Após o período de hidrólise e com as amostras à temperatura ambiente, foram transferidos 500 µL de cada amostra para um tubo de ensaio de vidro para ajustar o pH para 7,0 com hidróxido de sódio (NaOH) 2M. A partir deste hidrolisado, com pH neutro, foram pipetados 10 µL de cada amostra para uma microplaca de 96 poços. Foram preparadas soluções-padrão de hidroxiprolina nas concentrações de 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10; 20; 40; 60; 80 e 100 µg/mL, usando-se o tampão citrato-acetato pH 6,5 como veículo. Após pipetar a curva e as amostras na microplaca, foram adicionados 90 µL de solução de cloramina T 0,056M a cada poço e a microplaca foi incubada à temperatura ambiente durante 25 minutos. Ao final da incubação, as amostras oxidadas em cada poço foram então submetidas à adição de 100 µL do reagente de Ehrlich para a formação do cromóforo. A microplaca foi novamente incubada a 60°C durante 20 minutos.

Após a incubação, a microplaca foi homogeneizada em um homogeneizador para microplacas a 20 rpm durante 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 550 nm, a uma temperatura ambiente. As leituras foram realizadas em períodos não superiores a 30 minutos após o final da incubação. O teste foi realizado em duplicata tanto para as amostras quanto para as soluções-padrão de hidroxiprolina.

### **Análise dos resultados**

Para análise de todas as variáveis foi utilizado o ANOVA para comparação entre os grupos GC e GB em todos os dias de seguimento, sendo utilizado como pós teste o Bonferroni para comparações múltiplas.

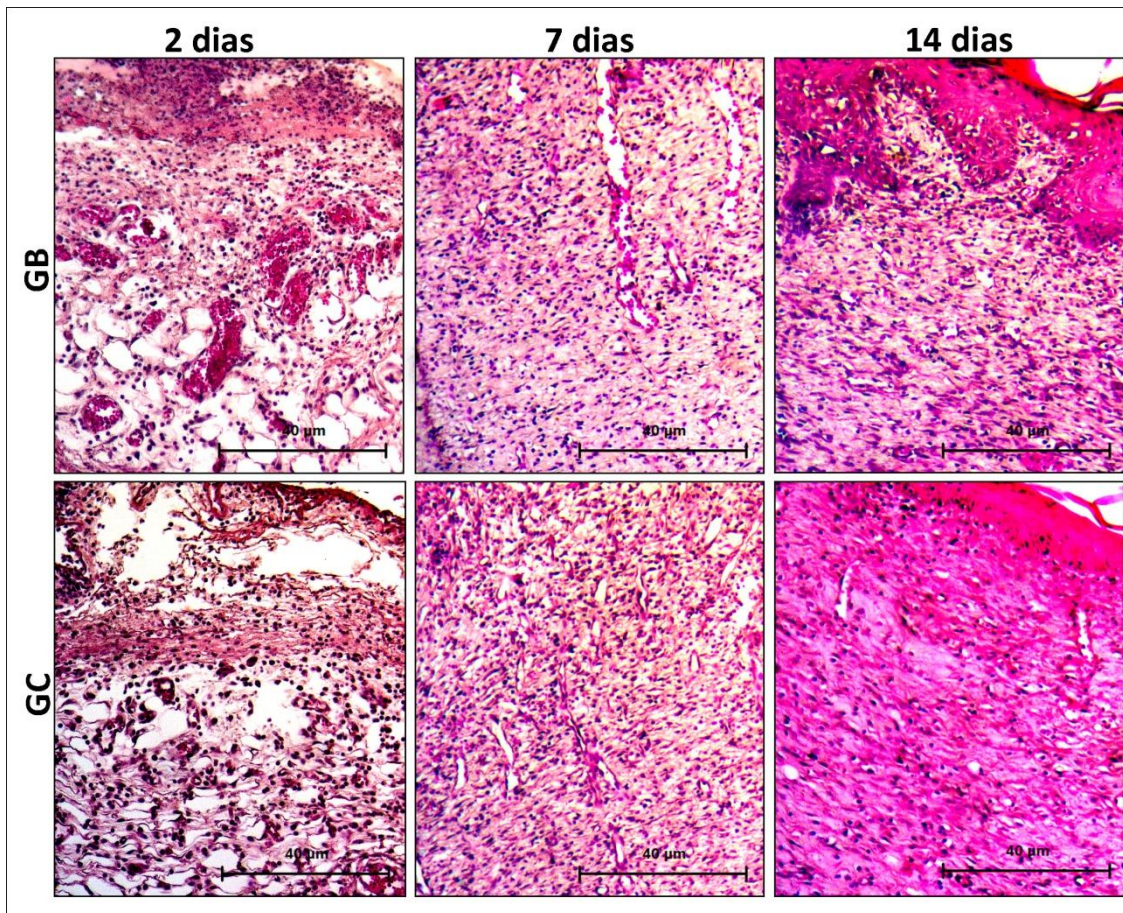
Foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 para realização dos gráficos e dos testes estatísticos. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados como evidências estatísticas de que há diferença entre os dados em questão, com intervalo de confiança de 95%.

## RESULTADOS

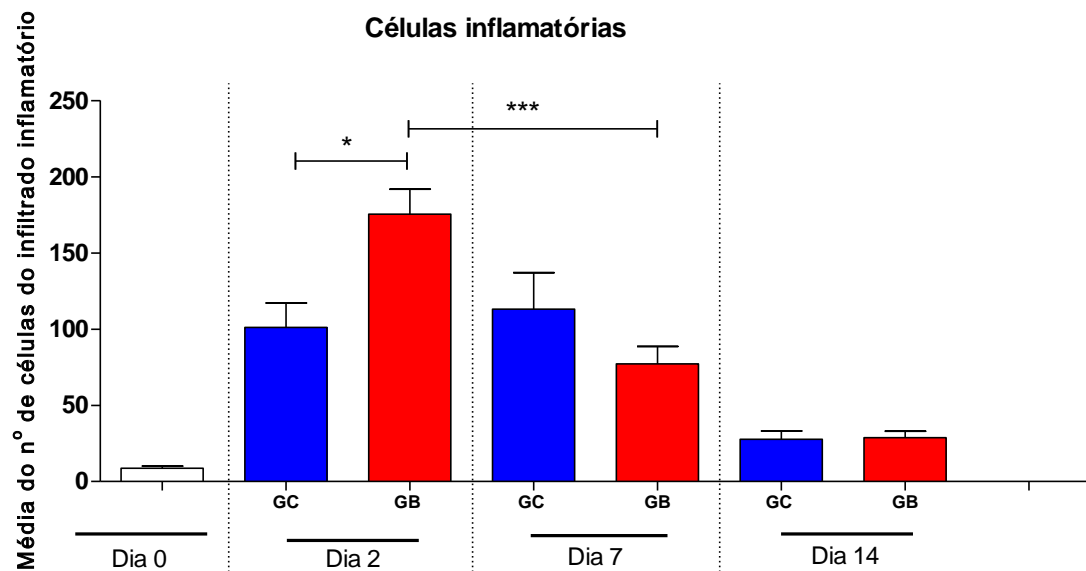
### **Avaliação do infiltrado inflamatório total**

Com a finalidade de avaliar a celularidade durante o processo inflamatório nas úlceras de ambos os grupos experimentais, foi empregada a coloração com hematoxilina e eosina. A análise histológica das úlceras/cicatrizes evidenciou no grupo GB, no 2º dia de seguimento, um denso infiltrado inflamatório composto predominantemente de neutrófilos em todo corte histológico. No 7º dia, ambos os grupos apresentaram quantidades semelhantes de células inflamatórias e no 14º dia, ambos os grupos apresentaram redução do infiltrado inflamatório (Figura 6).

A análise quantitativa do infiltrado inflamatório nas secções histológicas, empregando-se a histomorfometria mostrou, no 2º dia de seguimento, diferença estatística quanto ao número de células inflamatórias entre os grupos, com maior celularidade no grupo GB em relação ao GC. No 7º dia, houve um decréscimo significativo na quantidade de células inflamatórias no grupo GB, quando comparado ao 2º dia, enquanto que no grupo GC, tal decréscimo não foi observado. No 14º dia houve semelhança entre os grupos (Figura 7).



