



BRUNO GROSSELLI LANIA

**“USO DO ÓLEO DE ARROZ NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS
CUTÂNEAS EM RATOS (*Rattus norvegicus albinus*)”**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

BRUNO GROSSELLI LANIA

**“USO DO ÓLEO DE ARROZ NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS
CUTÂNEAS EM RATOS (*Rattus norvegicus albinus*)”**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Letícia Cintra

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO BRUNO
GROSSELLI LANIA E ORIENTADO PELO PROF. DR.
PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

iii

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

L27u Lania, Bruno Grosselli, 1987-
 Uso do óleo de arroz na cicatrização de úlceras
 cutâneas em ratos (*Rattus norvegicus albinus*) / Bruno
 Grosselli Lania. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

 Orientador : Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho.
 Coorientador : Maria Letícia Cintra.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Ensaio de imunoabsorção enzimática. 2.
 Mediadores da inflamação. 3. Reação em cadeia da
 polimerase em tempo real. 4. Dermatologia. I. Velho,
 Paulo Eduardo Neves Ferreira, 1966-. II. Cintra, Maria
 Letícia, 1951-. III. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Use of rice oil for treatment of cutaneous ulcers (*Rattus norvegicus albinus*).

Palavras-chave em inglês:

Enzyme-linked immunosorbent assay

Inflammation mediators

Real-time polymerase chain reaction

Dermatology

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho [Orientador]

Ricardo Romiti

Patrícia Érica Christofolletti Daldon

Data da defesa: 15-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

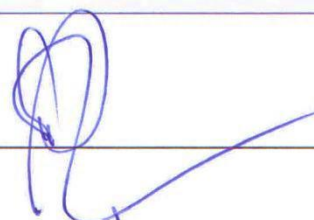
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

BRUNO GROSSELLI LANIA

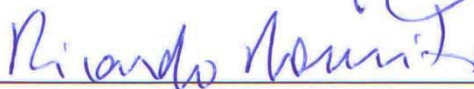
Orientador PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

MEMBROS:

1. PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO



2. PROF. DR. RICARDO ROMITI



3. PROFA. DRA. PATRÍCIA ÉRICA CHRISTOFOLETTI DALDON



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 15 de fevereiro de 2013

Dedicatória

Aos meus pais, Dagma e Eduardo,

Sem vocês não seria possível.

Obrigado por transformar meu sonho em realidade.

Agradecimentos

Quando era criança, sonhava em ser cientista e achava que conseguiria descobrir e fazer experiências sozinho, embalado pela inocência infantil ao assistir o programa “O Mundo de Beakman”! Mas aprendi que o sonho só se torna realidade quando sonhado junto.

A realização de meu sonho, concretizado neste trabalho, só foi possível graças ao amor, empenho e apoio de pessoas às quais dedico todo meu agradecimento.

A Deus, pelo dom da vida.

À minha amada Paula, pelo amor, compreensão, apoio e ajuda. Perdão pelas “horas roubadas” de namoro para estar no laboratório.

A meus pais, pelo esforço que fizeram para me proporcionar a melhor formação possível e pelo exemplo de vida. Obrigado por sempre estarem do lado certo e não necessariamente do meu lado.

A meus irmãos Eduardo, Mariana e Daniel por sempre me apoiarem, aconselhando e torcendo pelo meu sucesso.

Aos meus amigos Samuel, Ana Júlia, Guilherme, Juliana, Daniel, Stéfany, Rodrigo, Mayara, Fernanda e Davi por terem ajudado a diminuir o fardo e o cansaço, lembrando-me que a vida também é diversão!

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho por confiar a mim este desafio, pelos conselhos, orientações. Certamente ensinou-me muito mais do que está registrado nesta tese.

À Profa. Dra. Maria Letícia Cintra, por ter aceito ser minha co-orientadora, pelos ensinamentos em histologia, dedicação e disponibilidade sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Lício Augusto Velloso por ter permitido o uso de seu laboratório viabilizando a realização do meu mestrado. Sem sua ajuda, este trabalho não seria possível.

À Profa. Dra. Sarah Monte Alegre, por ter cedido espaço no seu laboratório para a realização deste trabalho, e por disponibilizar seus funcionários Aglécio e Conceição para meu treinamento. A vocês também, Aglécio e Conceição, obrigado pela dedicação e tempo disponível.

À Profa. Dra. Renata Ferreira Magalhães, pelo apoio no início do projeto e por sempre estar disponível para conselhos e revisões do trabalho que estava realizando.

Ao Dr. Nilson Borlina Maia, pela colaboração dada ao longo de todo o projeto, tanto na execução do projeto quanto nas discussões realizadas.

À Joseane Morari, pela disponibilidade em todos os momentos, pela paciência em me ensinar a mesma coisa várias vezes, por fazer o trabalho braçal de bancada quando eu não podia, por me auxiliar, mesmo a contragosto, a sacrificar os animais.

Aos colegas que me auxiliaram ao longo de todo o mestrado: Gérson, Lucas, Gabriela, Carina, Carol, Érika, Bruna, Lígia, Nathália, “Maginha”, Dani e Letícia, do laboratório do Prof. Lício; Dr. Rovilson, Dani, Sílvio, Josélia, Clarice e Lenira, do Cemib; Marizete, Luzia, Edson e Eliane, do laboratório de Microbiologia do HC; Luís Felipe, Ana Cláudia, Luzia e Aretuza, do laboratório de Anatomia Patológica; Marina, Luíza, Amanda e Lígia, do laboratório do Prof. Paulo Velho. Obrigado por tudo, dos ensinamentos teóricos e práticos aos cafés e risadas!

À Deyse Gebert, pela análise estatística profissional que enriqueceu este trabalho.

À CAPES, por conceder a bolsa de mestrado ao longo do projeto.

À HT Nutri LTDA, pelo financiamento desta pesquisa e pela parceria formada com nosso grupo de estudo.

Obrigado é uma palavra pequena demais para expressar a gratidão que devo a todos!

“Tudo posso nAquele que me fortalece.”

Filipenses 4.13

Resumo

Introdução: o processo de cicatrização é longo e complexo, dura meses nos humanos, e depende de diversos fatores locais e gerais. Ele pode ser dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação. Para que ocorra, é necessária uma cascata de eventos e a participação de diversos tipos de células, bem como de substâncias por elas secretadas. Entre estas destacam-se as substâncias pró-cicatriciais, como a leptina, IL-2, IL-4, IL-6 e o IGF-1, as anti-cicatriciais, como a adiponectina, IL-12, o IFN- α , o IFN- γ e, finalmente, o TNF- α , que possui ação variável, de acordo com a concentração circulante desta substância. Muito há para se pesquisar nesse campo, e o desenvolvimento de produtos, com princípios ativos que estimulam a cicatrização, mas de baixo custo, que aproveite matérias-primas encontradas na região, poderia beneficiar um número grande de indivíduos. Foi demonstrado que o uso do óleo do farelo de arroz induz a proliferação de linfócitos, a síntese de citocinas, o aumento da hematopoese e a atividade fagocítica de macrófagos.

Objetivos: testar a efetividade do óleo de arroz na cicatrização de feridas cutâneas, e avaliar, tanto no tecido lesado, como no sangue, a sua ação em fatores que atuam na cicatrização.

Material e métodos: sobre feridas cirúrgicas circulares, produzidas pela exérese da pele, com bisturi, no dorso de ratos, (45 animais, divididos em três grupos) foi aplicado um produto à base de óleo de arroz (patente BR 10 2012 008718 9). O processo de cicatrização foi avaliado por meio do estudo histológico e da quantificação tissular (por meio da PCR *real time*) e sérica (por meio da técnica Elisa), de fatores que atuam na cicatrização: leptina, IL-2, IL-4, IL-6, IGF-1, adiponectina, IL-12, IFN- α , IFN- γ e TNF- α .

Resultados e conclusões: comparativamente com o controle, foi encontrada diferença significativa na celularidade das feridas e detectada ação sistêmica do produto, face ao aumento dos níveis séricos de adiponectina, leptina, IL-2, IL-6, TNF- α e IFN- γ . Os resultados deste trabalho poderão ser úteis para a indústria farmacêutica e cosmecêutica brasileira ou internacional.

Abstract

The wound healing process is long and complex, lasts months and depends on many local and general factors. It can be divided into three phases: inflammatory, proliferative and remodeling. For that to occur, it is necessary a cascade of events involving several cell types, as well as substances secreted by them. Among these we highlight the pro-healing substances such as leptin, IL-2, IL-4, IL-6 and IGF-1, anti-scarring such as IL-12, IFN- α , IFN- γ and, finally, TNF- α , which possesses variable action, according to the circulating concentration of this substance. More research is needed in this field, and the development of products with active ingredients that stimulate healing, but of low cost, which uses raw materials found in the region, could benefit a large number of individuals. It has been shown that the use of rice bran oil induces lymphocyte proliferation, cytokine synthesis, increased hematopoiesis and phagocytic activity of macrophages.

The objectives of this study were to test the effectiveness of rice oil topical use and assess both the injured tissue and blood to evaluate its action on factors that act in healing.

Methods: Circular surgical wounds were produced by excision of skin with a scalpel in the back of rats (45, divided into three groups), then applied saline solution or essentials fatty acids or rice bran oil (patent BR 10 2012 0087 18 9). The healing process was evaluated by histological examination and quantification of tissue (by real time PCR) and serum (by ELISA technique), factors that act in healing, namely leptin, IL-2, IL -4, IL-6, IGF-1, adiponectin, IL-12, IFN- α , IFN- γ and TNF- α .

Compared with control, there was significant difference in the cellularity of the wound healing area and systemic action of the product detected by the increases in serum levels of adiponectin, leptin, IL-2, IL-6, TNF- α and IFN - γ . The results of this study may be useful to the Brazilian or international pharmaceutical and cosmeceutical industry.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tratamentos aplicados em cada grupo de estudo.....	46
Tabela 2. Dados de ANAVA para estudo de diferença entre grupos	68
Tabela 3. Dados de teste T de Student para estudo de diferença dentro do G1	68
Tabela 4. Dados de teste T de Student para estudo de diferença dentro do G2	68
Tabela 5. Dados de teste T de Student para estudo de diferença dentro do G3	69
Tabela 6. Dados de teste T de Student para estudo de diferença entre controle do G1 e tratamento do G2.....	69
Tabela 7. Dados de teste T de Student para estudo de diferença entre controle do G1 e tratamento do G3.....	70
Tabela 8. Teste de ANAVA para leptina.	74
Tabela 9. Teste de Scott-Knott para dia 2 - leptina.....	75
Tabela 10. Teste de Scott-Knott para dia 4 - leptina.....	75
Tabela 11. Teste de Scott-Knott para dia 10 - leptina.....	76
Tabela 12. Teste de ANAVA para diferença entre grupos - leptina	76
Tabela 13. Teste de ANAVA para ferida contralateral - leptina	77
Tabela 14. Teste de ANAVA para IL-2.	77
Tabela 15. Teste de médias para grupos – IL-2.	78
Tabela 16. Teste de ANAVA para ferida contralateral – IL-2.....	78
Tabela 17. Teste de médias para grupos – ferida contralateral – IL-2.....	79
Tabela 18. Teste de médias para dias – ferida contralateral – IL-2.	79
Tabela 19. Teste de ANAVA – IL-6.....	79
Tabela 20. Teste de médias para grupos – IL-6.	80
Tabela 21. Teste de ANAVA – ferida contralateral – IL-6.....	80
Tabela 22. Teste de médias para grupos – ferida contralateral – IL-6.....	81
Tabela 23. Teste de ANAVA – IGF-1.	81
Tabela 24. Teste de médias para grupos – IGF-1.....	82
Tabela 25. Teste de ANAVA – ferida contralateral – IGF-1.	82
Tabela 26. Teste de ANAVA – adiponectina.	83
Tabela 27. Teste de ANAVA – ferida contralateral – adiponectina.	83
Tabela 28. Teste de ANAVA – IL-12.....	84
Tabela 29. Teste de médias dos grupos para o dia 2 – IL-12.....	84
Tabela 30. Teste de Scott-Knott dos grupos para o dia 4 – IL-12.	85
Tabela 31. Teste de média dos grupos para o dia 10 – IL-12.	85
Tabela 32. Teste de ANAVA – ferida contralateral – IL-12.	85
Tabela 33. Teste de Scott-Knott para grupos – ferida contralateral – IL-12.	86
Tabela 34. Teste de ANAVA – IFN- α	86
Tabela 35. Teste de Scott-Knott para grupos - IFN- α	87

Tabela 36. Teste de ANAVA – ferida contralateral - IFN- α	87
Tabela 37. Teste de Scott-Knott para grupos – ferida contralateral - IFN- α	88
Tabela 38. Teste de ANAVA – IFN- γ	88
Tabela 39. Teste de ANAVA - nível de dias - IFN- γ	89
Tabela 40. Teste F dos grupos para o dia 2 - IFN- γ	89
Tabela 41. Teste de Scott-Knott dos grupos para o dia 4 - IFN- γ	89
Tabela 42. Teste de Scott-Knott dos grupos para o dia 10 – IFN- γ	90
Tabela 43. Teste T de Student G1 x G2 – ferida contralateral - IFN- γ	90
Tabela 44. Teste T de Student G1 x G3– ferida contralateral - IFN- γ	90
Tabela 45. Teste T de Student G2 x G3– ferida contralateral - IFN- γ	90
Tabela 46. Teste T de Student D2 x D4 – ferida contralateral - IFN- γ	91
Tabela 47. Teste T de Student D2 x D10 – ferida contralateral - IFN- γ	91
Tabela 48. Teste T de Student D4 x D10 – ferida contralateral - IFN- γ	91
Tabela 49. Teste de ANAVA – TNF- α	92
Tabela 50. Teste de ANAVA – ferida contralateral - TNF- α	92
Tabela 51. Teste de ANAVA – Elisa – Leptina.	96
Tabela 52. Teste de ANAVA – Elisa – IL-2.	96
Tabela 53. Teste de ANAVA – Elisa – IL-4.	96
Tabela 54. Teste de ANAVA – IL-6.....	97
Tabela 55. Teste de Scott-Knott para grupos – Elisa – IL-6.	97
Tabela 56. Teste de ANAVA – Elisa – IGF-1.	98
Tabela 57. Teste de ANAVA – Elisa – adiponectina.	98
Tabela 58. Teste de Scott-Knott para grupos – Elisa – adiponectina.....	98
Tabela 59. Teste de Scott-Knott para dias – adiponectina.....	99
Tabela 60. Teste de ANAVA – Elisa – IL-12.	99
Tabela 61. Teste de Scott-Knott para grupos – Elisa – IL-12.	99
Tabela 62. Teste de Scott-Knott para dias – Elisa – IL-12.....	100
Tabela 63. Teste de ANAVA – Elisa – IFN- α	100
Tabela 64. Teste de ANAVA – IFN- γ	101
Tabela 65. Teste de Scott-Knott para grupos – Elisa – IFN- γ	101
Tabela 66. Teste de Scott-Knott para dias – Elisa – IFN- γ	101
Tabela 67. Teste de ANAVA – Elisa – TNF- α	102
Tabela 68. Teste de ANAVA dentro de cada nível de dias – Elisa – TNF- α	102
Tabela 69. Teste de Scott-Knott dos grupos para o dia 2 – Elisa - TNF- α	102
Tabela 70. Teste de Scott-Knott dos grupos para o dia 4 – Elisa – TNF- α	103
Tabela 71. Teste de Scott-Knott dos grupos para o dia 10 – Elisa - TNF- α	103

Lista de Quadros

Quadro 1: Estudos realizados com uso de arroz e derivados.....	38
Quadro 2: Esquema da experimentação animal, divisão dos grupos e sacrifícios.....	46
Quadro 3: Esquema de coleta de amostras dos animais sacrificados.....	57
Quadro 4: Gráfico referente à celularidade no lado controle dos três grupos.....	66
Quadro 5: Gráfico referente à celularidade no lado tratamento do três grupos.....	67
Quadro 6: Resumos dos valores encontrados de RQ para as diferentes citocinas avaliadas nos grupos 1, 2 e 3, em relação ao grupo 1, por PCR <i>real time</i>	71
Quadro 7: Resumos dos valores encontrados de RQ para as diferentes citocinas avaliadas nos grupos 1, 2 e 3, em relação ao lado controle do próprio animal, por PCR <i>real time</i>	72
Quadro 8: gráfico com os dados de PCR <i>real time</i> em relação à ferida (f) e ao grupo controle (c) das citocinas pró-cicatriciais.....	73
Quadro 9: gráfico com os dados de PCR <i>real time</i> em relação à ferida (f) e ao grupo controle (c) das citocinas anticicatriciais e com efeito variável.....	74
Quadro 10. Resumo dos valores encontrados nas dosagens das citocinas pelo método Elisa.....	93
Quadro 11: Gráfico com os dados de Elisa das citocinas pró-cicatriciais.....	94
Quadro 12: Gráfico com os dados de Elisa das citocinas anticicatriciais e com efeito variável.....	95
Quadro 13. Resumo da ação e achados das citocinas inflamatórias avaliadas.....	116

Lista de Figuras

Figura 1: Gaiola com o animal, água, alimento e cama de maravalha	44
Figura 2. a) Câmara com prateleiras para gaiolas, b) controles de temperatura, fotoperíodo, alarmes e c) filtragem do ar.	45
Figura 3. a) Aplicação de anestésico e b) tricotomia dos animais.	47
Figura 4. Manipulação do animal a) antes da anestesia e b) após a anestesia.	48
Figura 5. Procedimento de ferimento dos animais. a) Corte circular com bisturi descartável, b) excisão do disco de pele até a fáscia e c) animal pronto para receber os tratamentos.	48
Figura 6. Procedimentos de troca de curativo. a) remoção do curativo antigo, b), aplicação de tratamentos diários nos animais e c) oclusão com gazes.	49
Figura 7. a) Decapitação do animal, b) coleta de sangue e c) centrifugação e coleta de soro.	50
Figura 8. a) Excisão da área tricotomizada e b) retirada de fragmento, do ferimento para análise.	50
Figura 9. Aspecto das regiões feridas e tratadas, excisadas dos animais abatidos aos a) 2, b) 4 e c) 10 dias.	51
Figura 10. Montagem das lâminas para análise histológica a partir dos a) frascos identificados com os fragmentos sendo fixados em formol; b) e c) corte no sentido longitudinal do ferimento para inclusão; d) fragmentos acondicionados em cassetes plásticos, devidamente identificados, para encaminhamento ao histotécnico.	52
Figura 11. Análise morfométrica da celularidade dérmica no leito da ferida operatória. a) Lâmina contendo três cortes seriados de fragmento da lesão, b) gráticula de cicloides empregada para análise morfométrica e c) um dos dez campos histológicos analisados pela gráticula.	53
Figura 12. Aspecto dos ferimentos do lado submetido aos tratamentos durante quatro dias.	60
Figura 13. Histologia - segundo dia após o ferimento	62
Figura 14. Histologia - segundo dia após o ferimento: processos em fases distintas de evolução.	63
Figura 15. Histologia - quarto dia após o ferimento: processos em fases distintas de evolução.....	63
Figura 16. Histologia - décimo dia após o ferimento (aumento x40).	64
Figura 17. Histologia - décimo dia após o ferimento (aumento x100).....	65

