



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

MAURICIO FERREIRA GOMES

**POTENCIAL CICATRIZANTE DO EXTRATO CETÔNICO DE *Pentaclethra*
macroloba NO PROCESSO DE REPARO DE LESÕES EXCISIONAIS NA PELE DE
CAMUNDONGOS DIABÉTICOS**

BELÉM – PARÁ

2017

MAURICIO FERREIRA GOMES

**POTENCIAL CICATRIZANTE DO EXTRATO CETÔNICO DE *Pentaclethra
macroloba* NO PROCESSO DE REPARO DE LESÕES EXCISIONAIS NA PELE DE
CAMUNDONGOS DIABÉTICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Belém, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Sob orientação da Prof^a. Dra. Gilmara Bastos.

BELÉM – PARÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Gomes, Mauricio Ferreira

Potencial cicatrizante do extrato cetônico de *Pentaclethra maculosa* no processo de reparo de lesões excisionais na pele de camundongos diabéticos / Mauricio Ferreira Gomes ; Orientadora, Gilmara Bastos. - 2017.

75 f. : il.

Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2017.

1. Diabetes mellitus – complicações - tratamento. 2. Cicatrização de feridas. 3. Óleos vegetais – uso terapêutico. I. Bastos, Gilmara, orientadora. II. Título.

CDD – 22 ed. 616.462

MAURICIO FERREIRA GOMES

**POTENCIAL CICATRIZANTE DO EXTRATO CETÔNICO DE *Pentaclethara
macroloba* NO PROCESSO DE REPARO DE LESÕES EXCISIONAIS NA PELE DE
CAMUNDONGOS DIABÉTICOS**

Dissertação aprovada em 25 de Maio de 2017

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Elizabeth Sumi Yamada

Prof. Dr. Paulo Eduardo Santos Ávila

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

INSTITUIÇÕES

- Universidade Federal do Pará (UFPA) – Laboratório de Neuroinflamação, Instituto de Ciências Biológicas.
- Universidade Federal do Pará (UFPA) – Laboratório de Neuropatologia Experimental, Hospital Universitário João de Barros Barreto.

FONTES FINANCIADORAS

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

A Deus por me abençoar nessa caminhada me dando força e saúde.

A minha mãe por todo apoio e amor incondicional desde do início desta jornada, por ser meu maior exemplo e por ser minha mãe.

A minha irmã Laura Lino e ao meu pai Deusimar Gomes por todo apoio, amor e incentivo.

A minha namorada Nayara Oliveira por todo amor, apoio e companheirismo no dia a dia dessa jornada.

A minha orientadora a Prof^a. Dra. Gilmara Bastos por todo apoio e pela oportunidade.

A Prof^a. Dra. Elizabeth Yamada pelo apoio e por ter aberto as portas do seu laboratório para o desenvolvimento do meu projeto.

A todos que compõem o Laboratório de Neuroinflamação, em especial a duas pessoas que me ajudaram diretamente Aline Bastos e Gabriel Cardoso.

A todos que compõem o Laboratório de Neuropatologia Experimental (LANEX), Anderson, Sol, Ricky e todos que o compõe.

A seu Amarildo por ter sido um fator fundamental no auxílio e suporte dos animais do biotério da UFPA.

Ao casal Isabella César e Patrick Ramos por todo apoio e amizade de todos esses anos.

Aos meus amigos Paulo Ávila, Anderson Bentes, Eduardo Trovão, Carlos Augusto, Marcos Lebrege e Tiago Silveira.

A esta instituição de ensino por ter me possibilitado a oportunidade de formação, em especial ao programa de pós graduação em neurociências e biologia celular.

A todos que fizeram parte da minha formação e que me ajudaram direta ou indiretamente, mas que não tenho como citá-los aqui, meu muito obrigado.

EPÍGRAFE

"O valor das metas futuras não reside na imagem do futuro que se cria na mente, mas sim na mudança que elas provocam no presente"

David Allen

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM), uma doença que desperta o interesse de muitos profissionais da saúde, é uma patologia crônica que nos últimos anos tornou-se motivo de preocupação para a saúde pública. A doença divide-se em diabetes tipo 1 e tipo 2, a qual causa uma disfunção na fisiologia da insulina/glicose. Essa desregulação causa alterações significativas em alguns eventos biológicos, dentre eles, o processo de cicatrização. O surgimento de uma lesão em uma pessoa normal desencadeia uma cascata de reações celulares e bioquímicas com objetivo de reparar o tecido lesionado. Em pacientes portadores de diabetes o reparo é mais lento. Vários mecanismos são descritos como fatores importantes no retardo do processo de cicatrização em diabéticos, entre eles, a produção excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), diminuição do Óxido Nítrico (NO), diminuição da resposta aos Fatores de Crescimento (GFs) e das proteínas da via de sinalização da insulina. A busca por formas terapêuticas que possam auxiliar o processo de reparo tecidual apresenta uma grande demanda, devido o índice de pessoas portadoras de diabetes estar aumentando aos longos dos anos. Sendo assim visa-se, encontrar alternativas farmacológicas para este aspecto, no presente estudo foi realizada a caracterização do efeito farmacológico da aplicação tópica do extrato cetônico da semente *Pentaclethra macroloba* (Pracaxi), no processo de regeneração tecidual em animais diabéticos. Para avaliação do efeito cicatrizante foi criada uma ferida cutânea excisional com *punch* de biopsia nos animais diabéticos e posteriormente foram tratados por aplicação tópica do extrato para avaliação do potencial cicatrizante da semente. O efeito do tratamento foi avaliado mediante alguns aspectos, tais como: a contração da ferida, reepitelização, quantidade de células inflamatórias, organização tecidual e formação de colágeno na matriz extracelular. Os resultados encontrados demonstram que o extrato de pracaxi apresentou efeito cicatrizante em camundongos diabéticos, estimulando a reestruturação tecidual após lesões cutâneas. Desta forma, o pracaxi torna-se uma possível alternativa para o tratamento de lesões teciduais em diabéticos devido estimular a cascata de cicatrização promovendo a melhor formação da matriz extracelular.

Palavras-chave: Diabetes, Feridas, *Pentaclethra macroloba*, Cicatrização.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM), a disease that attracts the interest of many health professionals, is a chronic pathology that has become a public health concern in recent years. The disease is divided into diabetes type 1 and type 2, which causes a dysfunction in insulin / glucose physiology. This deregulation causes significant alterations in some biological events, among them, the cicatrization process. The emergence of injury in to a normal person triggers a cascade of cellular and biochemical reactions Aiming to repair the injured tissue. In patients with diabetes, the repair is slower. Several mechanisms are described as important factors in the delay of the healing process in diabetics, among them, excessive production of reactive oxygen species (ROS), reduction of nitric oxide (NO), reduction of the response to growth factors (GFs) And proteins the insulin signaling pathway. The search for therapeutic forms that can help the tissue repair process is in great demand, Because the rate of people with diabetes is increasing over the years. Thus, it is aimed to find pharmacological alternatives for this aspect, in the present study the characterization of the pharmacological effect of the topical application of the ketone extract of the seed *Pentaclethra macroloba* (Pracaxi) on the tissue regeneration process in diabetic animals was performed. To evaluate the healing effect, an excisional cutaneous wound with biopsy punch was created in diabetic animals and were subsequently treated by topical application of the extract to evaluate the healing potential of the seed. The effect of the treatment was evaluated by some aspects, such as: wound contraction, Reepithelialization, quantity of inflammatory cells, tissue organization and formation of collagen in the extracellular matrix. The results showed that the pracaxi extract presented a healing effect in diabetic mice, stimulating the tissue reconstruction after skin lesions. In this way, the pracaxi becomes a possible alternative for the treatment of tissue lesions in diabetics because it stimulates the healing cascade promoting the best formation of the extracellular matrix.

Key words: Diabetes, Tissue Injury, Pracaxi, cicatrization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Anatomia fisiológica do pâncreas
- Figura 2.** Processo de entrada de glicose nas células
- Figura 3.** Fisiopatologia do Diabetes *Mellitus* tipo 1
- Figura 4.** Fisiopatologia do Diabetes *Mellitus* tipo 2
- Figura 5.** Patogênese do Diabetes mellitus tipo 2
- Figura 6.** Efeito citotóxico da aloxana nas células beta pancreáticas
- Figura 7.** Cascata de Cicatrização
- Figura 8.** Processo Inflamatório
- Figura 9.** Fase de Remodelação
- Figura 10.** Dificuldade de cicatrização em diabéticos
- Figura 11.** Árvore de Pracaxi (*Pentaclethra maculosa*): A. Árvore de pracaxi com as favas; B- Sementes de Pracaxi
- Figura 12.** Fluxograma do processo da extração e caracterização da semente de Pracaxi
- Figura 13.** Processo de Extração à frio do Extrato da Semente de Pracaxi
- Figura 14:** Cronograma experimental
- Figura 15.** Procedimentos experimentais para indução de Diabetes Tipo 1. Indução via aloxana: A- Administração intraperitoneal de aloxana 150mg/kg; B- Medição da glicemia dos animais; C – Linha experimental com os respectivos dias de medição da glicemia
- Figura 16.** Excisão no dorso. A indução da lesão excisional: A- Retirada do pelo da região do dorso do animal; B- Indução da lesão com *punch* de biopsia (6mm)
- Figura 17.** Avaliação da contração de Lesão: A- Fórmula da área de contração em porcentagem; B- Cálculo da área pelo software ImageJ
- Figura 18.** Histopatológico do pâncreas: A- Grupo normal (sem indução de diabetes); B- Grupo de diabéticos (Indução de diabetes por aloxana)
- Figura 19.** A imagens representativas das feridas de grupos de controle não diabético, Controle diabético e tratados com Dersani® e com Pracaxi 5mg e 10mg tratados em dias diferentes
- Figura 20.** Histopatológico da pele feitos pelo método de hematoxilina e eosina
- Figura 21.** Histopatológico da pele feitos por coloração de *Picrosirius red* para marcação histológica de colágeno
- Gráfico 1.** Composição de Ácidos Graxos (%)
- Gráfico 2.** Níveis Glicêmicos dos grupos ao longo dos experimentos (***) < 0,001

Gráfico 3. Contração da ferida (%) nos grupos controle não diabético, Controle diabético e tratados com Dersani® e com Pracaxi 5mg e 10mg tratados em dias diferentes (***) $< 0,001/$ ### $<0,001$)

Gráfico 4. Reepitelização (%) nos grupos controle não diabético, Controle diabético e tratados com Dersani® e com Pracaxi 5 e 10mg/kg

LISTA DE SIGLAS

- CAD** Cetoacidose diabética
- CG** Cromatografia Gasosa
- DM** Diabetes *mellitus*
- DM1** Diabetes tipo 1
- DM2** Diabetes tipo 2
- ESP** Extrato da Semente de Pracaxi
- EGF** Fator de Crescimento epidérmico
- FGF** Fator de Crescimento de Fibroblastos
- HCl** Ácido Clorídrico
- HE** Hematoxilina e Eosina
- IBGE** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- I.P** Intraperitonal
- IDDM** Diabetes insulino-dependente
- IL** Interleucinas
- IMC** Índice de massa corporal
- NaCl** Cloreto de sódio
- NIDDM** Diabetes não insulino-dependente
- PBS** *Phosphate Buffered Saline*
- PDGF** Fator Derivado de plaquetas
- OMS** Organização Mundial de Saúde
- GLUT** - Transportadores de glicose – Glucose transporter
- ROS** Espécies reativas de oxigênio
- SM** Síndrome metabólica
- SOD** Superóxido dismutase
- TGF- α** Fator de Crescimento transformante- α
- TGF- β** Fator de Crescimento transformante- β
- TNF- α** Fator de necrose tumoral α
- VEGF** Fator de crescimento de células endoteliais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. JUSTIFICATIVA	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 PÂNCREAS: ESTRUTURA, FUNÇÃO E SÍNTESE DE INSULINA	18
3.2 CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELLITUS	20
3.2.1 Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1 (DM1)	21
3.2.2 Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2 (DM2)	22
3.2.3 Mecanismo de ação da Aloxana	24
3.3 CICATRIZAÇÃO	26
3.3.1 Inflamação	27
3.3.2 Proliferação	29
3.3.3 Remodelação	30
3.4 CICATRIZAÇÃO E DIABETES	31
3.5 ETNOFARMACOLOGIA	34
3.6 <i>Pentaclethra macroloba</i>	35
4. OBJETIVOS	37
4.1 OBJETIVO GERAL	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5. METODOLOGIA	38
5.1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO	38
5.1.1 Preparação do Extrato da Semente de Pracaxi (ESP)	39
5.1.2 Caracterização Química do Extrato	39
5.1.2.1 Esterificação da amostra para análise cromatográfica	39
5.1.2.2 Cromatografia Gasosa (CG)	40
5.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS CAMUNDONGOS SUÍÇOS	40
5.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS	40
5.4 MODELO DE INDUÇÃO DE DIABETES VIA ADMINISTRAÇÃO DE ALOXANO	42
5.5 MODELO DE LESÃO EXCISIONAL COM <i>PUNCH</i> (6mm) – LESÃO TECIDUAL	43
5.6 CONTRAÇÃO DO FERIMENTO E REEPITELIZAÇÃO	44
5.7 HISTOPATOLÓGICO DO PÂNCREAS – HEMATOXILINA E EOSINA	45
5.8 HEMATOXILINA E EOSINA (HE) - PELE	46

5.9 PICROSIRIUS RED – MARCAÇÃO DE COLÁGENO-----	46
5.10 ANALISE ESTATÍSTICA -----	46
6. RESULTADOS -----	48
6.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO CETÔNICO DA SEMENTE DE PRACAXI -----	48
6.2 EFICIENCIA DO MODELO DE INDUÇÃO DE DIABETES VIA ADMINISTRAÇÃO DE ALOXANO -----	50
6.2.1 Histopatológico do Pâncreas – Hematoxilina e Eosina-----	51
6.3 CONTRAÇÃO DO FERIMENTO E REEPITELIZAÇÃO DA LESÃO -----	51
6.4 COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA (HE) – PELE -----	54
6.5 EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DE PRACAXI NA SÍNTESE E DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO-----	57
7. DISCUSSÃO-----	59
8. CONCLUSÃO-----	65
REFERENCIAS -----	66
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA -----	75

1. INTRODUÇÃO

O diabetes é uma doença crônica, metabólica caracterizada por níveis elevados de glicose no sangue, o que leva ao longo do tempo a sérios danos ao coração, vasos sanguíneos, olhos, rins e nervos. Existem basicamente dois tipos de diabetes, classificados como tipo 1 e tipo 2, sendo este último mais comum, acometendo geralmente adultos, e ocorre quando o corpo se torna resistente à insulina ou não produz insulina suficiente. Já o Diabetes tipo 1, também conhecido como diabetes juvenil ou diabetes insulino-dependente, é uma condição crônica em que o pâncreas deixa de exercer a sua fisiologia normal e assim acaba por produzir pouca ou nenhuma insulina. Para as pessoas que vivem com diabetes, o acesso a um tratamento acessível, incluindo a insulina, é fundamental para a sua sobrevivência e também para evitar o desenvolvimento de outras patologias. Existe um objetivo global acordado para travar o aumento da diabetes e da obesidade até 2025 (OMS, 2016). Devido ao aumento progressivo dos índices de diabéticos e, conseqüentemente, as complicações causadas pela mesma, buscase formas de estudar essa patologia.

Experimentalmente o diabetes pode ser induzido por compostos químicos, entre eles, destaca-se a aloxana e a estreptozotocina (SZKUDELSKI, 2001). A aloxana (2,4,5,6 – tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracila) como agente diabetogênico foi descrito inicialmente através do estudo correlacionando os efeitos da sua administração em coelhos quanto aos danos necróticos causados nas ilhotas do pâncreas (DUNN; SHEEHAN; McLETHIE, 1943). Desde então, a diabetes induzida por aloxana tem sido comumente utilizada como modelo experimental para diversos estudos, dos quais destacam-se as pesquisas relacionadas a cicatrização (KAZEMI-DARABADI *et al.*, 2014; PESSOA *et al.*, 2016), pois dentre as principais dificuldades ocasionadas pelo diabetes pode se destacar as complicações em processos de cicatrização de lesões teciduais (CASSETTARI *et al.*, 2014).

O processo de cicatrização normal pode ser dividido em três etapas: inflamatória; proliferativa e remodelamento. A fase inflamatória tem início imediato após a lesão; a proliferativa é responsável pela reconstituição epidérmica através da matriz extracelular que possui como constituinte principal os fibroblastos, ocorrendo a chamada reepitelização; e na fase de remodelamento ocorre deposição de tecido neoformado, que contribui para maturação de tecido cicatricial. Sendo assim, fazem-se necessárias outras intervenções para o auxílio do processo de cicatrização que pode estar comprometido, devido a processos infecciosos no leito da lesão, ou alterações dos eventos celulares da cicatrização relacionadas à diabetes (GUIRRO *et al.*, 2015).

As lesões em diabéticos apresentam dificuldade de revascularização (angiogênese) e baixa expressão de fatores de crescimento que são cruciais para restauração da homeostasia tecidual, prejudicando à cicatrização. Estas complicações podem evoluir para consequências graves, como a formação de feridas de difícil resolução, podendo levar até perda de função tecidual (ANDRADE *et al.*, 2013).

Como alternativas para intervenção terapêutica no tratamento de lesões teciduais em diabéticos, destacam-se as plantas medicinais e as suas preparações (como por exemplo, extratos) sendo que os compostos ativos presentes em algumas delas têm sido utilizados para acelerar o processo de cicatrização de feridas. Como alternativas no tratamento de lesões, algumas das estratégias mais utilizadas são aquelas que atuam na investigação de plantas medicinais como fonte de possíveis tratamentos, a etnofarmacológica, representa uma ferramenta de grande valor, e consiste em combinar informações adquiridas junto a usuários da flora medicinal, com estudos químicos e farmacológicos (ELISABETSKY, 2003).

A etnofarmacologia foi fundamental, representando uma pré-triagem, sobre a aplicabilidade farmacológica do uso terapêutico da semente da *Pentaclethra maculosa*, popularmente conhecido como Pracaxi. Apesar de toda importância atribuída a plantas, o seu potencial é ainda pouco explorado, pois apenas recentemente estas se tornaram objeto de estudo científico. Como exemplo, podemos citar a utilização do óleo de pracaxi como alternativa terapêutica em um estudo de caso para um paciente com úlcera diabética, o qual demonstrou a utilidade cicatrizante no tratamento (SIMMONS; BANOV; BANOV, 2015). Diante dos relatos da literatura e a partir de conhecimentos etnofarmacológicos sobre o potencial cicatrizante e anti-inflamatório da semente, busca-se avaliar e descrever a composição química da semente, verificar a atuação na reparação tecidual e o seu mecanismo de cicatrização em animais diabéticos.

2. JUSTIFICATIVA

O Diabetes e suas complicações trazem grande perda econômica para as pessoas afetadas pela doença e suas famílias, além de causar problemas significativos para os sistemas de saúde e economias nacionais através de custos médicos e hospitalares. Com base nas estimativas de custos de uma recente revisão sistemática, estima-se que o custo anual direto com o diabetes para o mundo seja superior a 827 bilhões de dólares. Os principais fatores de custo são o atendimento hospitalar e ambulatorial. Um fator contribuinte é o aumento dos custos gerados devido a complicações posteriores, como por exemplo a pré-disposição para desenvolver-se quadros infecciosos (OMS, 2016).

No Brasil, o relatório produzido pela Federação Internacional de Diabetes estimou a existência de 12 milhões de adultos vivendo com diabetes até 2015. Tais dados são motivos de alerta para a saúde pública, pois o diabetes é uma patologia que acarreta diversas complicações, entre elas, o comprometimento da capacidade regenerativa dos tecidos ocasionando maior dificuldade na cicatrização de ferimentos (IDF, 2014).

Anualmente, um milhão de pessoas com diabetes *mellitus* (DM) perdem uma parte da perna em todo o mundo, traduzindo-se em três amputações por minuto, índice que chega a ser assustador. Tal fato ocorre devido à dificuldade de controle neurovascular, resultando em alteração de fluxo capilar, oxigenação, filtração de fluidos e resposta inflamatória, o que torna os pacientes diabéticos mais suscetíveis a lesões teciduais irreversíveis. Além disso, pacientes diabéticos que sofrem traumas ou ferimentos teciduais possuem cicatrização prejudicada devido apresentar alteração no processo de inflamação aguda, angiogênese anormal, desequilíbrio dos componentes da matriz extracelular e da remodelação tecidual (BREM & TOMIC-CANIC, 2007).

A incidência anual de úlceras em pacientes com diabetes *mellitus* (DM) está entre 2 e 4% dos casos. Estima-se que esse percentual seja mais alto em países com baixa situação socioeconômica ou em países em desenvolvimento, como por exemplo o Brasil. Desta forma alternativas terapêuticas eficientes devem ser pesquisadas para atuar no tratamento dessas lesões e reduzir os danos causados. Atualmente entre as os fármacos utilizados no tratamento de lesões encontram-se: Dersani® (Saniplan), Curatec® AGE (LM Farma), Repitelin® (Biolab), Dermosan® (Sunny Day), AGE Cremer óleo® (Cremer), AGE Derm® (Helianto FarmacêuticaLtda), OASIS Wound Matrix ®, Primoderm® (LC produtos Naturais com Calêndula) Supriderm® (LC produtos Naturais com Calêndula) (FERREIRA *et al.*, 2011; SMANIOTTO *et al.*, 2012).

O Brasil detém a maior flora mundial onde se encontram várias espécies que podem ser bioativas farmacologicamente. É de conhecimento científico que inúmeros fármacos de origem vegetal possuem atuação terapêutica significativa, entretanto ainda se faz necessário o aumento do acervo de novos fármacos com propriedades terapêuticas, em especial, as de origem vegetal (fitoterápicos), visto que, apresentam menor efeitos colaterais, maior disponibilidade de matéria-prima e ser recomendado pela Organização Mundial de Saúde por considerá-la uma prática da medicina tradicional (SIMON, 2001). Logo os fitoterápicos podem oferecer um espectro maior de possibilidades de novas formulações terapêuticas, inclusive no que se diz respeito ao tratamento de pacientes diabéticos, visto que essa patologia tem como característica um processo de cicatrização anormal.