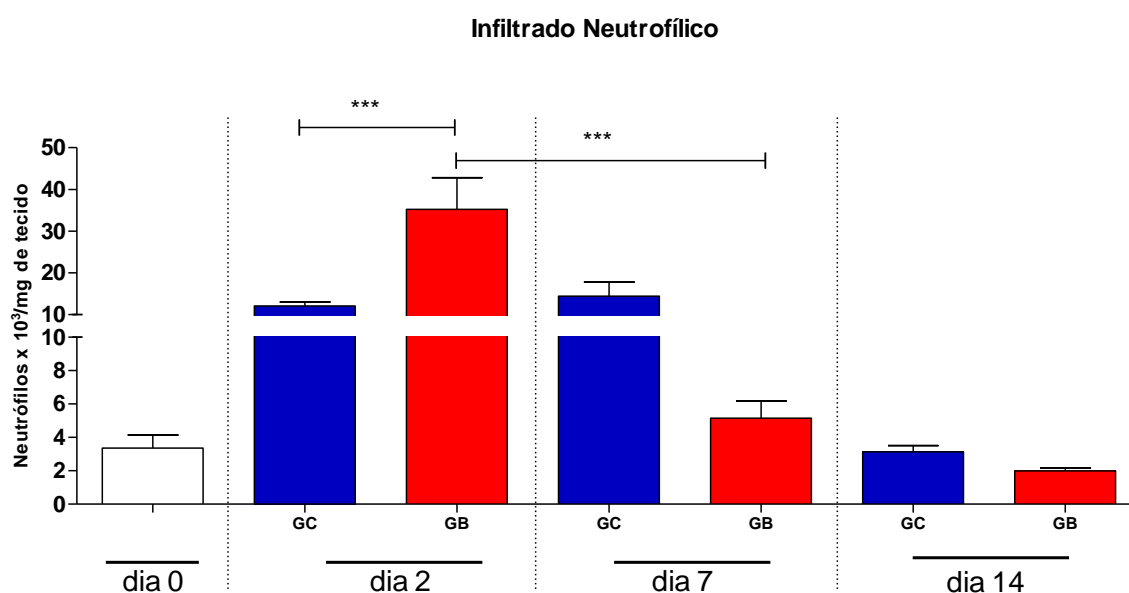
**Figura 6** – Fotomicrografia da área ulcerada de ambos os grupos ao longo do seguimento. Coloração com **hematoxilina e eosina**.



**Figura 7** - Infiltrado inflamatório total nas úlceras cutâneas de ambos os grupos ao longo do seguimento. Valores médios e desvio padrão das células inflamatórias totais, quantificadas pela análise histológica (HE), nas úlceras cutâneas tratadas com o creme contendo apenas o veículo (GC) (n=5) e com o creme contendo o óleo da polpa da bocaiúva a 20% (GB) (n=5) por 2, 7 e 14 dias (ANOVA  $p < 0,0001$ ).

## Determinação do infiltrado neutrofílico

Com a finalidade de avaliar bioquimicamente a participação neutrofílica no processo inflamatório, empregou-se o método de dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO) nos diferentes dias de tratamento entre os grupos. Como se verifica, na figura 7, no 2º dia ambos os grupos apresentaram quantidades elevadas da enzima mieloperoxidase. No 7º dia, o grupo GB apresentou uma redução importante do infiltrado neutrofílico em relação ao seu 2º dia. No 14º dia, ambos os grupos apresentaram-se semelhantes e com quantidades reduzidas de MPO em relação aos dias anteriores (Figura 8).

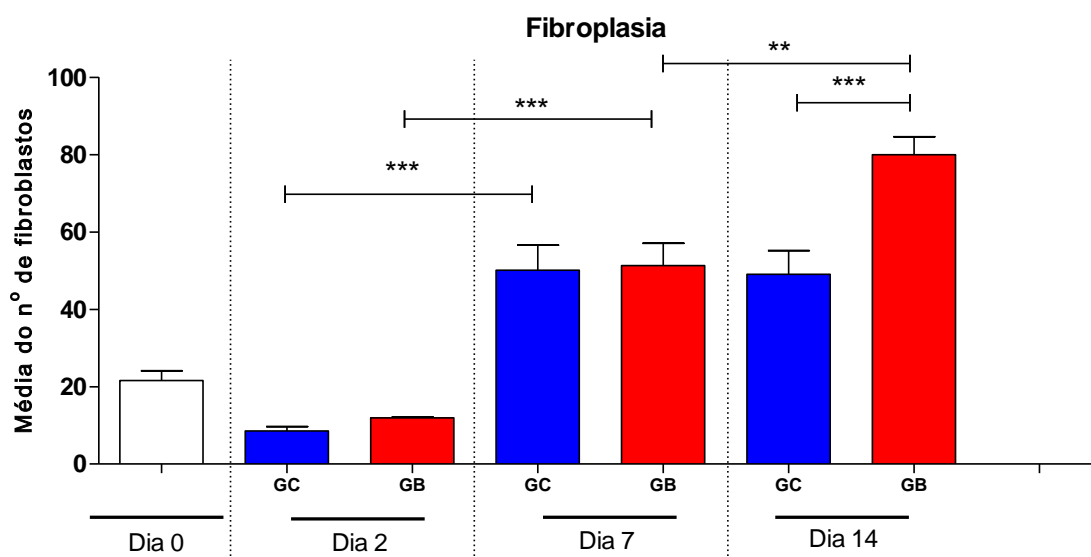


**Figura 8-** Quantificação do infiltrado neutrofílico por meio da dosagem de mieloperoxidase nas úlceras cutâneas de ambos os grupos ao longo do seguimento. Valores médios e desvio padrão de neutrófilos observados nas úlceras cutâneas tratadas com o creme contendo apenas o veículo (GC) (n=5) e com o creme contendo o óleo da polpa da bocaiúva a 20% (GB) (n=5) por 2, 7 e 14 dias (ANOVA  $p < 0,0001$ ).

## Avaliação da fibroplasia

Pela análise histológica (coloração HE) das úlceras/cicatrizes, observou-se importante estímulo à fibroplasia no 7º e 14º dias em ambos os grupos com alto grau de diferenciação.

Em relação à análise quantitativa da fibroplasia, no 2º dia de seguimento ambos os grupos apresentaram quantidades reduzidas e semelhantes de fibroblastos. No 7º dia, ambos os grupos apresentaram importante proliferação de fibroblastos em relação ao 2º dia. No 14º dia houve aumento na quantidade de células no grupo GB em relação ao 7º dia, o que não foi observado no grupo GC. Os grupos GC e GB apresentaram diferenças significativas entre si no 14º dia, com maiores quantidades de células no grupo GB em relação ao grupo GC (Figura 9).

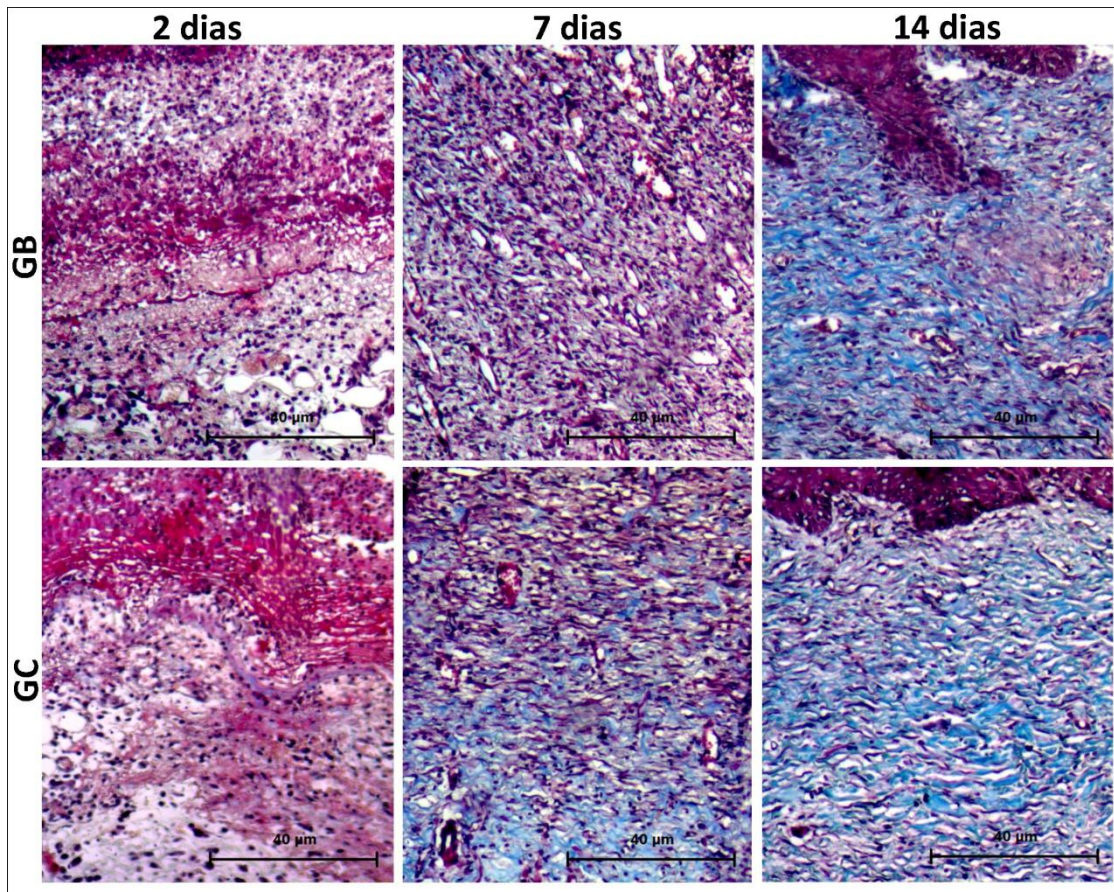


**Figura 9** – Fibroplasia nas úlceras cutâneas de ambos os grupos ao longo do seguimento. Valores médios e desvio padrão dos fibroblastos, quantificados por meio da análise histológica (HE), nas úlceras cutâneas tratadas com o creme contendo apenas o veículo (GC) (n=5) e o creme contendo o óleo da polpa da bocaiúva a 20% (GB) (n=5) por 2, 7 e 14 dias (ANOVA  $p < 0,0001$ )