Lista de Abreviaturas

AGE – ácido graxos essenciais

ANAVA – Análise de variância

BHI – *Brain Heart Infusion*

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

Ct – ciclo do limiar de detecção

D10 – dia 10

D2 – dia 2

D4 – dia 4

DNA – ácido desoxirribonucleico

ELISA – ensaio de imunoabsorção ligado a enzima

G1 – grupo 1

G2 – grupo 2

G3 – grupo 3

GAPD – gliceraldeído 3-fostato desidrogenase

HE – hematoxilina e eosina

IFN – interferon

Ig – imunoglobulina

IGF-1 – fator de crescimento insulina-símile 1

IL – interleucina

LAK – células *killer* ativadas por linfócito

LDL – lipoproteína de baixa densidade

MHC – complexo de histocompatibilidade principal

N/D – não detectado

ng/mL – nanogramas por mililitro

NK – *natural killer*

OA – óleo de arroz

PCR – reação em cadeia da polimerase

PGE 2 – prostaglandina 2

qPCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

RQ – quantificação relativa

TNF – fator de necrose tumoral

VCAM-1 – molécula de adesão à célula vascular 1

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. ETAPAS DA CICATRIZAÇÃO	28
1.2. ANÁLISES LABORATORIAIS DA CICATRIZAÇÃO	29
1.3. SUBSTÂNCIAS IMUNOMODULADORAS ENVOLVIDAS NA CICATRIZAÇÃO	30
1.4. O TRATAMENTO TÓPICO IDEAL	35
1.5. O USO DE ÓLEOS VEGETAIS PARA CICATRIZAÇÃO	36
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES	39
3. OBJETIVOS	41
3.1. GERAL	42
3.2. ESPECÍFICOS	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	44
4.1.1 Manipulação dos animais	44
4.1.2 Experimentos com os animais.....	45
4.1.3 Preparo do animal	47
4.1.4 Tratamento no animal	49
4.1.5 Sacrifício dos animais e coleta de material para análises.....	50
4.2 HISTOLOGIA	51
4.2.1. Preparo de lâminas para análise histológica.....	51
4.2.2. Análise histológica	52
4.3. ANÁLISE DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO TECIDO CICATRICIAL	53
4.3.1 Extração de RNA	53
4.3.2. PCR quantitativo (qPCR) – PCR <i>real time</i>	54
4.3.3. Validação da eficiência dos genes de interesse	54
4.4. ELISA (ANÁLISE DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO SORO).....	56
4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	57
5. RESULTADOS.....	59
5.1. AVALIAÇÃO CLÍNICA	60
5.2. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	60
5.2.1. Avaliação histológica subjetiva.....	60
5.2.2. Avaliação histológica objetiva	66
5.2.2.1. Análise estatística da contagem de células.....	67
5.3. AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO TECIDO CICATRICIAL (PCR <i>REAL TIME</i>)	70

5.3.1. Análise estatística da PCR <i>real time</i>	74
5.4. AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS SISTÊMICAS (ELISA).....	92
5.4.1 Análise estatística de Elisa	95
6. DISCUSSÃO	105
6.1. CLÍNICA.....	106
6.2. ÁREA DE CICATRIZAÇÃO	106
6.3. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	106
6.4. AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO TECIDO CICATRICIAL (PCR <i>REAL TIME</i>) E NO SORO (ELISA)	107
7. CONCLUSÃO.....	117
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

1. Introdução

As tentativas de intervir no processo da cicatrização de feridas, sejam elas acidentais ou intencionalmente promovidas durante procedimentos cirúrgicos, remontam à antiguidade. A incidência e a prevalência de úlceras crônicas é extremamente alta, repercutindo em elevados custos financeiros. Embora, no Brasil, não se encontrem dados precisos, alguns trabalhos demonstram que a cronificação de feridas tem grande impacto psicossocial e econômico. São a segunda causa de afastamento do trabalho no Brasil (Ereno, 2003).

Muitas variáveis, tanto de ordem geral como local, influenciam esse longo e complexo processo de cicatrização. Dos fatores gerais, citam-se a idade, o estado nutricional do paciente, a existência de doenças de base, como diabetes, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, aterosclerose, disfunção renal, quadros infecciosos sistêmicos e uso de medicamentos. Além deles, interferem também a localização anatômica da lesão, raça, técnica cirúrgica utilizada, entre outros (Mandelbaum *et al*, 2003).

Para que uma úlcera cutânea apresente cicatrização, ocorre, em nível celular e molecular, uma cascata de eventos que trabalham em sinergia para a reepitelização e reconstituição do tecido lesado (Ortonne e Clevy, 1994).

1.1. Etapas da cicatrização

O processo de cicatrização pode ser dividido de forma mais simples em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação (Pittman, 2007).

Na fase inflamatória, depois de iniciada a coagulação hemostática, inúmeros mediadores químicos são liberados por células inflamatórias e células do próprio tecido. Nos três primeiros dias, predomina a exsudação e ação dos polimorfonucleares e monócitos, responsáveis pela fagocitose de bactérias, produtos necróticos e liberação de enzimas líticas. O macrófago é a célula mais importante desta fase e permanecerá atuando nas 3 fases do processo. Os linfócitos aparecem na lesão, aproximadamente após

uma semana. As linfocinas, por eles liberadas, têm influência na ação dos macrófagos e muitas outras células (Mandelbaum *et al*, 2003). A fibronectina, sintetizada por fibroblastos, ceratinócitos e células endoteliais, adere simultaneamente, como uma cola, à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células (Mosher e Furcht, 1981).

A fase proliferativa é responsável pelo fechamento propriamente dito da lesão. Nela acontece a reepitelização, pela migração dos ceratinócitos a partir das bordas da ferida e dos anexos, se estes foram preservados (Diegelmann *et al*, 1981; Clark, 1985; Gentilhomme *et al*, 1999). As citocinas modulam o processo inflamatório que é necessário no processo cicatricial, mas que pode ser prejudicial se excessivo. Elas também são responsáveis por cicatrização mais rápida e eficaz (Gentilhomme *et al*, 1999). A formação da matriz depende, além das células inflamatórias e endoteliais, do fibroblasto responsável pela produção de substâncias importantes tanto para o desbridamento como para a remodelação fisiológica (van Winkle, 1967). A proliferação de vasos (tecido de granulação), que ocorre nesta fase, é essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes, para a cicatrização. Desta forma, pode-se dizer que a fase de proliferação é dividida em reepitelização, fibroplasia e angiogênese (Mandelbaum *et al*, 2003).

A remodelação é a última fase, dura meses, e é responsável pelo aumento da força de tensão e diminuição do tamanho da cicatriz. A reestruturação da matriz extra-celular, incluindo os componentes das fibras colágenas e reabsorção de água são eventos que permitem conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui a sua espessura (Doillon *et al*, 1985). Paulatinamente, a neovascularização local diminui, de forma que a área vai perdendo o eritema. No final, a área cicatricial não complicada tem cerca de 80% da força de tensão da pele normal, não é volumosa e é plana (Mandelbaum *et al*, 2003).

1.2. Análises laboratoriais da cicatrização

Para analisar a cascata de eventos ocorridas no processo cicatricial, pode-se fazer estudo macroscópico e microscópico da área da lesão, assim como avaliar a presença de

diversas moléculas mediadoras do processo. Para esta análise, destacam-se os métodos de Elisa e PCR *real time*.

O teste de Elisa (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é um método de detecção e quantificação de proteínas específicas num meio complexo, como o soro sanguíneo (Leng *et al*, 2008). Este método permite a análise de amostras de proteínas imobilizadas em poços de microplacas, usando anticorpos específicos (Engvall e Perlmann, 1971). O teste se tornou possível devido a avanços científicos em várias áreas correlatas. O teste é sensível e tem como base a presença de anticorpos quimicamente ligados a enzimas biológicas, cuja atividade produz um sinal mensurável (Nakane e Pierce, 1967; Avrameas, 1969). Hoje em dia, o teste utiliza anticorpos marcados com fluoróforos, devido ao desenvolvimento da tecnologia de fluorescência (Leng *et al*, 2008).

Já a PCR *real time* (reação em cadeia da polimerase em tempo real), ou qPCR, é uma variação do método desenvolvido por Kary Mullis em 1983. O princípio da técnica é a amplificação de um alvo específico de DNA, a partir de uma quantidade não detectável de material (Mullis e Faloona, 1987). Na PCR clássica, desenvolvida por Mullis, no final da reação pode-se avaliar se o DNA em estudo está ou não presente na amostra, amplificando a mesma. Na técnica de PCR em tempo real pode-se avaliar a amostra quantitativamente, uma vez que esta tecnologia combina a amplificação do DNA, com sua detecção imediata no mesmo tubo, por meio da fluorescência (Kubista *et al*, 2006).

1.3. Substâncias imunomoduladoras envolvidas na cicatrização

Dentre as substâncias relacionadas com a inflamação que interferem no processo cicatricial, destacam-se as seguintes: leptina, interleucina (IL) 2, IL-4, IL-6 e fator de crescimento relacionado à insulina (IGF)-1 como substâncias pró-cicatriciais; adiponectina, IL-12, interferon (IFN)- α e IFN- γ como substâncias anti-cicatriciais e fator de necrose tumoral (TNF)- α , que possui ação variável, de acordo com a sua concentração circulante.

A falta de leptina nos animais, assim como nos humanos, pode levar a um aumento de peso e também ao aumento no tempo necessário para cicatrização. A administração direta de leptina leva à diminuição do tempo de cicatrização, com maior velocidade de reepitelização, mas sem interferir na angiogênese. Outro fato observado em animais é do aumento da expressão de genes de receptores para leptina localmente, o que indica a importância da leptina para o processo cicatricial. A leptina leva a um aumento numérico de ceratinócitos no local de aplicação, no início da cicatrização (Nascimento e Costa, 2006).

A IL-2 é uma citocina pleiotrópica (assim como a maioria das citocinas), isto é, tem múltiplos efeitos: uma única citocina pode interagir com mais de um tipo de célula, ter múltiplas atividades biológicas, interagir com outras citocinas, com as quais pode ter sobreposição de atividades (Arai *et al*, 1990). Produzida primariamente por linfócitos T ativados, tem papel chave na promoção da expansão clonal de células T antígeno-específicas. Além disso, a IL-2 é capaz de mediar múltiplas respostas imunes numa variedade de tipos celulares. Estimula a proliferação dos timócitos, a proliferação e diferenciação de células B ativadas; promove o crescimento e diferenciação e a atividade citocida dos monócitos; induz o crescimento das células *natural killer*, bem como da produção de citocinas por estas células e aumento da sua atividade citolítica e aumenta a produção de células LAK (células *killer* ativadas por linfócito) (Goldsmith e Greene, 1994). Em situações de cicatriz hipertrófica e queloides, a IL-2 é encontrada em linfócitos locais, sugerindo ação pró-cicatricial (Armour *et al*, 2007)

A IL-4 também é uma citocina pleiotrópica que possui múltiplas atividades de modulação de resposta imune, numa variedade de tipos celulares. É fator de ativação/diferenciação das células B, que regula a troca de isótopo de imunoglobulinas, particularmente IgG1 e IgE. Ela suprime o desenvolvimento de células T CD4+ produtoras de IFN- γ e regula a diferenciação de células T *helper naive* no subconjunto Th2. Junto com o TNF- α induz, sinergicamente, a expressão de VCAM-1 (molécula de adesão à célula vascular) em células endoteliais e musculares lisas, resultando no recrutamento seletivo

de eosinófilos e linfócitos no sítio de inflamação. A IL-4 regula negativamente a produção de mediadores inflamatórios como a IL-1, TNF- α , e prostaglandina 2 (PGE₂) em monócitos. Foi demonstrada atividade anti-tumoral tanto *in vivo* quanto *in vitro*. As células secretoras de IL-4 são os basófilos, linfócitos T CD8+, CD4+ de memória e Th2 *naive*, mastócitos, eosinófilos e células dendríticas ativadas por vírus. A IL-4 é a principal responsável por estimular a produção de tenascina (uma glicoproteína da matriz extracelular, presente como uma fina camada na derme papilar adulta, mas que é reexpressa no processo cicatricial) por fibroblastos, nas fases anteriores da deposição de colágeno e migração celular (Makhluf *et al*, 1996).

A IL-6 é uma citocina que desempenha papéis importantes na defesa do hospedeiro, em reações de fase aguda, hematopoese, metabolismo ósseo e progressão do câncer. A IL-6 é essencial para a evolução de inflamação aguda. É secretada por vários tipos de células e a produção é regulada por numerosos sinais como estímulos mitogênicos ou antigênicos, lipopolissacarídeos, cálcio, outras citocinas e vírus. As citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 inibem a expressão de IL-6 nos monócitos (Hirano *et al*, 1996). Níveis sorológicos elevados de IL-6 foram observados em situações patológicas como infecções virais e bacterianas, trauma, doenças autoimunes e inflamação. Os níveis de IL-6 aumentam no início do processo cicatricial; possui propriedade mitogênica nos queratinócitos, assim como quimiotática para neutrófilos e o movimento destes até a área afetada. Tem capacidade de estimular a angiogênese local e aumentar a deposição de colágeno no local da ferida (Lin *et al*, 2003).

O IGF-I, também conhecido como somatomedina C, é um membro da família da insulina. Foi descoberto como um mediador de ações do hormônio do crescimento nas células somáticas, mas também tem sido demonstrado como importante regulador do metabolismo celular, diferenciação e sobrevivência. O IGF-I é sintetizado como uma pré-proteína que é clivada por proteólise, para gerar a proteína madura (Humbel, 1990). O IGF-1, juntamente com o fator de crescimento derivado de plaquetas 2 (PDGF-2), pode aumentar a espessura da pele na cicatrização de feridas (Lynch *et al*, 1989). Na verdade,

esta substância está diretamente ligada à regeneração de vários tipos de tecidos, não apenas o epitelial (Chen *et al*, 2008).

A adiponectina é proteína atuante na homeostase de glicose e lipídeos, cujos níveis circulantes são altos, chegando a aproximadamente 0,01% das proteínas plasmáticas (Basu *et al*, 2009). É induzida durante a diferenciação do adipócito e sua secreção é estimulada pela insulina. A adiponectina é uma adipocina que influencia o metabolismo sistêmico. Atua no metabolismo de glicose e ácidos graxos, sendo, em algumas situações, antagonista do TNF- α (Yano *et al*, 2008). Induz diminuição nos níveis séricos de glicose e triglicérides e aumenta o nível de glucagon. No fígado, promove a inibição insulina-dependente da gliconeogênese e tem ação antifibrosante; no músculo esquelético promove o uso e oxidação de ácidos graxos, uso de glicose e produção de lactato. Age como anti-inflamatório e tem ação protetora contra a aterosclerose (Berg *et al*, 2001). Na pele de pacientes diabéticos, a adiponectina atua diretamente nos ceratinócitos, regulando a expressão de substâncias imunomoduladoras produzidas por estas células; isso indica que a adiponectina atua indiretamente sobre outras células, por meio dos produtos dos ceratinócitos. Outra ação seria a supressão da proliferação e diferenciação dos ceratinócitos, benéfico em casos de hiperqueratinização (Kaway *et al*, 2008). Estudo realizado no Brasil aponta que o sobrepeso tem a capacidade de aumentar o tempo de cicatrização (Nascimento e Costa, 2006).

A IL-12 é uma glicoproteína heterodimérica, que aumenta a atividade citotóxica e induz a produção de IFN- γ nas células *natural killer*, T e T dendríticas da epiderme. Também induz a produção de IFN- γ nos macrófagos. Esta citocina, em conjunto com outras da mesma família (IL-23 e IL-27), é capaz de promover o desenvolvimento de resposta imune por meio de células T CD4⁺ Th1; em resposta a infecções, a IL-12 promove a produção de células Th1, após a IL-27 ter transformado o Th0 em Th0/1; junto com a IL-18, a IL-12 cria células Th1 de memória a partir de células efectoras (Hamza *et al*, 2010). Em processos cicatriciais, a IL-12 tem sua expressão genética aumentada, fazendo com que os macrófagos produzam e secretem mais IFN- γ (Ishida *et al*, 2004).

O IFN- α é uma glicoproteína pertencente à família das citocinas que participam no controle e na replicação celular, na defesa do hospedeiro contra organismos estranhos, como vírus ou bactérias e é um dos principais interferons de tipo I. É produzido por fagócitos mononucleares em resposta à infecção viral. Tem papel na inibição da replicação viral e aumenta a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade do tipo I (MHC tipo I), seja por atuação autócrina ou parácrina (Krause e Pestka, 2005). Outra forma de ação do IFN- α é proteger algumas células contra a entrada de vírus. Numerosas investigações mostraram que o IFN- α atua na regulação do crescimento celular e no efeito imunomodulatório (Ferrantini *et al*, 2007).

O IFN- γ , também conhecido como interferon do tipo II, foi inicialmente identificado como produto com atividade anti-viral de linfócitos T ativados mitogenicamente. Possui papel chave na defesa do hospedeiro, exercendo atividades imunorregulatórias, anti-proliferativas e pró-inflamatórias (Boehm *et al*, 1997). Algumas das funções mais importantes são a estimulação de funções efetoras dos macrófagos, aumento da diferenciação da resposta de tipo Th1 induzida por IL-12, modulação da expressão das classes I e II de moléculas do MHC, regulação da troca de classe de imunoglobulinas (Ig) e regulação das interações entre leucócitos e endotélio. O IFN- γ também foi implicado em papéis fisiológicos em neurônios sensores e na espermatogênese (Neumann *et al*, 1997; Kanzaki e Morris, 1998).

Ambos os interferons possuem ação anticicatrizial, atuando na inibição da síntese do colágeno e proliferação celular e podem aumentar a produção de metaloproteinases. O IFN- α pode aumentar a produção da enzima collagenase, aumentando sua ação anticicatrizial. Deste modo, ambas devem ter seus valores aumentados na fase final da cicatrização, impedindo que a mesma evolua para lesão hipertrófica (Tredget *et al*, 2000).