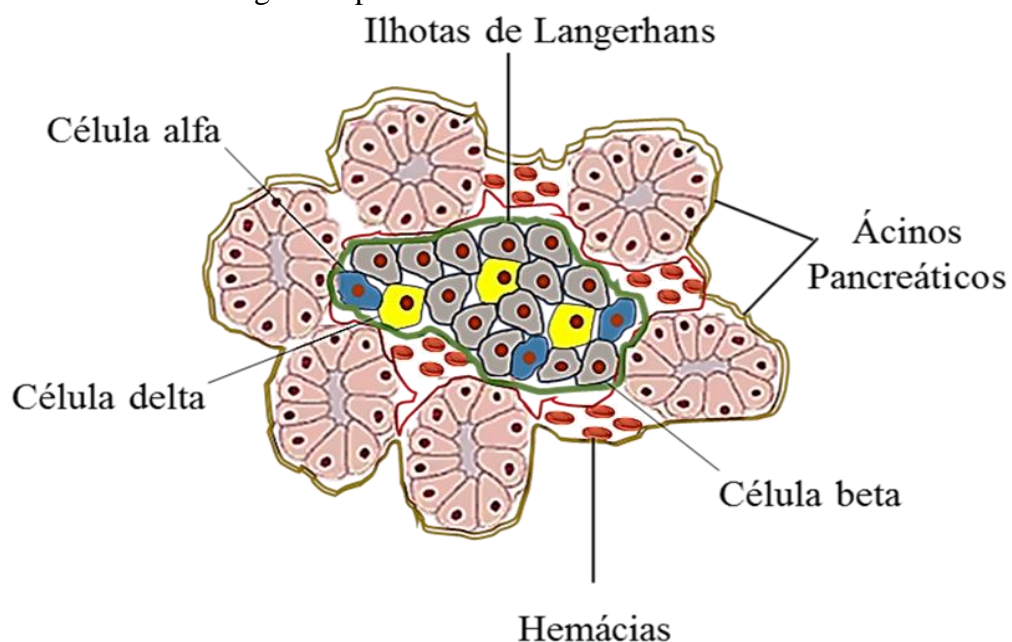
3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PÂNCREAS: ESTRUTURA, FUNÇÃO E SÍNTESE DE INSULINA

O pâncreas é um órgão em forma de V e representa uma glândula acessória da digestão, pesando em torno de 250g no homem, alongada, de localização retroperitoneal e transversa na parede posterior do abdome, posterior ao estômago, entre o duodeno à direita e o baço à esquerda. No órgão reconhecem-se três partes: Uma cabeça emoldurada pelo duodeno; extremidade direita, dilatada, a, um corpo, disposto transversalmente; e uma cauda, extremidade esquerda, afilada, que continua diretamente o corpo e se situa próximo ao baço (DÂNGELO, 2007).

O pâncreas é uma glândula mista, ou seja, com uma porção endócrina e outra exócrina. A porção endócrina é representada pelas ilhotas pancreáticas (ou de Langerhans), que tem a função de secretar hormônios para a corrente sanguínea. Foram identificados quatro tipos de células: Células α (alfa), que secretam glucagon; células β (beta), que secretam insulina e amilina; células δ (delta), que secretam somatostatina; e células PP, que secretam o polipeptídeo pancreático, e uma porção exócrina, composta por células serosas, que tem a função de produzir enzimas digestivas a serem secretadas, pelos ácinos pancreáticos, no duodeno (GUYTON & HALL, 2011).

Figura 1. Anatomia fisiológica do pâncreas



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando as plataformas *Mind The Graph* (Versão Livre - <https://mindthegraph.com/>) e *Microsoft Office Power Point 2016* (Adaptado de GUYTON & HALL, 2011).

As inter-relações estreitas presentes nas ilhotas de Langerhans possibilitam a comunicação intercelular e o controle direto de secreção de alguns hormônios por outros hormônios. Como por exemplo, a insulina inibe a secreção de glucagon, a amilina inibe a secreção de glucagon e a somatostatina inibe tanto a secreção de insulina como de glucagon (GUYTON & HALL, 2011).

A insulina é um hormônio essencial para a manutenção de homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. Logo após uma refeição rica em carboidratos a insulina inicia seu efeito sobre o metabolismo. A glicose absorvida para o sangue causa secreção rápida de insulina, que por sua vez, causa a pronta captação, armazenamento e utilização da glicose por quase todos os tecidos do organismo, especialmente os músculos, fígado e tecido adiposo (SILVA, 2011).

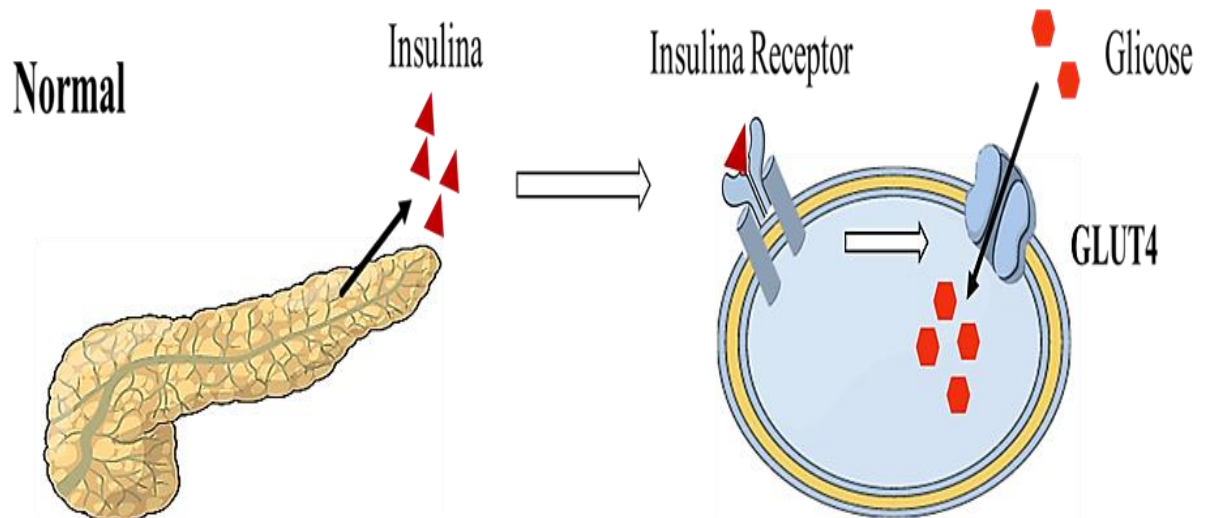
A insulina humana é uma proteína pequena, formada por duas cadeias de 21 e 30 aminoácidos, ligadas por meio de duas ligações de dissulfeto. A molécula pró-insulina é quebrada no complexo de golgi das células beta pancreáticas, local de síntese da insulina, para formar o peptídeo conector (peptídeo C) e insulina. Sendo assim armazenados em grânulos secretores (GUYTON & HALL, 2011).

A secreção insulínica basal é constante, no entanto, alguns estímulos vindos de nutrientes, neurotransmissores e hormônios podem aumentar ou diminuir esses níveis; além de fármacos e agentes tóxicos. A insulina possui alguns efeitos elucidados como promover a captação e metabolismo da glicose nos músculos; a captação, o armazenamento e a utilização da glicose hepática; síntese e armazenamento das gorduras, entre outros (FARIA, 2007; SILVA, 2011). A liberação de insulina é mediada pelo estímulo de glicose, regulada pelas células β pancreáticas. O aumento de glicose provoca alteração nos níveis glicêmicos no sangue, esse aumento representa o sinal para iniciação da secreção de insulina. O transporte da glicose para o interior das células do organismo ocorre por meio de proteínas transmembrana homólogas, sendo denominadas GLUT (Transportadores de glicose – Glucose transporter) (MANOLESCU *et al.*, 2007; MUECKLER; THORENS, 2013).

O GLUT apresenta inúmeras isoformas ao longo dos tecidos. A GLUT-1 foi a primeira isoforma identificada, que trabalha por difusão facilitada e está presente no cérebro, rins, eritrócitos e cólon; estando presente também, apesar de ser em menor quantidade, no tecido adiposo e muscular (MUECKLER, 1995; SILVA, 2011). O GLUT-2 está presente de forma predominante no fígado e nas células beta pancreáticas e está envolvido na liberação de insulina regulado por glicose. As células beta possuem um grande número de transportadores de glicose (GLUT-2), permitindo o influxo de glicose por difusão facilitada proporcionalmente à

concentração plasmática na faixa fisiológica (THORENS *et al.*, 1990). Carpinelli *et al.*, (1980) demonstraram que a estimulação da secreção de insulina está diretamente relacionada ao aumento desse evento de entrada de glicose, a qual é metabolizada (Figura 2) (MUECKLER, 1994; GUYTON & HALL, 2011; MUECKLER; THORENS, 2013).

Figura 2. Processo de entrada de glicose nas células



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando as plataformas *Mind The Graph* (Versão Livre - <https://mindthegraph.com/>) e *Microsoft Office Power Point 2016*

O comprometimento das ilhotas pancreáticas resulta na incapacidade de secretar insulina ou quando a insulina secretada apresenta ação deficiente nos tecidos, fato que promove anormalidades fisiológicas como: hiperglicemia (acúmulo de glicose no sangue), glicosúria (glicose presente na urina), poliúria (micção frequente), polidipsia (sede excessiva), polifagia (fome excessiva) e perda de peso, desenvolvendo patologias incluídas à função da insulina no metabolismo, como: a diabetes, hiperinsulinemia e resistência à insulina (OLIVEIRA, 2012; AIRES, 2012).

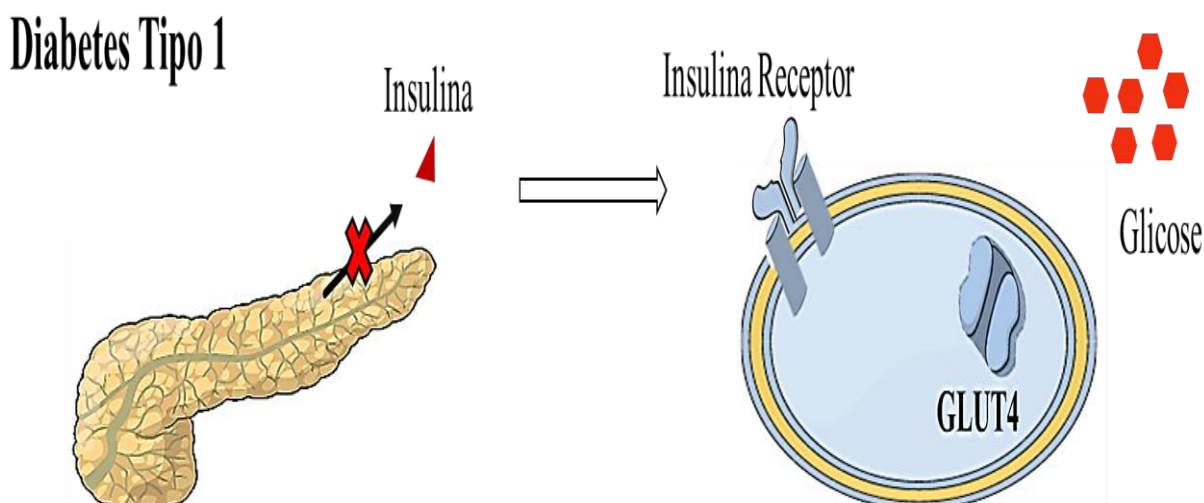
3.2 CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELLITUS

A classificação atual do Diabetes *mellitus* foi proposta pela Associação Americana de Diabetes (American Diabetes Association – ADA) em 1997, e se baseia na etiologia da doença, não na sua forma de tratamento. Desta forma, os termos anteriormente denominados Diabetes insulino dependente (IDDM) e Diabetes não insulino dependente (NIDDM), foram substituídos pela denominação diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2.

3.2.1 Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1)

O diabetes tipo 1 (DM1) é causado por deficiência absoluta da insulina, causada comumente por agressão química, viral ou processo autoimune ou, bem mais raramente, idiopática das células β pancreáticas. Neste tipo de diabetes, ocorre destruição, mediada pelas células T, ou seja, anticorpos produzidos contra antígenos virais acabam lesionando as células β devido ao mimetismo molecular. A hiperglicemia permanente ocorre quando mais de 90% das células secretoras de insulina das ilhotas pancreáticas são destruídas, dessa forma deixa de liberar a insulina e fazer a captação da glicose, como representado na figura 3 (MATTHEWS & MATTHEWS, 2011).

Figura 3. Fisiopatologia do Diabetes *Mellitus* tipo 1



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando as plataformas *Mind The Graph* (Versão Livre - <https://mindthegraph.com/>) e *Microsoft Office Power Point 2016*

O desenvolvimento do DM1 é dividido em quatro fases: Pré-clínica, com suscetibilidade genética e autoimunidade contra a célula β , início clínico do diabetes, remissão transitória e estabelecimento associado a complicações agudas e crônicas. Os pacientes com DM1 apresentam sintomas graves, hiperglicemia acentuada e tem tendência a cetoacidose, condição grave que pode resultar em coma ou até mesmo a morte e acontece quando os níveis de açúcar (glicose) no sangue do paciente diabético encontram-se elevados. Esse quadro clínico é a máxima expressão da deficiência insulínica. No DM1 os pacientes apresentam índice de massa corporal (IMC) normal, no entanto a obesidade não se exclui do diagnóstico (ADA, 2012).

O diagnóstico do DM1 tem como manifestação inicial a cetoacidose diabética (CAD), de 30% a 65% dos pacientes. A CAD é uma complicação aguda caracterizada por hiperglicemia, acidose metabólica, desidratação e cetose, no período de deficiência profunda de insulina. Sendo geralmente causados por condições infecciosas ou omissão da administração de insulina (DIB, 2008; VILAR, 2013).

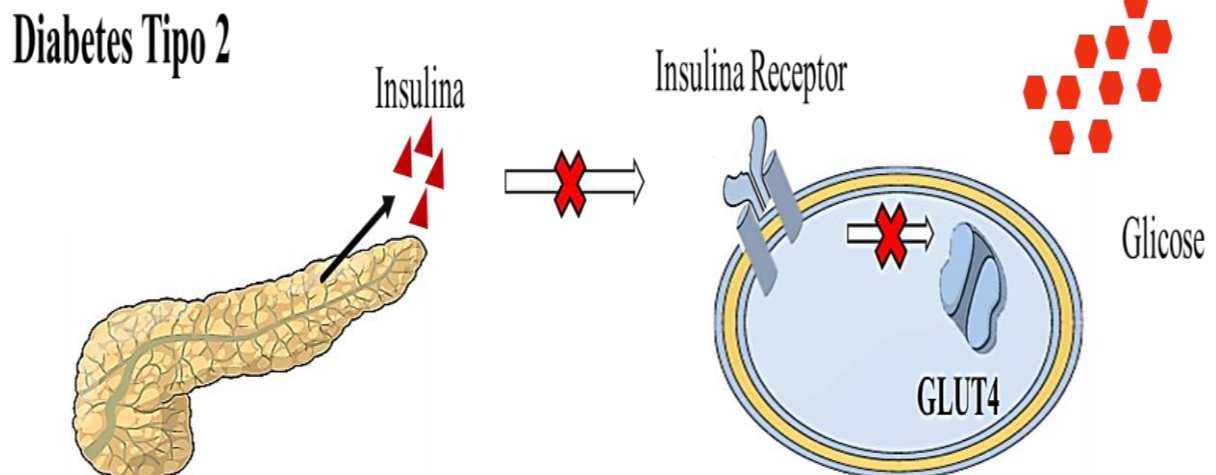
As principais causas para alterações metabólicas encontradas na CAD são: A perda do transporte de glicose para dentro dos tecidos periféricos, como músculo e gordura, já que este transporte é mediado pela insulina, aumento da gliconeogênese e glicogenólise hepática e prejudicando a quebra de gordura, proteínas e glicogênio. A hiperglicemia permanente se estabelece quando uma porcentagem de 90% das ilhotas são destruídas (PASQUALOTTO *et al.*, 2012; SILVA & NOGUEIRA, 2015).

As características principais no organismo de pacientes com DM1: glicose sanguínea aumentada; o aumento da utilização dos lipídeos como fonte de energia e para formação de colesterol pelo fígado; e depleção das proteínas do organismo, fazendo-se necessário o devido tratamento, pois tal anormalidade metabólica promove o consumo dos tecidos corporais e levando o indivíduo a morte (GUYTON & HALL, 2011).

3.2.2 Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2)

O diabetes tipo 2 caracteriza-se pela incapacidade de utilizar a insulina corretamente, afetando assim a forma como o corpo metaboliza a glicose, fazendo assim com que ela se acumule no sangue. Esse mecanismo pode ser observado na figura 4.

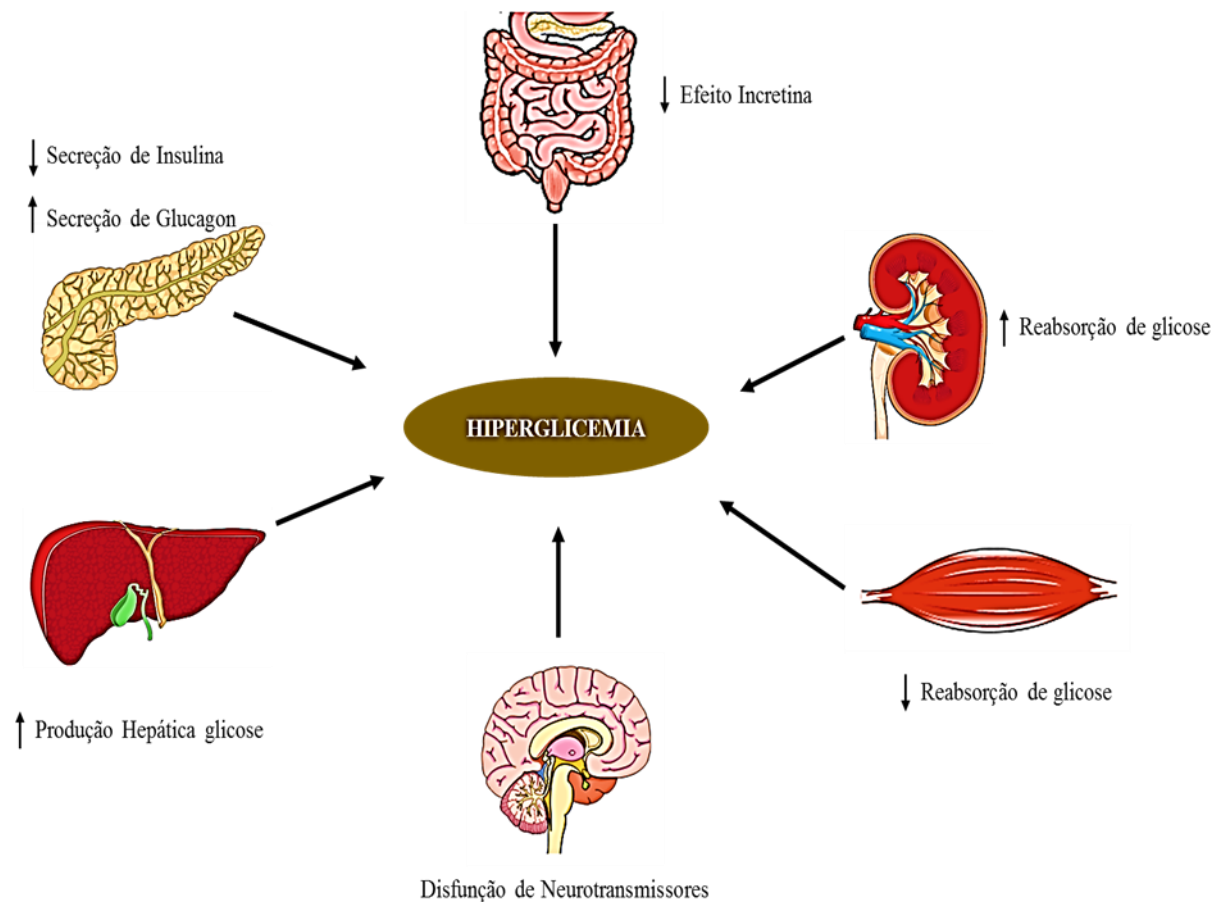
Figura 4. Fisiopatologia do Diabetes *Mellitus* tipo 2



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando as plataformas *Mind The Graph* (Versão Livre - <https://mindthegraph.com/>) e *Microsoft Office Power Point 2016*

Os mecanismos fisiopatológicos que promovem a hiperglicemia severa no paciente com DM2 ocorrem devido à resistência periférica à ação insulínica nos adipócitos; secreção deficiente de insulina pelo pâncreas; aumento da produção hepática de glicose resultante da resistência insulínica no fígado, entre outros motivos, como representado na figura 5 (CARLSSON *et al.*, 2004; ADA, 2012).

Figura 5. Patogênese do Diabetes mellitus tipo 2



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando as plataformas *Mind The Graph* (Versão Livre - <https://mindthegraph.com/>) e *Microsoft Office Power Point* 2016.

O DM2, diferentemente do DM1, está relacionado com o aumento da concentração de insulina plasmática devido a sensibilização reduzida dos tecidos-alvos quanto a atividade metabólica da insulina, promovendo assim a resistência insulínica. O processo de dessensibilização atinge diversos eventos celulares, como o armazenamento de carboidratos, dessa forma aumenta a glicose sanguínea que irá estimular a secreção de insulina. No entanto

em estágios mais avançados de DM2 as células beta pancreáticas tornam-se incapazes de suprir a demanda de insulina necessária para evitar a hiperglicemia (GUYTON & HALL, 2011).

A incidência do DM2 representa um percentual de 90% de todos os casos de diabetes, caracterizando-se por ocorrer majoritariamente em indivíduos com mais de 40 anos, estando relacionado com hábitos alimentares irregulares e com a obesidade. Além disso pacientes portadores de DM2 apresentam síndrome metabólica, implicando em riscos cardiovasculares elevados (LAAKSONEN *et al.*, 2004).

A síndrome metabólica (SM) eleva em torno de 5 vezes a incidência de DM2, para diminuir os riscos pessoas mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença devem adotar hábitos mais regulares e saudáveis para minimizar esse risco (LAWS *et al.*, 2012).

Pesquisas apontam fatores que elevam o risco de desenvolver diabetes tipo 2: Obesidade, histórico familiar com pré-disposição para o diabetes, idade, intolerância à glicose, hipertensão e tabagismo. Além disso também pode-se mencionar fatores como substâncias nocivas para manutenção da homeostasia da captação de glicose pelas células (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005).

3.2.3 Mecanismo de ação da Aloxana

A aloxana (2,4,5,6 – tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracila) como agente diabetogênico foi descrita inicialmente através do estudo dos efeitos da sua administração em coelhos quanto aos danos necróticos causados nas ilhotas do pâncreas (DUNN; SHEEHAN; McLETHIE, 1943). Desde então, a diabetes induzida por aloxana tem sido comumente utilizada como modelo experimental para diversos estudos (KAZEMI-DARABADI *et al.*, 2014; PESSOA *et al.*, 2016).