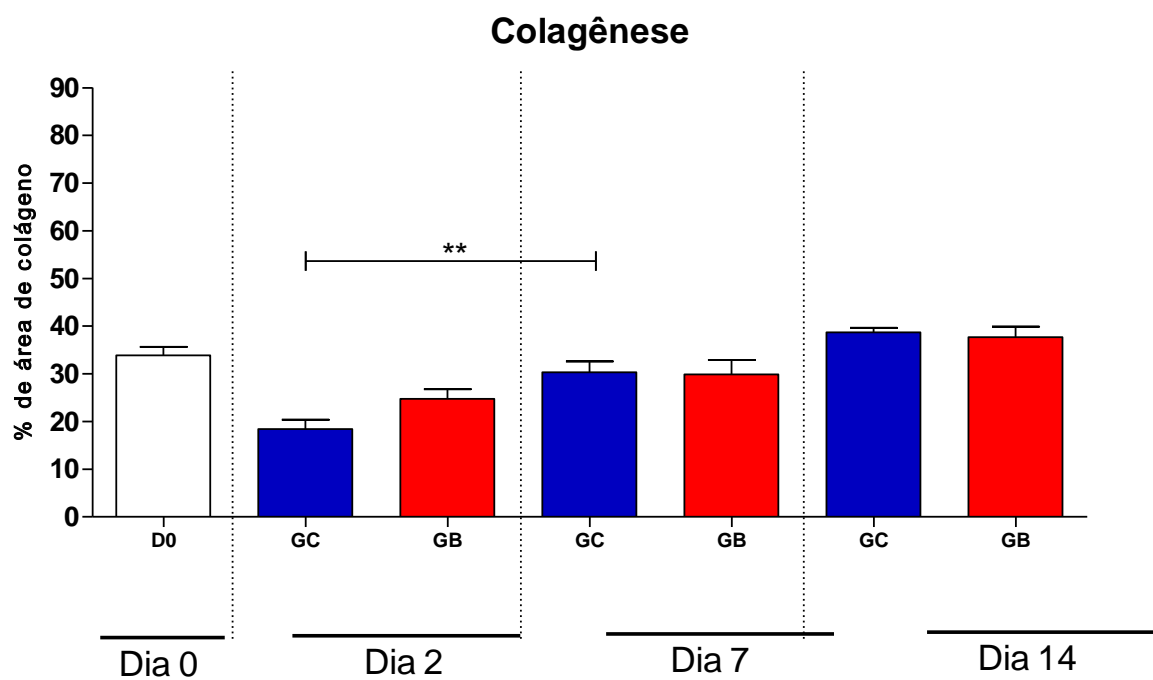
### Avaliação por imagem da colagênese

A análise histológica para a quantificação da formação de colágeno foi determinada pela porcentagem da área total em azul nas seções histológicas por meio da coloração de tricrômio de Masson. Tal análise revelou quantidade estatisticamente semelhante de colágeno entre os grupos ao longo do seguimento (Figura 10), com apenas o grupo controle apresentando aumento no colágeno do 2º para o 7º dia de seguimento (Figura 11).





**Figura 10** - Produção colagênica no grupo controle (GC) e no grupo tratado com a pomada contendo o óleo da polpa da bocaiúva (GB).

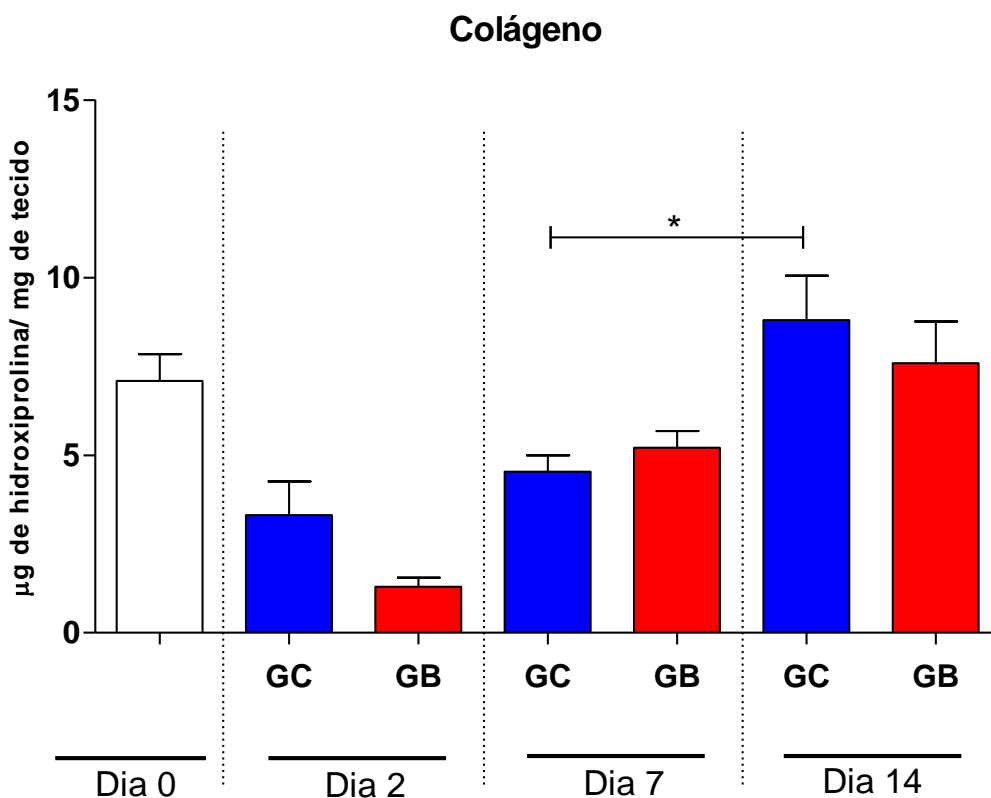


**Figura 11** - Quantificação do colágeno nas úlceras do grupo controle (GC) e do grupo tratado com o creme contendo o óleo da polpa da bocaiúva (GB).

### Análise quantitativa da colagênese

Após a obtenção do peso seco de cada biópsia, as mesmas foram processadas para a análise quantitativa da colagênese por meio da dosagem de hidroxiprolina. Ao final do experimento, realizou-se a leitura de absorbância a 550nm das microplacas de 96 poços.

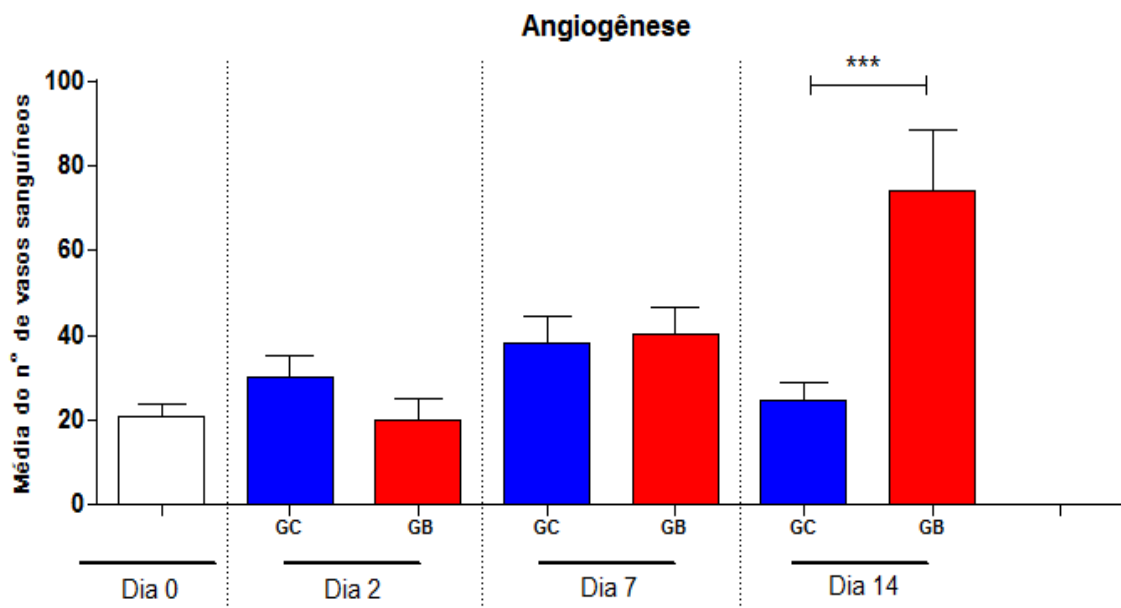
De acordo com a figura 12, apesar de não ter ocorrido diferenças estatísticas na concentração de OHP entre os grupos GC e GB quando nos mesmos dias de tratamento, pode-se observar que ocorreu um aumento na concentração de hidroxiprolina em ambos os grupos no 14º dia, de modo que o grupo GC apresentou maiores concentrações, quando comparado ao 7º dia.