O TNF- α desempenha papéis críticos na resistência normal do hospedeiro à infecção e ao crescimento de tumores malignos, servindo como imunoestimulante e como mediador da resposta inflamatória. O excesso de produção de TNF, no entanto, tem sido implicado numa série de condições patológicas, incluindo caquexia, choque séptico, e

doenças auto-imunes. O TNF- α é produzido por ativação dos macrófagos e outros tipos de células, incluindo células T e B, células NK, células endoteliais, células musculares lisas e algumas células tumorais. Nas feridas, o TNF- α é um dos responsáveis por iniciar a cascata pró-inflamatória, sendo responsável pela força e tensão cicatricial. Foi encontrado também que a ação do TNF- α pode variar de acordo com a quantidade presente no local de lesão, a saber: quando baixa, acelera o processo e, quando alta, torna-o mais lento (Mast e Schultz, 1996). Porém, estudo realizado por Ware e colaboradores, aponta que, na cicatrização, a ausência de receptores para esta citocina acelera o processo (Ware *et al*, 1996).

Considerando o complexo mecanismo que atua no processo de cicatrização e a interação de numerosas substâncias com atividade estimuladora e moduladora, torna-se claro que há, ainda, um longo caminho a ser percorrido, no campo da pesquisa, para a sua compreensão e, conseqüentemente, controle.

1.4. O tratamento tópico ideal

Embora se acredite que exista excesso de recursos e tecnologias disponíveis no mercado, no campo da cicatrização e dos curativos, muito há que se pesquisar, não só para aperfeiçoar tais recursos, como para torná-los acessíveis a maior número de pessoas. Isto pode ser atingido mediante o desenvolvimento de tecnologias mais simples e baratas, igualmente eficientes, que aproveitem matérias-primas encontradas na região, pois um dos desafios para o profissional e paciente é o elevado custo de tais recursos (Ereno, 2003).

Um produto eficaz para o tratamento de feridas deve ser facilmente removível, não necessitar trocas frequentes, ter boa relação custo/benefício, manter a área cicatricial com umidade ideal e as áreas periféricas secas e protegidas, ser facilmente aplicável e adaptável (conformar-se às diversas partes do corpo) (Dealey, 2001).

Deve-se considerar que a utilização de recursos para otimizar a cicatrização e reparação tecidual é um processo multifatorial e de caráter multidisciplinar (Dantas, 2003), que precisa levar em conta os seguintes parâmetros: o paciente (saber qual o melhor tratamento), os profissionais de saúde (o conhecimento do assunto e possibilidade de escolha do melhor tratamento), as instituições de saúde (públicas e privadas, que possuem recursos financeiros) e a indústria (que pesquisa, desenvolve e produz materiais e produtos para cicatrização, e espera ver seus produtos difundidos no mercado) (Mandelbaum *et al*, 2003).

1.5. O uso de óleos vegetais para cicatrização

Os estudos têm sido realizados para avaliar o potencial do uso de produtos naturais como princípio ativos de recursos para cicatrização. Entre estes, citam-se os trabalhos com dendezeiro (Sasidharan *et al*, 2012), água termal (Faga *et al*, 2011), jatyadi taila (Shailajan *et al*, 2011), óleo de pinha (Tumen *et al*, 2011), hortelã (Takayama *et al*, 2011) e babosa (Duansak *et al*, 2003).

Os trabalhos com óleo do farelo de arroz demonstram que este possui capacidade de aumentar a resposta imune de camundongos, como a proliferação de linfócitos B, e de citocinas como a IL-2 e o TNF- α , assim como a diminuição de IL-4 e IgE (Sierra *et al*, 2005). Certo estudo com orizanol isolado de óleo de farelo de arroz mostrou que este fitoquímico tem capacidade de aumentar a atividade imune celular e humoral, como a resposta de hipersensibilidade tardia, induzir a produção de anticorpos por linfócitos B e T e aumentar a hematopoese e a fagocitose induzida por macrófagos (Ghatak e Panchal, 2012). Outro estudo revela que o uso de compostos bioativos do óleo de farelo de arroz tem ação anti-envelhecimento, quando usado em formulações tópicas na pele de coelhos. O gel e creme formulados com os bioativos não apresentaram eritema nem edema local e melhoraram a hidratação, elasticidade, espessura e rugosidade da pele de voluntários humanos (Manosroi *et al*, 2012). Em 2002, de Paepe e colaboradores descreveram que o

uso de amido de arroz, tanto na água do banho, quanto em formulações sem lipídeos ou loção de banho de “água em óleo” levou a um aumento de 20% na capacidade de cura de pacientes com dermatite atópica, assim como melhorou as funções de barreira da pele (de Paepe *et al*, 2002). É relatado, também, que o óleo de farelo de arroz é fonte natural de esqualeno (um triterpeno intermediário na biossíntese do colesterol), o principal componente dos lipídeos polinsaturados da superfície da pele e apresenta vantagens para a pele como emoliente e antioxidante, assim como para hidratação e atividades antitumorais, com potencial uso em dermocosméticos (Huang *et al*, 2009). Outro estudo indica que o consumo de cerca de 18 gramas de leite modificado de farelo de arroz, por 5 semanas, promove a diminuição da concentração sérica de colesterol e também de colesterol LDL, em pacientes com diabetes do tipo 2 (Lai *et al*, 2012). Pesquisadores da Coréia do Sul relataram que dieta com arroz integral (presente em muitas bebidas e chás e comercializado como um tipo de “arroz integral germinado”), suprime o ganho de peso e o acúmulo de gordura no fígado e adipócitos epididimais. Além disso, melhora os perfis séricos de lipídeos, em parte por controlar a adipogênese por meio da redução de fatores transcricionais (Ho *et al*, 2012). Uma pesquisa com óleo de farelo de arroz associado a diacilglicerol, conduzida em Calcutá, indicou que o consumo deste óleo diminuiu significativamente o peso dos ratos e a quantidade de colesterol e triglicérides circulantes no plasma, indicando um possível uso para prevenção de obesidade e incidência de hipercolesterolemia (Dhara *et al*, 2012). Porém, há estudo que indica que lipídeos isolados de óleo de arroz refinado têm capacidade de causar úlcera duodenal em ratos (Jayaraj *et al*, 2000). O Quadro 1 abaixo resume os trabalhos citados no texto.

Desta forma, o óleo de arroz poderia ser útil para o tratamento tópico de feridas. O objetivo deste trabalho foi avaliar por aspectos clínicos e histológicos, o processo de cicatrização de feridas de ratos tratadas topicamente com óleo de arroz obtido por processo segundo patente BR 10 2012 008718 9, comparativamente com um controle e dosar, no tecido em cicatrização e no sangue, fatores que atuam na cicatrização.

Os resultados deste trabalho poderão ser úteis para a indústria farmacêutica e cosmeceutica brasileira ou internacional.

Autor	Produto	Ano	Modelo	Efeito
de Paepe	Amido de arroz	2002	Humano	Melhorou funções de barreira da pele e a cura de dermatites atópicas
Lai	Leite de farelo de arroz	2011	Humano	Diminui nível de colesterol
Ho	Arroz integral	2012	Camundongo	Suprime ganho de peso e o acúmulo de gordura no fígado, controlando a adipogênese
Jayaraj	Óleo de arroz refinado	2000	Rato	Pode causar úlcera duodenal
Sierra	Óleo de farelo de arroz	2005	Camundongo	Aumenta resposta imune ($\uparrow$ IL-2 e TNF- α)
Huang	Óleo de farelo de arroz	2009	<i>In vitro</i>	Emoliente e antioxidante
Dhara	Óleo de farelo de arroz	2012	Rato	Diminui o peso e nível de colesterol
Manosroi	Óleo de farelo de arroz	2012	Humano	Ação antiidade, melhorou hidratação, elasticidade, espessura e rugosidade
Ghatak	Orizanol	2012	Rato	Aumenta atividade imune celular e humoral, hematopoiese e fagocitose

Quadro 1: Estudos realizados com uso de arroz e derivados.

2. Justificativa e hipóteses

A justificativa deste trabalho foi avaliar a utilidade de desenvolver-se medicamento para uso tópico a base de óleo de arroz com capacidade de cicatrização de úlceras cutâneas, com eficácia comprovada e possibilidade de largo emprego no sistema de saúde pública.

Como hipóteses levantadas, os óleos vegetais são benéficos para a cicatrização e o óleo de arroz pode acelerar o processo cicatricial, assim como o uso tópico deste óleo pode levar à ação sistêmica.

3. Objetivos

3.1. Geral

Avaliar a efetividade do óleo de arroz obtido por processo segundo Patente BR 10 2012 008718 9 na cicatrização de úlceras cutâneas, com possibilidade de largo emprego no sistema de saúde pública.

3.2. Específicos

1. Avaliar através de aspectos clínicos e histológicos a ação do óleo de arroz obtido por processo segundo Patente BR 10 2012 008718 9 na cicatrização de úlceras cutâneas produzidas em ratos (*Rattus norvegicus albinus*),

2. Dosar no tecido lesado e no sangue fatores envolvidos com a cicatrização e fatores envolvidos na gênese de outras doenças, como, por exemplo, a psoríase, a saber: leptina, IL-2, IL-4, IL-6 e IGF-1 (pró-cicatriciais), adiponectina, IL-12, IFN- α e IFN- γ (anti-cicatriciais) e TNF- α (efeito variável).

4. Materiais e métodos

4.1 Experimentação animal

4.1.1 Manipulação dos animais

Foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciências Animais de Laboratório (CEMIB) da Unicamp, 45 fêmeas de ratos isogênicos da espécie *Rattus norvegicus albinus* linhagem NTacUnib:SD (Sprague Dawley), com idade média de 7 semanas e massa entre 220 a 270g.

Os animais foram alojados e identificados em gaiolas individuais fabricadas em polipropileno e aço galvanizado, adequadas para o tamanho da espécie (0,2 x 0,36 x 0,12m), com cama de maravalha, água e ração específica fornecidos à vontade do animal e substituídos diariamente. A Figura 1 mostra em detalhe uma gaiola com o animal acomodado.



Figura 1: Gaiola com o animal, água, alimento e cama de maravalha

As gaiolas com os animais foram acondicionadas em câmaras da marca Alesco, com filtragem do ar na entrada e saída, temperatura constante de 22⁰C e iluminação artificial, com fotoperíodos alternados entre claro e escuro de 12 horas/dia. Cada câmara acomoda 30 animais em suas seis prateleiras, conforme mostra a Figura 2.



Figura 2.a) Câmara com prateleiras para gaiolas, b) controles de temperatura, fotoperíodo, alarmes e c) filtragem do ar.

Após um período de cinco dias para adaptação nas gaiolas dentro das condições da câmara, os animais eram anestesiados para aplicação dos tratamentos pré-definidos.

4.1.2 Experimentos com os animais

O experimento foi autorizado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Campinas, de acordo com a Lei Federal 6.638.

Após o período de adaptação nas gaiolas 45 animais foram preparados para a realização dos ferimentos e passar a receber os tratamentos diários com os diferentes tipos de óleo, separados em grupos de 15 animais conforme indica a tabela abaixo. Em cada grupo, cinco animais foram sorteados para serem sacrificados nos dias 2, 4 e 10 após a aplicação do tratamento.

Respeitando-se o sentido da cabeça para a cauda, em todos os animais foram feitas quatro feridas do lado esquerdo, designadas como "A", "B", "C" e "D" e as do lado direito outras quatro designadas "E", "F", "G" e "H". O lado esquerdo recebeu sempre o produto de "Controle" ou "Testemunha" e o direito o "Tratamento" a ser estudado.

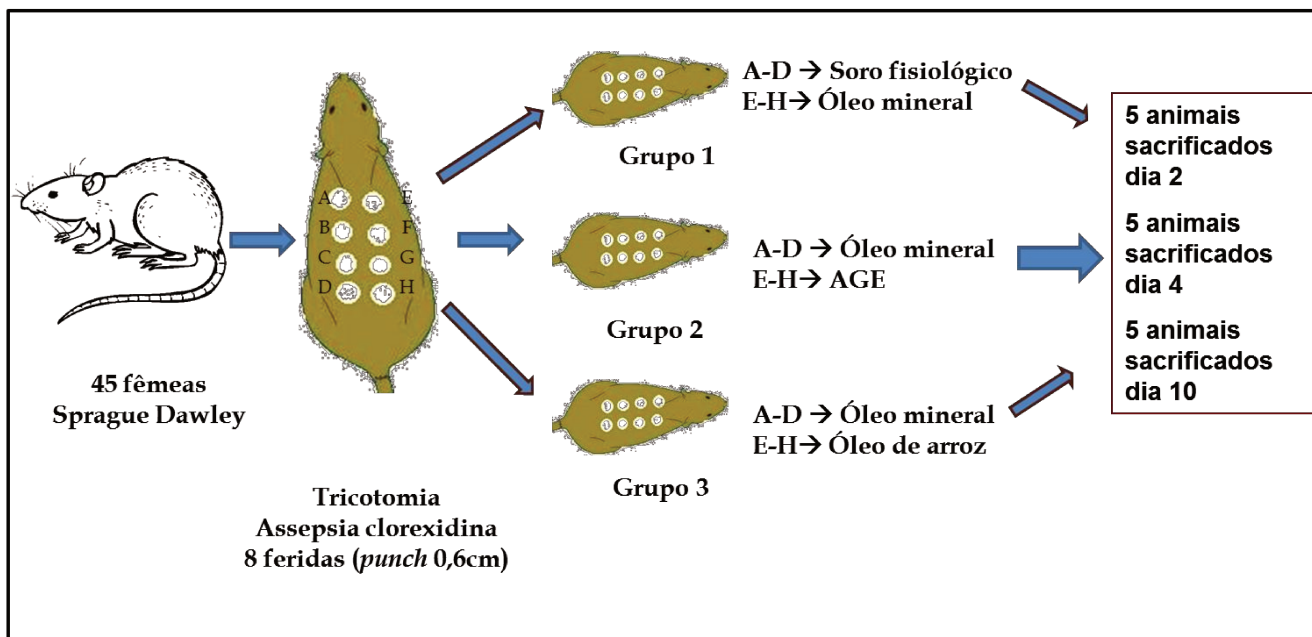
A tabela 1 mostra a distribuição das feridas e dos tratamentos recebidos para cada grupo de animais.

Tabela 1. Tratamentos aplicados em cada grupo de estudo.

	Lado Esquerdo (Controle)	Lado Direito (Tratamento)
Grupo 1	Curativo oclusivo com gaze estéril	Óleo mineral
Grupo 2	Óleo mineral	Ácidos Graxos Essenciais
Grupo 3	Óleo mineral	Óleo de arroz

O óleo de arroz utilizado neste projeto foi cedido pela empresa HT Nutri (RS, Brasil), o óleo mineral utilizado foi Óleo Mineral Frasco 100 mL Rioquímica e óleo Dersani, com ácidos graxos essenciais (AGE, triglicérides de cadeia média 40% e óleo de girassol 60%).

Logo após o recebimento do óleo de arroz, o mesmo foi submetido a testes microbiológicos para avaliação da presença de microorganismos. Foi realizada cultura em ágar sangue, ágar chocolate, Saboraud, e meio *Brain Heart Infusion* (BHI). Em todos os testes realizados, não foi verificado crescimento microbiano até sete dias após inoculação. O Quadro 2 abaixo esquematiza a experimentação animal, a divisão de grupos e seleção dos animais a serem sacrificados.



Quadro 2: Esquema da experimentação animal, divisão dos grupos e sacrifícios.

4.1.3 Preparo do animal

Para receber o tratamento especificado e evitar estresse, cada animal foi conduzido para sala separada dos demais onde foi anestesiado com quetamina 50mg.kg^{-1} , xilazina $7,0\text{ mg.kg}^{-1}$ e diazepam $2,0\text{ mg.kg}^{-1}$. Após a anestesia as regiões paravertebrais e escapulares foram completamente tricotomizadas e foi feita desinfecção com uma solução de 2% de digliconato de clorexidina para assepsia da área onde seriam produzidas as feridas.

A Figura 3 mostra detalhe da aplicação do anestésico no abdome do animal e tricotomia das regiões paravertebrais e escapulares e a Figura 4 mostra o animal antes e após anestesia.

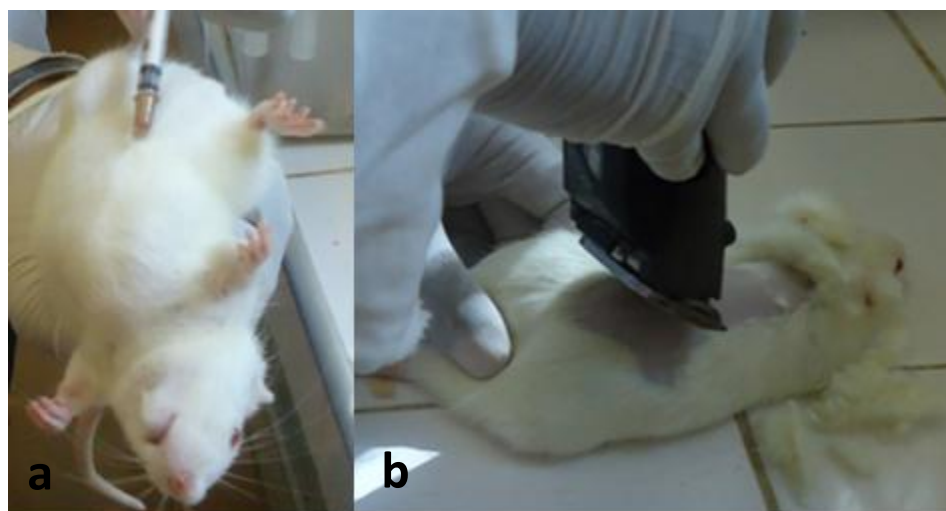


Figura 3. a)Aplicação de anestésico e b) tricotomia dos animais.