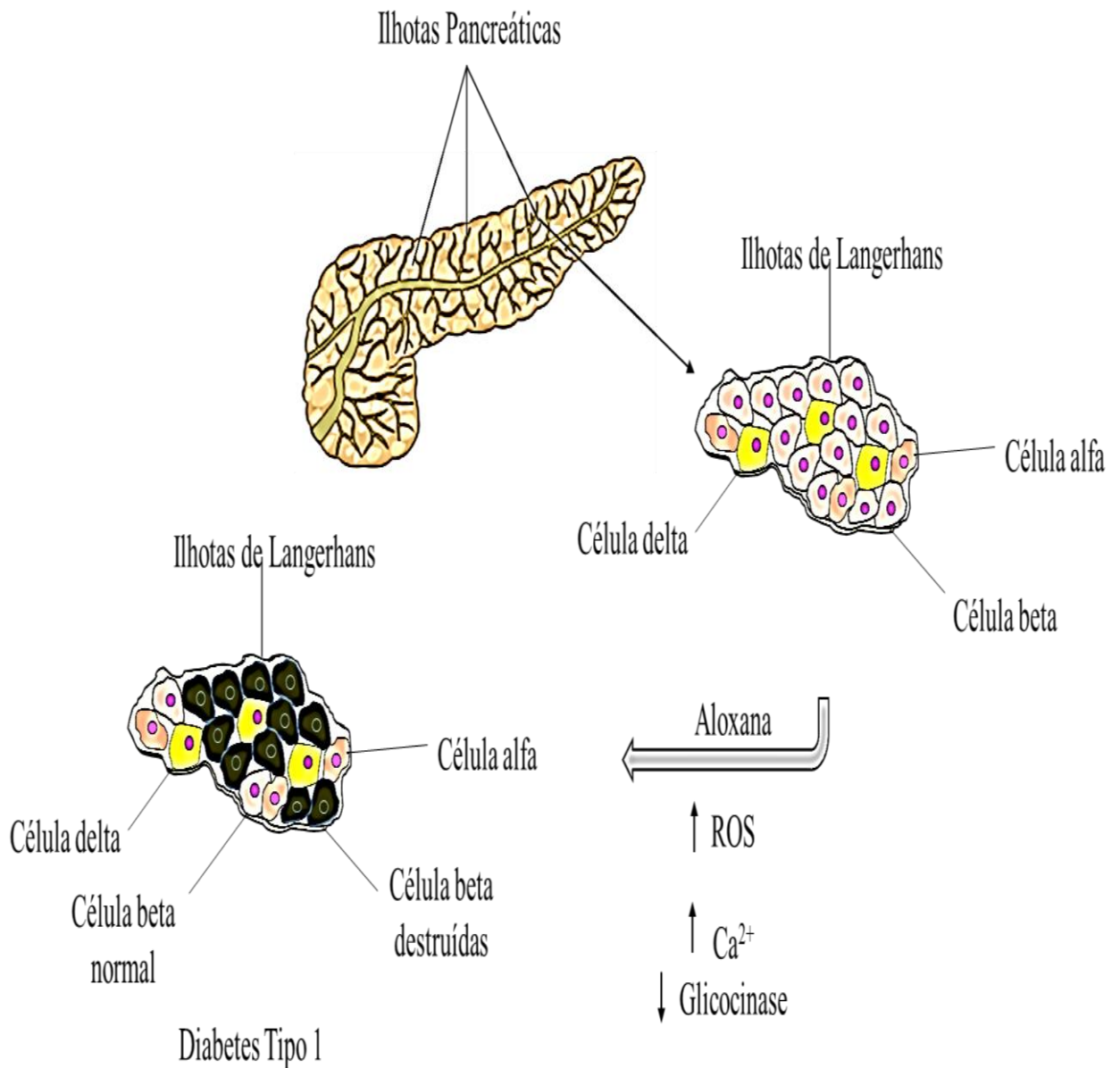
O mecanismo de ação da aloxana foi intensamente estudado *in vitro e in vivo*, buscando dessa forma deixá-lo muito bem caracterizado. Pesquisas demonstraram que a droga provoca um aumento súbito na secreção de insulina, na presença ou ausência de glicose (SZKUDELSKI, 2001).

Essa droga possui citotoxicidade específica para as células β do pâncreas, causando danos aos vasos sanguíneos das ilhotas pancreáticas, provocando a morte das células e quadro clínico de diabetes mellitus tipo 1 como representado na figura 6 (SZKUDELSKI, 2001; LENZEN, 2008).

A seletividade da aloxana pelas células β do pâncreas promove efeitos patológicos, pelo fato de atuar inibindo seletivamente a secreção de insulina induzida pela glicose devido a

capacidade de inibir de maneira específica a glicocinase, a qual representa o sensor de glicose da célula beta, o aumento do influxo de cálcio citosólico acelera a destruição das células, e a formação das espécies reativas de oxigênio (ROS) em uma reação cíclica com o produto de redução da droga, o ácido dialúrico, induz necrose seletiva de células beta, como demonstrado na Figura 6. Tais efeitos podem ser atribuídos às propriedades químicas específicas da aloxana, estruturalmente tão semelhante à glicose que o transportador de glicose GLUT2 na membrana plasmática da célula beta aceita e transporta a droga para o citosol (GORUS; MALAISSE; PIPELEERS, 1982; LENZEN, 2008).

Figura 6. Efeito citotóxico da aloxana nas células beta pancreáticas



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando as plataformas *Mind The Graph* (Versão Livre - <https://mindthegraph.com/>) e *Microsoft Office Power Point* 2016.

A descrição do mecanismo e o potencial da droga na indução de diabetes tipo 1 representa uma excelente alternativa como modelo experimental no estudo de danos e complicações promovidas por tal patologia. Dentre as diversas complicações que o diabetes apresenta pode-se destacar as relacionadas com o processo de cicatrização de lesões (CASSETTARI *et al.*, 2014; KAZEMI-DARABADI *et al.*, 2014; PESSOA *et al.*, 2016).

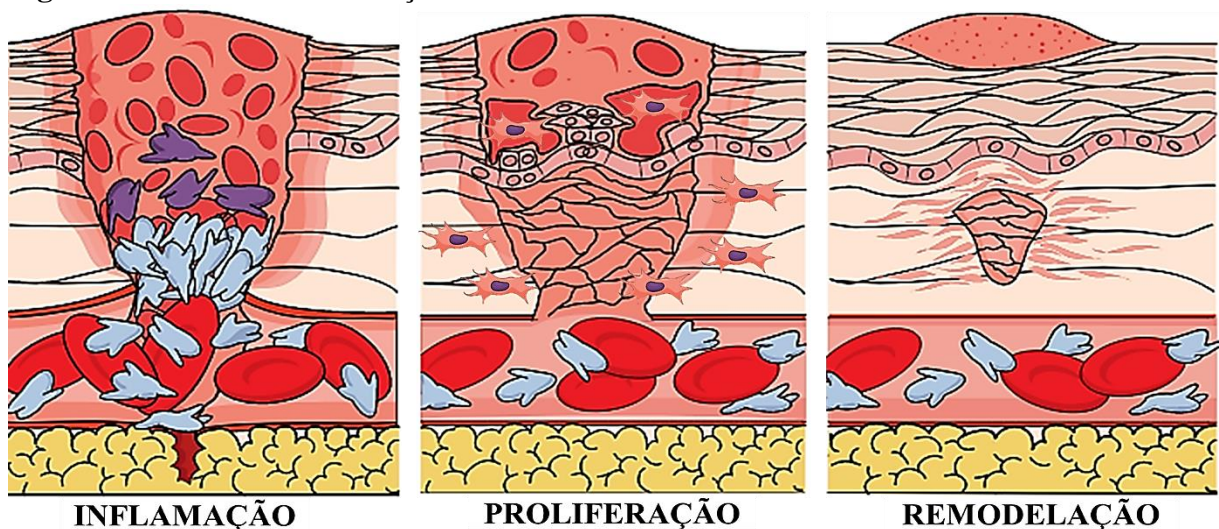
3.3 CICATRIZAÇÃO

As feridas são eventos que podem afetar a fisiologia da pele, em especial aquelas que acometem a camada dérmica. Assim, lesões teciduais são eventos que afetam a fisiologia da pele e a sua estrutura, acarretando com isso vários processos na busca de cura dessas lesões. Sendo o processo de cicatrização uma coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que visam à recuperação da área lesionada (ISAAC *et al.*, 2010).

A cascata de cicatrização possui uma sequência coordenada de eventos, os quais apresentam classificações didáticas que são utilizadas para facilitar o entendimento de um processo totalmente dinâmico e com fases tão interdependentes como a cicatrização (MANDELBAUM ;DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; MALLEFET & DWECK, 2008).

O processo de cicatrização (Figura 7) é dividido de forma diferente entre alguns autores, alguns consideram: inicialmente um processo de inflamação, seguido por um de proliferação e finalizando com o reparo em um estágio de remodelação (ISAAC, 2010; JANIS; HARRISON, 2014).

Figura 7. Cascata de Cicatrização



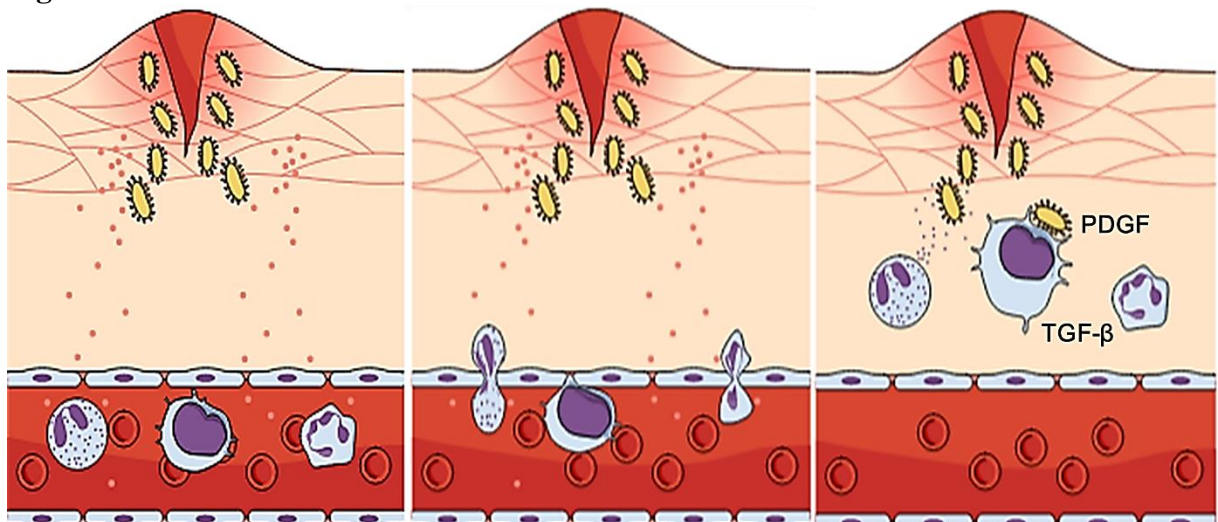
Fonte: Elaborada pelo autor utilizando as plataformas *Mind The Graph* (Versão Livre - <https://mindthegraph.com/>)

3.3.1 Inflamação

A inflamação caracteriza-se por ser uma reação de defesa contra agentes nocivos, entre eles microrganismos e células do próprio organismo que estejam danificadas, promovendo a ocorrência de fatores biológicos como respostas vasculares e reações sistêmicas buscando a estabilização da homeostasia dos tecidos. Se não houvesse a inflamação, as infecções iriam desenvolver-se de forma descontrolada, impossibilitando que sucedesse a cicatrização e dessa forma os processos destrutivos em órgãos seriam permanentes até a perda total de função. Existem cinco sinais clássicos do processo inflamatório, chamados de Sinais Cardinais, os quais caracterizam os eventos biológicos que ocorrem e são eles: edema, calor, rubor, dor e perda da função (POBER & SESSA, 2007).

Cada sinal citado anteriormente apresenta características específicas como o edema que é causado principalmente pela fase exsudativa (fluido inflamatório extravascular) proveniente do aumento de líquido e de células. O calor apresenta-se na fase vascular, onde há hiperemia arterial (que é o aumento do volume sanguíneo no local) e, conseqüentemente, aumento da temperatura da região. O rubor caracteriza-se pela vermelhidão do local, decorrente da hiperemia. A dor é originada por mecanismos mais complexos que incluem compressão das fibras nervosas locais devido ao edema, agressão direta às fibras nervosas e ação farmacológica sobre as terminações nervosas, envolvendo diretamente outras fases da inflamação (por exemplo, vascular e exsudativa). Por fim, a perda de função é decorrente do prolongamento excessivo do processo inflamatório atingindo diretamente a execução das atividades e funções dos tecidos (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Figura 8. Processo Inflamatório



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando as plataformas *Mind The Graph* (Versão Livre - <https://mindthegraph.com/>)

Uma função primordial da resposta inflamatória é levar leucócitos à região agredida, pois muitos deles desempenham papel importante na defesa, fagocitando ou produzindo substâncias que destroem microrganismos e tecidos necróticos, que inativam ou degradam antígenos. As células circulantes como neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos chegam ao sítio da agressão pela corrente sanguínea, atravessando a parede dos vasos e migrando em direção ao local de agressão de forma maciça durante as primeiras 24 horas de lesão atraídas pelas numerosas citocinas inflamatórias produzidas, pelas plaquetas ativadas, pelas células endoteliais, bem como pelos produtos de degradação dos agentes patogênicos da lesão (LAMANO, 2008; RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010).

Esses mediadores químicos provocam dilatação das arteríolas e aumento de permeabilidade dos capilares e vênulas, o que permite um maior fluxo de sangue para a área agredida, bem como a exsudação (extravasamento) de líquido, proteínas e células de defesa para o espaço intersticial. Com a exsudação líquida ocorre a formação do edema inflamatório, o sangue torna-se gradativamente mais viscoso, pelo aumento da concentração de hemácias, e a corrente circulatória dos pequenos vasos torna-se cada vez mais vagarosa, culminando com a estase sanguínea (pequenos vasos dilatados e repletos de hemácias). Ao mesmo tempo, ocorre à migração dos leucócitos através da parede vascular para o espaço intersticial, (chamada de transmigração, diapedese ou emigração leucocitária) constituindo a fase inicial (aguda) de qualquer tipo de resposta inflamatória, e são denominados de fenômenos vasculares-exsudativos permitindo o recrutamento e deslocamento das células circulantes de defesa citadas anteriormente (ROSS & ODLAND, 1998; LAMANO, 2008; KIM *et al.*, 2008).

O recrutamento e a ativação de células inflamatórias, seja inflamação aguda ou crônica, são uma consequência de muitos sinais que ocorrem no local da ferida e alguns dos primeiros destes incluem fatores liberados pela desgranulação de plaquetas, as quais Induzidas pela trombina, liberam vários fatores de crescimento, como o derivado de plaquetas (PDGF), o de crescimento transformante- β (TGF- β), o de crescimento epidérmico (EGF), o de crescimento transformante- α (TGF- α) e o fator de crescimento de células endoteliais (VEGF), além de glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospondina, que são importantes constituintes da matriz extracelular provisória (DEPPERMAN *et al.*, 2015).

Na fase inflamatória da cicatrização de feridas ocorre a ativação de substâncias vasoativas tais como serotonina, bradicinina, prostaglandinas e histamina. Estas substâncias aumentam a permeabilidade do endotélio dentro do local da lesão e aumentam a perfusão de líquido intersticial para esta área. A maior permeabilidade facilita a infiltração pelas células imunes e de reparação favorecendo os eventos descritos anteriormente, enquanto que a

circulação aumentada eleva a distribuição de oxigênio no tecido. Como consequência, a temperatura no local de lesão aumentada, o microambiente quente e úmido criado dentro da ferida é essencial para a próxima fase de cura. No final do estágio de inflamação da cicatrização de feridas, os macrófagos produzem vários fatores de crescimento, tais como o PDGF, o TGF- β , o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o VEGF, que se destacam como as principais citocinas necessárias para estimular a formação do tecido de granulação e criar o ambiente perfeito para a próxima fase de proliferação e reparo celular (STRODTBECK, 2001; MENDONÇA; EMING *et al.*, 2007; MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009).

3.3.2 Proliferação

A proliferação é responsável pelo fechamento da lesão propriamente dito. Compreende: reepitelização, que se inicia horas após a lesão. A fibroplasia e a angiogênese compõem a formação do tecido de granulação responsável pela ocupação do tecido lesionado. Os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local. Com a progressão da fase proliferativa, a matriz provisória é substituída pelo tecido de granulação recém-formado. A epitelização da ferida representa o estágio final da fase proliferativa (WALDROP; DOUGHTY, 2001; ENOCH; LEAPER, 2007).

A formação da matriz extracelular fornece um substrato para a adesão celular e regula criticamente o crescimento, movimento e diferenciação das células dentro dele. A matriz extracelular consiste em proteínas estruturais (colágeno e elastina) e uma matriz intersticial composta de glicoproteínas adesivas proteoglicano e glicosaminoglicano (ECKES *et al.*, 2010; REINKE; SORG, 2012).

O aumento da permeabilidade microvascular característico do processo inflamatório, representa a primeira etapa desse processo proliferativo, apresentando-se como etapa importante, que permite, através dos fatores celulares como, por exemplo, liberação de citocinas e elementos celulares, a formação da matriz extracelular provisória necessária à migração e proliferação das células endoteliais (WALDROP; DOUGHTY, 2000; DELAVARY *et al.*, 2011).

O crescimento dos vasos sanguíneos é um componente essencial da reparação tecidual, uma vez que os vasos suprem as células no local da ferida com nutrição e oxigênio. A angiogênese é etapa fundamental do processo de cicatrização, na qual novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes. Os novos vasos participam da formação do tecido

de granulação provisório e suprem de nutrientes e de oxigênio o tecido em crescimento. De forma diferencial, a vasculogênese refere-se aos primeiros estádios do desenvolvimento vascular, durante o qual as células precursoras do endotélio vascular sofrem mobilização de progenitores endoteliais derivados de medula óssea (EMING *et al.*, 2007).

Um dos principais componentes celulares da fase proliferativa são os fibroblastos, sendo a migração dos mesmos induzida pelo PDGF e TGF- β liberados pelos macrófagos. Os fibroblastos quando chegam ao leito da ferida, proliferam e produzem proteínas matriciais como fibronectina e, posteriormente, colágeno e proteoglicanos. Estes componentes ajudam a construir a nova matriz extracelular, que irá suportar o crescimento adicional das células essenciais para o processo de reparação. Existe uma interação crucial entre os fibroblastos e a matriz extracelular que ajuda a regular a síntese adicional dos componentes e a remodelação tecidual (BELDON, 2010).

O processo de reepitelização do tecido lesionado é acelerado pela contração do tecido conjuntivo subjacente, devido a aproximação das margens da ferida. Este processo de contração é realizado por miofibroblastos, ativados por TGF- β e PDGF, sendo assim um importante aliado da cicatrização das feridas, principalmente nas abertas pois os miofibroblastos produzem quantidades maiores de componentes da matriz extracelular. Porém, se ocorre de forma incorreta e desordenada causa defeitos cicatriciais devido a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, estimulados pelos fatores de crescimento citados anteriormente (FRANK *et al.*, 1995; DELAVARY *et al.*, 2011).

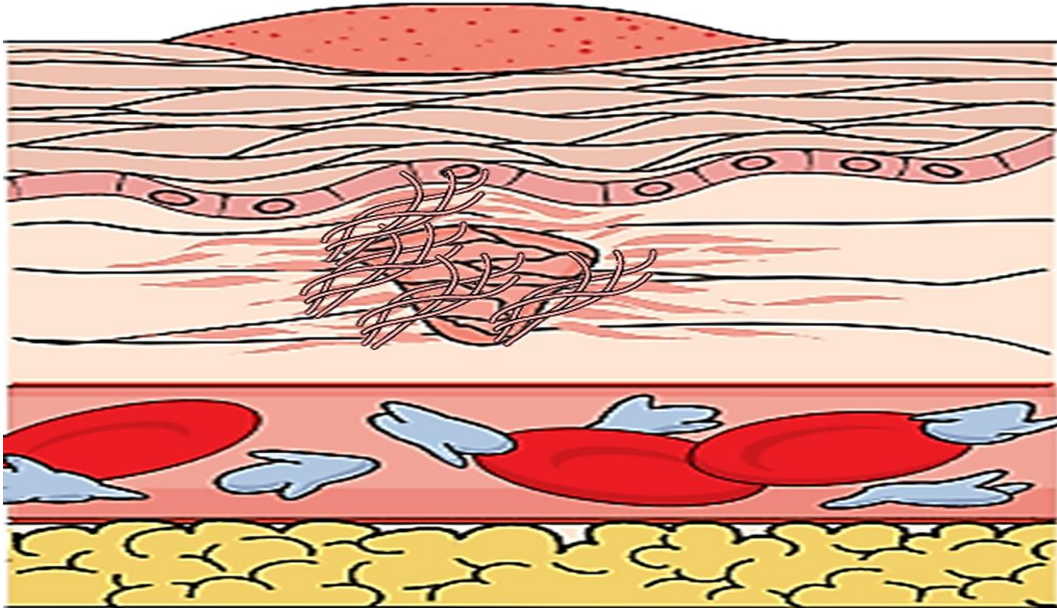
3.3.3 Remodelação

A fase final da cicatrização de feridas é a remodelação ou maturação do tecido de granulação em tecido conjuntivo maduro ou cicatriz. A ferida também desenvolve a sua resistência final durante esta fase de cicatrização. A maturação da ferida tem início durante a 3ª semana e caracteriza-se por um aumento da resistência, sem aumento descontrolado na quantidade de colágeno, caracterizando-se por um equilíbrio de produção e destruição das fibras de colágeno neste período, por ação da collagenase. O desequilíbrio desta relação favorece o aparecimento de cicatrizes hipertróficas e queloides (STRODTBECK, 2001; YOUNG; MCNAUGHT, 2011).

Por fim, o processo de remodelação, como já citado, tem como constituinte principal as fibras de colágeno que irão se depositar no local (figura 9). Esta etapa constitui-se da mudança do tipo de colágeno que a compõe e de sua disposição, sendo que a reparação pode

ocorrer por primeira ou segunda intenção. O colágeno tipo III, inicialmente mais abundante que o tipo I, vai sendo degradado mais ativamente com o decorrer do tempo, enquanto que o colágeno I vai tendo sua produção aumentada pelos fibroblastos, sendo responsável pelo aumento da força de tensão e diminuição do tamanho da cicatriz, atingindo assim a restauração tecidual local (SINGER & CLARK, 1999; BROUGHTON *et al.*, 2006).

Figura 9. Fase de Remodelação



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando as plataformas *Mind The Graph* (Versão Livre - <https://mindthegraph.com/>)

São vários os fatores que podem interferir no processo de cicatrização das feridas, em especial nos eventos biológicos que a compõem, fatores como a idade avançada, o estado nutricional do paciente, as alterações vasculares, são alguns exemplos de complicações que podem alterar diretamente o processo de cicatrização. Porém o diabetes mellitus representa um fator que altera de forma drástica o processo de restauração tecidual, interferindo em todas as etapas e trazendo serias complicações para os pacientes.

3.4 CICATRIZAÇÃO E DIABETES

O processo de cicatrização de feridas ocorre de forma dificultada quando o paciente é diabético. Feridas em diabéticos apresentam inibição da revascularização e baixa expressão de fatores de crescimento em relação a lesão em não-diabéticos, com prejuízo à cicatrização. Estas complicações podem evoluir para consequências graves, como a formação de feridas de difícil resolução, podendo levar até perda de função tecidual (ANDRADE *et al.*, 2013).

Estudos apontam diversas alterações fisiológicas no processo de cicatrização relacionadas diretamente com o diabetes, entre elas destaca-se os da tabela 1. Os diversos fatores descritos na literatura caracterizam causas que promovem o desequilíbrio dos componentes da matriz extracelular e da remodelação tecidual (BREM & TOMIC-CANIC, 2007).