**Figura 12** – Análise quantitativa da colagênese por meio da dosagem de Hidroxiprolina nas úlceras cutâneas de ambos os grupos ao longo do seguimento. Valores médios e desvio padrão do colágeno (por dosagem bioquímica) nas úlceras cutâneas tratadas com o creme contendo apenas o veículo (GC) (n=5) e com o creme contendo o óleo da polpa da bocaiúva a 20% (GB) (n=5) por 2, 7 e 14 dias (ANOVA  $p < 0,0001$ ).

## Avaliação da angiogênese

Na análise histológica quantitativa da angiogênese, foram feitas contagens de vasos sanguíneos em secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina. Não houve diferença estatística entre os grupos GB e GC durante o 2º e 7º dias. Porém, observou-se aumento pronunciado da quantidade de vasos no 14º dia no grupo GB, conforme apresentado na figura 13.

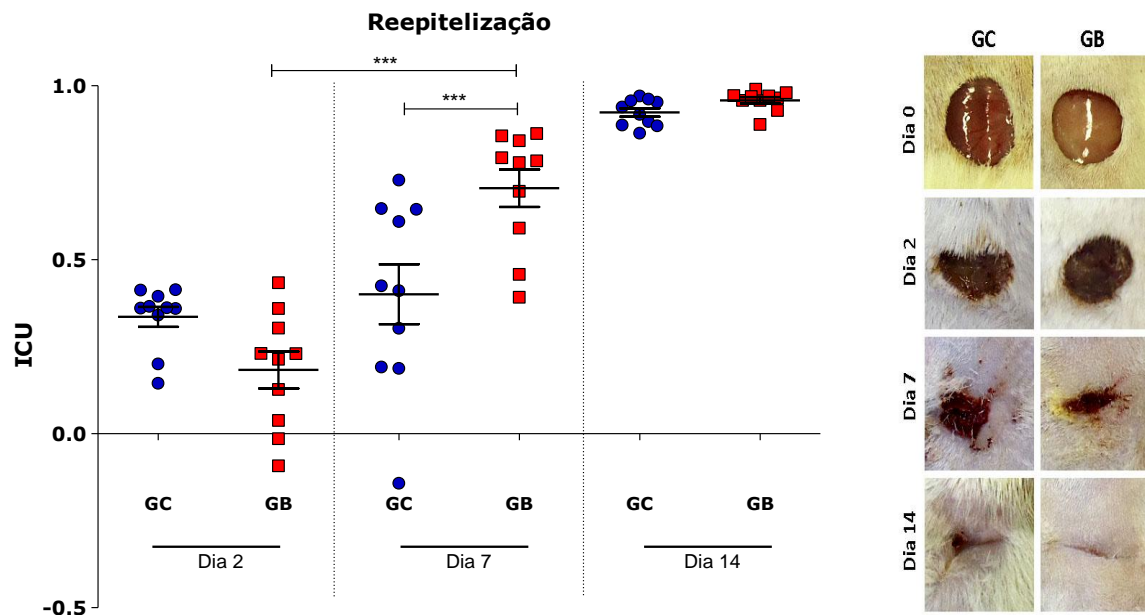


**Figura 13** - Angiogênese nas úlceras cutâneas de ambos os grupos ao longo do seguimento. Valores médios e desvio padrão de vasos sanguíneos, quantificados por meio de análise histológica (HE), nas úlceras cutâneas tratadas com o creme contendo apenas o veículo (GC) (n=5) e o creme contendo o óleo da polpa da bocaiúva a 20% (GB) (n=5) por 2, 7 e 14 dias (ANOVA  $p < 0,0001$ ).

## Avaliação da reepitelização das úlceras (ICU)

Para o estudo da reepitelização foi calculado o índice de cicatrização das úlceras (ICU) considerando a área da úlcera (calculada pelo software ImageJ) no início e no último dia de acompanhamento. Foi encontrada diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) entre os diferentes grupos na análise da reepitelização. Comparando a reepitelização dos grupos GB e GC, no 2º dia ambos os grupos apresentaram reepitelização semelhante. No 7º dia, as úlceras do grupo GB apresentaram maior

grau de reepitelização em relação ao grupo GC, assim como aumento da reepitelização quando comparado ao grupo GC no 2º dia de tratamento. Ao 14º dia, a maioria das úlceras de ambos os grupos já estava totalmente cicatrizada, embora as úlceras do grupo GB apresentassem maior qualidade de cicatriz e fechamento evidente (Figura 14).



**Figura 14** – Reepitelização das úlceras cutâneas nos dois grupos experimentais ao longo do seguimento. Quantificação da reepitelização (pelo índice de cicatrização das úlceras) das úlceras cutâneas tratadas com o creme contendo apenas o veículo (GC) e o creme contendo o óleo da polpa da bocaiúva a 20% (GB) por 2, 7 e 14 dias (ANOVA  $p < 0,0001$  )

## DISCUSSÃO

Úlceras cutâneas constituem um importante problema de saúde pública que afeta milhões de pacientes em todo o mundo, devido a sua cronicidade e alta morbidade.<sup>18</sup> O processo de cicatrização é extremamente complexo e caracterizado por uma série progressiva de eventos celulares, moleculares e bioquímicos com o objetivo de restaurar a integridade mecânica e função barreira da pele.<sup>19</sup> Vários estudos têm sido desenvolvidos intentando a melhor compreensão do processo cicatricial, assim como a busca por diferentes alternativas para o tratamento dos pacientes com úlceras cutâneas.<sup>18</sup>

Muitos produtos naturais (de origem animal ou vegetal) provenientes da biodiversidade brasileira são conhecidos por apresentarem atividades biológicas importantes, havendo uma série de trabalhos que atestam tais propriedades. Apesar disto, para a maioria desses produtos ainda não há estudos sistematizados comprovando sua eficácia clínica e segurança.<sup>18,19</sup> Dentre esses produtos encontra-se o óleo da polpa da bocaiúva, que, devido à sua composição tem sido empregado na alimentação humana como fonte complementar de nutrientes essenciais, além de ser utilizado popularmente para fins medicinais e cosméticos.<sup>20,21</sup>

Dados sobre a composição química do óleo da polpa da bocaiúva mostram quantidades consideráveis de carotenóides, principalmente beta-caroteno, que exibe ação antioxidante e impede a lipoperoxidação, além de conferir proteção à pele.<sup>22,23,24</sup> Além dos carotenoides, Coimbra e Jorge (2011)<sup>25</sup> relataram altos teores de tocoferol no óleo da polpa da bocaiuva os quais também apresentam atividade antioxidante e representam uma importante fonte de vitamina E. Nos óleos vegetais, os tocoferóis atuam protegendo os ácidos graxos insaturados da oxidação lipídica.

O óleo também apresenta quantidades importantes de ácidos graxos insaturados, dos quais os presentes em maiores concentrações são os ácidos oleico (65,87%) e linoleico, (5,1%), apresentando também uma quantidade discreta de ácido linolênico (2,52%).<sup>26</sup>

Os ácidos graxos exercem importantes papéis na resposta imunológica e inflamatória.<sup>27</sup> Eles funcionam como combustíveis para a geração de energia, são componentes de fosfolipídios de membrana, reguladores de expressão de genes, precursores da síntese de mediadores bioativos que funcionam como fonte de

segundos mensageiros e substrato para a síntese de moléculas como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas.<sup>28</sup>

Diversos são os relatos quanto às propriedades farmacológicas de várias das substâncias que compõem o óleo de forma isolada, porém não há estudos quanto ao uso do óleo na cicatrização de úlceras cutâneas. No presente estudo, foi utilizada como tratamento uma formulação para uso tópico contendo 20% do óleo da polpa da bocaiúva incorporado em creme base lanette. A escolha da concentração do óleo na pomada foi baseada em estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa (dados não publicados), nos quais os melhores resultados quanto à ação antioxidante e antimutagênica foram obtidos na concentração de 20%. Além disso, esta concentração proporciona a obtenção de uma pomada de consistência adequada, permitindo boa permanência no local da ferida.

Existem numerosos estudos na literatura a respeito do processo cicatricial ser beneficiado pela umidade no leito da úlcera, por promover o desbridamento autolítico e a migração celular.<sup>29,30</sup> A pomada e a cobertura utilizadas promoveram um curativo úmido oleoso, que, além de ter evitado a desidratação tecidual e diminuído a chance de traumatismos durante as trocas diárias, nos animais tratados também contou com as propriedades das substâncias presentes no óleo.<sup>2,31,32</sup> Assim, a manutenção da umidade adicionada à utilização do óleo também podem ter contribuído para a migração celular e melhor fechamento das úlceras observado no grupo tratado.