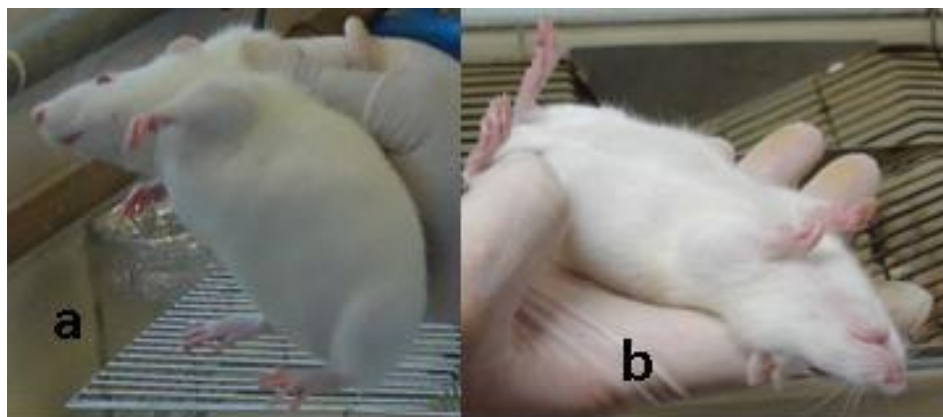


Figura 4. Manipulação do animal a) antes da anestesia e b) após a anestesia.

Na área tricotomizada foram feitas 4 feridas do lado direito e outras 4 do lado esquerdo, cerca de 1 cm ao longo da coluna vertebral. Para uma melhor homogeneidade dos ferimentos tanto entre os oito ferimentos de cada animal como entre todos os animais estudados, utilizou-se um bisturi descartável com 6mm de diâmetro para corte na forma de disco em toda a profundidade da pele. O fragmento cutâneo em forma de disco era levantado por pinça e excisado com tesoura.

A Figura 5 detalha o procedimento de formação dos ferimentos nos animais para receberem os tratamentos específicos.

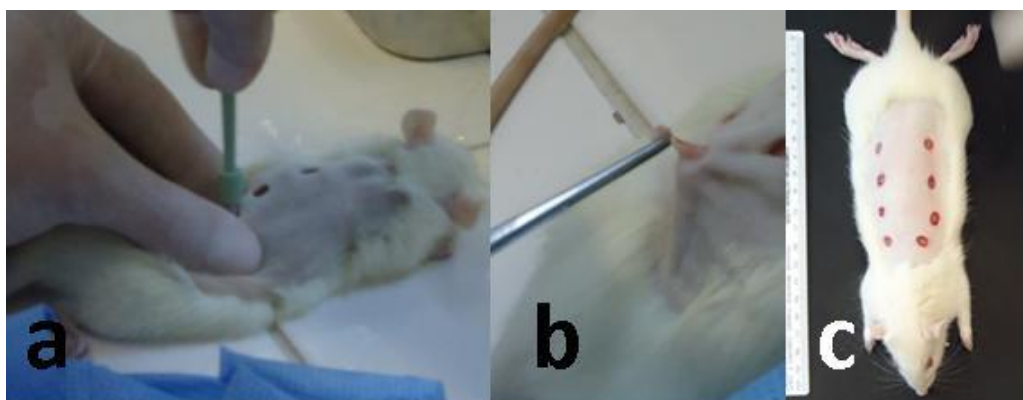


Figura 5. Procedimento de ferimento dos animais. a) Corte circular com bisturi descartável, b) excisão do disco de pele até a fáscia e c) animal pronto para receber os tratamentos.

4.1.4 Tratamento no animal

Imediatamente após os ferimentos serem produzidos, o animal recebeu a primeira aplicação do produto específico para cada ferida como estipulado na Tabela 1, que foi coberta com uma gaze para cada lado do animal a fim de se evitar contaminação dos diferentes óleos aplicados no mesmo animal. A gaze foi presa por esparadrapo do tipo *micropore* e reforçada com esparadrapo externo. Diariamente, os ferimentos foram limpos com soro fisiológico, os tratamentos repetidos com os respectivos óleos e os curativos substituídos até o dia determinado para o sacrifício. Para os curativos diários os animais não foram anestesiados para que não houvesse interferência no metabolismo hepático, uma vez que todos os animais aceitaram todos os procedimentos sem agressividade e foram tolerantes à manipulação. O dorso e cada ferimento de cada animal foram fotografados com câmara e lupa digital, respectivamente, para avaliação posterior, realizada por dois pesquisadores, um biólogo e um dermatologista, considerando os critérios de quantidade de área cicatrizada, profundidade da lesão e velocidade de cicatrização. A Figura 6 mostra a aplicação de um tratamento, e o curativo em um animal.

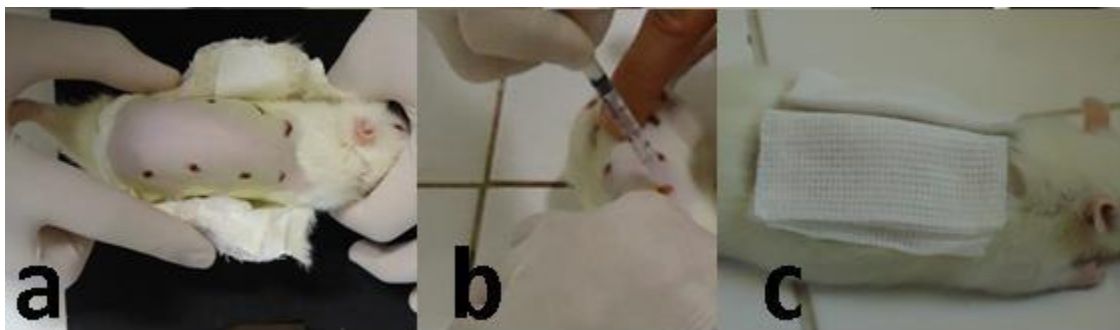


Figura 6. Procedimentos de troca de curativo. a) remoção do curativo antigo, b), aplicação de tratamentos diários nos animais e c) oclusão com gazes.

4.1.5 Sacrifício dos animais e coleta de material para análises

Após sorteio para sacrifício nos dias 2, 4 ou 10 os animais em que haviam sido produzidos os ferimentos foram anestesiados com tiopental ($85,0 \text{ mg.kg}^{-1}$), fotograficamente documentados e decapitados com guilhotina. Imediatamente após, o sangue foi coletado para as dosagens das substâncias relacionadas com inflamação pela técnica Elisa (Figura 7).

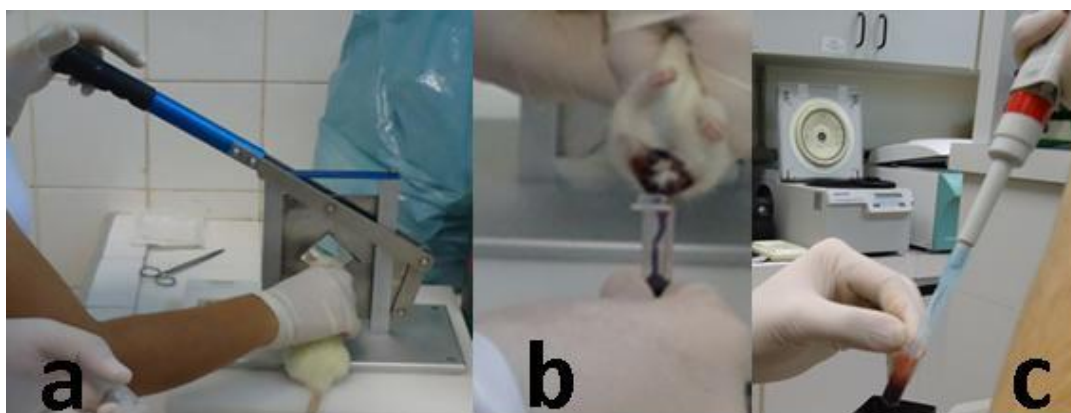


Figura 7. a) Decapitação do animal, b) coleta de sangue e c) centrifugação e coleta de soro.

A pele das áreas tricotomizadas da região dorsal foram excisadas até a fáscia (Figura 8), separando-se as metades proximais, com duas feridas de cada lado para fixação em formal a 10% para o preparo das lâminas para avaliação histopatológica.

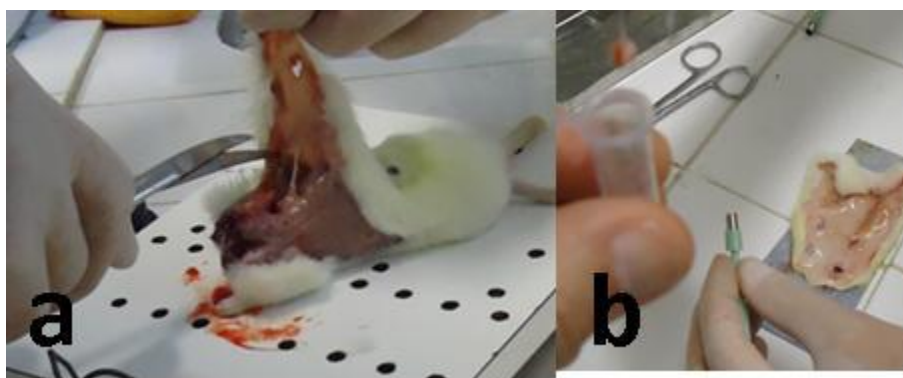


Figura 8. a) Excisão da área tricotomizada e b) retirada de fragmento, do ferimento para análise.

Novas biopsias com lâminas circulares de mesmo diâmetro foram feitas nos quatro pontos das biopsias anteriores na porção caudal da pele excisada. Cada um dos quatro fragmentos de derme ou pele retirados foram imediatamente identificados e colocados em recipiente contendo nitrogênio líquido sendo crioconservados a -80°C no final do período do experimento até o preparo para as dosagens teciduais (PCR *real time*) das substâncias associadas à inflamação (Figura 9). Na Figura 9 são apresentados os aspectos das peças excisadas nos diferentes dias do sacrifício.



Figura 9. Aspecto das regiões feridas e tratadas, excisadas dos animais abatidos aos a) 2 , b) 4 e c) 10 dias.

4.2 Histologia

4.2.1. Preparo de lâminas para análise histológica

Os fragmentos obtidos da pele com as feridas da porção proximal foram conservados em formol a 10%, em frascos individuais, devidamente identificados, para a elaboração das lâminas para a análise histológica. O fragmento de pele abrangendo toda a ferida, obtido por uma seção longitudinal, foi processado, em autotécnico, para exame histológico, incluído em parafina, cortado em micrótomo rotativo e corado pelo método de hematoxilina e eosina (HE). A Figura 10 mostra o procedimento macroscópico, para a

obtenção de cortes com 3mm de espessura, que foram acondicionados em cassetes perfurados de plástico e levados ao histotécnico para desidratação, diafanização e embebição em parafina.

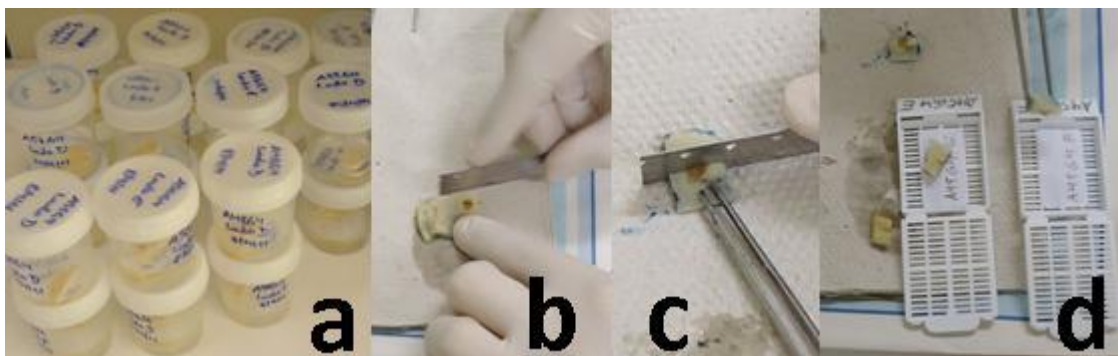


Figura 10. Montagem das lâminas para análise histológica a partir dos a) frascos identificados com os fragmentos sendo fixados em formol; b) e c) corte no sentido longitudinal do ferimento para inclusão; d) fragmentos acondicionados em cassetes plásticos, devidamente identificados, para encaminhamento ao histotécnico.

4.2.2. Análise histológica

Os cortes histológicos foram analisados de forma qualitativa e quantitativa, de forma cega, isto é, sem que o avaliador, médico patologista, conhecesse, no momento da leitura, a que grupo pertenciam os espécimes.

Para a avaliação subjetiva (qualitativa e semi-quantitativa) consideraram-se os seguintes aspectos: espessura/natureza da crosta e presença/espessura/extensão do epitélio regenerativo.

No tecido que preenchia a ferida (leito ulceroso), contendo células, vasos, fibrina, colágeno jovem e colágeno maduro, foram estimados: o edema, grau de congestão, a quantidade e qualidade das células inflamatórias, a quantidade das células estromatosas, dos vasos neoformados e das fibras colágenas maduras. A cavidade formada no

experimento foi avaliada considerando-se a porcentagem de preenchimento, relativamente à pele normal adjacente.

Após avaliar os resultados da análise qualitativa, foram contadas as células da derme (em reparação), para comparação entre os grupos. A avaliação objetiva (morfométrica) da celularidade dérmica (Fig. 11) foi realizada nas amostras de pele dos animais do dia 10, utilizando-se um microscópio Olympus, com graticula morfométrica com 30 cicloides, fixada na ocular. Todas as células (inflamatórias mononucleares, endoteliais ou estromatosas, a saber, fibroblastos, miofibroblastos e dendríticas) que tocavam cada um dos cicloides eram contadas, sendo o procedimento repetido em 10 campos aleatórios de grande aumento, em cada espécime.

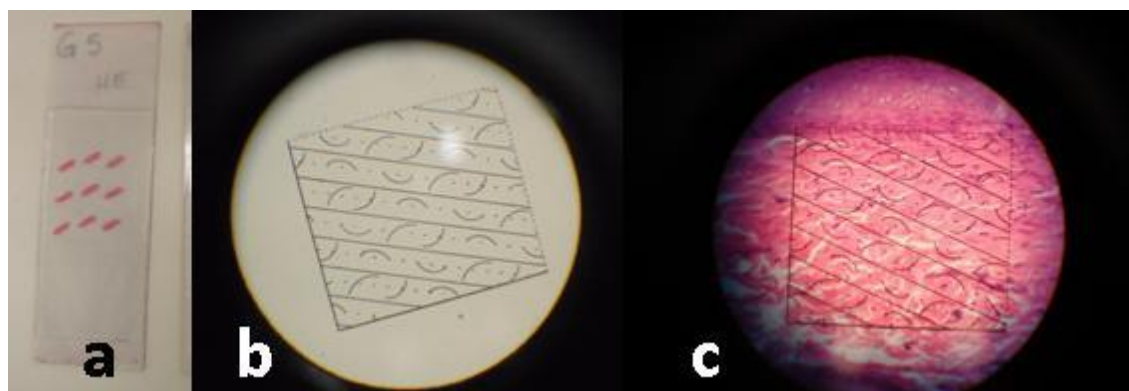


Figura 11. Análise morfométrica da celularidade dérmica no leito da ferida operatória. a) Lâmina contendo três cortes seriados de fragmento da lesão, b) graticula de cicloides empregada para análise morfométrica e c) um dos dez campos histológicos analisados pela graticula.

4.3. Análise das citocinas inflamatórias no tecido cicatricial

4.3.1 Extração de RNA

Foi feita extração de RNA total das amostras de pele congeladas à -80°C , segundo método do reagente Qiazol (Qiagen, USA). Para a produção do cDNA, utilizou-se o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA), sendo a concentração final do cDNA de $3,0\text{ }\mu\text{g}$. Este cDNA foi diluído segundo a concentração

necessária para a amplificação eficiente de cada gene, sendo esta eficiência verificada segundo método descrito abaixo.

4.3.2. PCR quantitativo (qPCR) – PCR *real time*

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™(AppliedBiosystems) que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Foram utilizados kits TaqMan™*assays* (AppliedBiosystems) para todos os genes, a saber: leptina (Rn00565158_m1), IL-2 (Rn00587673_m1), IL-4 (Rn01456866_m1), IL-6 (Rn01410330_m1), IGF-1 (Rn00710306_m1), adiponectina (Rn00595250_m1), IL-12 (Rn00575112_m1), IFN- α (Rn01400027_g1), IFN- γ (Rn00594078_m1), e TNF- α (Rn00562055_m1).

O gene *GAPDRat* (TaqMan™ - AppliedBiosystems), Partnumber 4352338E, foi escolhido como controle endógeno da reação. Ele serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. A sonda *GAPD* está marcada com o fluoróforo VIC®, enquanto os *primers* para os alvos estão marcados com o fluoróforo FAM®.

Antes de se iniciarem os experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, realizou-se a validação do sistema gene alvo, por exemplo, adiponectina e leptina, com o controle endógeno *GAPD rat*. Verificou-se que as eficiências de amplificação dos genes foram próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse (Morari, 2009).

4.3.3. Validação da eficiência dos genes de interesse

A validação consistiu na amplificação, tanto com os *primers* dos genes de interesse quanto com o do controle endógeno, dos cDNAs de triplicatas de concentrações diferentes (diluições seriadas) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, foi

construída uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo Ct [*ThresholdCycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (*Threshold*), o qual é definido arbitrariamente]. Nessa curva, foram obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência do um sistema foi calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Para exemplificar, a placa de validação dos genes adiponectina, leptina e *GAPD*, foram feitas triplicatas de uma amostra de cDNA de hepatócito de rato em 7 concentrações diferentes (diluições seriadas de 5x).

Após o cálculo das eficiências de amplificação de cada gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual tem por finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é eficiente. Para a construção do gráfico, foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X e a diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse para cada concentração no eixo Y. A seguir, obteve-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possui uma equação de reta que permite verificar o valor da inclinação desta reta. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos Cts do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiverem mais próximos à linha de tendência são considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações).

Também para exemplificar, a concentração de amostra validada como eficiente para os genes adiponectina, leptina e *GAPD* foi de 40,0 ng de cDNA (Morari, 2009).