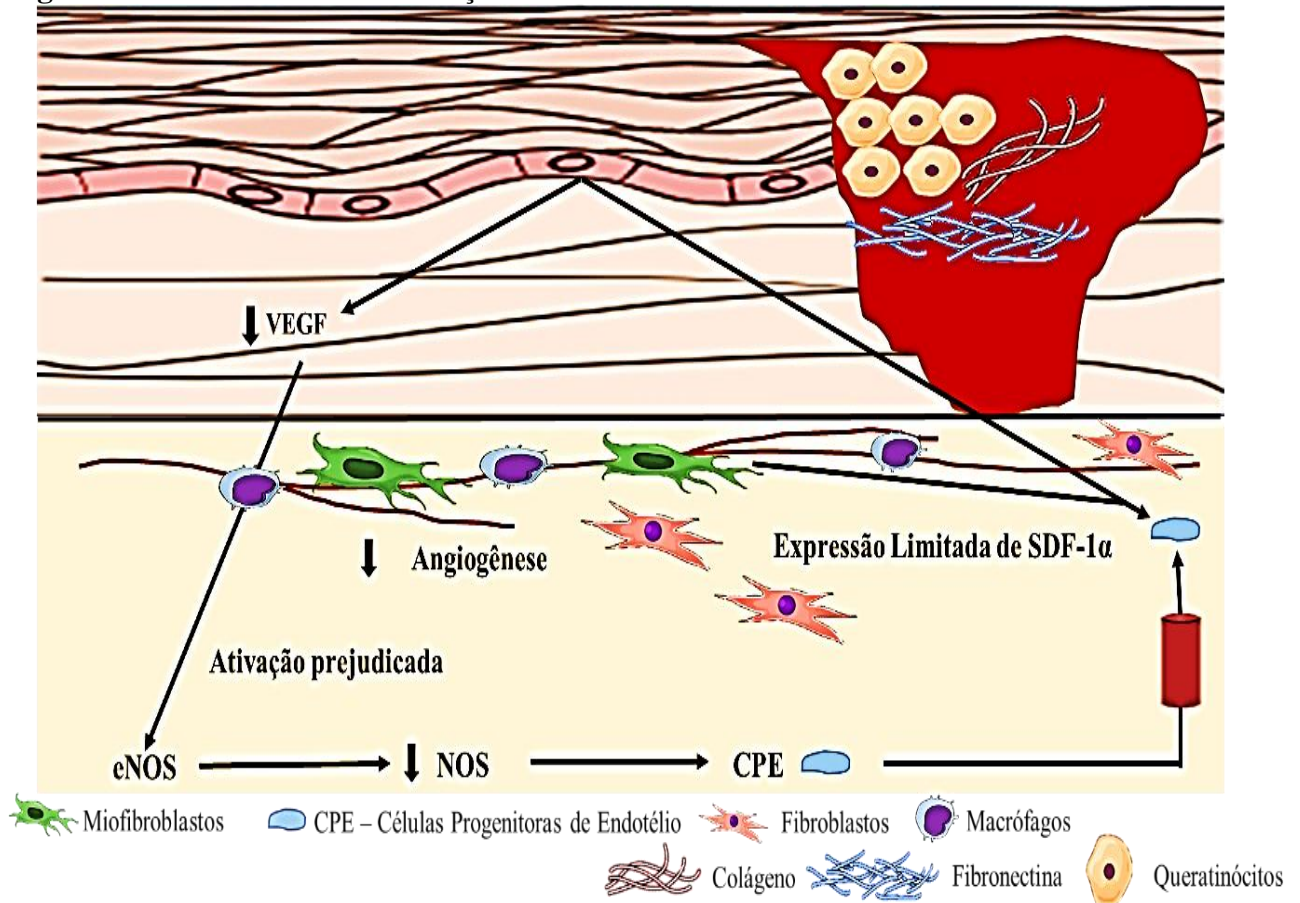
Tabela 1. Alterações fisiológicas no processo de cicatrização em diabéticos.

Alterações fisiológicas no processo de cicatrização de pacientes diabéticos
Excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) derivadas de um sistema de defesa antioxidante desbalanceado incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidases
Redução na produção de fatores de crescimento
Retardo da resposta angiogênica (formação de novos vasos)
Função de macrófagos fica comprometida
Altera a acumulação de colágeno
Quantidade de tecido de granulação
Migração e proliferação de queratinócitos e fibroblastos

Fonte: Fonte: GALIANO *et al.*, 2004; GALKOWSKA *et al.*, 2006; EO *et al.*, 2016

A cicatrização prejudicada no diabetes é caracterizada por uma inflamação aguda e uma angiogênese anormal, como observa-se na figura 10 as dificuldades de formação de novos sanguíneos (angiogênese) em diabéticos. A cicatrização adequada de uma ferida necessita de uma resposta inflamatória regulada, enquanto que as feridas diabéticas têm respostas inflamatórias prolongadas. As feridas no DM1 demonstram uma expressão aumentada de citocinas inflamatórias incluindo o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucinas (IL)-1 e IL-6 e diminuição da IL-10 conduzindo a lesão para uma fase inflamatória prolongada. Esta inflamação desregulada e prolongada leva ao desenvolvimento de ambientes de feridas crônicas e, eventualmente, lesões que não cicatrizam (PARK *et al.*, 2016).

Figura 10. Dificuldade de cicatrização em diabéticos



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando as plataformas *Mind The Graph* (Versão Livre - <https://mindthegraph.com/>) e *Microsoft Office Power Point* 2016.

Essas lesões crônicas, como as úlceras nos pés (pé diabético), levam a alta morbidade e aumento dos custos de tratamento. Além disso, as úlceras do pé compreendem mais de 50% dos casos de amputação entre os diabéticos (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2009). O estresse oxidativo aumentado é uma das principais causas de complicações nas feridas em diabéticos, causando cicatrização tardia. A redução da inflamação persistente e eliminação de radicais livres pela introdução de um agente anti-inflamatório e antioxidante no tratamento de feridas poderia ser uma estratégia importante para melhorar a cicatrização de feridas diabéticas (KANT *et al.*, 2014).

Fatores associados à angiogênese e ao processo de vasculogênese são vitais para a cicatrização de feridas, uma vez que desempenham um papel necessário no fornecimento de oxigênio, nutrientes e outros mediadores no local da ferida. Sendo assim, tornam-se alvos terapêuticos para melhorar a cicatrização de feridas danificadas na diabetes através da ativação destes fatores, restabelecendo a neovasculogênese e melhorando a cicatrização (KANT *et al.*, 2015).

As plantas medicinais, as suas preparações (como por exemplo, extratos) e os compostos ativos presentes em algumas delas têm sido utilizados para acelerar o processo de cicatrização de feridas. Como estratégia na investigação de plantas medicinais, a abordagem etnofarmacológica consiste em combinar informações adquiridas junto a usuários da flora medicinal (comunidades tradicionais), com estudos químicos e farmacológicos (ELISABETSKY, 2003).

3.5 ETNOFARMACOLOGIA

A etnofarmacologia é uma ciência que procura entender o universo dos recursos naturais, tais como as plantas, os animais e os minerais, utilizados como drogas sob a ótica de grupos humanos, definida como exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem (BRUHN & HOLMSTEDT, 1982).

As plantas medicinais são utilizadas com fins terapêuticos há muitos anos e representam a maior fonte de substâncias de interesse farmacêutico. A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica planta medicinal como uma espécie vegetal que, administrada ao ser humano, exerça ação farmacológica. A valorização do etnoconhecimento em relação às propriedades terapêuticas das plantas e o conhecimento popular têm-se apresentado como fonte de conhecimento técnico-científico. A acumulação de informações sobre o uso de recursos naturais por populações tradicionais tem oferecido, aos pesquisadores, modelos de uso sustentável desses mesmos recursos e direcionamentos para os princípios farmacológicos das espécies (LEITÃO *et al.*, 2014).

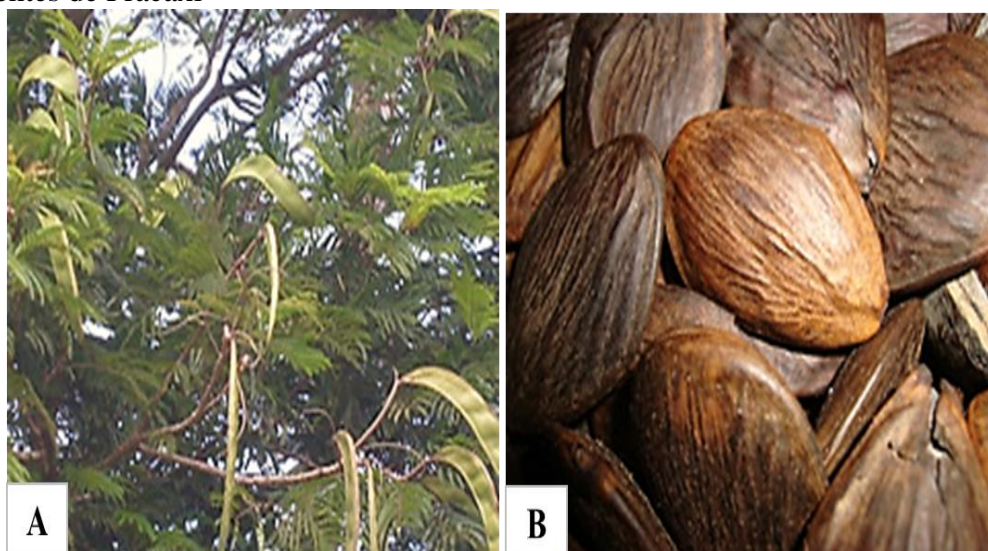
Neste contexto, o uso tradicional pode ser encarado como uma pré-triagem quanto à propriedade terapêutica. Considerando que a inserção de novas moléculas biologicamente ativas ocorre a partir, em muitos casos, de um conhecimento pré-existente, o método etnofarmacológico permite a formulação de hipóteses quanto à atividade farmacológica e à substância ativa responsável pelas ações terapêuticas relatadas (ELISABETSKY, 2003).

Tal conhecimento etnofarmacológico foi fundamental para a obtenção de informações prévias, representando uma pré-triagem, sobre a aplicabilidade farmacológica do uso terapêutico da *Pentaclethra maculosa*.

3.6 *Pentaclethra macroloba*

A *Pentaclethra macroloba* conhecida popularmente como Pracaxi, é uma espécie pertencente à família das fabaceae sendo uma árvore de tamanho médio de 25 metros de altura que cresce de preferência em terrenos úmidos, na beira de rios e ilhas do baixo Amazonas (LORENZI, 2002). Além disso, cresce preferencialmente em clima tropical chuvoso, florando no período seco e frutificando no período chuvoso, mais especificamente a alta estação de produção ocorre nos meses de fevereiro e março, produzindo favas onde se encontram as sementes como demonstrado na figura 11A (PESCE, 2009). A fava de Pracaxi é constituída por dois cotilédones achatados, um pouco ovais, e com um lado pontiagudo. A fava reveste a semente (figura 11B), que possui uma massa pouco consistente, além de apresenta consistência oleosa e cor branca (CALDAS, 2010).

Figura 11. Árvore de Pracaxi (*Pentaclethra macroloba*): A. Árvore de pracaxi com as favas; B- Sementes de Pracaxi



Fonte: <http://www.amazonoil.com.br/produtos/oleos/pracachy.htm>

Pentaclethra macroloba apresenta estudos que relatam algumas de suas atividades farmacológicas, como por exemplo a atividade inseticida de suas sementes (CHUN *et al.*, 1994). Posteriormente a atividade larvicida das sementes de *Pentaclethra macroloba*, foi confirmando, neste caso, a atividade inseticida apresentada pelas sementes encontrada foi sobre o *Aedes aegypti* (SANTIAGO *et al.*, 2005).

Esta árvore amazônica possui um alto poder terapêutico, por exemplo, funcionando como planta medicinal contra picadas de cobras devido as suas atividades anti-hemorrágicas,

antinucleolíticas e outras propriedades antiofídicas do extrato aquoso (SILVA *et al.*, 2005). Além disso, saponinas triterpenóides isolados da *Pentaclethra macroloba* como novos inibidores de veneno de serpente foram propostas como agentes terapêuticos no tratamento de envenenamentos por picada de cobra (SILVA *et al.*, 2007).

A atividade antimicrobiana de plantas medicinais amazônicas, entre elas o pracaxi, foram avaliadas recentemente. O pracaxi demonstrou capacidade de inibir o crescimento de *Klebsiella ozaenae*, uma bactéria bacilar, gram-negativa, que está relacionada com pneumonias e infecções no trato urinário e *Acinetobacter baumannii* espécie de bactéria aeróbia gram-negativa que provoca infecções oportunistas, afetando mais frequentemente as vias respiratórias e o trato urinário, podendo causar pneumonias severas e infecções urinárias (OLIVEIRA *et al.*, 2013). No entanto, o óleo de Pracaxi teve a atividade antimicrobiana avaliada contra *Staphylococcus aureus* (espécie gram-positivos) e foi demonstrado que não conseguiu inibir o crescimento das cepas (GUIMARÃES *et al.*, 2016).

Portanto é de suma importância pesquisas que forneçam comprovações da eficácia da utilização de plantas medicinais, tal como o *Pentaclethra macroloba*, visando as suas aplicações na área médica, em especial, no que se refere ao tratamento de feridas em pacientes diabéticos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização do efeito farmacológico da aplicação tópica do extrato cetônico da semente *Pentaclethra macroloba* (Pracaxi), no processo de regeneração tecidual em animais diabéticos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterização da composição química do extrato cetônico da semente de pracaxi;
2. Padronização dose-efeito do extrato do Pracaxi;
3. Avaliar o mecanismo de cicatrização dos animais diabéticos tratados com extrato cetônico em modelo *in vivo* de lesões excisionais em camundongos suíços;
4. Avaliar a atividade anti-inflamatória nos animais diabéticos tratados com o extrato cetônico em modelo *in vivo* de lesões excisionais em camundongos;
5. Analisar as características histológicas da cicatrização dos animais diabéticos após administração do extrato cetônico em modelo *in vivo* de lesões excisionais em camundongos;
6. Analisar as características da formação da matriz extracelular na cicatrização dos animais diabéticos após administração do extrato cetônico em modelo *in vivo* de lesões excisionais em camundongos.

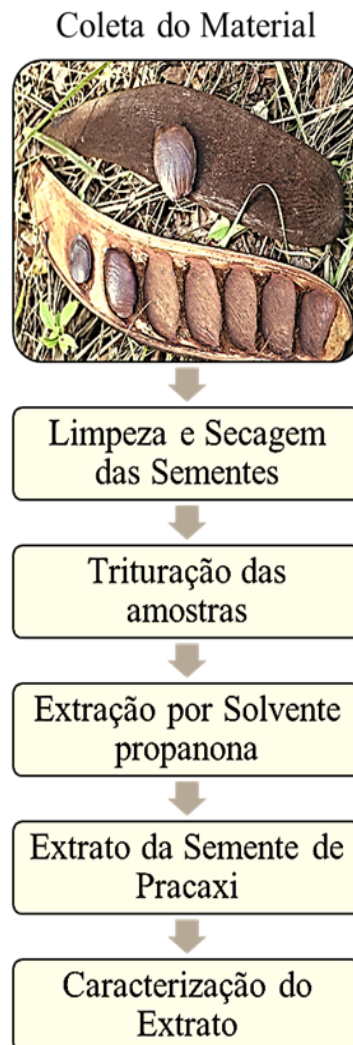
5. METODOLOGIA

5.1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

A planta medicinal foi coletada na Ilha do Marajó e depositadas no herbário do Museu Paraense Emilio Goeldi, Belém-PA, para identificação botânica. Após a limpeza e secagem do material vegetal, as partes utilizadas (semente) em bom estado de pureza foram trituradas e pesadas para posterior extração, todo o fluxograma das etapas está representado na Figura 12.

A extração ocorreu por meio do solvente propanona (cetona) e o produto obtido, após as devidas etapas de preparação, foi realizada a caracterização do extrato, em especial, quanto as ácidos graxos saturados e insaturados que compõem a semente de pracaxi. Sendo que todo o processo de extração foi realizado no laboratório de Neuroinflamação (ICB/UFPA).

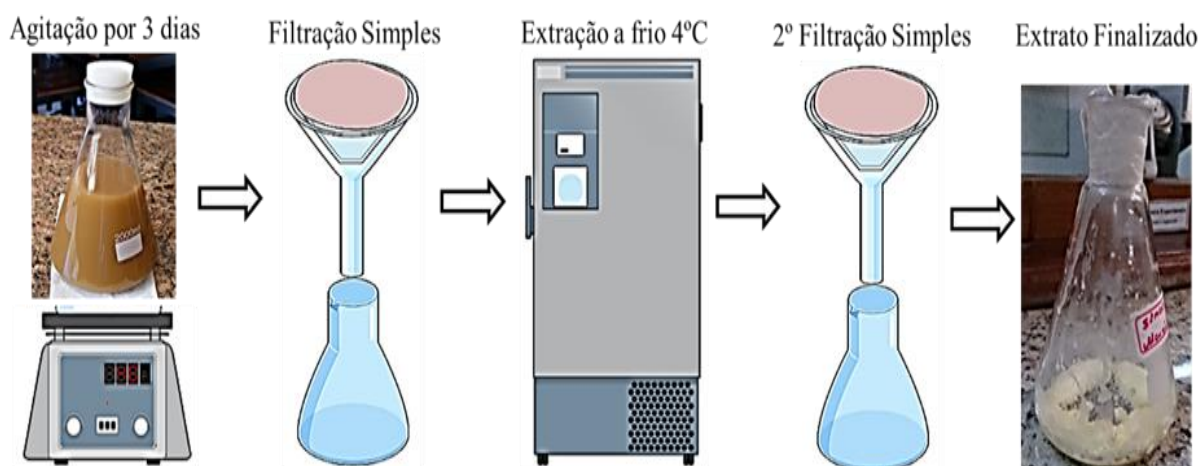
Figura 12. Fluxograma do processo da extração e caracterização da semente de Pracaxi



5.1.1 Preparação do Extrato da Semente de Pracaxi (ESP)

As sementes beneficiadas foram trituradas e pesadas (150g) em seguida transferidas para dois erlenmeyer de 1000 mL, a redução do tamanho da semente é fundamental por aumentar o contato com o solvente. O extrato foi produzido com o solvente (propanona), onde foi adicionado 200mL em cada recipiente, o qual ficou em agitação contínua por três dias consecutivos. Após esse período de agitação a solução foi filtrada e resfriada a 4°C (devido ao fato de que a propanona solubiliza o óleo e o precipita-o a baixa temperatura), por fim foi realizada uma nova filtração com papel filtro qualitativo para produção final do extrato (Figura 13).

Figura 13. Processo de Extração à frio do Extrato da Semente de Pracaxi



Fonte: Elaborada pelo autor utilizando as plataformas *Mind The Graph* (Versão Livre - <https://mindthegraph.com/>) e *Microsoft Office Power Point* 2016 (Adaptado de Caldas, 2010).

A escolha da propanona como solvente nesta extração se deve ao fato de sua rápida volatilização, não deixar odor impregnante a substância isolada e proporcionar maior rendimento em gordura (CALDAS, 2010).

5.1.2 Caracterização Química do Extrato

5.1.2.1 Esterificação da amostra para análise cromatográfica

A caracterização química dos ácidos graxos que compõem o extrato foi realizada por análise cromatográfica no Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustíveis

(LAPAC/UFGA). O extrato oleico produzido foi esterificado pelo método oficial AOCS Ce 2-66, este método transforma os triglicerídeos em éster metílico (derivados preferenciais para as análises de cromatografia gasosa), permitindo assim determinar a composição dos ácidos graxos do extrato (VISENTAINE; FRANCO, 2006).

5.1.2.2 Cromatografia Gasosa (CG)

A cromatografia gasosa analisou os ésteres metílicos dos ácidos graxos usando um cromatógrafo gás-líquido, com detector de ionização de chama, acoplado a um integrador processador, que produziu um cromatograma com picos correspondentes a cada componente de ácidos graxos constituinte da amostra do extrato, além de avaliar os respectivos tempos de retenção e percentuais relativos. A identificação foi feita pela comparação com os padrões dos ésteres de ácidos graxos. A CG permite a separação dos componentes e, posteriormente, a sua quantificação e identificação dos ésteres metílicos saturados e insaturados (RIBEIRO, 2005).

A composição dos ácidos graxos do extrato oleico da semente de pracaxi foi determinada pelo método de CG oficial AOCS Ce 1-62, Cromatógrafo VARIAN CP 3800 com detector de ionização de chama FID. As condições de análise foram: Coluna CP WAX 52 CB (25 m X 0,25mm); DF: 1µm; temperatura do injetor 200°C; temperatura do detector 250°C; gás de arraste hélio com fluxo de 1,0 mL/min.

5.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS CAMUNDONGOS SUÍÇOS

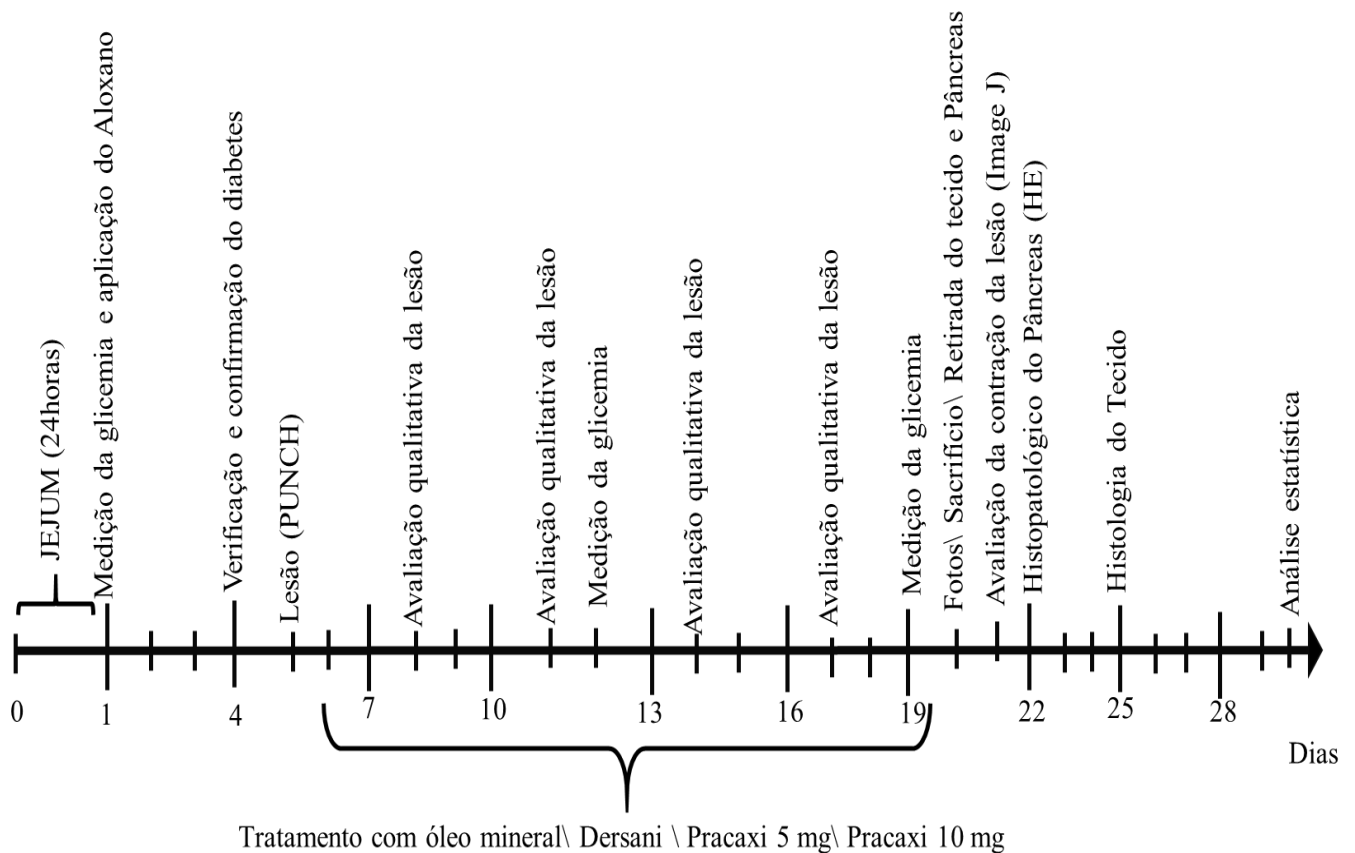
Foram utilizados camundongos Suíços albinos, machos adultos com seis a oito semanas de vida até o dia inicial do experimento; foram mantidos em caixas à temperatura ambiente; água e comida *ad libitum* e ciclo de claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos realizados durante o período experimental foram conduzidos de acordo com o guia de cuidados animais para laboratório do comitê de ética da UFGA (Protocolo – nº04/2017 Anexo A). Animais provenientes do Biotério da Universidade Federal do Pará.