A evolução do processo cicatricial em animais tratados com o óleo da polpa de bocaiuva foi realizada a partir do emprego de metodologias que avaliam parâmetros correspondentes às diversas fases da cicatrização. Para a avaliação da fase inflamatória do processo cicatricial, foi empregada a quantificação das células inflamatórias, com ênfase aos neutrófilos, principais células nessa fase. Neste contexto, os neutrófilos desempenham um papel muito importante, já que são as primeiras células inflamatórias recrutadas para a lesão por possuírem menor tamanho e também por serem as primeiras a responder após a formação do coágulo. No leito da úlcera os neutrófilos liberam enzimas proteolíticas, tal como a MPO, para a digestão de restos celulares e contribuem para a morte de bactérias. Havendo total descontaminação da úlcera, os neutrófilos entram em apoptose dentro de 48 horas. Porém, se o estímulo for persistente a função neutrofílica se perpetua

produzindo diversas enzimas proteolíticas, que podem degradar o tecido, prejudicando o processo cicatricial.<sup>33-38</sup>

Observou-se denso infiltrado inflamatório na análise histológica (HE) do grupo de animais tratados com o creme contendo o óleo da polpa da bocaiúva no 2º dia de seguimento, com diminuição do número de células do 2º para o 7º dia. O aumento do número de células inflamatórias parece ter favorecido o desbridamento autolítico da úlcera, já que intensificou a fase inflamatória, além de possivelmente ter estimulado a produção de citocinas e fatores de crescimento que induziriam às fases subsequentes do processo cicatricial.

Mesmo sendo um processo importante no reparo tecidual por preparar o ambiente da úlcera para a regeneração, a resposta inflamatória não deve ser muito intensa e persistente, pois a inflamação excessiva pode atrasar a evolução do processo de cicatrização por promover edema, quantidade excessiva de exsudato, os quais favorecem deiscência, crescimento bacteriano e distúrbio no equilíbrio entre síntese e degradação de colágeno.<sup>39,40</sup>

A dosagem de MPO, enzima produzida predominantemente por neutrófilos, indicou que o infiltrado neutrofílico em ambos os grupos apresentou-se intenso no 2º dia e em maior quantidade no grupo GB. Este mesmo grupo apresentou uma diminuição importante na concentração de neutrófilos do 2º para o 7º dia enquanto que o grupo GC não apresentou diminuição significativa, continuando com a concentração de MPO semelhante aos dias iniciais.

Os resultados tanto da análise histológica do infiltrado inflamatório total quanto do infiltrado neutrofílico (MPO) sugerem que o óleo da polpa da bocaiúva estimulou a participação das células inflamatórias, principalmente neutrófilos, na fase inicial do processo de reparo e regulou a resposta inflamatória nas fases subsequentes no grupo GB, diferente do grupo GC, onde essa regulação não ocorreu e a presença das células inflamatórias, com predominância de neutrófilos, se manteve intensa até o 7º dia.

As variações no índice de reepitelização das úlceras (ICU) acompanharam aquelas obtidas quanto à presença de células inflamatórias, já que o grupo GB apresentou aumento do ICU do 2º para o 7º dia, assim como também aumentou no grupo GB quando comparado ao controle no 7º dia. Pode-se sugerir que o aumento do infiltrado inflamatório no grupo GB no 2º dia e sua posterior redução acompanhada do aumento na reepitelização das úlceras, indica que a fase



inflamatória foi eficiente no desbridamento da ferida porém não persistente, favorecendo a evolução da cicatrização e a mais rápida reepitelização.

O óleo da polpa da bocaiúva, assim como todos os óleos vegetais de maneira geral, possui diversos constituintes diferentes, portanto, não se sabe se os efeitos observados são devido aos ácidos graxos insaturados, a outros componentes menores presentes em sua composição ou mesmo a esses componentes associados. No entanto, substâncias que compõem o óleo, especialmente o ácido oleico e linoleico, têm demonstrado impacto sobre várias doenças crônicas e vêm sendo alvo de investigações quanto ao emprego na cicatrização devido ao seu papel imunomodulador, que é demonstrado em diversos estudos.<sup>41-46</sup>

A modulação da resposta inflamatória observada pode ser atribuída à alta disponibilidade de ácido oleico presente no óleo da polpa da bocaiúva, já que esse ácido graxo induz a uma resposta inflamatória local menos intensa e compete com os ácidos linoleico e linolênico pelas mesmas enzimas (cicloxygenases e lipoxigenases), sintetizando mediadores inflamatórios menos potentes do que aqueles gerados pelo ácido araquidônico.<sup>47-50</sup>

Pereira e colaboradores (2008)<sup>51</sup> realizaram experimentos *in vivo* e *in vitro* com o objetivo de avaliar os efeitos dos ácidos graxos oleico e linoleico na fase inflamatória da cicatrização de feridas. Foram observadas mudanças significativas quanto aos parâmetros analisados nos grupos experimentais que receberam o tratamento tópico com os ácidos em questão. Houve evidências de ação pró inflamatória, com aumento da massa e do conteúdo protéico da ferida e do influxo de neutrófilos. Os autores também observaram aumento na produção das citocinas VEGF-a, IL-1b e CINC-2a/b por neutrófilos, as quais exercem efeitos importantes na resposta inflamatória, podendo representar um dos possíveis mecanismos pelo qual os ácidos graxos atuam no processo cicatricial.

Cardoso (2004),<sup>52</sup> investigou o efeito da administração tópica dos ácidos graxos oleico, linoleico e linolênico em feridas cutâneas induzidas cirurgicamente em ratos. Observou-se que o grupo que recebeu o tratamento tópico com ácido oleico (n-9) obteve um fechamento mais rápido das lesões, quando comparado aos demais grupos, tratados com os ácidos linolênico (n-3) e linoleico (n-6). Tais resultados permitem sugerir que a mais rápida reepitelização ocorrida no grupo de animais tratados com a pomada contendo o óleo da polpa da bocaiúva, no presente estudo, pode estar relacionada à elevada concentração de ácido oleico presente no óleo.



Em estudo realizado por Rodrigues e colaboradores (2012),<sup>53</sup> foram mensurados os efeitos da administração oral dos ácidos graxos oleico e linoleico na fase inflamatória da cicatrização de feridas. Tanto no grupo tratado com ácido linoleico quanto no tratado com ácido oleico, houve estímulo à aceleração e resolução da fase inflamatória, com precoce ativação de fatores de transcrição, produção de mediadores inflamatórios e influxo de células com posterior inibição dos mesmos.

Os resultados obtidos por Rodrigues e colaboradores (2012),<sup>53</sup> corroboram a hipótese de que, neste estudo, os ácidos graxos presentes no óleo da polpa da bocaiúva tenham participado ativamente do processo cicatricial por meio da modulação da resposta inflamatória, provocando uma aceleração da fase inflamatória seguida de posterior e drástica redução da mesma, como observado pelo autor.

Cardoso (2011),<sup>54</sup> relatou diminuição na presença de macrófagos e linfócitos em feridas tratadas com ácido oleico nos tempos de 24 e 120 horas após a indução da lesão, sendo a redução neste último tempo mais acentuada. Também ocorreu o mais rápido fechamento das lesões no grupo tratado com ácido oleico. O autor atribui a diminuição do influxo destas células inflamatórias ao efeito gerado pelo balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias alteradas quando aplicado o tratamento com o ácido graxo. A alteração na quantidade de neutrófilos, não reportada pelo autor, pode representar que seus resultados são parcialmente concordantes com os do presente estudo, já que neste, o tipo celular predominante no pico da fase inflamatória são os neutrófilos. Sendo assim, pode-se sugerir que a composição do óleo da polpa da bocaiúva promova uma proporção adequada entre citocinas pró e anti inflamatórias, levando ao rápido e eficiente desbridamento e à diminuição do influxo de células inflamatórias posteriormente.

O colágeno constitui o principal componente estrutural do tecido de granulação, fortalece a matriz extracelular e, finalmente, irá repor a matriz provisória de fibrina. A hidroxiprolina é usada como um marcador bioquímico para o colágeno tecidual, assim como um indicativo positivo da progressão da cicatrização.<sup>55,56</sup>

A colagênese foi avaliada por meio da dosagem de hidroxiprolina (OHP) e também pela avaliação por imagem, de lâminas coradas com tricrômio de masson. A dosagem de colágeno (OHP) apresentou-se semelhante entre os grupos quando nos mesmos dias de tratamento, ocorrendo apenas aumento no grupo GC do 7º

para o 14º dia. Na quantificação do colágeno por método de imagem, houve aumento também no grupo GC, porém, este ocorreu apenas do 2º para o 7º dia, diferente do período observado na dosagem de hidroxiprolina. Como as duas metodologias aplicadas foram completamente distintas, as diferenças nos resultados observadas entre os métodos utilizados, podem ter ocorrido devido à natureza dos mesmos.