Para a quantificação relativa dos genes em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix* (AppliedBiosystmes, Foster City, CA, USA) 2x, 0,625µL da solução de *primers* e sonda, 1,625µL de água e 4,0µL de cDNA (40ng de cDNA), sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0 µl de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram:

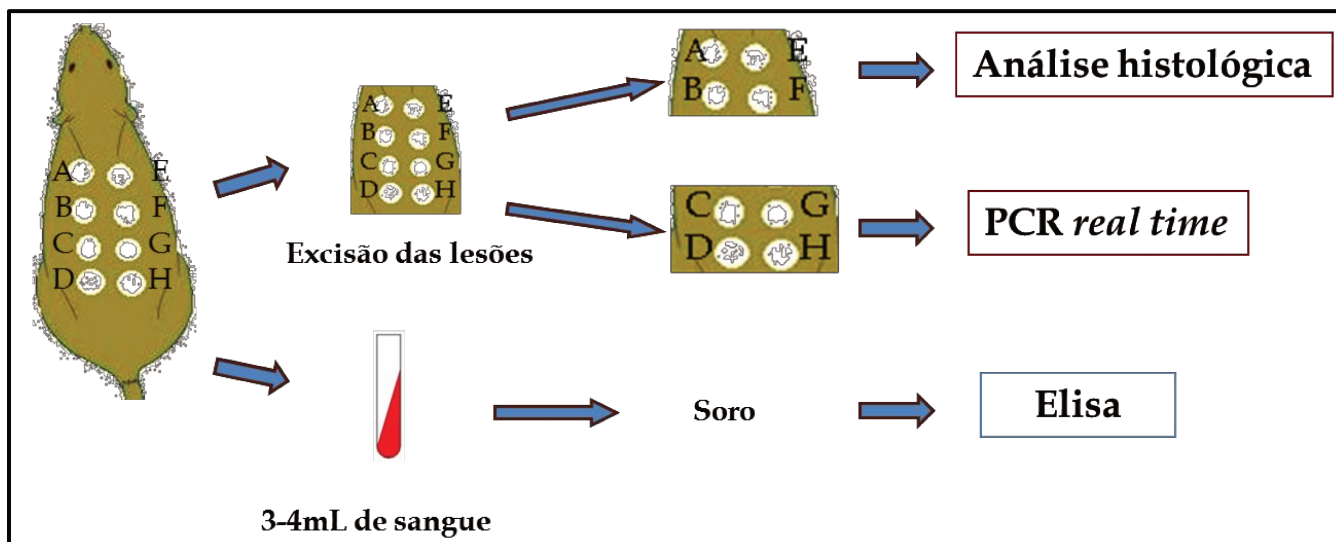
50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA).

4.4. Elisa (análise de citocinas inflamatórias no soro)

Este ensaio empregou a técnica de imunoensaio sanduíche quantitativo. Um anticorpo monoclonal específico para a substância alvo foi pré-adicionado em uma microplaca ainda na fábrica. As amostras, controles e padrões foram pipetados para os poços e se a substância em estudo estivesse presente seria ligada pelo anticorpo imobilizado. Depois de lavar as substâncias não ligadas, um anticorpo policlonal com enzima ligada específica para a substância foi adicionado aos poços. Após uma lavagem para remover qualquer reagente anticorpo-enzima não ligado, uma solução de substrato foi adicionada aos poços. A enzima de reação produz um produto azul que fica amarelo quando a “solução de parada” foi adicionada. A intensidade de medição de cor está em proporção com a quantidade de substância alvo ligado na etapa inicial. Os valores da amostra foram então lidos a partir da curva padrão.

Para as reações realizadas neste projeto, foram usados kits comerciais de Elisa Quantikine, da R&D Systems (Minneapolis, EUA) para as substâncias IL-2, IL-4, IL-12, IL-6, IGF-1, IFN- α , IFN- γ e TNF- α ; para as substâncias leptina e adiponectina foram usados kits comerciais fornecidos pela empresa Millipore (St. Charles, Missouri, EUA).

As placas dos 10 kits foram analisadas no leitor de microplaca BioRad 680, BioRadLaboratories (Hercules, CA, EUA), nos comprimentos de onda de 490 e 570nm, conforme recomendação dos fabricantes. O Quadro 3 abaixo esquematiza o sacrifício e coleta de amostras dos animais para as diferentes análises.



Quadro 3: Esquema de coleta de amostras dos animais sacrificados.

4.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas para a contagem das células, testes de Elisa e PCR *real time* foram feitas com o software R Development Core Team (R Foundation for Statistical Computing, 2012). As análises estatísticas para os experimentos acima citados seguiram as seguintes etapas: em primeiro lugar foram analisadas as diferenças entre os grupos 1, 2 e 3. Para isso aplicou-se a análise de variâncias (ANOVA), utilizando um nível de significância de 5%.

Para a utilização da ANOVA é necessário que os dados obedeçam as seguintes pressuposições:

- normalidade dos resíduos do modelo;
- homogeneidade de variâncias entre os tratamentos;
- aditividade entre os efeitos.

Para a avaliação da normalidade foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk, utilizando o nível de significância de 5%; a avaliação da homogeneidade de variâncias foi avaliada com

o teste de Bartlett também a 5% de significância e a aditividade entre os efeitos é garantida na implantação do experimento.

Para os dados que não obedeceram a essas pressuposições, foram realizados os seguintes procedimentos:

- avaliação visual de *outliers* (dados atípicos), ou
- transformação de Box-Cox.

Na avaliação de dados atípicos, utilizou-se gráfico de dispersão para a identificação de possíveis *outliers*. Em alguns casos apenas a retirada do *outlier* já era suficiente para alcançar a normalidade e a homogeneidade de variâncias. Quando essa retirada não colocava os dados dentro das pressuposições da ANAVA, então aplicou-se a transformação de Box-Cox.

Essa transformação é baseada num gráfico chamado de gráfico de verossimilhança. Este gráfico mostra que o máximo da sua curva indica um valor lambda (λ), o qual é utilizado na equação a seguir, para a transformação dos dados.

$$x = \begin{cases} \frac{y^\lambda - 1}{\lambda}, & \text{se } \lambda \neq 0 \\ \log(y), & \text{se } \lambda = 0. \end{cases}$$

Designa-se valor de λ como o valor máximo da curva de verossimilhança e representa o valor que nos dará a máxima probabilidade de normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias.

Em seguida foram analisadas as diferenças dentro de cada grupo e para isso foi utilizado o teste de médias t de Student, também a 5% de significância. Na avaliação das diferenças entre os tratamentos de cada grupo comparando com o lado controle do grupo 1 (soro fisiológico) nos animais também foi utilizado o teste de médias t de Student.

Já nas análises dos resultados dos testes de Elisa e PCR *real time*, nas situações em que não foi possível atingir normalidade e homogeneidade utilizando os dois métodos mencionados anteriormente, optou-se pela aplicação do teste de médias t de Student, pois esse teste não exige as pressuposições da ANAVA.

5. Resultados

5.1. Avaliação Clínica

A avaliação visual feita durante a manipulação diária de cada um dos animais, para renovação do tratamento, registro fotográfico e troca de curativos, indicou que no grupo 1 houve cicatrização mais rápida no lado tratado com óleo mineral quando comparado com o lado em que só foi usado soro fisiológico e uma melhora comparativamente significativa dos animais do grupo 3, tratados com óleo de arroz. A partir do terceiro dia podia-se observar uma cicatrização mais efetiva dos ferimentos neste grupo. Na Figura 12 pode-se observar um exemplo do aspecto dos ferimentos no quarto dia de tratamento.



Figura 12. Aspecto dos ferimentos do lado submetido aos tratamentos durante quatro dias.

5.2. Avaliação histológica

5.2.1. Avaliação histológica subjetiva

O exame histológico subjetivo dos fragmentos retirados da ferida produzida no experimento mostrou:

No segundo dia após o ferimento:

A ferida achava-se coberta por exsudato fibrino-leucocitário. A reepitelização havia se iniciado, porém de forma incipiente, em todos os animais. Os vasos apresentavam-se muito congestionados, ou seja, dilatados e cheios de sangue. Começava a ser produzido um tecido colágeno dérmico bem imaturo (jovem), pouco celular, com grande quantidade de

substância fundamental basófila (Fig. 13). Em alguns animais, o processo já estava mais avançado, observando-se maior extensão, no leito da ferida, com tecido colágeno imaturo e aumento da celularidade (Fig. 14).

No quarto dia após o ferimento:

A reepitelização já estava bem avançada em vários dos animais. Comparando-se com os achados do 2º dia após o ferimento, observou-se um significativo aumento da celularidade, mais intensa em alguns. Tratava-se do tecido de granulação, composto por células endoteliais e do tecido conjuntivo, produtoras de colágeno (fibroblastos e miofibroblastos). Fibras colágenas mais espessas já podiam ser vistas de forma evidente, mas não em todos os animais. Em alguns animais ainda se observava tecido colágeno imaturo e poucas células estromatosas jovens (Fig. 15). Uma pequena parte da cavidade que foi formada no experimento, já se encontrava preenchida. O tecido que preenchia a ferida continha células inflamatórias, endoteliais e do tecido conjuntivo, fibrina, colágeno jovem e colágeno maduro em proporção variada.

No décimo dia após o ferimento:

A ferida produzida já apresentava reepitelização completa, na grande maioria dos animais. Poucos espécimes ainda apresentavam colágeno jovem na base da lesão, que ainda não havia sido substituído pelo maduro. Uma boa parte da cavidade formada no experimento já se encontrava preenchida; contudo, a área afetada ainda estava deprimida, relativamente à pele normal adjacente (Fig. 16). O tecido que estava preenchendo a ferida operatória apresentava-se mais celular em alguns espécimes e menos em outros, em proporção inversa à do número de fibras colágenas maduras (Fig. 17).

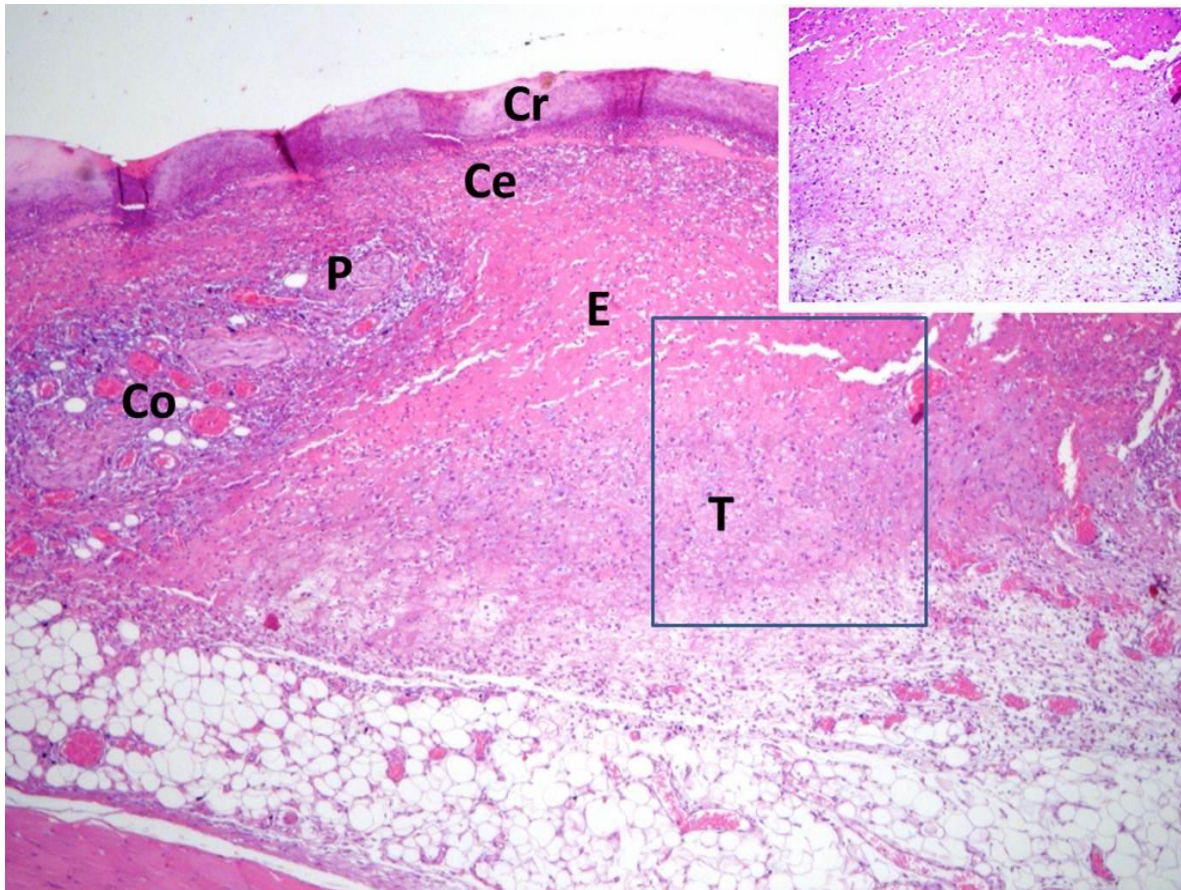


Figura 13. Histologia - segundo dia após o ferimento

Legenda da Figura 13:

Cr: crosta fibrino-leucocitária; E: exsudato fibrinoso, restos celulares; Ce: células inflamatórias da fase aguda; P: proliferação celular incipiente (células endoteliais e estromatosas); Co: congestão vascular; T: tecido conjuntivo jovem (*inset*). Aumento original x40 e x100 no *inset*.

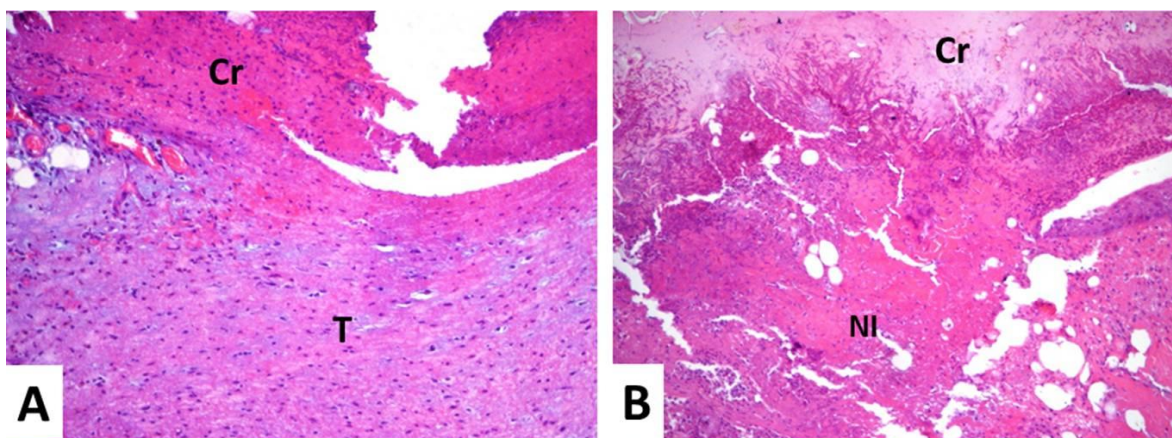


Figura 14. Histologia - segundo dia após o ferimento: processos em fases distintas de evolução.

Legenda da Figura 14: A: processo cicatricial mais adiantado, com tecido colágeno jovem na base da úlcera; B: processo cicatricial mais atrasado, com tecido necrótico-inflamatório (NI) na base da úlcera. Cr: crosta fibrino-leucocitária; T: tecido conjuntivo jovem. Aumento original x100.

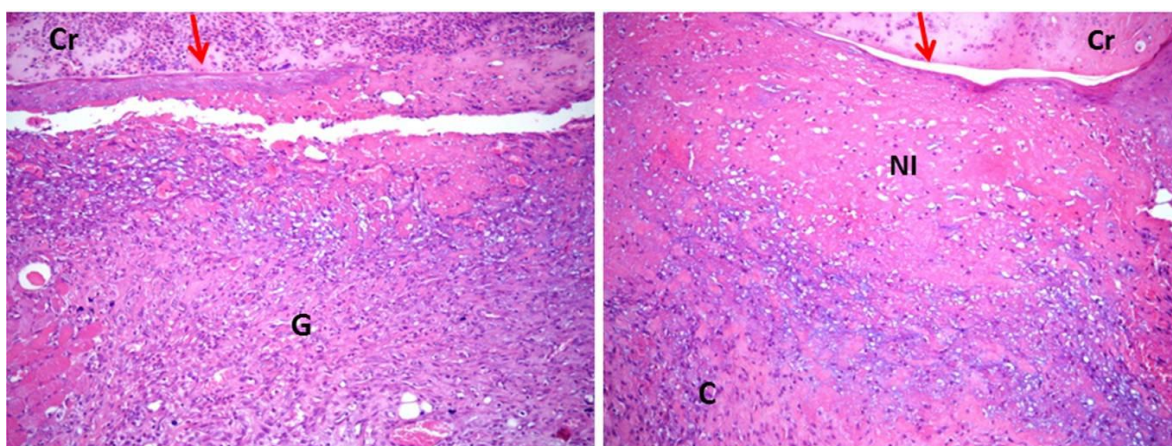


Figura 15. Histologia - quarto dia após o ferimento: processos em fases distintas de evolução

Legenda da Figura 15: A: processo cicatricial mais adiantado, com tecido de granulação bem celular (G); B: processo cicatricial mais atrasado, apenas com tecido necrótico-inflamatório na base da úlcera (NI) e leve aumento de celularidade na profundidade (C). Cr: crosta fibrino-leucocitária; Ep: epiderme jovem de reepitelização. A seta aponta a epiderme jovem de reepitelização. Aumento original x100.

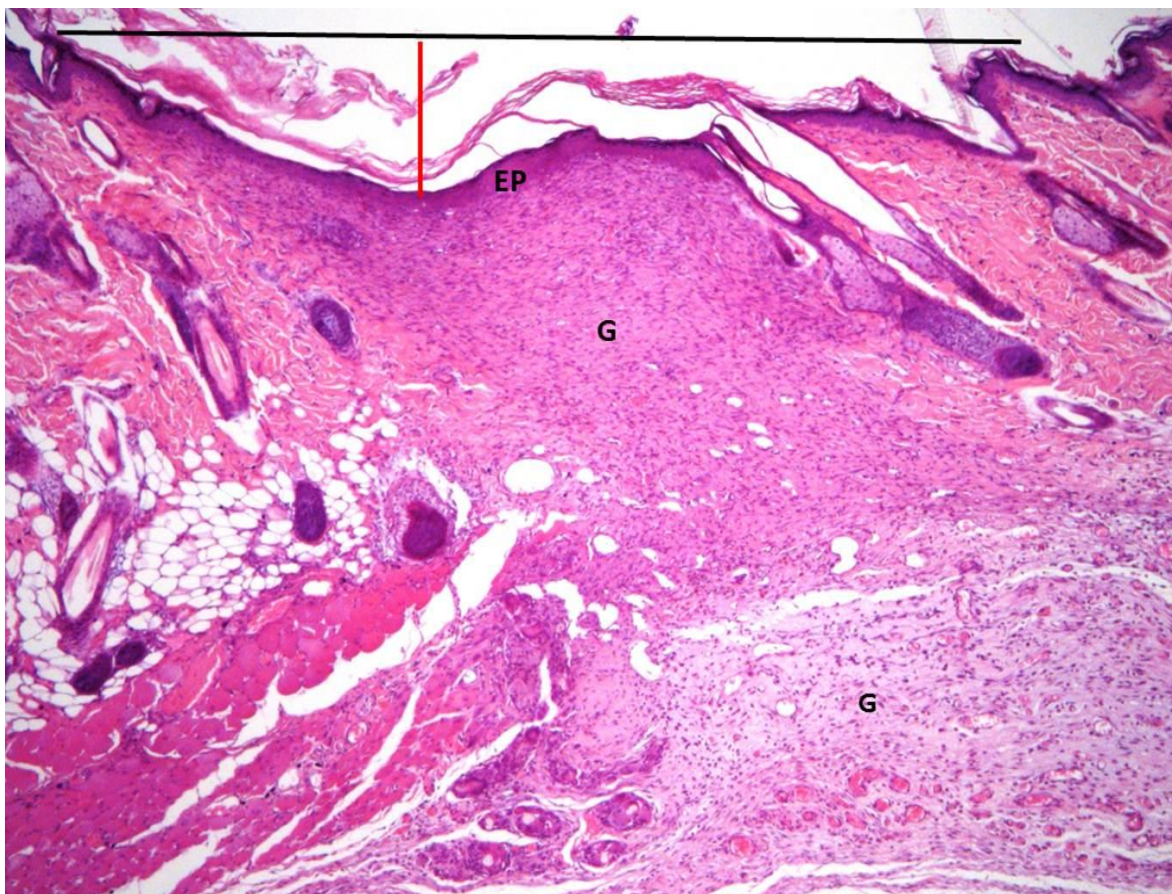


Figura 16. Histologia - décimo dia após o ferimento (aumento x40).