5.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em diferentes grupos de estudo (n= 5 animais/grupo) para indução de diabetes e avaliação do processo de cicatrização totalizando um número total de 35 animais.

- Grupo I: Animais sem lesão e não diabéticos (n = 5);
- Grupo II: Animais sem lesão e diabéticos (n = 5);
- Grupo III: Animais com lesão e não diabéticos (n = 5);
- Grupo IV: Animais com lesão, diabéticos e administração tópica de óleo mineral (n = 5);
- Grupo V: Animais com lesão, diabéticos e administração tópica de Dersani® como cicatrizante padrão (n = 5);
- Grupo VI: Animais com lesão, diabéticos e administração tópica do ESP na dose de 5mg/kg (n = 5);
- Grupo VII: Animais com lesão, diabéticos e administração tópica do ESP na dose de 10mg/kg (n = 5); e

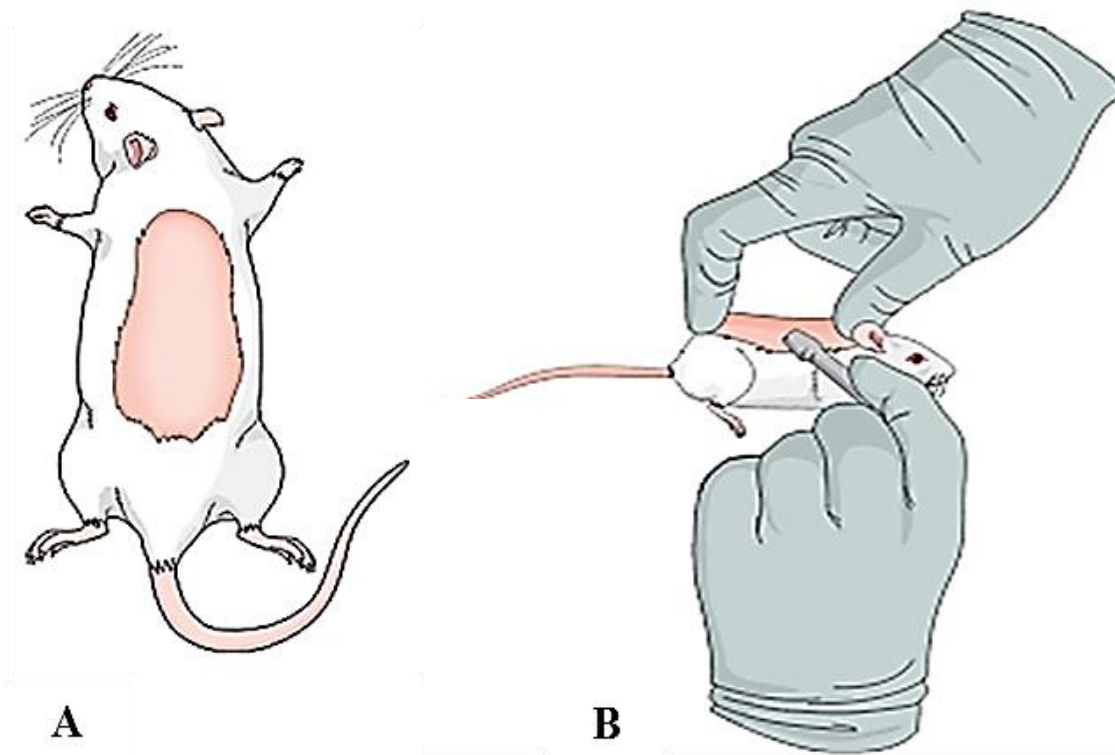
Os animais foram submetidos ao protocolo experimental que consistia no seguinte cronograma, antes do início do período experimental, denominado dia zero, os animais foram deixados em jejum até o dia seguinte, no primeiro dia de experimento foi realizada a medição da glicemia acompanhada da aplicação do fármaco Aloxano, no quarto dia era feita a verificação do nível glicêmico para confirmar o desenvolvimento do diabetes nos animais dos grupos II, IV, V, VI e VII, os animais eram considerados diabéticos quando o valor glicêmico estivesse acima de 300 mg/dl, nos demais grupos não foram administrados aloxano. No quinto dia de experimento era realizada a lesão pelo método de *punch*, no dia seguinte era iniciado o tratamento com os respectivos componentes de cada grupo (óleo mineral \ Dersani \ Pracaxi 5 mg \ Pracaxi 10 mg), sendo a resposta da lesão ao tratamento registrado com fotos a cada três dias, com períodos intercalares de medição da glicemia (12º e 19º dias de experimento). No vigésimo dia era realizada a última fotografia, seguida do sacrifício dos animais por perfusão e posterior retirada do tecido e pâncreas. No 21º dia eram feitas as análises de contração das lesões com o auxílio do programa Image J. Nos 22º e 25º dias foram realizados os histopatológicos do pâncreas e tecidos, respectivamente. No restante dos dias eram realizadas as análises estatísticas (Figura 14).

Figura 14: Cronograma experimental

5.4 MODELO DE INDUÇÃO DE DIABETES VIA ADMINISTRAÇÃO DE ALOXANO

A indução do diabetes ocorreu por administração de aloxana monohidratada intraperitoneal (i.p) em camundongos Suíços albinos machos (20-25g), como ilustrado na figura 15A, na dose de 150 mg/kg (LENZEN, 2008). Os animais foram expostos a um jejum de 24h antes da aplicação da aloxana (2% diluída em solução salina). Os camundongos, que após dois dias da administração, apresentaram níveis de glicose no sangue acima de 300mg/dL na medição com o glicosímetro (On Call Plus), medição representada na figura 15B, foram selecionados para os experimentos e divididos nos grupos experimentais. A curva temporal da medição de glicemia está representada esquematicamente da figura 15C (SZKUDELSKI, 2001; BANK *et al.*, 2016).

Figura 16. Excisão no dorso. A indução da lesão excisional: A- Retirada do pelo da região do dorso do animal; B- Indução da lesão com *punch* de biopsia (6mm)



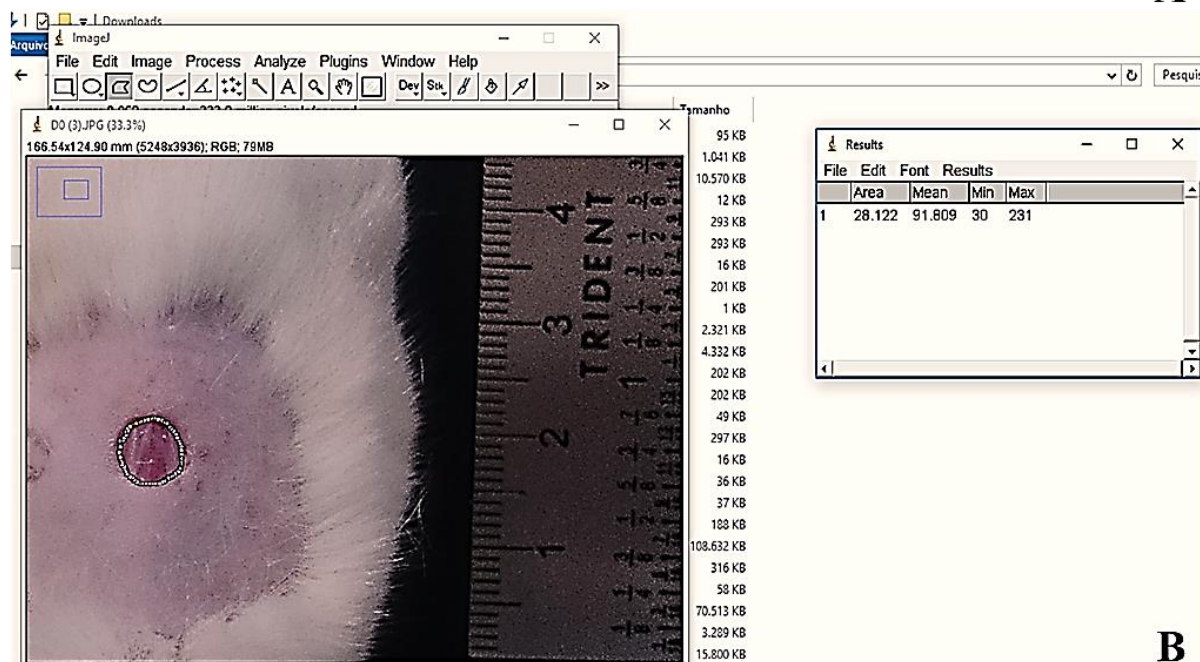
Fonte: Elaborada pelo autor utilizando a plataforma *Mind The Graph* (Versão Livre - <https://mindthegraph.com/>)

5.6 CONTRAÇÃO DO FERIMENTO E REEPITELIZAÇÃO

As lesões foram fotografadas para avaliação qualitativa nos dias 0, 3,6, 9, 12 e 15, levando em consideração como dia zero a aplicação do modelo de lesão excisional com *punch*, para avaliar a contração dos ferimentos frente ao tratamento tópico. Para tanto, os camundongos foram previamente anestesiados com dose mínima de anestésico, e foram posicionados em decúbito ventral ao lado de uma régua milimetrada. As fotos foram usadas para avaliar a curva temporal da contração da ferida (Sony Z3 Compact 21,5 mega pixels, Japan) e após serem transferidas para o computador foram analisadas com o software ImageJ para a quantificação da área. Este programa permitiu delimitar e quantificar a redução da área de lesão (Figura 16), sendo a contração expressa em porcentagem determinada pela equação representada na figura 17A. A área calculada pelo delineamento da lesão no software ImageJ está demonstrada na ilustração da figura 17B (OTRANTO *et al.*, 2010; LATIF *et al.*, 2015; SHEN *et al.*, 2017).

Figura 17. Avaliação da contração de Lesão: A- Fórmula da área de contração em porcentagem; B- Cálculo da área pelo software ImageJ

$$\% \text{Área de Contração} = (\text{Área Inicial} - \text{Área no dia da avaliação}) / \text{Área Inicial} \times 100$$



Fonte: Próprio Autor utilizando o Software ImageJ.

5.7 HISTOPATOLÓGICO DO PÂNCREAS – HEMATOXILINA E EOSINA

Os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina (20mg/ml) e Xilazina (4mg/ml) para coleta dos órgãos, foi aberta a caixa torácica dos animais, e o coração foi exposto para que fosse feita a perfusão pelo ventrículo esquerdo, que era iniciada com solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) até o clareamento dos órgãos (cerca de 300 ml) e, a seguir, era utilizado paraformaldeído tamponado a 4% pH 7,4, cerca de 100 ml. Após a perfusão, foi feita a coleta do pâncreas, as amostras do órgão foram fixadas em formalina tamponada 10% por 24 horas e, em seguida, acondicionadas em etanol a 70%. Os fragmentos foram processados e incluídos em parafina em seguida cortados em micrótomo rotativo. Para análise histopatológica, foram considerados os aspectos morfológicos observados em coloração de hematoxilina e eosina (HE). A análise morfométrica foi realizada em sistema computadorizado de imagem (LIMA *et al.*, 2001; JELODAR *et al.*, 2007; KHATUNE *et al.*, 2016).

5.8 HEMATOXILINA E EOSINA (HE) - PELE

A coloração de hematoxilina e eosina foi utilizada para evidenciar os componentes estruturais das amostras de tecido, como folículo piloso, glândulas sebáceas, tecido epitelial, tecido adiposo, músculo e infiltrado inflamatório. Os tecidos coletados eram cortados no micrótomo (5 μ m) e foram corados com hematoxilina e eosina seguindo o protocolo específico: Os cortes foram lavados com água destilada (5min), corados com hematoxilina (10min), lavados com água destilada, imersos em álcool clorídrico 3 vezes, lavados com água corrente (5min), imersão em álcool 70%, eosina (5min), em seguida era feita uma bateria de imersão (30seg) em álcool 70%, 80%, 90% e absoluto, xilol I e II (10min) e por fim montagem da lâmina para análise microscópica.

5.9 PICROSIRIUS RED – MARCAÇÃO DE COLÁGENO

A coloração de *Picrosirius red* foi utilizada na marcação histológica de colágeno. Os grupos após o tratamento tiveram as regiões das lesões coletadas e submetidas a cortes histológicos. Os tecidos foram cortados em criostato e armazenados com PBS (Phosphate Buffered Saline) em tubos de 5mL, após os cortes obtidos, eles foram distribuídos sobre algumas lâminas previamente gelatinizadas. A partir disto os cortes passavam pelo protocolo de coloração *Picrosirius red*, do qual as lâminas eram lavadas com água corrente por 10', em seguida lavada com água destilada e colocada em ácido fosfomolíbico 0,2% aquoso por 3', depois corados com Sirius red 0,1% saturado em ácido pícrico por 90', após coradas as lâminas serão lavadas com ácido clorídrico (HCl) por 2' e álcool 70% por 45'', por fim eram desidratadas em uma série de álcool 70%, 80%, 90% e 100% (3x) e em xilol (2x), respectivamente, após a desidratação as lâminas foram postas para secar e em seguida montadas com Entellan. Posteriormente a coloração, as lâminas foram analisadas em microscopia de campo claro onde foi possível observar a marcação das fibras de colágeno (OTRANTO *et al.*, 2010).

5.10 ANALISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos são registrados em protocolos de pesquisa e posteriormente submetidos à análise estatística por meio do Software *Prisma 5.0*, considerando $\alpha < 5\%$. Sendo realizada a inferência estatística por meio do teste de ANOVA para comparação dos resultados

nos períodos estudados dentro de cada grupo e o teste de bonferroni na comparação entre os grupos. Durante o experimento foi avaliado o perfil de diabetes dos animais, afim de verificar a necessidade, ou não, de aumento do tamanho amostral. Os resultados produzidos foram organizados em gráficos e tabelas.

6. RESULTADOS

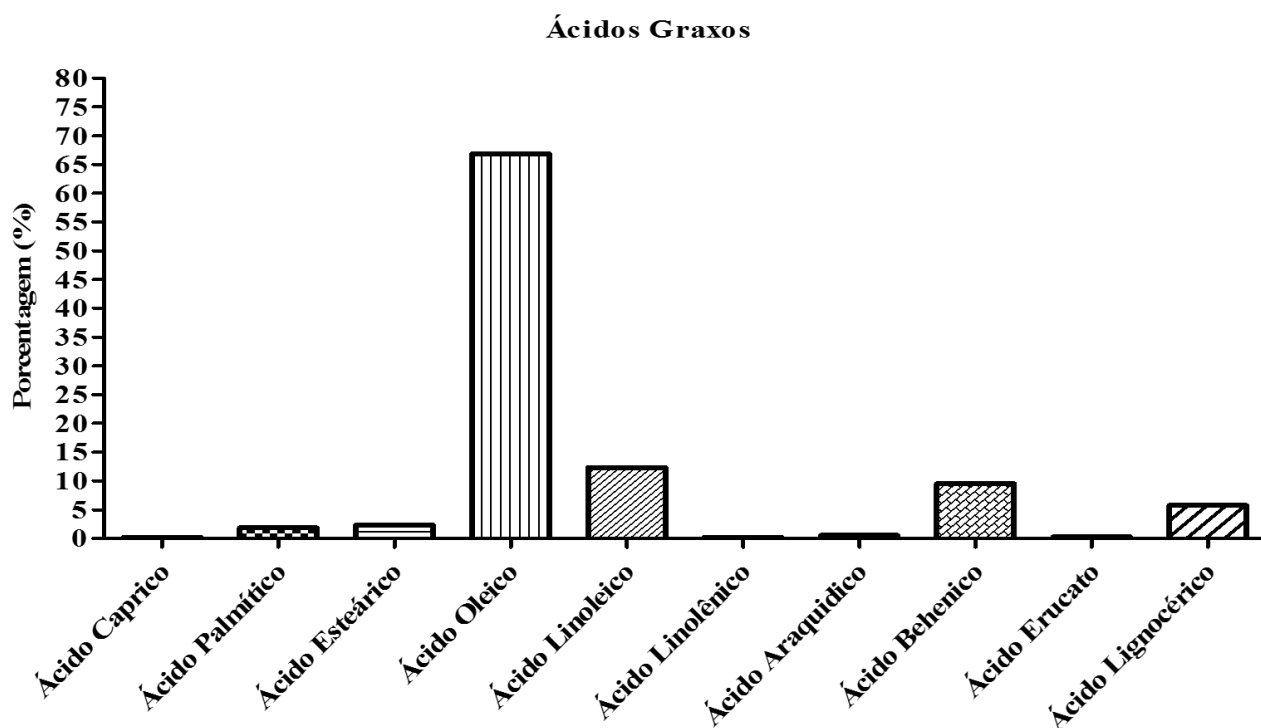
6.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO CETÔNICO DA SEMENTE DE PRACAXI

A composição de ácidos graxos do extrato da semente de pracaxi apresentou como destaque em sua composição o ácido oleico com mais de 66% do total de ácidos graxos presente na semente, seguido dos ácidos linoleico com 12% e beenico com 9,5%. A importância de se obter os dados das proporções de ácidos graxos permite direcionar a finalidade da pesquisa. As médias dos resultados da composição em percentual podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2. Composição de Ácidos Graxos

Ácidos Graxos	(%)
Ácido Caprico C10:0	0,1775
Ácido Palmítico C16:0	1,8444
Ácido Esteárico C18:0	2,3118
Ácido Oleico C18:1	66,886
Ácido Linoleico C18:2	12,3528
Ácido Linolênico C18:3	0,1498
Ácido Araquidico C20:0	0,5387
Ácido Beenico C22:0	9,5206
Ácido Erucato C22:1	0,2859
Ácido Lignocérico C24:0	5,7735

Os dados expostos na tabela 2, estão descritos em forma gráfica. Neste caso, o gráfico 1 representa os ácidos graxos presentes do extrato da semente de pracaxi pela respectiva porcentagem de cada um deles.

Gráfico 1. Composição de Ácidos Graxos (%)

Comparando os dados obtidos com os da literatura foi possível observar que os valores da composição em ácidos graxos do extrato analisado no presente estudo estão próximo aos demonstrados por Costa *et al.*, (2014) que estabeleceu as proporções de ácidos graxos do óleo de pracaxi.

Tabela 3. Comparação da composição de Ácidos Graxos da semente de pracaxi analisado neste trabalho com o da literatura

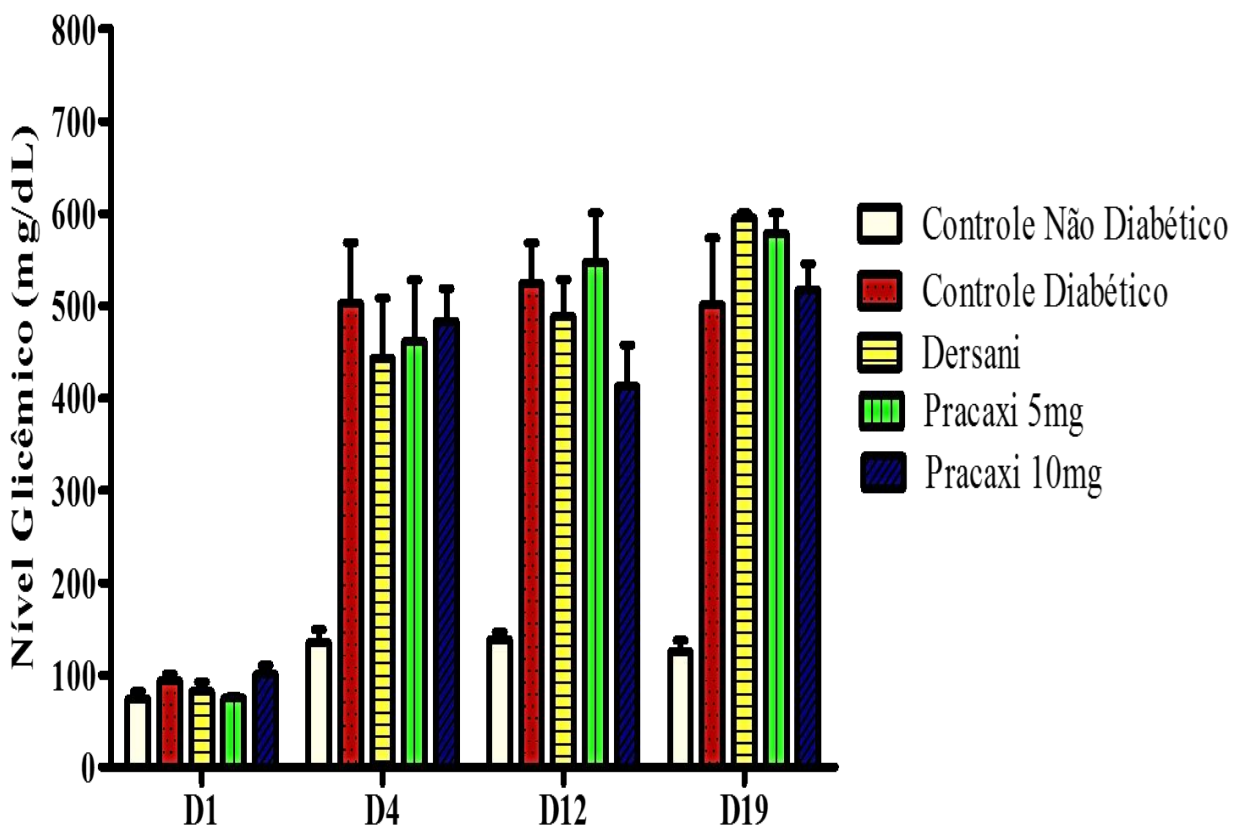
Ácidos Graxos	Resultados obtidos (%)	* Literatura %
Ácido Capríco C10:0	0,1775	-
Ácido Palmítico C16:0	1,8444	1.854 ± 0.03
Ácido Estearílico C18:0	2,3118	-
Ácido Oleico C18:1	66,886	53.550 ± 0.69
Ácido Linoleico C18:2	12,3528	13.050 ± 0.07
Ácido Linolênico C18:3	0,1498	0.134 ± 0.01
Ácido Araquídico C20:0	0,5387	1.053 ± 0.06
Ácido Beenico C22:0	9,5206	16.136 ± 0.52
Ácido Erucato C22:1	0,2859	-
Ácido Lignocérico C24:0	5,7735	10.448 ± 0.47

*COSTA *et al.*, 2014

6.2 EFICIENCIA DO MODELO DE INDUÇÃO DE DIABETES VIA ADMINISTRAÇÃO DE ALOXANA

A indução do diabetes realizada pela administração intraperitoneal (i.p) de aloxana monoidratada em camundongos Suíços albinos machos (20-25g), na dose de 150 mg/kg, promoveu um quadro de diabetes permanente ao longo de todo o período experimental. Esse quadro de diabetes caracterizado pela perpetuação do nível glicêmico em valores bastante elevados como representado no gráfico 2, demonstrou assim, a elevação da glicose sanguínea dos animais.