Mesmo não havendo aumento no colágeno no grupo tratado em ambas as metodologias, a fibroplasia avaliada pelo estudo histológico (HE) revelou aumento significativo no número de células no grupo GB no 14º dia. A ausência de alteração na produção de colágeno nos animais tratados com o óleo da polpa da bocaiúva, acompanhada do aumento do número de fibroblastos, evidencia que são necessários mais estudos, com novas formulações e formas de tratamento para elucidar a influência do óleo da polpa da bocaiúva sobre a fibroplasia e deposição de colágeno.

Franco e colaboradores (2012),<sup>57</sup> investigaram o efeito da aplicação tópica de formulações contendo óleo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) em feridas cutâneas induzidas em ratos. Os autores observaram maior número de células inflamatórias e maior reepitelização nos grupos tratados e não encontraram diferenças significativas a respeito da quantidade de fibroblastos, densidade de colágeno e resistência mecânica nas cicatrizes entre os grupos no 14º dia de tratamento. Vale ressaltar que óleo de linhaça, assim como o óleo da polpa da bocaiúva, é rico em ácidos graxos insaturados, no entanto a substância predominante é o ácido linolênico. Assim, estes resultados condizem parcialmente com os encontrados no presente estudo, já que neste, também não foram observadas alterações significativas no conteúdo de colágeno nos animais tratados, mesmo havendo estímulo à presença de células inflamatórias e aumento da reepitelização das feridas.

Quanto ao colágeno, resultados semelhantes também foram obtidos por Albina e colaboradores (1993),<sup>58</sup> que estudaram a influência de uma dieta rica em ácido linolênico na deposição de colágeno (após 30 dias) e na resistência mecânica na pele de ratos por tração da incisão cirúrgica (após 10 dias) e não encontraram diferenças significativas entre os grupos.

A angiogênese é de suma importância para o processo cicatricial, especialmente durante a fase inflamatória, devido à intensa necessidade de nutrientes e oxigênio para o tecido, já que as células estão em alto gasto energético

em razão das intensas mitoses e ativação celular para o desbridamento tecidual.<sup>59</sup> tempo esperado para ocorrer o pico na angiogênese durante o reparo de úlceras cutâneas é em torno do 7º dia após a lesão, porém, o aumento na angiogênese ocorreu apenas no grupo GB no 14º dia.

Batista e colaboradores (2010)<sup>60</sup> avaliaram os efeitos provocados na cicatrização de úlceras cutâneas pela aplicação tópica de creme contendo óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) o qual, assim como o óleo da polpa da bocaiúva, também apresenta elevada concentração de ácidos graxos insaturados com predominância de ácido oleico além de elevada concentração de carotenoides. Além da redução significativa da área das lesões e do influxo de células inflamatórias e aumento do número de fibroblastos, o autor relatou aumento do número de vasos sanguíneos no 7º dia de tratamento, ou seja, dentro do período esperado.

Por outro lado, Oliveira e colaboradores (2013)<sup>61</sup> investigaram o efeito da aplicação tópica de uma formulação contendo o óleo do abacate (*Persea Americana* Mill), também rico em ácidos graxos insaturados e carotenoides, em feridas cutâneas. Embora tenha encontrado resultados semelhantes aos de Batista (2010)<sup>61</sup> quanto aos efeitos na resposta inflamatória e fechamento das úlceras, não houve diferença quanto ao número de vasos sanguíneos entre os animais tratados e o grupo controle.

Tais resultados reforçam a ideia de que, como os óleos vegetais são constituídos por inúmeras substâncias além das já mencionadas (ácidos graxos insaturados e carotenoides), cada óleo apresenta particularidades quanto à ação farmacológica devido à suas composições e características próprias, geradas pela proporção e pela ação sinérgica entre seus componentes. Assim, os resultados observados no óleo da polpa da bocaiúva quanto à angiogênese permitem sugerir que o não aparecimento desta dentro do tempo esperado pode estar associada a algum componente menor do óleo, que estaria interferindo neste processo.

É importante salientar que, como o processo cicatricial evolui constantemente, certas substâncias podem deixar de ser a melhor indicação para o tratamento das úlceras após alguns dias.<sup>62</sup> Portanto, o fato de os animais tratados com o óleo terem apresentado aumento na angiogênese após o período esperado e não terem a síntese de colágeno aumentada pode representar que em fases tardias da cicatrização a formulação utilizada no estudo não seja a mais adequada. Contudo, vale ressaltar que esses eventos não impediram que as úlceras tratadas evoluíssem

para uma mais rápida reepitelização quando comparadas às úlceras não tratadas, mantendo a importância da utilização do tratamento durante os primeiros dias do processo cicatricial.

Os dados presentes na literatura quanto à utilização de óleos vegetais, especialmente aqueles ricos em ácidos graxos insaturados, somados aos achados do presente estudo, implicam em um relevante papel e potencial terapêutico do óleo da polpa da bocaiúva no tratamento de úlceras cutâneas, principalmente quanto à sua participação na fase inflamatória do processo cicatricial.

## REFERÊNCIAS

1. Oliveira AF, Batista JS, Paiva ES, *et al.* Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. *Rev Bras Pl Med* 2010; 12: 302-10.
2. Mandelbaum SR, di Dantis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. *An bras Dermatol* 2003; 78: 525-42.
3. Padgett DA, Marucha PT, Sheridan JF. *Psychoneuroimmunology* 2007; 2: 837-50.
4. Tabatabai MA, Eby WM, Singh KP. Hyperbolic modeling of wound healing. *Mathematical and Computer Modelling* 2011; 53: 755-68.
5. Vargas NRC, Coelho FS, Mendieta MC. *et al.* Plantas medicinais utilizadas para cicatrização de feridas pelos produtores rurais de agricultura de base ecológica do sul do Rio Grande do Sul. *XVIII CIC e XI Enpos*. 2009.
6. Ferreira AM, Souza BMV, Rigotti MA, Loureiro MRD. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. *Rev Esc Enferm USP* 2012; 46: 752-60.
7. Argandoña EJS, Chuba CAM. Caracterização biométrica, física e química de frutos da palmeira bociuva *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. *Rev. Bras. Frutic* 2011; 33:3 1023-28.
8. Ramos MIL, Ramos filho MM, Hiane PA, *et al.* Qualidade nutricional da polpa de bociuva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciênc. Tecnol. Aliment* 2008; 28: 90-4.
9. Munhoz CL, Guimarães RCA, Nozaki VT, *et al.* Frutos de bocaiúva: caracterização física e perfil de ácidos graxos dos óleos. *4º Seminário de agroecologia de Mato Grosso do Sul* - Glória de Dourados, 2012.
10. Robson MC, Hill DP, Woodske ME, Steed DL. Wound healing trajectories as predictors of effectiveness of therapeutic agents. *Archives of Surgery* 2000; 135:7 773- 7.
11. Caetano KS, Frade MAC, Minatel DG, *et al.* Phototherapy improves healing of chronic venous ulcers. *Photomedicine & Laser Surgery* 2009; 27:1 111-8.
12. Minatel DG, Frade MAC, Franca S, Enwemeka CS. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. *Lasers in Surgery and Medicine* 2009; 41: 433-41.
13. Gonçalves RO, Silva EM, Marques TC, Lopes Filho GJ. Avaliação histoquímica quantitativa do colágeno na fascia transversalis e na bainha anterior do músculo reto abdominal em doentes com hérnia inguinal. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias* 2003; 30:4 286-92.

14. Andrade TA, Iyer A, Das PK, *et al.* The inflammatory stimulus of a natural látex biomembrane improves healing in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2011; 44:10 1036-47.
15. Souza, D. G.; Cassali, G. D.; Poole, S.; Teixeira, M. M. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology* 2001;134:5 985-94.
16. Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clinical Biochemistry* 1996; 29:3 225-9.
17. Reddy AS, Kalyani S, Kumar NS, *et al.* Dehydration of 1,4-dioxane by pervaporation using crosslinked calcium alginate-chitosan blend membranes. *Polymer Bulletin* 2008; 61:6 779–90.
18. Ranzato E, Martinotti S, Burlando B. Wound healing properties of jojoba liquid wax: an in vitro study. *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 134:2 443-9.
19. Schultz GS, Davidson JM, Kirsner RS *et al.* Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair and Regeneration* 2011; 19:2 134-48.
20. Lorenzi GMAC. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. – Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável. *Tese (Doutorado em Ciências Agrárias)* Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
21. Ramos MIL, Ramos Filho MM, Hiane PA, *et al.* Qualidade nutricional da polpa de bociuva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciênc. Tecnol. Aliment* 2008; 28: 90-4.
22. Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr* 1999; 12:2 123-30
23. Ciconini G, Favaro SP, Souza CFT, *et al.* Óleo de polpa da macaúba: variabilidade das características físico-químicas em plantas do Mato Grosso do Sul. *IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas* João Pessoa, PB, 2010.
24. Ramos DD, Vieira, MC, Formagio ASN, *et al.* Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. *Ciência Rural* 2011; 41:8 1331-6.
25. Coimbra MC, Jorge N. Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palmfruits. *Food Research International* 2011; 44:7 2139-42.
26. Hiane PA, *et al.* Bociuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., pulp and kernel oils: characterization and fatty acid composition. *Braz J Food Technol* 2005; 8:3.256-9.
27. Cabral GA. Lipids as bioeffectors in the immune system. *Life Sciences* 2005; 77: 1699–710.