Legenda da Figura 16: em relação à superfície cutânea adjacente, há pouco espaço a ser preenchido (linha vertical vermelha). EP: epiderme jovem que cobre toda a extensão da ferida; G: tecido de granulação já bem colagenizado na superfície e mais frouxo e edematoso na profundidade. Aumento original x40.

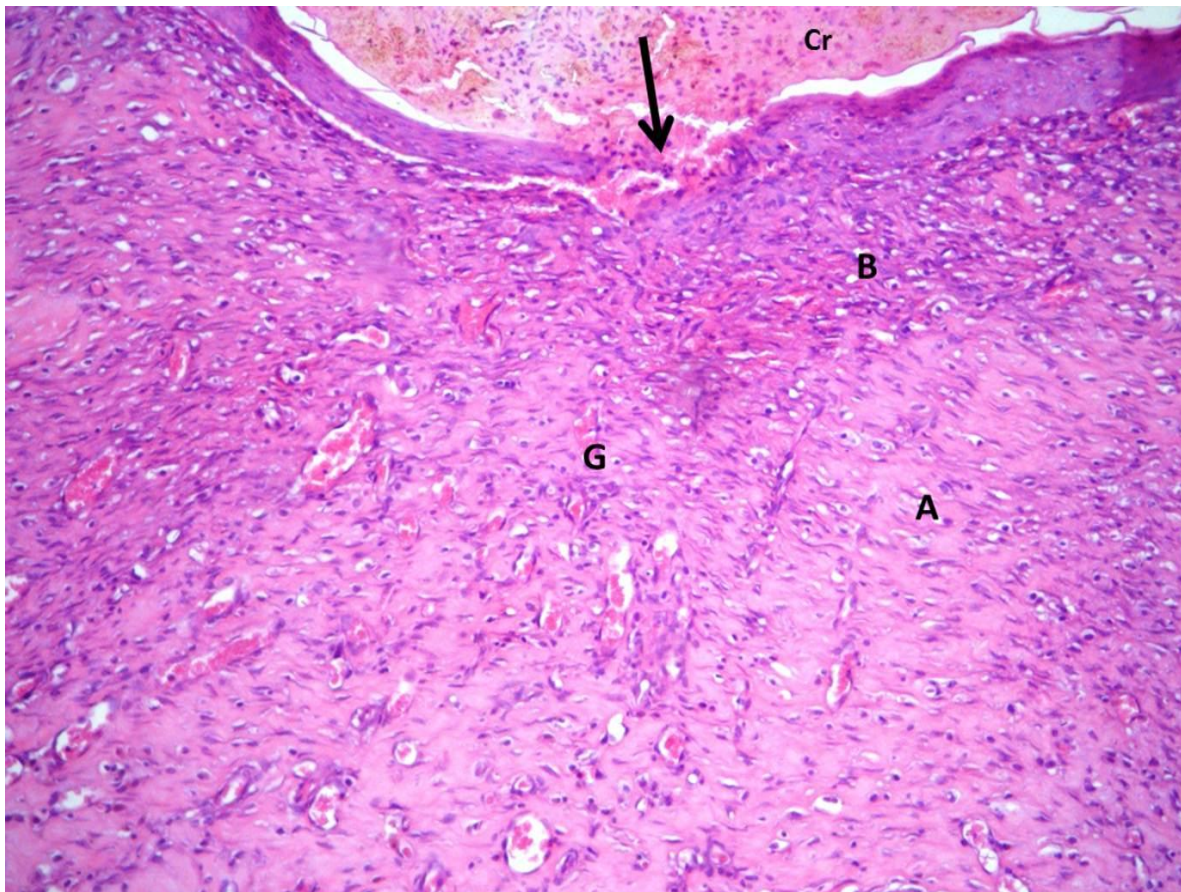


Figura 17. Histologia - décimo dia após o ferimento (aumento x100).

Legenda da Figura 17: Há apenas diminuta área a ser reepitelizada (seta). A crosta (Cr) ainda não se desprendeu. Tecido de granulação (G) já bem collagenizado na profundidade (A), com área mais celular e menos collagenizada na superfície(B). Aumento original x100.

Embora não houvesse diferença estatística, observou-se que:

No segundo dia do experimento, já havia maior celularidade e mais colágeno nos animais tratados com óleo de arroz.

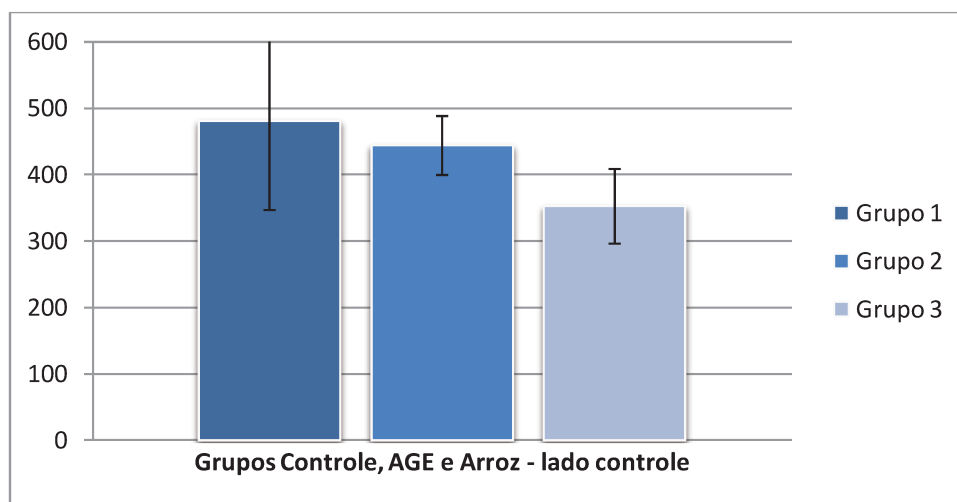
No dia 4 notou-se reepitelização mais acentuada nos animais tratados com o óleo de arroz, seguida pelos animais tratados com os AGE e, por último, com o óleo mineral. A

celularidade já era menor e a colagenização mais avançada, nos animais tratados com óleo de arroz e AGE, mas o preenchimento era maior nos animais do grupo controle.

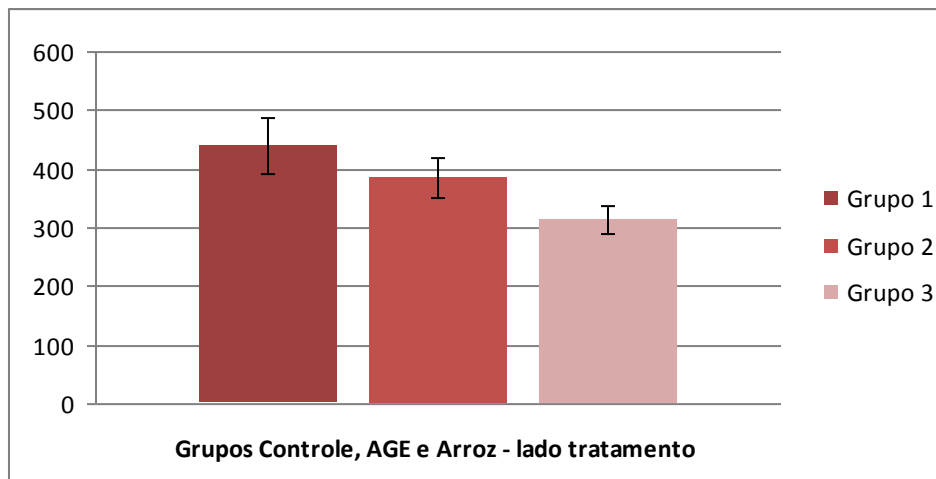
No dia 10, o preenchimento era significativamente maior nos animais tratados com óleo de arroz.

5.2.2. Avaliação histológica objetiva

A análise objetiva foi baseada na contagem das células, conforme descrito anteriormente. Os resultados podem ser visualizados nos quadros abaixo:



Quadro 4: Gráfico referente à celularidade no lado controle dos três grupos



Quadro 5: Gráfico referente à celularidade no lado tratado nos três grupos

A celularidade era menor nos lados tratados com óleo de arroz e com AGE, sugerindo uma cicatrização mais adiantada, nestes animais.

5.2.2.1. Análise estatística da contagem de células

A análise foi feita para investigar a existência, ou não, de diferenças entre os três grupos em estudo (1, 2 e 3) e também dentro de cada grupo avaliando possíveis diferenças entre o tratamento e o controle dentro dos grupos.

- Estudo da diferença entre os grupos

Para este estudo foi considerada a diferença na quantidade de células entre o tratamento e o controle, ou seja, em cada um dos grupos foram computadas as diferenças, na quantidade de células contadas, entre controle e tratamento. Após a determinação desta diferença foi aplicada a análise de variância (ANAVA) nesses dados.

Tabela 2. Dados de ANAVA para estudo de diferença entre grupos

Analysis of Variance Table

Response: dif

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor(grupo)	2	1716	858.1	0.1561	0.8573
Residuals	11	60465	5496.8		

Portanto, não houve diferença significativa, na contagem de células, entre os três grupos em estudo ($p=0,8573$).

- Estudo comparativo dos resultados entre os animais do Grupo 1

Para a avaliação dentro do grupo 1 foi aplicado o teste de médias “t de Student”, utilizando o nível de significância igual a 0,05.

Tabela 3. Dados de teste T de Student para estudo de diferença dentro do G1

Teste t de Student

$t_c = 1,374$ $p\text{-valor} = 0,1315$

De acordo com o teste t de Student não houve diferença significativa entre controle e tratamento do grupo 1.

- Estudo da diferença dentro do grupo 2

Para a avaliação dentro do grupo 2 foi aplicado o teste de médias “t de Student”, utilizando o nível de significância igual a 0,05.

Tabela 4. Dados de teste T de Student para estudo de diferença dentro do G2

Teste t de Student

$t_c = -1,646$ $p\text{-valor} = 0,0803$

De acordo com o teste t de Student não houve diferença significativa entre controle e tratamento do grupo 2.

- Estudo da diferença dentro do grupo 3

Para a avaliação dentro do grupo 3 foi aplicado o teste de médias “t de Student”, utilizando o nível de significância igual a 0,05.

Tabela 5. Dados de teste T de Student para estudo de diferença dentro do G3

```
-----
Teste t de Student
tc = -1,3715      p-valor = 0,1210
-----
```

De acordo com o teste t de Student não houve diferença significativa entre controle e tratamento do grupo 3.

- Estudo da diferença entre o controle do grupo 1 e o tratamento do grupo 2

Para esta avaliação foi aplicado o teste de médias “t de Student”, utilizando o nível de significância igual a 0,05.

Tabela 6. Dados de teste T de Student para estudo de diferença entre controle do G1 e tratamento do G2

```
-----
Teste t de Student
tc = 1,812      p-valor = 0,05997
-----
```

De acordo com o teste t de Student não houve diferença significativa entre o controle do grupo 1 e o tratamento do grupo 2, embora o p-valor esteja muito próximo de 0,05.

- Estudo da diferença entre o controle do grupo 1 e o tratamento do grupo 3

Para esta avaliação foi aplicado o teste de médias “t de Student”, utilizando o nível de significância igual a 0,05.

Tabela 7. Dados de teste T de Student para estudo de diferença entre controle do G1 e tratamento do G3

Teste t de Student
 $t_c = 2,74$ $p\text{-valor} = 0,02595$

De acordo com o teste t de Student houve diferença significativa entre o controle do grupo 1 e o tratamento do grupo 3.

5.3. Avaliação das citocinas inflamatórias no tecido cicatricial (PCR *real time*)

Todos os valores apresentados nas tabelas abaixo estão com os dados calculados de RQ, que é a quantificação relativa.

Os métodos para quantificação relativa da expressão gênica permitem avaliar diferenças no nível de expressão de um gene específico (alvo) entre as diferentes amostras. A produção de dados é expressa como uma alteração ou diferença no número de vezes nos níveis de expressão. Para o estudo, foram feitas duas análises. Na primeira análise, uma amostra foi escolhida como calibradora e também foi escolhido um gene endógeno para normalizar os resultados. Os resultados normalizados obtidos são sempre relativos ao dado do calibrador. A amostra calibradora utilizada para todos os grupos foi a que apresentou o valor mediano entre as três medições realizadas, para cada dia de tratamento (dois, quatro ou dez dias). Na outra análise, cada amostra de ferida com tratamento foi calibrada com uma amostra controle do próprio animal; assim, cada amostra tinha um calibrador diferente e específico.

Os quadros abaixo resumem estes resultados:

Resultados qPCR em relação ao grupo controle							
<i>Leptina</i>				<i>IL-2</i>			
	<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>		<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>
	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>		<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>
<i>Dia 2</i>	1	N/D	N/D	<i>Dia 2</i>	1,000	N/D	209,64
<i>Dia 4</i>	0,68595	2,9599	N/D	<i>Dia 4</i>	1,58364	2,5122	17,1999
<i>Dia 10</i>	1,30254	3,0155	15,894	<i>Dia 10</i>	0,98421	N/D	7,9337
<i>IL-4</i>				<i>IL-6</i>			
	<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>		<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>
	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>		<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>
<i>Dia 2</i>	N/D	N/D	N/D	<i>Dia 2</i>	29,5485	19,8944	0,02826
<i>Dia 4</i>	N/D	N/D	N/D	<i>Dia 4</i>	1,74044	1,34772	0,00021
<i>Dia 10</i>	N/D	N/D	N/D	<i>Dia 10</i>	3,11884	4,32348	204,557
<i>IGF-1</i>				<i>Adipo</i>			
	<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>		<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>
	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>		<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>
<i>Dia 2</i>	0,81582	2,56724	1,01068	<i>Dia 2</i>	1,00971	0,99784	0,293
<i>Dia 4</i>	0,99639	6,40828	0,01019	<i>Dia 4</i>	1,61285	2,80048	0,314
<i>Dia 10</i>	0,75066	2,65234	0,86222	<i>Dia 10</i>	0,84471	2,63851	3,1362
<i>IL-12</i>				<i>IFN-α</i>			
	<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>		<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>
	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>		<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>
<i>Dia 2</i>	0,99209	2,78657	0,98608	<i>Dia 2</i>	2,29617	0,03855	2,11287
<i>Dia 4</i>	1,26476	7,87765	0,01848	<i>Dia 4</i>	1,02605	0,03206	2,66224
<i>Dia 10</i>	0,77279	0,79403	7,32084	<i>Dia 10</i>	1,00148	0,10674	2,0163
<i>IFN-γ</i>				<i>TNF-α</i>			
	<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>		<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>
	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>		<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>
<i>Dia 2</i>	1	N/D	2,31363	<i>Dia 2</i>	4,09404	35,7803	1,33
<i>Dia 4</i>	1,22638	22,77	N/D	<i>Dia 4</i>	0,71205	0,96728	0,00256
<i>Dia 10</i>	1,72811	3,25803	0,36501	<i>Dia 10</i>	0,89728	0,30012	0,06964

Quadro 6: Resumos dos valores encontrados de RQ para as diferentes citocinas avaliadas nos grupos 1, 2 e 3, em relação ao grupo 1, através de PCR real time.

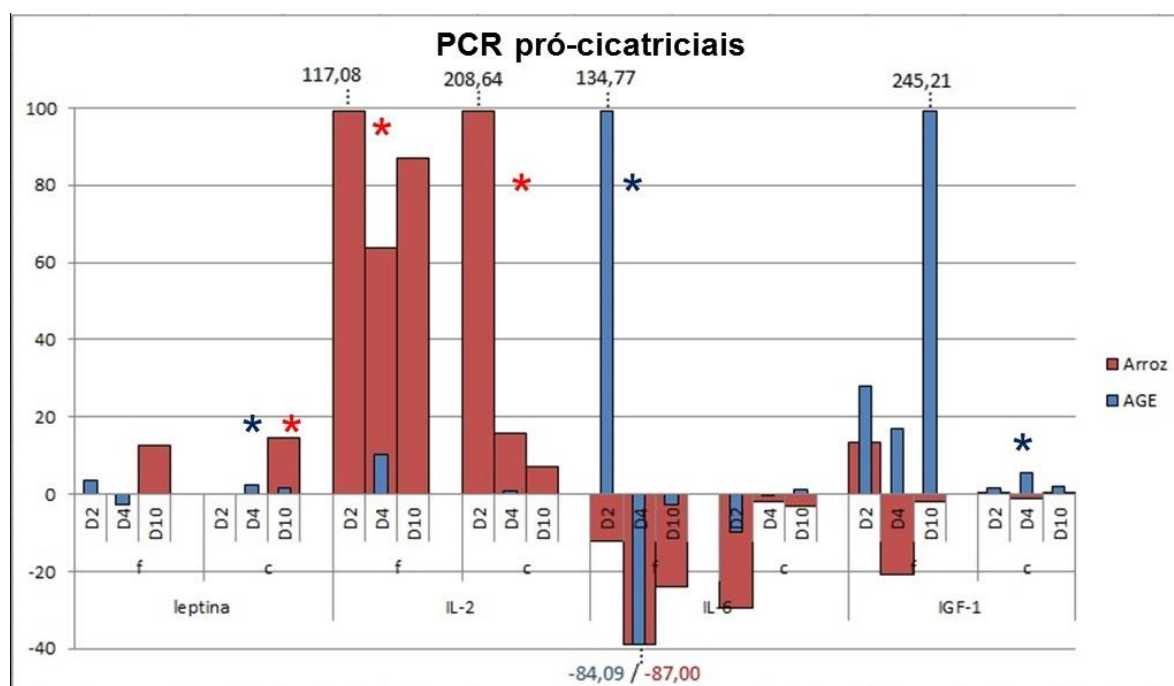
Observação: os valores relatados como N/D não foram detectados por esta técnica nas amostras estudadas, pois os valores eram inferiores aos limites mínimos de detecção

do aparelho. Se a amostra não amplificou até o 40º ciclo da reação, esta foi considerada como não detectada.