Gráfico 2. Níveis Glicêmicos dos grupos ao longo dos experimentos (***) $< 0,001$)



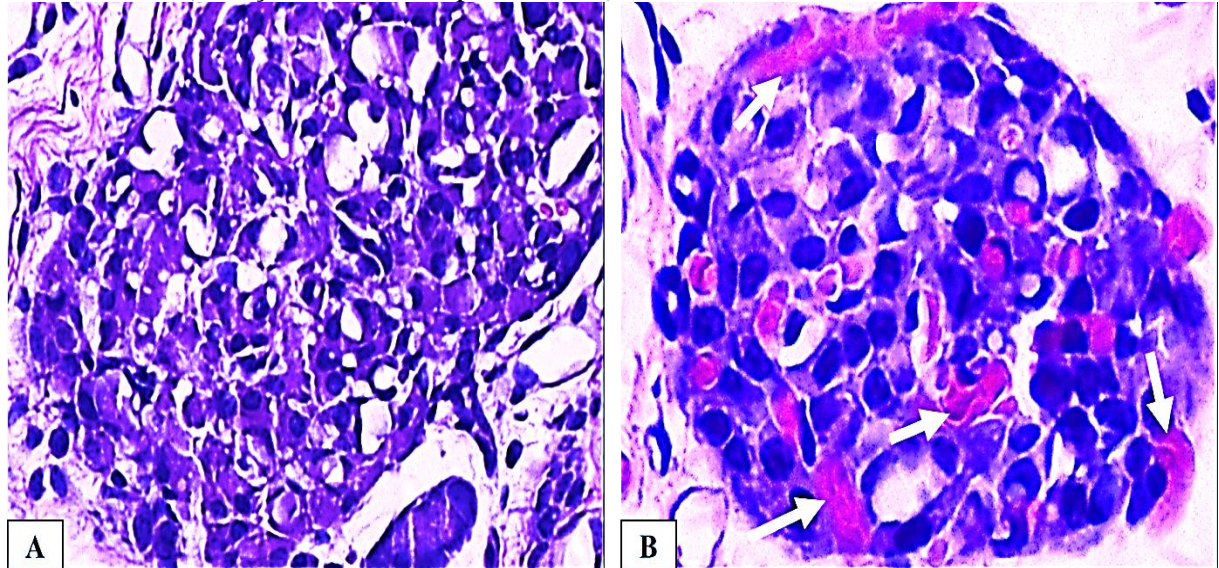
Dos 25 animais induzidos a diabetes via aloxana, 2 (dois) não ficaram diabéticos, 1 (um) morreu na fase de hipoglicemia e 7 (sete) morreram na fase de hiperglicemia. Os demais, no caso os 15 (Quinze) foram divididos nos grupos experimentais, representando um índice de 67% de êxito na indução do diabetes nos animais.

6.2.1 Histopatológico do Pâncreas – Hematoxilina e Eosina

Para confirmação do potencial diabético da aloxana os fragmentos de pâncreas foram processados e incluídos em parafina, em seguida foram cortados em micrótomo rotativo. Para análise histológica, foram considerados os aspectos morfológicos observados em coloração de hematoxilina e eosina (HE).

Neste estudo buscamos avaliar as lesões causadas nas ilhotas através da coloração de HE, onde foram avaliados o grupo normal (sem indução de diabetes) destacado na figura 18A e o grupo de diabéticos (Indução de diabetes por aloxana) representando na figura 18B. Podemos observar na Figura 18B, pela indicação das setas, a presença de regiões lesionadas nas ilhotas, fato que corrobora o resultado exposto anteriormente (Gráfico 2), estando assim diretamente relacionado com o quadro de diabetes permanente através dessas lesões pancreáticas irreversíveis, pois assim o pâncreas deixa de produzir insulina. Validando assim o aloxana como agente diabetogênico.

Figura 18. Histopatológico do pâncreas: A- Grupo normal (sem indução de diabetes); B- Grupo de diabéticos (Indução de diabetes por aloxana)



6.3 CONTRAÇÃO DO FERIMENTO E REEPITELIZAÇÃO DA LESÃO

As avaliações qualitativas das lesões, foram realizados nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 pós-operação por uma câmara digital (Sony Z3 Compact 21,5 mega pixels, Japan). A partir das

imagens obtidas foram observadas características no grupo tratado com Pracaxi 5mg e 10mg, em comparação com o grupo controle não diabético, controle diabético e com o grupo tratado com Dersani®. Adicionalmente, foi observado as lesões em camundongos suíços tratados com extrato de pracaxi. A avaliação bruta da ferida revelou que a aplicação tópica do pracaxi 10mg diminuiu o tamanho da ferida, de forma semelhante aos animais não diabéticos (Figura 19) com aumento percentual significativo nas porcentagens da contração da ferida, como representado no gráfico 3, demonstrando resultados positivos quando comparamos os grupos de controle não diabético e pracaxi 10mg com os demais grupos.

Figura 19. A imagens representativas das feridas de grupos de controle não diabético, Controle diabético e tratados com Dersani® e com Pracaxi 5mg e 10mg tratados em dias diferentes.

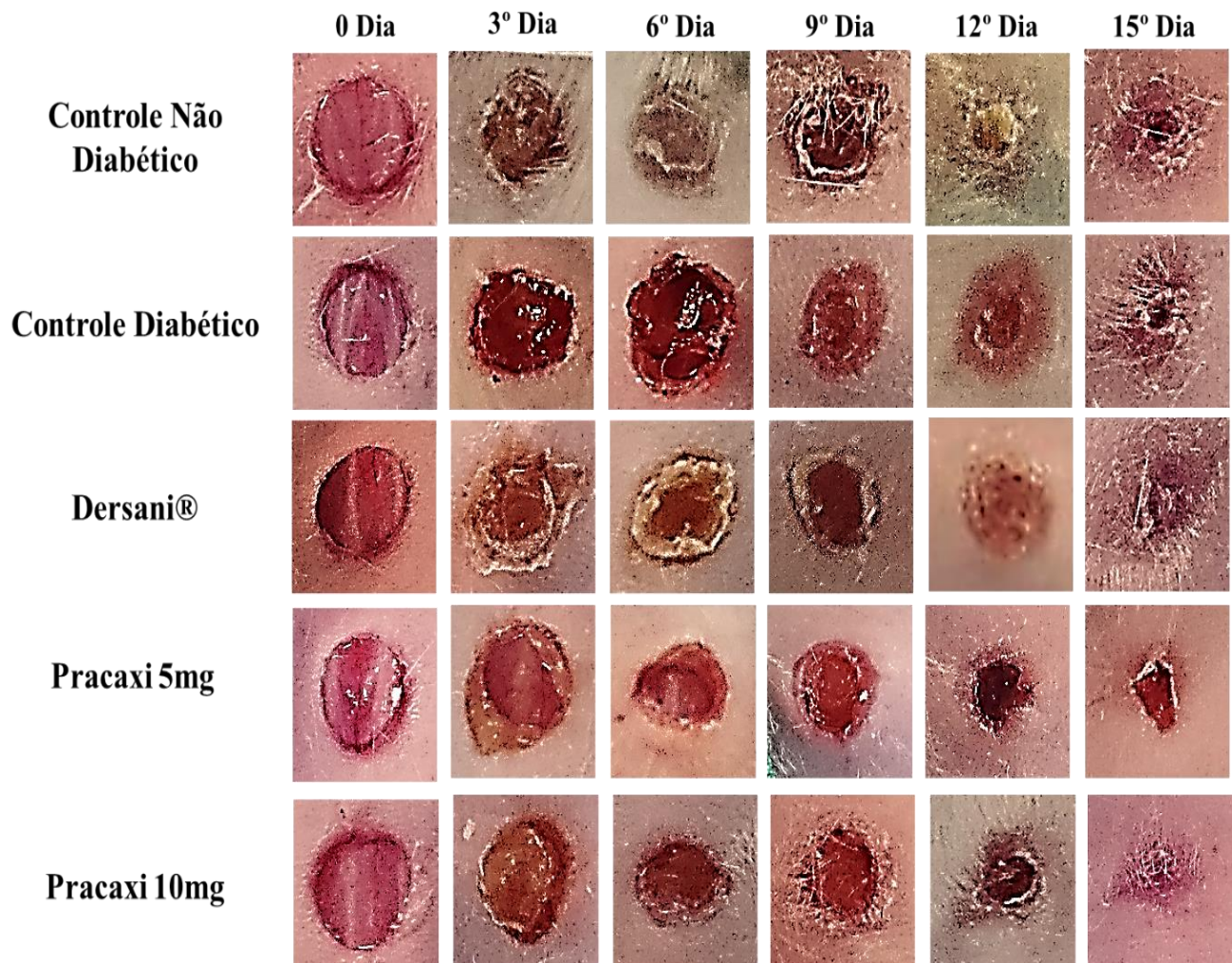
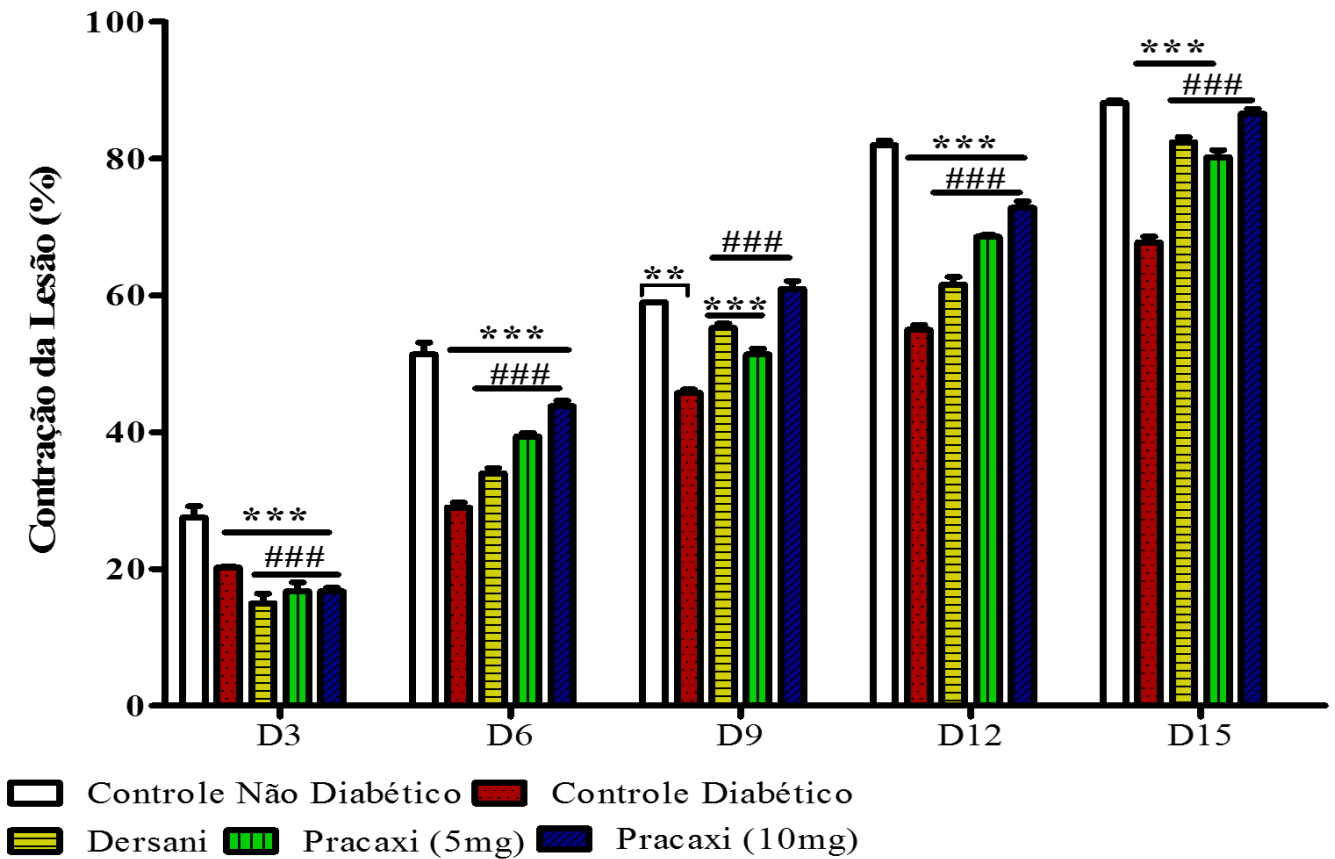


Gráfico 3. Contração da ferida (%) nos grupos controle não diabético, controle diabético e tratados com Dersani®, Pracaxi 5mg e 10mg em função do tempo (***) $< 0,001$ /### $< 0,001$)

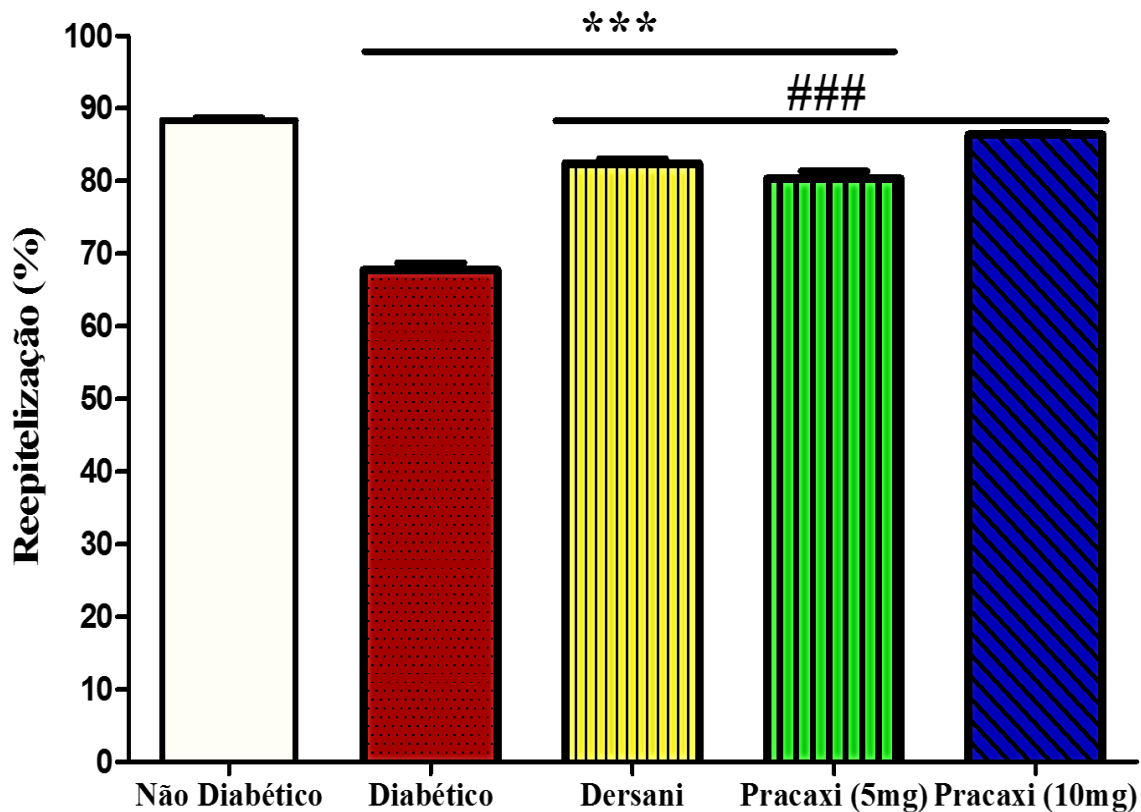


*** $p < 0,001$ – Diferença estatística significativa do grupo controle não diabético em relação aos demais grupos

$< 0,001$ – Diferença estatística significativa do grupo controle diabético em relação aos demais grupos

Após quinze dias de tratamento das lesões, a porcentagem de área de ferida reepitelizada foi maior no grupo de controle não diabético e no tratado com pracaxi 10mg do que nos grupos de controle diabético, Dersani® e Pracaxi ($p < 0,001$, para ambos) (Gráfico 4). A reepitelização é o acontecimento terminal no processo de reparo. Quando o tecido conjuntivo acaba de preencher o defeito.

Gráfico 4. Reepitelização (%) nos grupos controle não diabético, Controle diabético e tratados com Dersani®, Pracaxi 5 e 10mg/kg após 15 dias de tratamento



*** $p < 0,001$ – Diferença estatística significativa do grupo controle não diabético em relação aos demais grupos

$p < 0,001$ – Diferença estatística significativa do grupo controle diabético em relação aos demais grupos

6.4 COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA (HE) – PELE

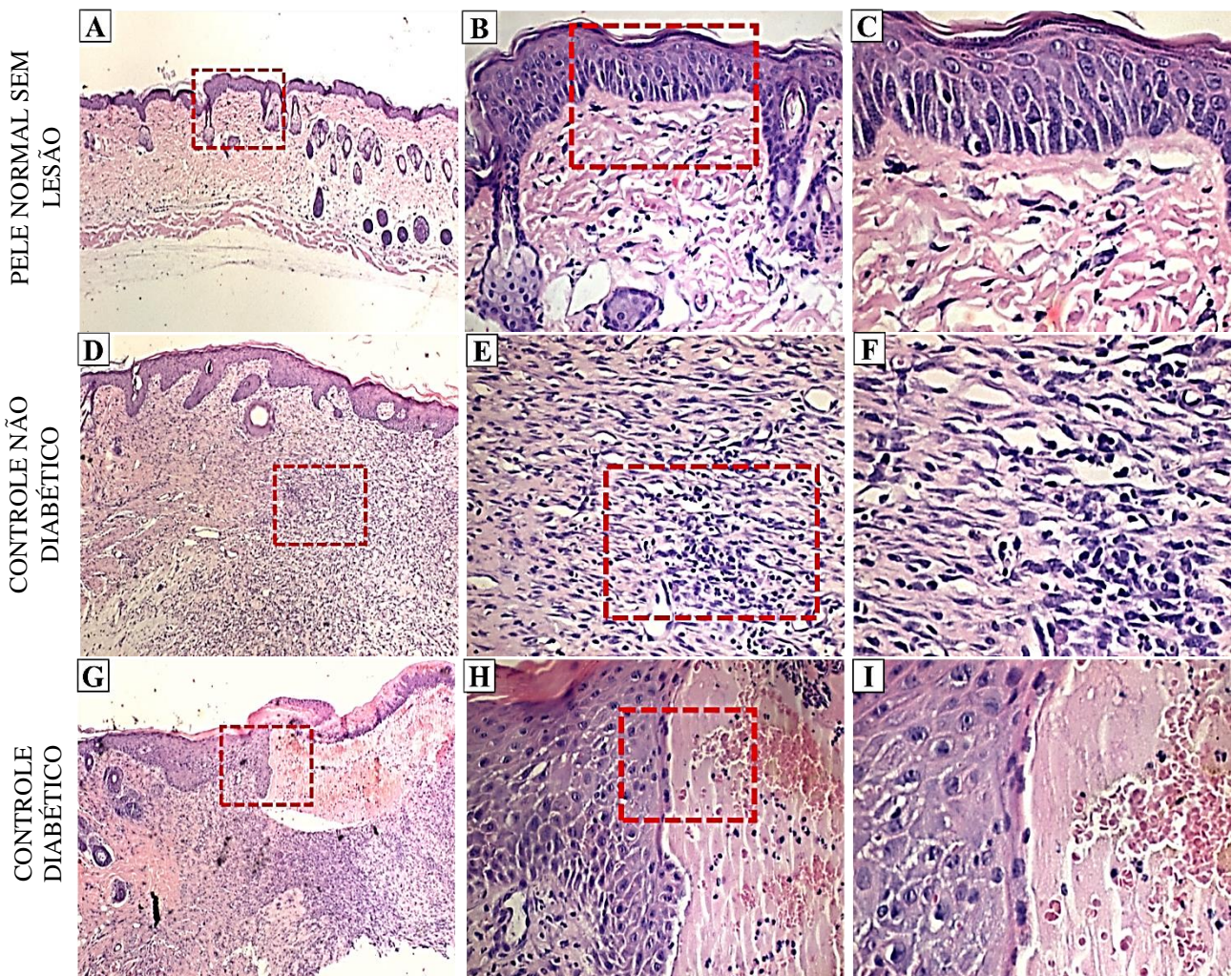
A figura 20 representa as secções de feridas na pele que ilustram a coloração com HE (nas objetivas de 10x, 20x e 40x, respectivamente) os grupos Pele normal sem lesão (Fig. 20 A-C), controle não diabético (Fig. 20 D-F), controle diabético (Fig. 20 G-I), Dersani® (Fig. 20 J-M), Pracaxi 5mg (Fig.20 N-P) e Pracaxi 10mg (Fig.20 O-S) após 15 dias de tratamento na ferida.

No grupo da pele normal sem lesão (Fig. 20 A-C), observa-se a organização tecidual da pele em suas camadas. No grupo controle não diabético (Fig. 20 D-F) observa-se uma redução significativa de infiltrado celular e também uma reestruturação da pele. Fato que

também foi evidente no grupo tratado com Pracaxi 10mg (Fig.20 O-S) em comparação com os demais grupos.

Nas secções de feridas do grupo de controle diabético houve uma coloração marcada pela predominância de células inflamatórias e poucos fibroblastos (Fig. 20 G-I), além de demonstram uma lenta maturação do tecido de granulação. As feridas tratadas com Dersani® (Fig. 20 J-M) apresentaram um tecido de granulação com alto índice de infiltrados celulares, que foi coberto por deposição de colágeno, porém de forma desorganizada. De maneira semelhante o Pracaxi 5mg (Fig.20 N-P) foi coberto por deposição de colágeno, porém por fibras desorganizadas, no entanto diferentemente do Dersani®, o pracaxi 5mg apresentou expressão de infiltrado celular reduzido.

A avaliação histopatológica da pele demonstrou que as secções de feridas do grupo tratado com Pracaxi 10mg apresentou uma matriz extracelular compacta (ECM) coberta por uma camada epitelial espessa representando a maturidade da ferida.