28. Calder P. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2007; 77: 327–35.
29. Nardi AB, Rodaski S, Sousa RS, *et al.* Cicatrização secundária em feridas dermoepidérmicas tratadas com ácidos graxos essenciais, vitaminas A e E, lecitina de soja e iodo polivinilpirrolidona em cães. *Archives of Veterinary Science* 2004; 9:1 1-16.
30. Kumar MS, Klrubanandan S, Sripriya R, Sehgal PK. Triphala promotes healing of infected full-thickness dermal wound. *Journal of Surgical Research* 2008; 144: 94-101.
31. Marques SR, Peixoto CA, Messias JB, *et al.* The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound in lambs. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2004; 19:3 91-103.
32. Hatanaka E, Curi R. Fatty acids and wound healing: a review. *Revista Brasileira de Farmácia* 2007; 88:2 53-8.
33. Fierro IM, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ, Ferreira SH. The involvement of nitric oxide in the anti-candida albicans activity of rat neutrophils. *Immunology* 1996; 89:2 295-300.
34. Fierro IM, Nascimento-Da-Silva V, Arruda MA, *et al.* Induction of nos in rat blood pmn in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. *Journal of Leukocyte Biology* 1999; 65:4 508-14.
35. Lawrence, WT. Physiology of the acute wound. *Clinics in Plastic Surgery* 1998; 25:3 321–40.
36. Monaco JL, Lawrence T. Acute wound healing an overview. *Clinics in Plastic Surgery* 2003; 30: 1-12.
37. Stroncek JD, Bell N, Reichert W M. Instructional powerpoint presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures. *Journal of Biomedical Materials Research* 2009; 90A:4 1230-8.
38. Doughty DB, Sparks-Defriese B. Wound healing physiology. In: *Acute and chronic wounds: current management concepts* (BRYANT RA, NIX DP), 4ed. Missouri: Elsevier Mosby, 2012: 63-82.
39. Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Patologia estrutural e funcional* 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009: 1252p.
40. Araújo LU, Grabe-Guimarães A, Mosqueira VCF, *et al.* Profile of wound healing process induced by allantoin. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2010; 25:5 460-6.
41. Pompeia C, Cury-Boaventura MF, Curi R. Arachidonic acid triggers an oxidative burst in leukocytes. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36 1549–60.

42. Cury-Boaventura MF, Curi R. Regulation of reactive oxygen species (ROS) production by C18 fatty acids in Jurkat and Raji cells. *Clin Sci* 2005; 108: 245–53.
43. Gorjao R, Cury-Boaventura MF, De Lima TM *et al.* Regulation of human lymphocyte proliferation by fatty acids. *Cell Biochem Funct* 2007; 25: 305–15.
44. Martins De Lima T, Gorjao R, Hatanaka E, *et al.* Mechanisms by which fatty acids regulate leucocyte function. *Clin Sci* 2007; 113: 65–77.
45. Cury-Boaventura MF, Gorjao R, De Lima TM, *et al.* Effect of olive oil-based emulsion on human lymphocyte and neutrophil death. *JPEN Parenter Enteral Nutr* 2008; 32: 81–7.
46. Rodrigues HG, Vinolo MA, Magdalon J *et al.* Dietary free oleic and linoleic acid enhances neutrophil function and modulates the inflammatory response in rats. *Lipids* 2010; 45: 809–19.
47. Andrade PMM, Carmo MGT. N-3 fatty acids: a link between eicosanoids, inflammation and immunity. *Nmmetabólica* 2006; 8:3 135–43.
48. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2006; 75:3 197–202.
49. Garófolo A, Petrilli AS. Omega-3 and 6 fatty acids balance in inflammatory response in patients with cancer and cachexia. *Revista de Nutricao* 2006; 19:5, 611–21.
50. Cherian G. Metabolic and cardiovascular diseases in poultry: role of dietary lipids. *Poultry Science* 2007; 86:5 1012–6.
51. Pereira LM, Hatanaka E, Martins EF, *et al.* Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. *Cell Biochem Funct* 2008; 26: 197–204.
52. Cardoso CR, Souza MA, Ferro EA, *et al.* Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. *Wound Repair Regen* 2004; 12:2 235-43.
53. Rodrigues HG, Vinolo MA, Magdalon J, *et al.* Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing. *Journal of Investigative Dermatology* 2012; 132: 208–15.
54. Cardoso CR, Favoreto Jr S, Oliveira LL, *et al.* Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: A new approach for skin repair. *Immunobiology* 2011; 216: 409–15.
55. Kokane DD, More RY, Kale MB, *et al.* Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 124: 311–5.



56. Nayak BS, Kanhai J, Milne DM, *et al.* Experimental evaluation of ethanolic extract of *Carapa guianensis* L. leaf for its wound healing activity using three wound models. *Evidence-based complementary and alternative medicine (eCAM)* 2011; 2011: 1-7.
57. Franco ES, Aquino CMF, Medeiros PL, *et al.* Effect of a semisolid formulation of *Linum usitatissimum* L. (Linseed) Oil on the Repair of Skin Wounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012, Article ID 270752, 7 pages.
58. Albina JE, Gladden P, Walsh AR. Detrimental effects of an  $\omega$ -3 fatty acid-enriched diet on wound healing. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 1993; 17:6 519–21.
59. Bates DO, Jones OP. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Lower extremity wounds* 2003; 2:2 107-120.
60. Batista JS, Rodrigues CMF, Costa KMFM, *et al.* Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. *Arq Inst Biol* 2010; 77:3 441-7.
61. Oliveira AP, Franco ES, Barreto SS, *et al.* Effect of semisolid formulation of *Persea americana* Mill (Avocado) Oil on wound healing in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013 Artigo ID 472382, 8 p.
62. Franco D, Gonçalves LF. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. *Rev. Col Bras Cir* 2008; 35:3 203-6.

## **NORMAS DA REVISTA PARA SUBMISSÃO**

### **MANUSCRIPT CATEGORIES**

*IJD* invites the following types of submission:

#### **Case Report\***

A report of 400–600 words, illustrated by no more than three illustrations. This category offers a means for rapid communication about a single subject.

#### **Clinical**

An article of 700–1200 words concerning a drug evaluation. This category provides rapid publications and is meant to be a succinct presentation with a minimum of graphs and tables.

#### **Trial**

#### **Commentary\***

An editorial 700–1200 words in length with approximately five references. The author may express his or her opinion without complete documentation.

#### **Clinicopathological**

A photographic essay that includes both clinical and pathological photographs in color. The diagnosis and legends for the photographs should be listed after the references in the article. The article should be no more than 2–3 pages in length.

#### **Challenge\***

#### **Correspondence\***

Letters to the editor and short notes. Contributions should not exceed 600 words, two figures, and 10 references. In order to offer rapid dissemination of accepted manuscripts, Correspondence items will be published online-only. Online-only correspondence items are assigned to an issue of the journal, but are excluded from the print edition. Online-only correspondence items are e-paginated and are fully citable and indexable.

#### **Dermatological**

An article relating to the surgical aspects of treatment. Article types may include Review, Report or Case Report Format.

#### **Surgery**

#### **Education**

An article about the methodology of curriculum and instruction in dermatology, about 2500 words.

#### **Morphology\***

A photographic essay that emphasizes one or two photographs, in color. There should be accompanying text and references, but the entire article will appear on one printed page.

#### **On a Human Scale\* (by invitation only)**

An article that relates to social, economic, cultural, artistic and humanitarian aspects of medicine. The length of the article should not exceed 1200 words including a short summary of the topic addressed. A brief author biography and photo should be submitted with the article. If you have a topic that you feel would fit nicely in this section, please send a note to [ijdermatol@mayo.edu](mailto:ijdermatol@mayo.edu) for approval to submit.

## **Pharmacology and Therapeutics**

An article relating to the treatment of diseases and to the pharmacology of dermatologically-related drugs. (Can include Clinical Trials, Reviews, Reports, Case Reports and Correspondence. The latter is preferred for reports of adverse drug reactions.) When referring to a drug, please use the generic name approved by the United States Food and Drug Administration or recognized as the United States Adopted Name. At the end of the manuscript, please list the American Trade names.

## **Reminiscence**

An article on the history of dermatology or skin diseases; also a biographic account of an historic or noteworthy figure in dermatology.