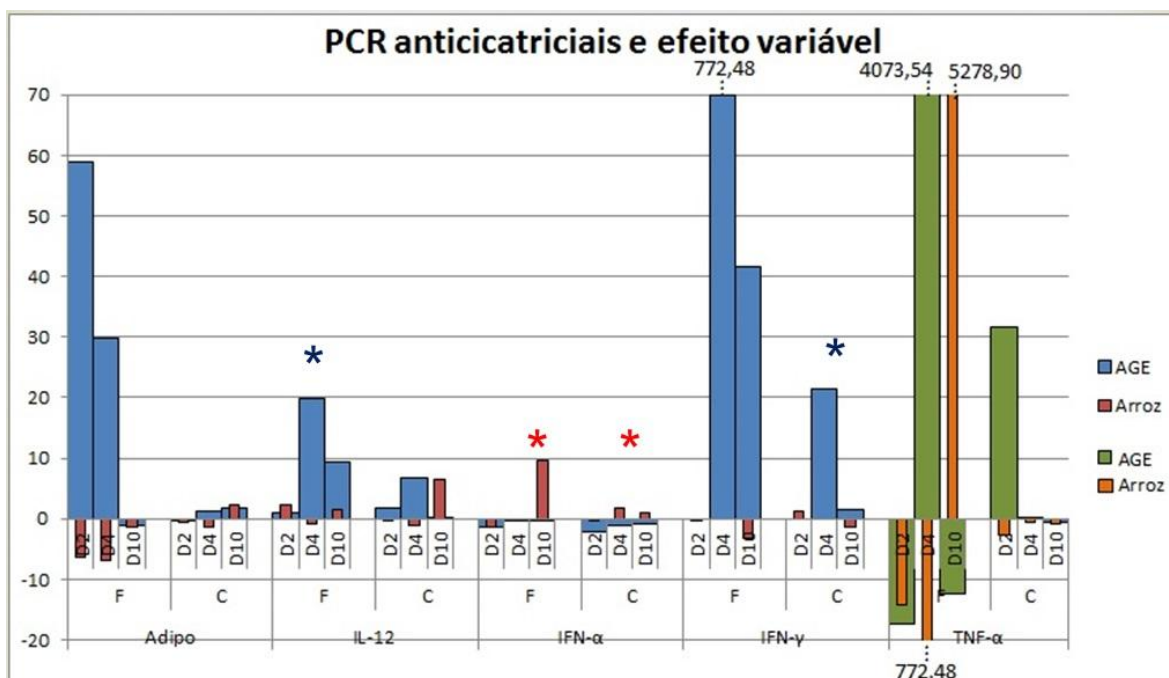
Resultados qPCR em relação à ferida contralateral							
<i>Leptina</i>				<i>IL-2</i>			
	<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>		<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>
	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>		<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>
<i>Dia 2</i>	0,88	4,268	N/D	<i>Dia 2</i>	1,3186	N/D	118,401
<i>Dia 4</i>	2,771	0	N/D	<i>Dia 4</i>	0,6148	10,9366	64,549
<i>Dia 10</i>	0,551	N/D	13,11	<i>Dia 10</i>	0,6724	N/D	87,6928
<i>IL-4</i>				<i>IL-6</i>			
	<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>		<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>
	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>		<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>
<i>Dia 2</i>	N/D	N/D	N/D	<i>Dia 2</i>	12,3191	147,095	0,0094
<i>Dia 4</i>	N/D	N/D	N/D	<i>Dia 4</i>	87,02	2,9262	0,0152
<i>Dia 10</i>	N/D	N/D	N/D	<i>Dia 10</i>	24,3623	21,7462	0,461
<i>IGF-1</i>				<i>Adipo</i>			
	<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>		<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>
	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>		<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>
<i>Dia 2</i>	1,077	28,925	14,352	<i>Dia 2</i>	6,902	65,716	0,455
<i>Dia 4</i>	20,973	38,007	0,124	<i>Dia 4</i>	7,564	37,325	0,781
<i>Dia 10</i>	2,075	247,286	0,034	<i>Dia 10</i>	2,346	1,338	0,928
<i>IL-12</i>				<i>IFN-α</i>			
	<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>		<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>
	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>		<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>
<i>Dia 2</i>	0,12	1,2205	2,5071	<i>Dia 2</i>	1,6018	0,3388	0,209
<i>Dia 4</i>	1,324	21,0793	0,4904	<i>Dia 4</i>	0,3781	0,0105	0,22
<i>Dia 10</i>	2,202	11,4966	3,6853	<i>Dia 10</i>	0,3879	0,0279	9,9959
<i>IFN-γ</i>				<i>TNF-α</i>			
	<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>		<i>Controle</i>	<i>AGE</i>	<i>Arroz</i>
	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>		<i>RQ</i>	<i>RQ</i>	<i>RQ</i>
<i>Dia 2</i>	0,212	N/D	0,003	<i>Dia 2</i>	20,3023	2,9281	6,0588
<i>Dia 4</i>	25,756	798,241	N/D	<i>Dia 4</i>	220,658	4294,2	0,1521
<i>Dia 10</i>	3,116	44,6627	0	<i>Dia 10</i>	18,6083	6,219	5297,51

Quadro 7: resumos dos valores encontrados de RQ para as diferentes citocinas avaliadas nos grupos 1, 2 e 3, em relação ao lado controle do próprio animal, através de PCR real time.

Abaixo estão resumidos os dados encontrados na análise de PCR real time em forma de gráfico, para comparar os resultados obtidos. Nestes dois gráficos (quadros cinco e seis) estão resumidos os dados dos grupos tratados com AGE e óleo de arroz, já subtraído os valores encontrados no grupo controle, mostrando então a diferença entre os tratamentos e o controle. As colunas que estão com reticências tiveram seus valores alterados para que o gráfico mostrasse os valores das outras amostras (os valores reais estão especificados acima das colunas) e os asteriscos mostram as dosagens com diferenças estatísticas significantes. Os resultados obtidos com a IL-2 e IGF-1 exemplificam bem o melhor resultado com os tratamentos aplicados (Quadro 8), assim como no Quadro 9 os resultados da adiponectina e TNF- α .



Quadro 8: gráfico com os dados de PCR real time em relação à ferida (f) e ao grupo controle (c) das citocinas pró-cicatriciais.



Quadro 9: gráfico com os dados de PCR real time em relação à ferida (f) e ao grupo controle (c) das citocinas anticicatriciais e com efeito variável.

5.3.1. Análise estatística da PCR *real time*

O objetivo deste experimento foi avaliar a existência de diferenças entre os grupos em estudo e os dias, após a lesão, em que foram avaliados os animais. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) considerando um experimento com dois fatores e em seguida foi aplicado o teste de médias de Scott-Knott à 5% de significância.

PCR para leptina em relação ao grupo 1

Como as pressuposições da ANOVA não foram atendidas, foi aplicada a transformação de Box-Cox.

O valor de λ utilizado para a transformação foi -0.7272727. Após a transformação as pressuposições da ANOVA foram atendidas.

Tabela 8. Teste de ANOVA para leptina.

Analysis of Variance Table

Response: leptinaG1.1T

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor(grupo)	2	0.05277	0.02638	0.4076	0.671255
factor(dia)	2	2.33611	1.16806	18.0438	5.007e-05 ***
factor(grupo):factor(dia)	4	1.68139	0.42035	6.4934	0.002038 **
Residuals	18	1.16522	0.06473		

De acordo com a tabela de ANAVA do desdobramento acima, observou-se que as quantidades de leptina (em relação ao grupo 1) apresentara diferenças entre os grupos apenas nos dias 4 e 10. Para um melhor detalhamento aplicou-se o teste de médias de Scott-Knott, que está apresentado a seguir.

- Comportamento dos grupos quando o dia é 2:

Tabela 9. Teste de Scott-Knott para dia 2 - leptina.

Grupo inside of the level 2 of Dia

According to the F test, the means of this factor are statistical equal.

	Levels	Means
1	1	0.3333333
2	2	0.0000000
3	3	0.0000000

Quando o dia é 2, os grupos não tem comportamento diferentes entre si.

- Comportamento dos grupos quando o dia é 4:

Tabela 10. Teste de Scott-Knott para dia 4 - leptina.

Grupo inside of the level 4 of Dia

Scott-Knott test

		Groups	Means
1	a	2	2.959905
2	b	1	0.4573011
3	b	3	0.0000000

Quando o dia é 4, as quantidades de leptina (em relação ao grupo 1) são maiores no grupo 2. Nos demais grupos podemos considerar as quantidades de leptina iguais e inferiores ao grupo 2.

- Comportamento dos grupos quando o dia é 10:

Tabela 11. Teste de Scott-Knott para dia 10 - leptina.

Grupo inside of the level 10 of Dia			
Scott-Knott test			
		Groups	Means
1	a	3	2407.635
2	b	1	1.302538
3	b	2	2.010335

Quando o dia é 10, as quantidades de leptina (em relação ao grupo 1) foram maiores no grupo 3. Nos demais grupos pode-se considerar as quantidades de leptina iguais e inferiores ao grupo 3.

- ✓ Desdobramento de dias dentro de cada nível de grupo:

Tabela 12. Teste de ANAVA para diferença entre grupos - leptina

Analysis of Variance Table					
	DF	SS	MS	Fc	Pr.Fc
Grupo	2	0.05277	0.02638	0.4076	0.6713
Grupo:Dia 1	2	0.28991	0.14495	2.2392	0.1354
Grupo:Dia 2	2	1.02873	0.51437	7.9458	0.0034
Grupo:Dia 6	2	2.69886	1.34943	20.8456	0
Residuals	18	1.16522	0.06473		
Total	26	5.23549	0.20137		

De acordo com a tabela de ANAVA do desdobramento acima, pode-se observar que apenas as quantidades de leptina encontradas nos grupos 2 e 3 apresentaram diferenças

entre os dias. Para o grupo 1, os dias podem ser considerados com quantidades iguais de leptina.

PCR para leptina em relação a ferida contralateral

Como as pressuposições da ANAVA não foram atendidas, foi aplicada a transformação de Box-Cox. O valor de λ utilizado para a transformação foi -0.969697. Após a transformação as pressuposições da ANAVA foram atendidas.

Tabela 13. Teste de ANAVA para ferida contralateral - leptina

Analysis of Variance Table

	DF	SS	MS	Fc	Pr>Fc
Grupo	2	0.12610	0.063048	1.9820	0.16675
Dia	2	0.10390	0.051952	1.6332	0.22296
Grupo*Dia	4	0.16088	0.040221	1.2644	0.32025
Residuals	18	0.57259	0.031811		
Total	26	0.96348			

De acordo com a tabela de análise de variância acima pode-se observar que nenhum dos fatores em estudo apresentou significância, nem mesmo a interação.

PCR para IL - 2 em relação ao grupo 1

Como as pressuposições da ANAVA não foram atendidas, foi aplicada a transformação de Box-Cox. O valor de λ utilizado para a transformação foi -0.4646465. Após a transformação, os pressupostos foram atendidos.

Tabela 14. Teste de ANAVA para IL-2.

Analysis of Variance Table

	DF	SS	MS	Fc	Pr>Fc
Grupo	2	2.9801	1.49007	7.3016	0.00477
Dia	2	0.8032	0.40160	1.9679	0.16868
Grupo*Dia	4	0.6301	0.15752	0.7719	0.55755
Residuals	18	3.6733	0.20407		
Total	26	8.0867			

Apenas o fator grupo apresentou significância.

Tabela 15. Teste de médias para grupos – IL-2.

Scott-Knott test				
Groups	Treatments		Means	
1	a	3	305.3410030	
2	b	1	1.1892840	
3	b	2	0.8373914	

O grupo 3 foi o que apresentou as maiores quantidades de IL-2, em relação ao grupo controle.

PCR para IL - 2 em relação à ferida contralateral

Como as pressuposições da ANAVA não foram atendidas, foi aplicada a transformação de Box-Cox. O valor de λ utilizado para a transformação foi -0.9494949. Após a transformação, os pressupostos foram atendidos.

Tabela 16. Teste de ANAVA para ferida contralateral – IL-2.

Analysis of Variance Table					
	DF	SS	MS	Fc	Pr>Fc
Grupo	2	2.7838	1.39189	8.3311	0.002746
Dia	2	2.4734	1.23668	7.4020	0.004509
Grupo*Dia	4	0.8758	0.21894	1.3105	0.303689
Residuals	18	3.0073	0.16707		
Total	26	9.1402			

De acordo com a tabela acima, tanto o fator grupo quanto o fator dia apresentaram significância, devendo ser analisados em separado.

Tabela 17. Teste de médias para grupos – ferida contralateral – IL-2.

	Groups	Treatments	Means
1	a	3	67.315028
2	b	2	3.645536
3	b	1	0.343339

O teste de Scott-Knott indicou que os grupos 1 e 2 são estatisticamente iguais e as quantidades de IL-2 encontradas no sangue dos animais é menor que as quantidades encontradas no sangue dos animais do grupo 3.

Tabela 18. Teste de médias para dias – ferida contralateral – IL-2.

	Groups	Treatments	Means
1	a	4	25.35879
2	a	2	26.45781
3	b	10	19.48731

O teste de Scott-Knott indicou que nos dias 2 e 4 as quantidades de IL-2 foram estatisticamente iguais e superiores as quantidades encontradas no sangue dos animais avaliados no dia 10.

PCR para IL - 6 em relação ao grupo 1

Como as pressuposições da ANAVA não foram atendidas, foi aplicada a transformação de Box-Cox. O valor de λ utilizado para a transformação foi -0.8686869. Após a transformação foi possível realizar a ANAVA.

Tabela 19. Teste de ANAVA – IL-6.

Analysis of Variance Table					
	DF	SS	MS	Fc	Pr>Fc
Grupo	2	1.4679	0.73393	6.2639	0.00861
Dia	2	0.2694	0.13468	1.1495	0.33899
Grupo*Dia	4	0.6022	0.15055	1.2849	0.31279
Residuals	18	2.1090	0.11717		
Total	26	4.4484			

De acordo com a tabela de análise de variância existem diferenças apenas entre os grupos.

Tabela 20. Teste de médias para grupos – IL-6.

Scott-Knott test

	Groups	Treatments	Means
1	a	3	68.18877
2	b	2	8.52186
3	b	1	11.46927

A quantidade de IL-6, quando comparada com o grupo controle foi maior no grupo 3, sendo os grupos 1 e 2 inferiores e estatisticamente iguais.

PCR para IL - 6 em relação à ferida contralateral

Como as pressuposições da ANAVA não foram atendidas, foi aplicada a transformação de Box-Cox. O valor de λ utilizado para a transformação foi -0.4242424. Após a transformação foi possível realizar a ANAVA.

Tabela 21. Teste de ANAVA – ferida contralateral – IL-6.

Analysis of Variance Table

	DF	SS	MS	Fc	Pr>Fc
Grupo	2	7.6504	3.8252	6.9748	0.00572
Dia	2	0.2399	0.1199	0.2187	0.80569
Grupo*Dia	4	3.0393	0.7598	1.3854	0.27852
Residuals	18	9.8717	0.5484		
Total	26	20.8012			

Apenas o fator grupo foi significativo; aplicou-se o teste de Scott-Knott para identificar as diferenças existentes entre os grupos.

Tabela 22. Teste de médias para grupos – ferida contralateral – IL-6.

Scott-Knott test

	Groups	Treatments	Means
1	a	1	41.2338031
2	a	2	38.1704869
3	b	3	0.1563973

Os grupos 1 e 2 foram estatisticamente iguais e superiores ao grupo 3 quando as quantidades foram comparadas com a ferida contralateral.

PCR para IGF - 1 em relação ao grupo 1

Retirando um valor que pode ser considerada um *outlier*, realizou-se novamente os testes das pressuposições da ANAVA e ainda assim os dados não normalizaram e as variâncias não homogeneizaram. Então se realizou também a transformação de Box-Cox. O valor de λ utilizado para a transformação foi 0.3434343. Após essa transformação os pressupostos para ANAVA foram atendidos.

Tabela 23. Teste de ANAVA – IGF-1.

Analysis of Variance Table

Response: IGF1g1T1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor(grupo)	2	34.029	17.0144	17.8001	6.767e-05 ***
factor(dia)	2	0.058	0.0290	0.0303	0.9702
factor(grupo):factor(dia)	4	11.083	2.7709	2.8988	0.0535 .
Residuals	17	16.250	0.9559		

De acordo com a tabela de análise de variância acima pode-se observar que apenas o fator grupo foi significativo, ou seja, existiram diferenças apenas entre os grupos e não entre os dias em que os animais foram avaliados. Aplicou-se o teste de Scott-Knott para identificar as diferenças existentes entre os grupos.

Tabela 24. Teste de médias para grupos – IGF-1.

SCOTT-KNOTT ORIGINAL TEST

Confidence Level: 0.95
Independent variable: factor(grupo)

FACTORS		MEANS	
1	2	3.8759570	A
2	1	0.8542889	B
3	3	0.5983799	B

O teste indica que os grupos 1 e 3 são estatisticamente iguais e inferiores em quantidade ao grupo 2.

PCR para IGF - 1 em relação à ferida contralateral

Como as pressuposições da ANAVA não foram atendidas, foi aplicada a transformação de Box-Cox. O valor de λ utilizado para a transformação foi -0.3838384. Após a transformação as pressuposições foram atendidas.

Tabela 25. Teste de ANAVA – ferida contralateral – IGF-1.

Analysis of Variance Table

	DF	SS	MS	Fc	Pr>Fc
Grupo	2	4102.0	2050.99	3.11666	0.07029
Dia	2	296.2	148.08	0.22501	0.80085
Grupo*Dia	4	989.0	247.25	0.37571	0.82276
Residuals	17	11187.3	658.07		
Total	25	16574.4			

De acordo com a tabela de análise de variância acima pode-se observar que em nenhum dos grupos e em nenhum dos dias os animais apresentaram quantidade de IGF - 1 em relação à ferida, diferentes.