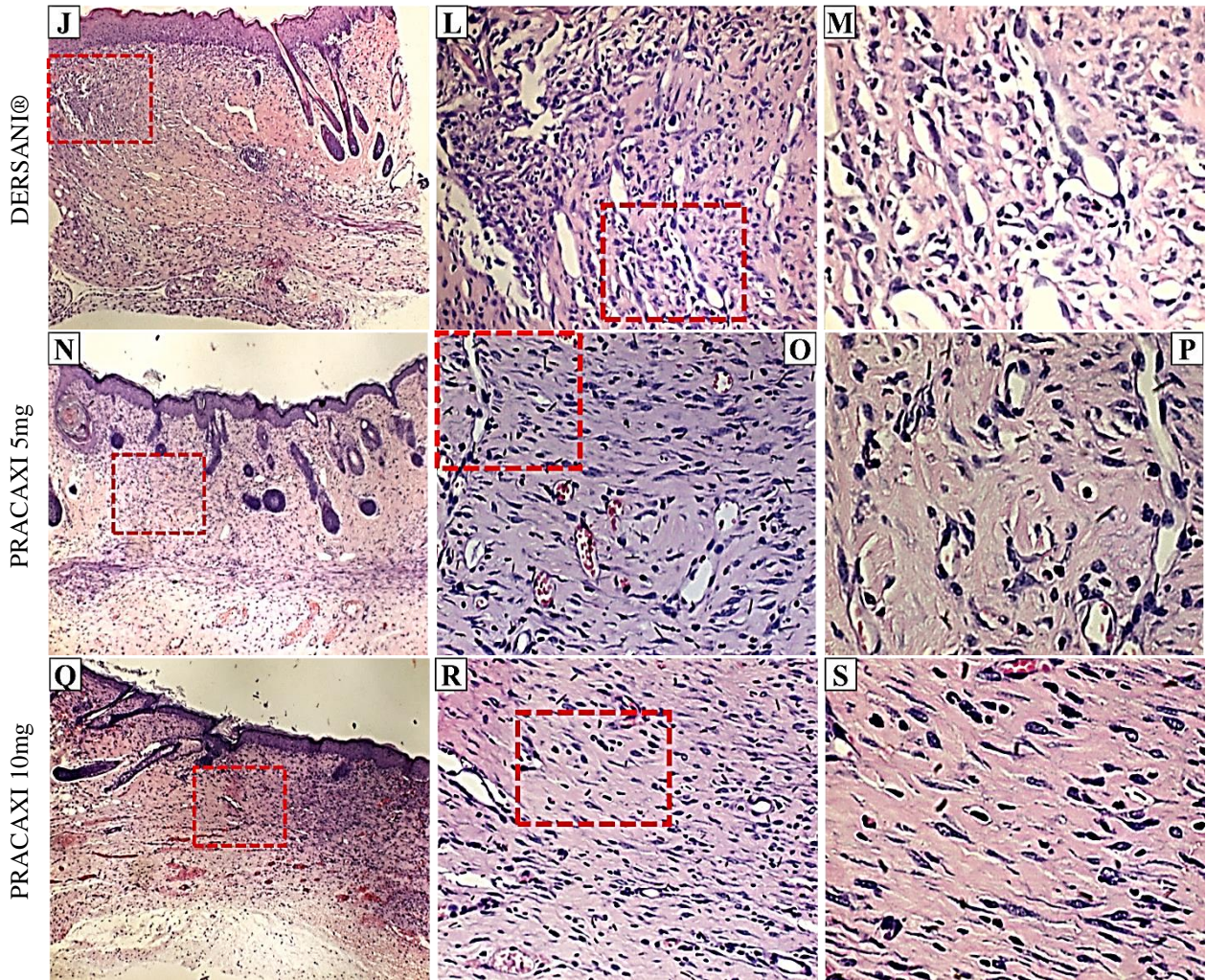
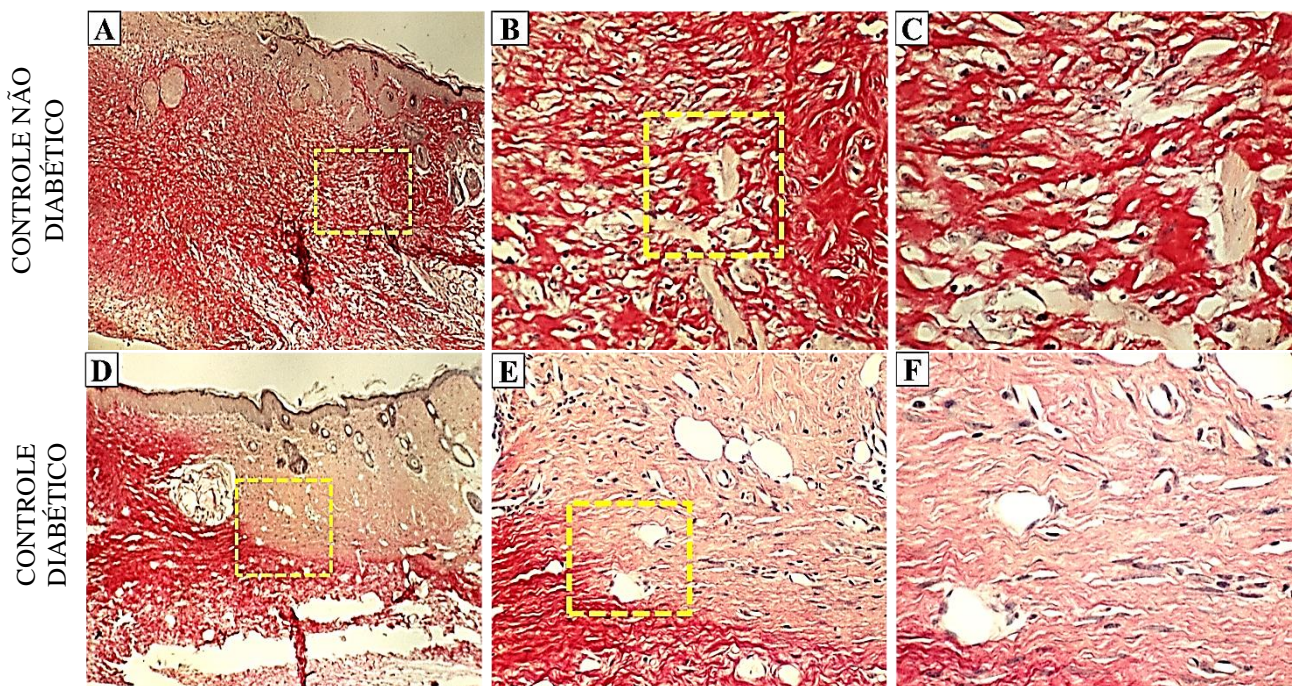


Figura 20: Secções de pele oriundas de amostras de tecido de camundongos representativos de cada grupo experimental. (A) Pele normal sem lesão na objetiva de 10x; (B) Pele normal sem lesão na objetiva de 20x; (C) Pele normal sem lesão na objetiva de 40x. Nas imagens A, B e C é possível observar os componentes estruturais das amostras de tecido, como folículo piloso, glândulas sebáceas, tecido epitelial, tecido adiposo, músculo e infiltrado inflamatório. Nas amostras dos animais do grupo controle não diabético representado pelas imagens (D), (E) e (F) com as objetivas de 10x, 20x e 40x respectivamente e possível observar uma reestruturação tecidual e um número expressivo de infiltrado celular. As amostras dos animais pertencentes ao grupo controle diabético representados pelas imagens (G) 10x, (H) 20x e (I) 40x apresentam uma reestruturação tecidual desorganizada e tardia. Já nos animais tratados com Dersani® representados pelas imagens (J), (L) e (M) com as objetivas de 10x, 20x e 40x respectivamente e observado uma organização tecidual desregulada e com alto índice de infiltrado celular. Nas amostras de tecido dos animais tratados com o óleo de Pracaxi (5mg) representados pelas imagens (N) 10x, (O) 20x, (P) 40x é observado uma organização tecidual significativa e com baixo índice de infiltrados celulares. Nas amostras dos animais tratados com o óleo de Pracaxi (10mg) representados pelas imagens (Q) 10x, (R) 20x, (S) 40x e possível observar uma organização tecidual uniforme e, com alta densidade tecidual na matriz extracelular neoformada

6.5 EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DE PRACAXI NA SÍNTESE E DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO

As imagens representativas das secções coradas com *picrosirius red* (Fig. 21 A-P) demonstraram que a síntese, deposição e orientação de colágeno eram melhores no grupo tratado com Pracaxi 10mg e nos animais não diabéticos em comparação com os outros grupos. As imagens que representam os grupos controle não diabético (Fig. 21 A-C), controle diabético (Fig. 21 D-F), Dersani® (Fig. 21 G-I), Pracaxi 5mg (Fig. 21 J-M) e Pracaxi 10mg (Fig. 21 O-S) após 15 dias de tratamento tópico da ferida. Nas imagens do grupo controle não diabético (Fig. 21 A-C) e Pracaxi 10mg (Fig. 21 O-S) é possível observar uma expressão significativa das fibras de colágeno, em especial no tratado com o pracaxi 10mg, que apresentou uma densidade significativa. Em contrapartida os animais diabéticos (Fig. 21 D-F) apresentaram uma baixa expressão de colágeno na composição da matriz extracelular, representando uma maturação tardia de colágeno no tecido de granulação. Nos grupos Dersani® (Fig. 21 G-I) e Pracaxi 5mg (Fig. 21 J-M), apresentou uma expressão de fibras de colágeno, no entanto não tão intensa como nos grupos controle não diabético (Fig. 21 A-C) e Pracaxi 10mg (Fig. 21 O-S). Demonstrando assim o potencial efeito cicatrizante do pracaxi 10mg no tratamento de lesões em diabéticos.



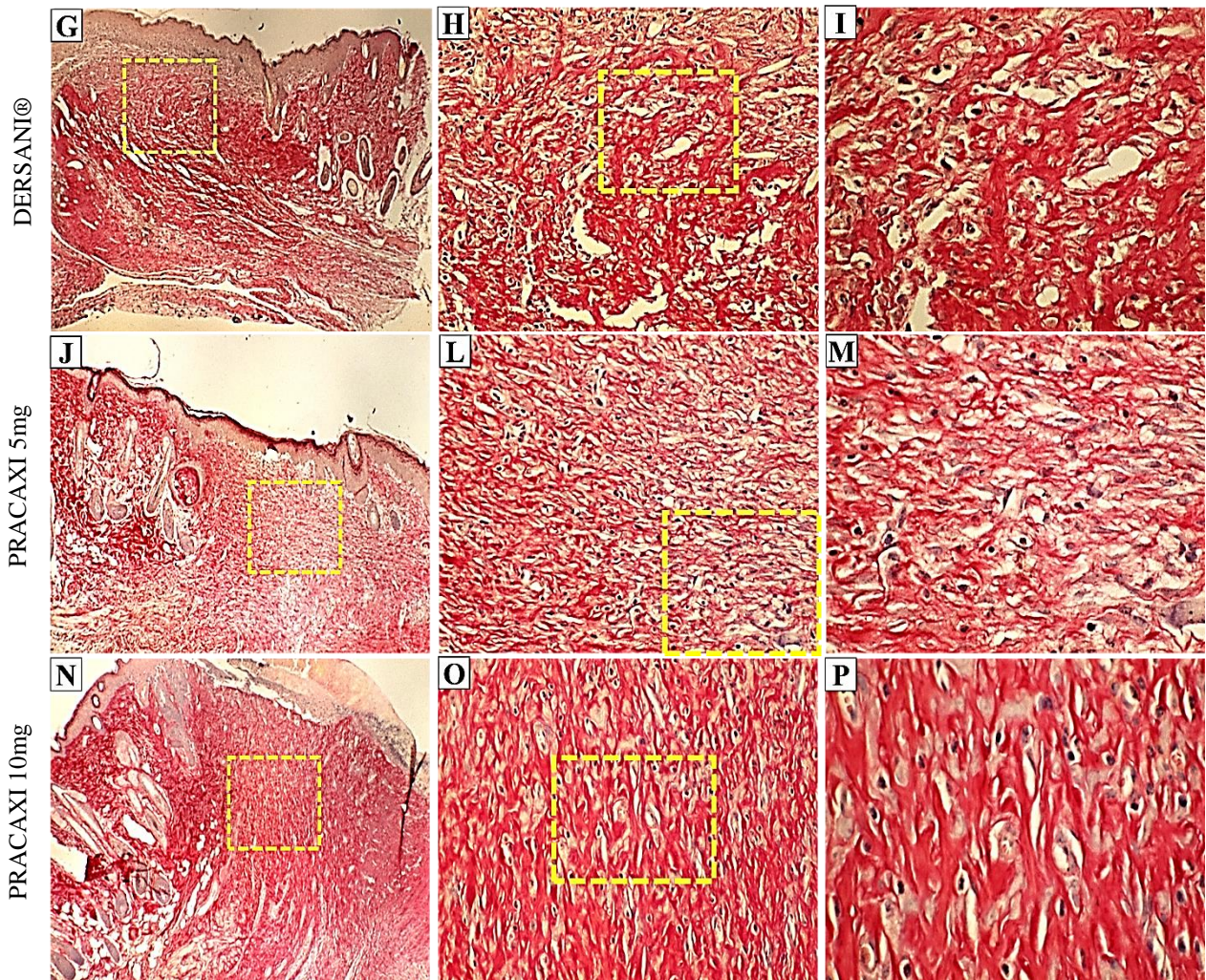


Figura 21: Secções de pele oriundas de amostras de tecido de camundongos representativas de cada grupo experimental. (A) Amostras dos animais pertencentes ao grupo controle não diabético na objetiva de 10x; (B) Amostras dos animais pertencentes ao grupo controle não diabético na objetiva de 20x; (C) Amostras dos animais pertencentes ao grupo controle não diabético na objetiva de 40x. Nas imagens A, B e C a coloração apresenta em destaque uma alta expressão de fibras de colágeno. Nas amostras dos animais do grupo controle diabético representado pelas imagens (D), (E) e (F) com as objetivas de 10x, 20x e 40x respectivamente e possível observar uma reduzida expressão de colágeno os tecidos. As amostras dos animais pertencentes ao grupo Dersani® representados pelas imagens (G) 10x, (H) 20x e (I) 40x apresentam uma produção de colágeno significativa. Já nos animais tratados com Pracaxi (5 mg) representados pelas imagens (J), (L) e (M) com as objetivas de 10x, 20x e 40x respectivamente e observado que os tecidos expressam uma quantidade expressiva de colágeno. Nas amostras de tecido dos animais tratados com o óleo de Pracaxi (10mg) representados pelas imagens (N) 10x, (O) 20x, (P) 40x é observado que o tratamento induziu uma expressão significativa de colágeno e uma organização de matriz extracelular neoformada.

7. DISCUSSÃO

A dificuldade de cicatrização em pacientes diabéticos é um importante dado já descrito na literatura. Em estudos etnofarmacológicos realizados na ilha do Marajó, por nosso grupo observamos que a semente de pracaxi apresenta atividade anti-hemorragica e cicatrizante (dados não publicados). Visando, encontrar alternativas farmacológicas para este aspecto característico do diabetes o presente estudo, verificou a atuação do extrato de pracaxi em reparo de lesões cutâneas em camundongos diabéticos. Para tanto, foi criada uma ferida cutânea excisional com *punch* de biopsia e os animais foram tratados por aplicação tópica do extrato para avaliação do potencial cicatrizante da semente. O efeito do tratamento foi avaliado mediante alguns aspectos, tais como: a contração da ferida, reepitelização, quantidade de células inflamatórias, organização tecidual e formação de colágeno na matriz extracelular. A partir dos resultados encontrados observamos que o extrato de pracaxi apresentou efeito cicatrizante em camundongos diabéticos, estimulando a reestruturação tecidual após lesões cutâneas. Desta forma, o pracaxi torna-se uma possível alternativa para o tratamento de lesões teciduais.

Lesões cutâneas em pacientes com diabetes tendem a ter um processo de cicatrização com menor eficiência devido a dificuldades de controle neurovascular, filtração de fluidos e resposta inflamatória (Tabela 1), resultando em pacientes mais suscetíveis a lesões. Atualmente os produtos disponíveis não possuem ação específica e comprovada para as lesões de pacientes diabéticos, dificultado o controle da lesão. Portanto, tomamos como imprescindível discutir a compreensão dos efeitos e a forma de atuação do pracaxi para ser utilizado como um possível cicatrizante de lesões teciduais em pacientes diabéticos.

Já é amplamente aceito que o diabetes está associado com espécies reativas de oxigênio, que contribuem para lesão das células pancreáticas e dessa forma promove a disfunção na homeostasia do órgão. Esta disfunção está associada com o potencial de indução de diabetes tipo 1 pela aloxana, que promove lesões necróticas nas ilhotas pancreáticas (TAKEMOTO *et al.*, 2015). Esse potencial diabetogênico foi padronizado em nosso experimento pela elevação do nível glicêmico dos animais como apresentado no gráfico 2 e as lesões das ilhotas foram confirmadas pelo histopatológico do pâncreas como observado na figura 18 para confirmação do quadro de diabetes tipo 1 permanente devido a necrose das regiões produtoras de insulina (figura 18B), corroborando com o já descrito na literatura (SZKUDELSKI, 2001; BANK *et al.*, 2016).

O perfil fitoquímico do extrato de pracaxi (Tabela 2), revelou que o extrato testado possui uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, como Ácido Oleico (C18:1), Ácido Linoleico (C18:2) e Ácido Linolênico (C18:3). As análises corroboram com os dados presentes na literatura quanto a caracterização do óleo de pracaxi, como podemos observar na tabela 3 os valores da composição de ácidos graxos do extrato analisado no presente estudo estão próximo aos demonstrados por Costa *et al.*, (2014) que estabeleceu as proporções de ácidos graxos do óleo de pracaxi. Estudos na literatura com algumas espécies, como a *Cucurbita pepo L.*, rica em ácidos graxos poliinsaturados apresentou grande potencial no processo de cicatrização (BARDAA *et al.*, 2016). Este achado evidencia a utilização de ácidos graxos, como principal constituinte de cicatrizantes farmacológicos.

A cicatrização de feridas cutâneas é um processo complexo, que consiste em uma progressão ordenada de inflamação, angiogênese, deposição de colágeno, reepitelização e remodelagem de tecidos (MARTIN, 1997). No entanto, esse evento pode ser comprometido por algumas patologias, como o diabetes. O Diabetes mellitus associa-se com a hiperglicemia e prejuízos na cicatrização de feridas em mecanismos que envolvem exacerbação e cronificação da resposta inflamatória, levando a uma inflamação crônica (WICKS *et al.*, 2014). A fase inflamatória da cicatrização de feridas em diabetes apresenta acúmulo e persistência de células inflamatórias na área da lesão, resultando em produção exacerbada de mediadores pró-inflamatórios que causam danos ao tecido circundante e prejudicam a resolução da ferida (RODRIGUES *et al.*, 2016). Devido as dificuldades de reparo tecidual no diabetes, estudos têm demonstrado que é benéfico para a cicatrização, terapias como os ácidos graxos que melhoram a angiogênese, atuam como anti-inflamatórios e antioxidante nos tecidos lesionados (WANG *et al.*, 2015).

Estudos anteriores já demonstravam que as aplicações tópicas de óleos ricos em ácidos graxos representam uma alternativa de grande valor na melhora de alguns parâmetros da cicatrização de feridas, redução de processos inflamatórios, estimulação da fibra do tecido conjuntivo e aceleração do fechamento de feridas (OTRANTO *et al.*, 2010). Esta perspectiva foi o ponto norteador para o estudo do pracaxi quanto seu perfil cicatrizante, pois o mesmo como descrito nos resultados possui um elevado teor de ácidos graxos como apresentando anteriormente no Gráfico 1. Dando ênfase na composição, destaca-se a presença significativa dos ácidos Oleico (C18:1), Linoleico (C18:2) e Linolênico (C18:3).

A modulação das propriedades cutâneas tem sido demonstrada e os ácidos graxos apresentam mecanismos que atuam na angiogênese e na cicatrização de feridas envolvendo múltiplos caminhos. Os diversos ácidos graxos apresentam atividades funcionais diretas na

casca de cicatrização, o ácido Linoleico (um dos principais constituintes do pracaxi) é caracterizado como um precursor do ácido araquidônico, que atua no estágio inicial do processo de cicatrização, nas células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, responsáveis por liberarem uma grande quantidade de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) atuando de maneira importante na cascata inflamatória (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) e além disso foi descrito como potente agente angiogênico em animais diabéticos (RODRIGUES *et al.*, 2016), sendo a angiogênese um dos eventos mais importantes no processo de reparo de lesões teciduais, a fim de restaurar a perfusão vascular para fornecer nutrição e oxigênio para o tecido de reparação (ZHANG *et al.*, 2010).

Conforme a análise histológica dos animais tratados com o Pracaxi (Figura 20), as lesões tratadas apresentaram uma redução nos índices de células inflamatórias no tecido demonstrando a importância de um controle no processo de migração de células inflamatórias. Estes dados, corroboram com os dados da literatura que descrevem que o recrutamento descontrolado de macrófagos é prejudicial para as lesões, principalmente quando ocorre predominância do subtipo M1 de macrófagos pró-inflamatórios na área danificada. Devido a permanência dos macrófagos M1 no tecido da ferida aumenta a produção de mediadores inflamatórios e bloqueia a resolução da inflamação, já os macrófagos do tipo M2 são fundamentais na restauração da homeostasia tecidual. Na literatura foi demonstrando a capacidade do ácido oleico de aumentar a formação de macrófagos M2 (WANG *et al.*, 2015). Ou seja, o extrato de pracaxi pode estar atuando subtipos de macrófagos.

O processo prolongado de inflamação em diabéticos leva a formação de edema, perda funcional e aumenta a taxa de infecções da ferida. No entanto, na figura 20 a análise histológica dos animais tratados com o Pracaxi, demonstraram uma rápida cicatrização com baixo índice de células inflamatórias em biópsia cutânea realizadas com Hematoxilina e Eosina após 15 dias de aplicação tópica (Figura 20 – Q, R, S), fato semelhante com os animais não diabéticos do estudo (Figura 20 – D, E, F). Relacionando essa atividade do pracaxi com o perfil fitoquímico que revelou que o extrato da semente testada é rico em quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, como ácido linoleico e ácido linolênico. O ácido linoleico, precursor do ácido araquidônico e o ácido oleico fundamental na formação de macrófagos M2 reduziram significativa a presença de infiltrado celulares (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Na resposta inflamatória, várias citocinas são secretadas por macrófagos e outras células, como resultado da ativação do receptor de reconhecimento de padrões (PRR) por microrganismos. O TNF- α é uma das primeiras citocinas a ser segregada durante a inflamação e provoca várias reações no organismo, incluindo a ativação leucocitária e a migração para o

sítio inflamatório, além disso, desempenha um papel crítico na fase proliferativa da cicatrização de feridas. O TNF- α também induz a angiogênese através da produção aumentada de VEGF. O aumento da produção de TNF- α e VEGF em animais diabéticos tratados com Ácido Linoleico explica o número aumentado de novos vasos e melhora da cicatrização, conforme o apresentado na Figura 19, que demonstra a aceleração na contração da lesão representando a ativação coordenada de toda cascata de cicatrização e onde possivelmente a fase proliferativa pode estar sendo acelerada pelo aumento dos níveis de fatores de crescimento. Com isso, estudos descrevem que aumento dos níveis de VEGF e o número de novos vasos formados após tratamento com Ácido Linoleico suportam a proposição de que este ácido graxo possui a capacidade de acelerar a angiogênese dessas lesões cutâneas (MAGDALON *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2016).

A avaliação de área da lesão (Gráfico 3) e o histopatológico pela coloração de *picrosirius red* (Figura 21) demonstram que a angiogênese, a reepitelização e a produção de fibras de colágeno de feridas diabéticas excisionais são significativamente menores (Figura 21 – D, E, F) do que as de lesões tratadas com pracaxi (Figura 21 – N, O, P). Na fase proliferativa, os fibroblastos proliferam para o leito da lesão, subsequentemente migram para uma área da ferida e depois depositam-se e organizam a Matriz Extracelular. Em feridas diabéticas, a formação de tecido de granulação é gravemente prejudicada devido à redução da proliferação de fibroblastos e níveis mais baixos de deposição de colágeno que consequentemente prejudicam a contração da ferida. (KAZEMI-DARABADI I *et al.*, 2013).