## **Report**

An original article including, whenever possible, an Introduction, Materials and Methods or Case Report(s), Results, Comment, and References. A Structured Abstract of not more than 250 words must be included and should consist of four paragraphs labeled Background, Methods, Results, and Conclusions. Also, it should describe the problem studied, how the study was performed, the main results, and what the author(s) concluded from the results. The article should range from 2500-3000 words.

## **Review**

A major didactic article that clarifies and summarizes the existing knowledge in a particular field. It should not be an exhaustive review of the literature, and references should not exceed 50 in number. Tables, diagrams, and selected figures are often helpful and preferred. The length is left to the judgment of the author, although it generally should not exceed 5000 words. Topics may include updates in clinically relevant basic science and cutaneous biology. A list of 10 questions should be listed at the end of the article to provide additional educational challenge to the reader. An abstract is required, though it need not be structured.

## **Tropical Medicine Rounds**

An article dealing with the diseases and special problems encountered by dermatologists working in the tropics. Article submissions should follow the Report or Case Report format.

## **Updates in Medicine**

By invitation only. This contribution to the journal should be 700–1200 words in length with sufficient references to document important points. It is not essential that the contribution be heavily referenced as it is meant to serve as an update for dermatologists in various fields of medicine and is not portrayed to be an extensive or exhaustive review of the literature. However, it would be very helpful if pertinent and salient references are included, not only for documentation purposes, but also for additional reading.

## **Medical Genetics**

Report, Review or Case Report format should be followed.

\*No abstract required

## **SUBMISSION OF MANUSCRIPTS**

Submissions should be made online at the IJD ScholarOne Manuscripts site (formerly known as Manuscript Central). New users should first create an account (do not upload document files at this time). Once a user is logged onto the site, submissions should be made via the Author Center.

Revised manuscripts must be submitted as revisions as directed by the ScholarOne website. Do not resubmit a revision as a new manuscript as this may result in re-review and considerable delay. The revision should be complete and contain all the tables and figures. Do not resubmit the original manuscript with your revision.

Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time. The author must supply a full statement to the Editor about all submissions and previous reports that might be regarded as redundant or duplicate publication of the same or very similar work.

## **PREPARATION OF MANUSCRIPTS**

Manuscripts must be written in English and must comply with these instructions in every detail.

Text should be supplied in a word processed format such as Microsoft Word for Windows. Charts and tables are considered textual and should be supplied in the same format. Figures (illustrations, diagrams, photographs) should be supplied in gif, jpeg, tif or eps format.

All manuscripts must be typed in 12 pt font with lines double spaced and margins of at least 2.5 cm.

Abbreviations must be defined when first used, both in the abstract and in the main text.

Manuscripts must be as succinct as possible. Text must comply with the word and figure limits defined in Section 2. If authors consider that a manuscript should not conform to the limits specified, exceptionally good reasons must be clearly provided in a cover letter accompanying the submission. Repetition of information or data in different sections of the manuscript must be carefully avoided.

Manuscripts should, where appropriate, include:

### **Title Page**

The first page of all manuscripts should contain the following information:

- 1) the title of the paper
- 2) surnames (family names), initials of each author, and their degree (if any)
- 3) name of the institution(s) at which the research was conducted
- 4) name, address, telephone number and email address of corresponding author
- 5) manuscript word count (excluding abstract and references), table and figure count
- 7) any conflict of interest disclosures (see Section 5)
- 8) a running head not exceeding 50 characters

## Abstracts

Authors submitting Reports should note that structured abstracts (maximum 250 words) are required. The structured abstract should adopt the format: Background, Methods, Results, Conclusions.

Review articles require abstracts (maximum 250 words) but they need not be structured.

Abstracts should not contain citations.

## Text

This should in general, but not necessarily, be divided into sections with the headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Table and figure legends. Figures should be submitted as separate files. The acknowledgements should include a statement of all funding sources that supported the work.

Please submit the full text of the manuscript, including the abstract, references, tables and legends as a single document. The title page may be included as page 1 of the main manuscript document or can be uploaded as a separate file, but must be included.

## Tables and Figures

Tables should not be inserted in the appropriate place in the text but should be included at the end of the manuscript, each on a separate page.

Figures (illustrations, diagrams, photographs) should be supplied in gif, jpeg, tif or eps format and submitted as separate electronic files.

Tables and figures should be referred to in text as follows: Fig. 1, Figs. 2–4; Table 1, Tables 2 and 3. The place at which a table or figure is to be inserted in the printed text should be indicated clearly on a manuscript. Each table and/or figure must have a legend that explains its purpose without reference to the text. Where a figure has more than one panel, each panel should be labelled in the top left-hand corner using lower case letters in parentheses i.e. '(a)', '(b)' etc., and a brief description of each panel given in the figure legend. When using histology figures, the stain type and magnification level must be included in the legend.

Only figures of excellent quality will be considered for publication. The Journal will publish color photographs free of charge subject to editorial approval. When an individual is identifiable in a photograph written permission must be obtained (see Section 5 'Ethics' below).

Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce previously published figures or tables.

## References

References should be in Vancouver format and appear as consecutive, unbracketed superscript numbers in the text, e.g. 'in our previous reports<sup>1,2</sup> and those of Smith *et al.*<sup>3–5</sup>' and should be listed numerically in the reference list at the end of the article.

Format references as below, using standard (Medline) abbreviations for journal titles. When there are more than four authors, include the first three authors followed by *et al.*

1. de Berker DAR, Baran R, Dawber RPR. The Nail in Dermatological Diseases. In: *Baran and Dawber's Diseases of the Nails and their Management* (Baran R, Dawber RPR, de Berker DAR, Haneke E, Tosti, A, eds), 3rd edn. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2001: 172–92.
2. Murray ML, Cohen JB. Mycophenolate mofetil therapy for moderate to severe atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 2007; **32**: 23–7.
3. Graham-Brown R, Burns T. *Lecture Notes: Dermatology*. Oxford: Wiley-Blackwell, 2006.
4. Smith A. (1999) Select committee report into social care in the community [WWW document]. URL <http://www.dhss.gov.uk/reports/report015285.html> [accessed on 7 November 2003].

## DECLARATIONS

### Original Publication

Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time. The author must supply a full statement to the Editor about all submissions and previous reports that might be regarded as redundant or duplicate publication of the same or very similar work.

### Conflicts of Interest

Authors are responsible for disclosing all financial and personal relationships between themselves and others that might be perceived by others as biasing their work. To prevent ambiguity, authors must state explicitly whether potential conflicts do or do not exist.

### Ethics

When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. Do not use patients' names, initials or hospital numbers, especially in illustrative material. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on, the care and use of laboratory animals was followed. A statement describing explicitly the ethical background to the studies being reported should be included in all manuscripts in the Materials and Methods section. Ethics committee or institutional review board approval should be stated.

Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying information should not be published in written descriptions, photographs and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Identifying details should be omitted if they are not essential but patient data should never be altered or falsified in an attempt to attain anonymity. Complete anonymity is difficult to achieve and informed consent should be obtained if there is any doubt. For

example, masking the eye region in photographs of patients is inadequate protection of anonymity.

## **Authorship**

All persons designated as authors should qualify for authorship and all those who qualify should be listed. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. One or more authors should take responsibility for the integrity of the work as a whole, from inception to published article. Authorship credit should be based only on 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; 3) final approval of the version to be published. Conditions 1, 2 and 3 must all be met. Acquisition of funding, the collection of data or general supervision of the research group, by themselves, do not justify authorship. All others who contributed to the work who are not authors should be named in the Acknowledgements section.

## **Committee on Publication Ethics (COPE)**

As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE), adherence to these submission criteria is considered essential for publication in IJD; mandatory fields are included in the online submission process to ensure this. If, at a later stage in the submission process or even after publication, a manuscript or authors are found to have disregarded these criteria, it is the duty of the Editor to report this to COPE. COPE may recommend that action be taken, including but not exclusive to, informing the authors' professional regulatory body and/or institution of such a dereliction. The website for COPE may be accessed at: <http://www.publicationethics.org.uk>

## **ADDITIONAL INFORMATION ON ACCEPTANCE**

### **Author services**

Author Services enables authors to track their article—once it has been accepted—through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

### **For authors signing the copyright transfer agreement**

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the

CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:  
 CTA                                      Terms                                      and                                      Conditions  
[http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

### **For authors choosing OnlineOpen**

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial - NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services. [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

### **Proofs**

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. The proof can be downloaded as a PDF file from this site. Further instructions will be sent with the proof. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

### **Early View**

*IJD* is covered by the Publisher's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can



be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found online at <http://www.doi.org/faq.html>.

### **Offprints**

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

### **Note to NIH Grantees**

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see <http://www.wiley.com/go/nihmandate>.

### **Contacting the Editorial Office**

Professor Lawrence E. Gibson  
Editor-in-Chief  
Mayo Clinic E-5A  
200 First Street SW  
Rochester MN 55905  
USA  
Tel: +1 507 538-8249  
Fax: +1 507 284 2072  
E-mail: [ijdermatol@mayo.edu](mailto:ijdermatol@mayo.edu)