Conforme o resultado exposto no gráfico 3, a contração da lesão apresentada esta correlacionada com as fases iniciais da formação de tecido de granulação após a lesão, devido os fibroblastos locais começarem a mover-se da derme, a transformação inicial de fibroblastos em miofibroblastos parece depender das alterações mecânicas que ocorrem na ferida comparado com a pele normal, em particular o aumento da rigidez. Além disso, a contração da lesão e o aumento da força cicatricial ocorre pela aproximação das bordas da ferida pela atuação dos miofibroblastos que sintetizam o colágeno da matriz extracelular. O resultado da contração da lesão corrobora com o descrito na literatura, quanto a atividade do fator de crescimento derivado de plaquetas na estimulação da motilidade. Além disso, o desenvolvimento de α -SM actina sintetizando miofibroblastos diferenciados é essencialmente devido à ação do fator de crescimento transformante- β 1 (TGF β 1) sendo assim, os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, contribuindo na contração das bordas da ferida (PIALLAT *et al.*, 2016). Os miofibroblastos são ativados em resposta à lesão tecidual com a tarefa primária de reparar a matriz extracelular perdida ou danificada. Porém a desregulação do processo normal de reparo

pode levar à ativação persistente de miofibroblastos, por exemplo, causado por inflamação crônica (HINZ, 2016).

Conforme o gráfico 4, a reepitelização da lesão representa a restauração da integridade da matriz extracelular, caracterizado pelo equilíbrio da formação de colágeno na matriz neoformada. Esse equilíbrio foi observado na reepitelização pós tratamento com pracaxi e confirmado no resultado exposto (Figura 21 - N, O, P) demonstrando a alta expressão de colágeno como principal componente da matriz cicatricial. Os dados corroboram com o descrito na literatura, onde é descrito o papel da IL-1 β na inibição da produção de colágeno tipo I e regulação da metaloproteinase-1, que degrada as fibras colágenas. O colágeno é o principal componente da matriz extracelular e desempenha um papel importante na remodelação da cicatrização de feridas (RODRIGUES *et al.*, 2016). Considerando estas importantes características, podemos presumir que as lesões com elevada proliferação de fibroblastos e angiogênese apresentam eficiente reparo tecidual. A concentração de protease é aumentada em feridas diabéticas, estas enzimas degradam as proteínas dos tecidos e interrompem a formação de novas matrizes extracelulares (ECM) (KANT *et al.*, 2015). A redução da formação do colágeno leva a formação ineficiente da matriz cicatricial, como observamos nos camundongos que eram diabéticos (Figura 21 - D, E, F) e que não receberam tratamento com o extrato de pracaxi (Figura 21 - A, B, C).

Recentemente foi realizado um estudo em séries de casos (21 pacientes com várias feridas cirúrgicas, traumáticas ou queimaduras) avaliando a eficácia dos ácidos graxos do pracaxi inseridos em uma base de silicone para aplicação tópica como terapia para o tratamento de feridas. Apresentando o potencial terapêutico da planta (BANOV; BANOV; BASSANI, 2014). Além deste, foi realizado um estudo de caso que avaliou o perfil de cicatrização de uma base tópica de silicone anidro contendo ácidos graxos a partir do óleo de pracaxi em um paciente com uma úlcera diabética, o qual demonstrou a utilidade no tratamento deste paciente com úlceras diabéticas (SIMMONS; BANOV; BANOV, 2015). Ambos os estudos demonstraram que houve aceleração no processo de cicatrização das feridas tratadas, no entanto os respectivos artigos não descreveram a forma de atuação do óleo e os mecanismos que ele atua no processo de cicatrização.

Em resumo, a administração tópica do extrato de pracaxi em lesões cutâneas em animais diabéticos promoveu uma resposta inflamatória reduzida (redução do infiltrado celular), uma reepitelização significativa e uma elevada expressão de colágeno na matriz extracelular, possivelmente devido a composição dos ácidos graxos da semente. Observou-se

que os efeitos pós tratamento com o extrato se caracterizam principalmente pela aceleração do processo de cicatrização em ratos diabéticos.

8. CONCLUSÃO

- A caracterização da composição química do extrato cetônico da semente de pracaxi demonstrou alto teor de ácidos graxos em sua composição, principalmente os Ácidos graxos Oleico (C18:1), Linoleico (C18:2) e Linolênico (C18:3);
- A padronização dose-efeito do extrato de Pracaxi de 5mg/kg e 10mg/kg, demonstrou um melhor potencial cicatrizante da dose de 10mg por aplicação tópica;
- O tratamento tópico com o extrato de pracaxi acelerou a contração da lesão dos animais diabéticos;
- A reepitelização da lesão dos animais diabéticos ocorreu de forma significativa nos animais tratados com o extrato de pracaxi;
- A atividade anti-inflamatória do pracaxi nos animais diabéticos tratados em modelo *in vivo* de lesões excisionais em camundongos suíços apresentou redução dos infiltrados celulares;
- As características histológicas da cicatrização dos animais diabéticos tratados com pracaxi demonstrou melhor organização estrutural da pele nos camundongos tratados com pracaxi;
- As características histológicas da cicatrização dos animais diabéticos tratados com pracaxi demonstrou melhor síntese de colágeno na matriz extracelular neoformada;
- O tratamento com pracaxi 10mg apresentou potencial cicatrizante em lesões excisionais em camundongos diabéticos, demonstrando melhor formação da matriz extracelular resultado semelhante aos animais não diabéticos do estudo.

REFERENCIAS

- AIRES, M.M. **Fisiologia**. 4ª Edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan; 2012.p.132.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. 2012;35:S64-71.
- ANDRADE, M.G.L. *et al.* Alterações do processo de cicatrização de queimaduras em indivíduos diabéticos. **Revista Brasileira de Queimaduras**. 2013;12(1):42-8.
- ARMSTRONG, D.G.; PETERS, E.J.; ATHANASIOU, K.A.; LAVERY, L.A. Is there a critical level of plantar foot pressure to identify patients at risk for neuropathic foot ulceration?. **J Foot Ankle Surg**. 1998 Jul-Aug;37(4):303-7.
- BANK, S. *et al.* The control of hyperglycemia by a novel trypsin resistant oral insulin preparation in alloxan induced type I diabetic mice. **Scientific Reports**. 2016;6:26789.
- BANOV, D.; BANOV, F.; BASSANI, A.S. Case series: the effectiveness of fatty acids from pracaxi oil in a topical silicone base for scar and wound therapy. **Dermatol Ther**. 2014; 4: 259–269.
- BARDA S, *et al.* Oil from pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds: evaluation of its functional properties on wound healing in rats. **Lipids in Health and Disease**. 15:73. 2016.
- BELDON, P. Basic science of wound healing. **Surgery**. 2010;28(9):409-12.
- BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. **Journal of Clinical Investigation**. 2007;117(5):1219-1222. doi:10.1172/JCI32169.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. **Plast. Reconstr. Surg**.2006;117(7 Suppl.):S12–S34.
- BRUHN, J. G.; HOLMSTEDT, B. "Ethnopharmacology, objectives, principles and perspectives". *In: Natural products as medicinal agents*. Stuttgart: Hippokrates, 1982.
- CALDAS, B. **Composição Química do Óleo fixo e Extração Proteica da Semente de Pracaxi (*Pentaclethra macroleoba* (wild) Kuntze)**. 2010. P.69. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – UFPA, Belém.
- CARLSSON, S.; HAMMAR, N.; GRILL, V; KAPRIO, J. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes in Finnish twins. **Int J Epidemiol**. 2004;33:616–617.

Carpinelli, A. R., Sener, A., Herchuelz, A. Malaisse, W. J. (1980) *Metab. Clin. Exp.* 29, 540-545.

CASSETTARI, L.L. *et al.* Continuous Electrical Current and Zinc Sulphate Administered by Transdermal Iontophoresis Improves Skin Healing in Diabetic Rats Induced by Alloxan: Morphological and Ultrastructural Analysis. **Journal of Diabetes Research**. 2014, 98;0232.

CHUN, J. *et al.* *Pentaclethra macroloba* seed effect on larval growth cell viability and midgut enzyme activity of *Helicoverpa zea*. **J Econ Entomol.**, 1994; 87: 1754-1760.

COSTA, M.N.F.S. *et al.* Characterization of *Pentaclethra macroloba* oil. **J Therm Anal Calorim** 2014; 115(3): 2269–2275.

DA SILVA J.O. *et al.* Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. **Journal Ethnopharmacol.** 2005;100:145–52.

DA SILVA, J. O. *et al.* Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon**. 2007, 50(2):283-91. Epub.

DANGELO, J, G. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

DELAVARY, B.M. *et al.* Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**. 2011;216:753–762.

DEPPERMAN, C. *et al.* Gray platelet syndrome and defective thrombo-inflammation in Nbeal2-deficient mice. **J Clin Invest**. 2015; doi: 10.1172/JCI69210.

DIB, A.S. Heterogeneidade do diabetes mellitus tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 2008; 52:205-18.

DUNN, J.S.; SHEEHAN, H.L.; MCLETHIE, N.G.B. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. **Lancet**. 1:484-487, 1943.

ECKEL, R.H.; GRUNDY, S.M.; ZIMMET, P.Z. The metabolic syndrome. **Lancet**. 2005; 58:773-95.

ECKES, B.; NISCHT, R.; KRIEG, T. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. **Fibrogenesis Tissue Repair**. 2010;3:4.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 35-36. 2003.

EMING, S.A.; BRACHVOGEL, B.; ODORISIO, T.; KOCH, M. Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model. *Prog. Histochem. Cytochem.* 2007; 42:115–170.

ENOCH, S.; LEAPER, D. Basic science of wound healing. *Surgery.* 2007, 26:31–37.

EO, H.; LEE, H.J.; LIM, Y. Ameliorative Effect of Dietary Genistein on Diabetes Induced Hyper-Inflammation and Oxidative Stress During Early Stage of Wound Healing in Alloxan Induced Diabetic Mice. *Biochem Biophys. Rev. Commun* 478 (3), 1021-1027. 2016 Jul 16.

FARIA, P. F. Diabetes mellitus em cães. *Acta Veterinária Brasileira.* v 1, p 8-22, 2007.

FERREIRA, M.C.; PAGGIARO, A.O.; ISAAC, C.; TEIXEIRA-NETO, C.; SANTOS, G.B. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. *Rev Bras Cir Plást.* 2011; 26 (4): 696-702.

FRANK, S. *et al.* Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 12607–12613.

GALIANO, R.D.; MICHAELS, J.; DOBRYANSKY, M.; LEVINE, J.P.; GURTNER, G.C. Quantitative and reproducible murine modelo of excisional wound healing. *Wound Repair and Regeneration.* 2004, V. 12 n. 4 p. 485-492.

GALIANO, R.D. *et al.* Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am. Journal Pathol.* 2004, 164:1935–1947.

GALKOWSKA, H.; WOJEWODZKA, U.; OLSZEWSKI, W.L. Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen.* 2006. 14:558–565.

GORUS, F.K.; MALAISSE, W.J.; PIPELEERS, D.G. Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. *Biochem J.* 208:513–515 (1982).

GUIMARÃES, A.L. *et al.* Antimicrobial Activity of Copaiba (*Copaifera officinalis*) and Pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) Oils against Staphylococcus Aureus: Importance in Compounding for Wound Care. *Int J Pharm Compd.* 2016 Jan-Feb;20(1):58-62.

GUIRRO, E.C. *et al.* Immediate effects of electrical stimulation, diathermy, and physical exercise on lower limb arterial blood flow in diabetic women with peripheral arterial disease: a randomized crossover trial. *J Manipulative Physiol Ther.* 2015 Mar-Apr;38(3):195-202.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica.** 12ª edição. Editora ELSEVIER, Rio de Janeiro. 2011.

HENRY, G.; GARNER, W.L. Inflammatory mediators in wound healing. **Surg Clin N Am.** 2003;83:483–507.

HINZ, B. Myofibroblasts, **Experimental Eye Research.** 2015.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**, 7th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015.

ISAAC, C. *et al.* Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Rev Med.** 2010;89(3/4): 125-31.

JELODAR, G.; MOHSEN, M.; SHAHRAM, S. Effect of Walnut Leaf, Coriander and Pomegranate on Blood Glucose and Histopathology of Pancreas of Alloxan Induced Diabetic Rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines.** 2007;4(3):299-305.

KANT, V. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **Int Immunopharmacol.** 2014; 20: 322-330.

KANT, V. *et al.* Curcumin-induced angiogenesis hastens wound healing in diabetic rats. **Journal Surgery Res** 193: 978-988, 2015.

KAZEMI-DARABADI, S.; SARRAFZADEH-REZAEI, F.; FARSHID, A.A.; DALIR-NAGHADEH, B. Allogeneous skin fibroblast transplantation enhances excisional wound healing following alloxan diabetic in sheep, a randomized controlled trial. **Int J Surg.** 2014;doi: 10.1016/j.ijssu.2014.06.007.

KERSTEIN, M.D. The scientific basis of healing. **Adv Wound Care** 10:30–36, 1997.

KHATUNE, N.A.; RAHMAN, B.M.; BARMAN, R.K.; WAHED, M.I.I. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant properties of ethanol extract of *Grewia asiatica* Linn. bark in alloxan-induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine.** 2016;16:295.

KIM, M.H. *et al.* Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging. **J Invest Dermatol.** 2008; 128: 1812-1820.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Patologia Básica.** 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 928 p.

LAAKSONEN, D.E. *et al.* Physical activity in the prevention of type 2 diabetes: the Finnish diabetes prevention study. **Diabetes.** 2005;54(1):158–65.

LACY, P.E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas, **Diabetes**. 1967, 35-39.

LAMANO, T. L.C. **Patologia Geral. Inflamação**. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2008.

LATIF, M.A. *et al.* Alopecia denudata Engler treatment enhance open wound healing activities in Wistar rat's skin. **J Ethnopharmacol**. 2015, 176, 258-267.

LAWS, R.A. *et al.* Factors influencing participant enrolment in a diabetes prevention program in general practice: lessons from the Sydney diabetes prevention program. **BMC Public Health**. 2012;12:822.

LEITÃO, F. *et al.* Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: an overview on their botanical diversity and toxicological potential. **Rev. Bras. Farmacogn**, 24: 225-247, 2014.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, Berlin, v. 51, p. 216–226, 2008.

LIMA, M.A. *et al.* Análise quantitativa das células das ilhotas pancreáticas em ratos sob efeito de aloxana. **Medicina (Ribeirão Preto)**. 2001;34(1):308-14.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil, vol. 2, 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MAGDALON, J. *et al.* Oral Administration of Oleic or Linoleic Acids Modulates the Production of Inflammatory Mediators by Rat Macrophages **Lipids**. 47: 803. 2012.

MALLEFET, P.; DWECK, A.C. Mechanism of Wound Healing Examined. **Personal Care**. 2008, 75 – 83.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S.A. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2003.72, 393–410.

MANOLESCU, A.R.; AUGUSTIN, R.; MOLEY, K.; CHEESEMAN, C. A highly conserved hydrophobic motif in the exofacial vestibule of fructose transporting SLC2A proteins acts as a critical determinant of their substrate selectivity. **Mol Membr Biol**. 2007; 24(5–6):455–463.

MARTIN, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science**. 276(5309):75-81. 1997.

MARUYAMA, K. *et al.* Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing. **Am. J. Pathol.** 2007. 170:1178–1191.

MATTHEWS, D. R.; MATTHEWS, P. C. Banting Memorial Lecture 2010. Type 2 diabetes as an ‘infectious’ disease: is this the Black Death of the 21st century?. **Diabetic Medicine**, 2011 28: 2–9.

MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol.** 2009;84(3):257-62.

MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters. **Eur J Biochem** 1994; 219: 713-725.

MUECKLER, M. Glucose transport and glucose homeostasis: New insights from transgenic mice. **News in Physiological Sciences.** 1995; 10:22–29.

MUECKLER, M.; THORENS, B. The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. **Molecular aspects of medicine.** 2013;34(0):121-138.

OLIVEIRA, A. A. *et al.* Antimicrobial activity of amazonian medicinal plants. **SpringerPlus.** 2013;2:371.

OLIVEIRA, G. I. V. **Monitoramento da indução do Diabetes mellitus em ratos Wistar com aloxana em diferentes doses.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. **Informe mundial sobre la diabetes.** Ginebra, 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream>. Acessado em: 01 de Março de 2017.

OTRANTO, M.; DO NASCIMENTO, A.P.; MONTE-ALTO-COSTA A. Effects of supplementation with different edible oils on cutaneous wound healing. **Wound Repair Regen.** 2010;18:629–636.

PARK, J. H.; KIM, S.; HONG, H. S.; SON, Y. Substance P promotes diabetic wound healing by modulating inflammation and restoring cellular activity of mesenchymal stem cells. **Wound Rep and Reg**, 2016; 24: 337–348.

PASQUALOTTO, K. R.; ALBERTON, D.; FRIGERI, H. R. Diabetes mellitus and Complications. **J. Biotec. Biodivers.** v. 3, N.4: pp. 134-145, Nov. 2012.

PESCE, C. **Oleaginosas da Amazônia.** 2. ed. rev. e atual. Belém: Núcleo de Estudos Agrários e Desenvolvimento Rural, 2009. 66 p.

PESSOA, A. F. M. *et al.* Oral administration of antioxidants improves skin wound healing in diabetic mice. **Wound Rep and Reg**, 2016, 24: 981–993.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat Rev Immunol**. 2007, 803–815, doi: 10.1038/nri2171.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **Eur Surg Res**. 2012; 49:35-43.

RIBEIRO, A. F. **Avaliação Química e Toxicológica do óleo Graxo de *plukenetia polyadenia*. Arg. (Eupobiaceae)**. 2005, Dissertação de Mestrado, UFPA.

ROBSON, M.C.; STEED, D.L.; FRANZ, M.G. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. **Curr Probl Surg**. 2001; 38:72–140.

RODERO, M.P.; KHOSROTEHRANI, K. Skin wound healing modulation by macrophages. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**. 2010;3(7):643-653.

RODRIGUES, H.G. *et al.* Oral Administration of Oleic or Linoleic Acid Accelerates the Inflammatory Phase of Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology**. Jan;132(1):208-15. 2012.

RODRIGUES, H.G. *et al.* Oral Administration of Linoleic Acid Induces New Vessel Formation and Improves Skin Wound Healing in Diabetic Rats. **PLoS ONE**. 11(10): e0165115. 2016.

ROMANA-SOUZA, A. P.; NASCIMENTO, A.P.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Propranolol improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**. Vol. 611, no. 1–3, pp. 77–84, 2009.

ROSS, R.; ODLAND, G. Human wound repair. II. Inflammatory cells, epithelial-mesenchymal interrelations, and fibrogenesis. **J Cell Biol**. 1968;39: 152-168.

SANTIAGO, G.M.P. *et al.* Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 15, n. 3, p. 187-190, Sept. 2005.

SHEN, H.M. *et al.* The N-butyl alcohol extract from *Hibiscus rosa-sinensis* L. flowers enhances healing potential on rat excisional wounds. **J Ethnopharmacol**. 2017 Feb 23;198:291-301.

SILVA, V.D. **Indução experimental do Diabetes mellitus em ratos Wistar submetidos à injeção intraperitoneal de aloxana em diferentes doses**. [Dissertação]. Presidente Prudente: Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista; 2011.

SILVA, V.D.; NOGUEIRA, R.M.B. Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos *Wistar*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 2015;36(1):9-15 ISSN 1808-4532.

SIMMONS, C.V.; BANOV, F.; BANOV, D. Use of a topical anhydrous silicone base containing fatty acids from pracaxi oil in a patient with a diabetic ulcer. **SAGE Open Medical Case Reports**. 2015; 3:205. doi:10.1177/2050313X15589676.

SIMON, D. **O guia Decepar Chora de ervas: 40 receitas naturais para uma saúde perfeita**. Rio de Janeiro(RJ): Campus; 2001.

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

SMANIOTTO, P.H.S.; FERREIRA, M.C.; ISAAC, C.; GALLI, R. Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, São Paulo , v. 27, n. 4, p. 623-626, Dec. 2012 .

STRODTBECK, F. Physiology of wound healing. **Newborn and Infant Nursing Reviews**, v. 1, n. 1, p. 43-52, 2001.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, Prague, n. 50, p. 536-546, 2001.

TAKEMOTO, K. *et al.* Insulin Release from the Beta Cells in Acatalasemic Mice Is Highly Susceptible to Alloxan-Induced Oxidative Stress. **Journal of Diabetes Mellitus**, 2015; 81-89.

THORENS, B.; CHARRON, M.J.; LODISH, H.F. Molecular physiology of glucose transporters. **Diabetes Care**, 1990, 13: 209-218.

VILAR, Lúcio. **ENDOCRINOLOGIA CLÍNICA**. Guanabara Koogan 5ª Edição, 2013.

VISENTAINER, J.V.; FRANCO, M.R.B. **Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação**. São Paulo: Varela, 2006. 120p.

WALDROP, J, DOUGHTY, D. Wound-healing Physiology. Acute and Chronic Wounds. Nursing Management. **London: Mosby Inc.**, 2000, 17–39.

WANG G. et al. Hydrogen sulfide accelerates wound healing in diabetic rats. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**. 8(5):5097-5104. 2015.

WICKS, K.; TORBICA, T.; MACE, K.A. Myeloid cell dysfunction and the pathogenesis of the diabetic chronic wound. **Semin Immunol**. 2014; 26(4):341–53. Epub 2014/06/24.

YOUNG, A.; MCNAUGHT, C.E. The physiology of wound healing. **Surgery**, 2011; 29:475-479.

ZHANG, Z.; WANG, S.; DIAO, Y.; ZHANG, J.; LV, D. Fatty acid extracts from *Lucilia sericata* larvae promote murine cutaneous wound healing by angiogenic activity. **Lipids in Health and Disease**. 9:24. 2010.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS

Protocolo nº 04/2017

Título do Projeto de Pesquisa: **Potencial cicatrizante do extrato cetônico *Pentaclethra macroloba* no processo de reparo de lesões excisionais na pele de camundongos diabéticos**

Pesquisador Responsável: **Anderson Bentes de Lima**
Instituição: **Universidade do Estado do Pará**

Data do Parecer: 06/04/2017

PARECER

O Comitê de Ética no Uso de Animais da UEPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794, sendo respeitados os Princípios Éticos da Experimentação Animal do CONCEA. O referido projeto utiliza 40 camundongos pertencentes a espécie *Mus musculus*, com 60 dias e peso de 30g a 40g, para fins de pesquisa, tratando-se de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata, do sexo masculino, originários da Seção de Criação e Produção de Animais de Laboratório (SACPA) do Instituto Evandro Chagas. Desse modo, após as avaliações o CEUA-UEPA, manifesta-se pela sua aprovação.

O projeto será desenvolvido no período de 03/2017 a 03/2018.

Parecer: **APROVADO**

Liberado para o início da pesquisa sendo obrigatória a entrega neste CEUA do relatório semestral e a conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no projeto.

Belém, 06 de abril de 2017.

Prof. Dr. Anderson Bentes de Lima
Coord. do CEUA/CCBS/UEPA