PCR para adiponectina em relação ao grupo 1

Observando o conjunto de dados pode-se notar que existe um valor muito diferente das demais. Retirando esta observação que pode ser considerada um *outlier*, as pressuposições foram atendidas e pode-se aplicar a ANAVA.

Tabela 26. Teste de ANAVA – adiponectina.

Analysis of Variance Table					
	DF	SS	MS	Fc	Pr>Fc
factor(grupo)	2	0.17506	0.087529	0.7268	0.4971
factor(dia)	2	0.51432	0.257161	2.1353	0.1472
factor(grupo):factor(dia)	4	0.69339	0.173348	1.4394	0.2617
Residuals	18	2.16776	0.120431		

De acordo com a tabela de análise de variância acima pode-se observar que nenhum dos fatores em estudo apresentou significância, nem mesmo a interação.

PCR para adiponectina em relação à ferida contralateral

Como as pressuposições da ANAVA não foram atendidas foi aplicada a transformação de Box-Cox. O valor de λ utilizado para a transformação foi -0.5454545. Após a transformação, as pressuposições da ANAVA foram atendidas.

Tabela 27. Teste de ANAVA – ferida contralateral – adiponectina.

Analysis of Variance Table					
	DF	SS	MS	Fc	Pr>Fc
factor(grupo)	2	0.9934	0.49670	1.9365	0.1731
factor(dia)	2	0.2908	0.14538	0.5668	0.5771
factor(grupo):factor(dia)	4	0.2227	0.05568	0.2171	0.9254
Residuals	18	4.6168	0.25649		

De acordo com a tabela de análise de variância acima pode-se observar que nenhum dos fatores em estudo apresentou significância, nem mesmo a interação.

PCR para IL - 12 em relação ao grupo 1

Como as pressuposições da ANAVA não foram atendidas, foi aplicada a transformação de Box-Cox. O valor de λ utilizado para a transformação foi -0.6666667. Após a transformação as pressuposições da ANAVA foram atendidas.

Tabela 28. Teste de ANAVA – IL-12.

Analysis of Variance Table

Response: IL12g1.1T

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor(grupo)	2	0.36732	0.18366	1.5536	0.23855
factor(dia)	2	0.25014	0.12507	1.0580	0.36778
factor(grupo):factor(dia)	4	2.05193	0.51298	4.3394	0.01244 *
Residuals	18	2.12786	0.11821		

De acordo com a tabela de análise de variância acima pode-se observar que a interação foi significativa, devendo-se desdobrar a interação.

Tabela 29. Teste de médias dos grupos para o dia 2 – IL-12.

Grupo inside of the level 2 of Dia

According to the F test, the means
of this factor are statistical equal.

	Levels	Means
1	1	0.6613947
2	2	1.8577130
3	3	0.6573872

Quando o dia foi 2, os 3 grupos não apresentaram diferenças entre si.

Tabela 30. Teste de Scott-Knott dos grupos para o dia 4 – IL-12.

Scott-Knott test			
Groups	Treatments	Means	
1	a	2	7.877654
2	b	1	1.264764
3	b	3	0.012320

Quando o dia foi 4, as quantidades de IL-12 (em relação ao grupo 1) dos grupos 1 e 3 puderam ser consideradas iguais e inferiores as quantidades encontradas no grupo 2.

Tabela 31. Teste de média dos grupos para o dia 10 – IL-12.

Grupo inside of the level 10 of Dia			
	Levels	Means	
1	1	0.7727878	
2	2	0.7940329	
3	3	33.1277900	

Quando o dia foi 10, os 3 grupos não apresentaram diferenças entre si.

PCR para IL - 12 em relação à ferida contralateral

Como as pressuposições da ANAVA não foram atendidas, foi aplicada a transformação de Box-Cox. O valor de λ utilizado para a transformação foi -0.4848485. Após a transformação atendeu-se as pressuposições da ANAVA.

Tabela 32. Teste de ANAVA – ferida contralateral – IL-12.

Analysis of Variance Table						
Response: IL12ferida.1T						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
factor(grupo)	2	2.0354	1.01772	4.6358	0.02377	*
factor(dia)	2	1.3206	0.66030	3.0077	0.07465	.
factor(grupo):factor(dia)	4	2.0807	0.52017	2.3694	0.09118	.
Residuals	18	3.9517	0.21954			

De acordo com a tabela de análise de variância acima pode-se observar que a interação entre grupos e dias não foi significativa e que apenas a diferença entre grupos é significativa.

Tabela 33. Teste de Scott-Knott para grupos – ferida contralateral – IL-12.

```
-----
SCOTT-KNOTT ORIGINAL TEST
Confidence Level: 0.95
Independent variable: factor(grupo)
FACTORS      MEANS
1           2 10.49190 A
2           1  1.20184 B
3           3  0.71595 B
-----
```

Em relação à ferida, o grupo 2 apresentou valores mais elevados de IL-12.

PCR para IFN- α em relação ao grupo 1

Como as pressuposições da ANAVA não foram atendidas foi aplicada a transformação de Box-Cox. O valor de λ utilizado para a transformação foi -0.212121. Após a transformação foi realizada a ANAVA.

Tabela 34. Teste de ANAVA – IFN- α .

```
-----
Analysis of Variance Table

Response: INFaG1T
               Df  Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
factor(grupo)  2 161.148   80.574 44.6986 1.044e-07 ***
factor(dia)     2   4.696    2.348  1.3025  0.2963
factor(grupo):factor(dia)  4   8.699    2.175  1.2065  0.3423
Residuals      18  32.447    1.803
-----
```

Apenas o fator grupo foi significativo; aplicou-se o teste de Scott-Knott para identificar as diferenças existentes entre os grupos.

Tabela 35. Teste de Scott-Knott para grupos - IFN- α .

SCOTT-KNOTT ORIGINAL TEST

Confidence Level: 0.95
Independent variable: factor(grupo)

FACTORS		MEANS	
1	3	1.179184e+03	A
2	1	1.441234e+00	A
3	2	5.911645e-02	B

De acordo com o teste de Scott-Knott, o grupo 2 apresentou quantidades menores de IFN- α do que os grupos 1 e 3, estatisticamente iguais e com quantidades superiores.

PCR para IFN- α em relação à ferida contralateral

Como as pressuposições da ANAVA não foram atendidas foi aplicada a transformação de Box-Cox. O valor de λ utilizado para a transformação foi -2.959596. Após a transformação as pressuposições da ANAVA foram atendidas.

Tabela 36. Teste de ANAVA – ferida contralateral - IFN- α .

Analysis of Variance Table

	DF	SS	MS	Fc	Pr>Fc
Grupo	2	0.22645	0.113227	19.2822	0.00003
Dia	2	0.01115	0.005575	0.9494	0.40552
Grupo*Dia	4	0.01670	0.004174	0.7108	0.59515
Residuals	18	0.10570	0.005872		
Total	26	0.36000			

Apenas o fator grupo foi significativo; aplicou-se o teste de Scott-Knott para identificar as diferenças existentes entre os grupos.

Tabela 37. Teste de Scott-Knott para grupos – ferida contralateral - IFN- α .

Scott-Knott test				
	Groups	Treatments	Means	
1	a	3	3.47496943	
2	b	1	0.78931473	
3	c	2	0.02393826	

Os três grupos apresentaram diferenças nas quantidades de IFN- α onde a maior é a do grupo 3.

PCR para IFN- γ em relação ao grupo 1

Como as pressuposições da ANAVA não foram atendidas, foi aplicada a transformação de Box-Cox. O valor de λ utilizado para a transformação foi -0.1414141. Após a transformação as pressuposições da ANAVA foram atendidas.

Tabela 38. Teste de ANAVA – IFN- γ .

Analysis of Variance Table					
	DF	SS	MS	Fc	Pr>Fc
Grupo	2	1.7769	0.88847	4.7396	0.022203
Dia	2	2.2812	1.14060	6.0846	0.009580
Grupo*Dia	4	3.4013	0.85033	4.5361	0.010396
Residuals	18	3.3742	0.18746		
Total	26	10.8337			

De acordo com a tabela de análise de variância acima pode-se observar que a interação foi significativa, ou seja, os efeitos provocados pelos grupos e pelos dias separadamente tiveram efeitos diferentes do que quando considerados os dois fatores ao mesmo tempo.

Tabela 39. Teste de ANAVA - nível de dias - IFN- γ .

Analysis of Variance Table					
	DF	SS	MS	Fc	Pr.Fc
Dia	2	2.28121	1.14060	6.0846	0.0096
Dia:Grupo 2	2	0.52741	0.26370	1.4068	0.2706
Dia:Grupo 4	2	3.14552	1.57276	8.39	0.0027
Dia:Grupo 10	2	1.50531	0.75266	4.0151	0.0362
Residuals	18	3.37420	0.18746		
Total	26	10.83365	0.41668		

De acordo com a tabela de ANAVA do desdobramento acima, pode-se observar que as quantidades de INF- γ (em relação ao grupo 1) apresentaram diferenças entre os grupos nos dias 4 e 10.

Tabela 40. Teste F dos grupos para o dia 2 - IFN- γ .

Grupo inside of the level 2 of Dia		
According to the F test, the means of this factor are statistical equal.		
Levels	Means	
1	1	0.3333333
2	2	0.0000000
3	3	1.5424206

Quando o dia foi 2, não houve diferença estatística entre os grupos.

Tabela 41. Teste de Scott-Knott dos grupos para o dia 4 - IFN- γ .

Scott-Knott test		
Groups	Treatments	Means
1	a	2 22.770019
2	b	1 1.226379
3	b	6 0.0000000

O grupo 2 apresentou maior quantidade que os grupos 1 e 3 (não detectado).

Tabela 42. Teste de Scott-Knott dos grupos para o dia 10 – IFN- γ .

Scott-Knott test

		Groups	Means
1	a	2	3300.5990
2	b	3	103.2315
3	b	1	1.7281

O grupo 2 apresentou quantidade maior que os grupos 1 e 3.

PCR para IFN- γ em relação à ferida contralateral

Tabela 43. Teste T de Student G1 x G2 – ferida contralateral - IFN- γ .

```
Welch Two Sample t-test
data: grupo1$INFgFerida and grupo2$INFgFerida
t = -1.0137, df = 8.017, p-value = 0.3403
sample estimates:
mean of x mean of y
 9.647566 266.094644
```

As quantidades de IFN- γ não diferiram entre os grupos 1 e 2.

Tabela 44. Teste T de Student G1 x G3– ferida contralateral - IFN- γ .

```
Welch Two Sample t-test
data: grupo1$INFgFerida and grupo6$INFgFerida
t = 1.185, df = 8, p-value = 0.27
sample estimates:
mean of x mean of y
9.6475663144 0.0006679722
```

As quantidades de IFN- γ não diferiram entre os grupos 1 e 3.

Tabela 45. Teste T de Student G2 x G3– ferida contralateral - IFN- γ .

```
Welch Two Sample t-test
data: grupo2$INFgFerida and grupo6$INFgFerida
t = 1.0524, df = 8, p-value = 0.3234
sample estimates:
mean of x mean of y
2.660946e+02 6.679722e-04
```

As quantidades de IFN- γ não diferiram entre os grupos 2 e 3.

- Teste t de Student para os dias

Tabela 46. Teste T de Student D2 x D4 – ferida contralateral - IFN- γ .

```
-----  
Welch Two Sample t-test  
data: dia2$INFgFerida and dia4$INFgFerida  
t = -1.0906, df = 8, p-value = 0.3072  
sample estimates:  
mean of x mean of y  
0.02418868 274.68004590  
-----
```

As quantidades de IFN- γ não diferiram entre os dias 2 e 4.

Tabela 47. Teste T de Student D2 x D10 – ferida contralateral - IFN- γ .

```
-----  
Welch Two Sample t-test  
data: dia2$INFgFerida and dia10$INFgFerida  
t = -1.5279, df = 8.02, p-value = 0.165  
sample estimates:  
mean of x mean of y  
0.02418868 1.03864404  
-----
```

As quantidades de IFN- γ não diferiram entre os dias 2 e 10.

Tabela 48. Teste T de Student D4 x D10 – ferida contralateral - IFN- γ .

```
-----  
Welch Two Sample t-test  
data: dia4$INFgFerida and dia10$INFgFerida  
t = 1.0865, df = 8, p-value = 0.3089  
sample estimates:  
mean of x mean of y  
274.680046 1.038644  
-----
```

Pode-se dizer que não houve diferença estatística entre os grupos analisados, nem para os diferentes dias de tratamento.

PCR para TNF- α em relação ao grupo 1

Para esta variável foi utilizada a transformação de Box-Cox. A seguir está a tabela de ANAVA já com os dados cumprindo suas pressuposições.

Tabela 49. Teste de ANAVA – TNF- α .

	DF	SS	MS	Fc	Pr>Fc
Grupo	2	0.2150	0.107485	0.85906	0.44021
Dia	2	0.4897	0.244834	1.95679	0.17023
Grupo*Dia	4	0.3691	0.092268	0.73744	0.57854
Residuals	18	2.2522	0.125120		
Total	26	3.3259			

De acordo com a tabela de análise de variância nenhum dos grupos e em nenhum dos dias os animais apresentaram quantidade de TNF- α em relação ao grupo 1, diferentes.

PCR para TNF- α em relação à ferida contralateral

Para esta variável foi utilizada a transformação de Box-Cox. A seguir está a tabela de ANAVA já com os dados cumprindo suas pressuposições.

Tabela 50. Teste de ANAVA – ferida contralateral - TNF- α .

	DF	SS	MS	Fc	Pr>Fc
Grupo	2	4.6471	2.32355	2.5151	0.10883
Dia	2	3.3203	1.66014	1.7970	0.19429
Grupo*Dia	4	5.3487	1.33716	1.4474	0.25929
Residuals	18	16.6289	0.92383		
Total	26	29.9449			

De acordo com a tabela de análise de variância nenhum dos grupos e em nenhum dos dias os animais apresentaram quantidade de TNF- α em relação à ferida contralateral, diferentes.

5.4. Avaliação das citocinas inflamatórias sistêmicas (Elisa)

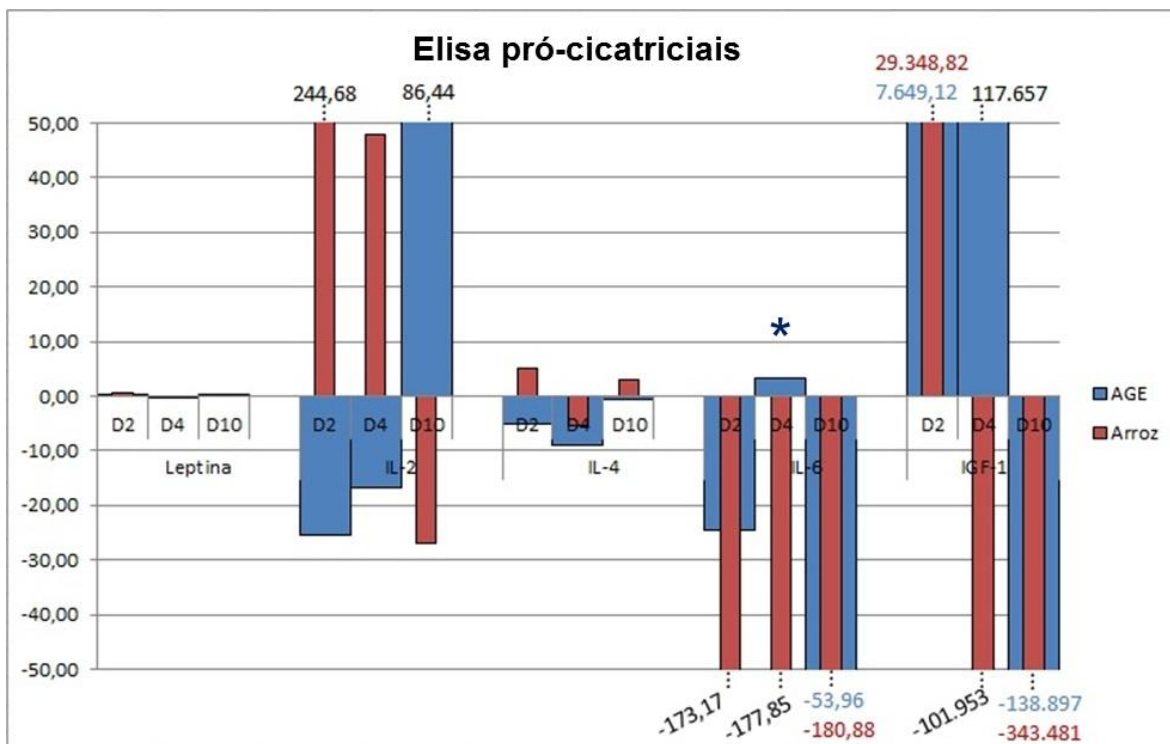
As medições e quantificações das citocinas inflamatórias dosadas por técnica Elisa estão sumarizados na quadro abaixo:

<i>Resultados ELISA para Leptina</i>				<i>Resultados ELISA para IL 2</i>			
	CONTROLE	AGE	ARROZ		CONTROLE	AGE	ARROZ
DIA 2	0,26	0,47	0,84	DIA 2	41,0803	15,6712	285,766
DIA 4	0,74	0,43	0,59	DIA 4	14,4842	-2,3757	62,4561
DIA 10	0,74	0,76	1,16	DIA 10	6,88647	93,3245	-19,948
<i>Resultados ELISA para IL 4</i>				<i>Resultados ELISA para IL-6</i>			
	CONTROLE	AGE	ARROZ		CONTROLE	AGE	ARROZ
DIA 2	10,24	5,21	15,2	DIA 2	280,107	255,535	106,935
DIA 4	13,36	4,29	8,05	DIA 4	256,329	259,481	78,4776
DIA 10	6,67	6,03	9,6	DIA 10	276,947	222,988	96,0668
<i>Resultados ELISA para IGF-1</i>				<i>Resultados ELISA para Adiponectina</i>			
	CONTROLE	AGE	ARROZ		CONTROLE	AGE	ARROZ
DIA 2	594564	602213	623912	DIA 2	8972,18	11116,1	8906,27
DIA 4	767184	884841	665231	DIA 4	8337,17	8712,68	6242,34
DIA 10	786540	647642	443059	DIA 10	16526,4	13466,2	9145,04
<i>Resultados ELISA para IL 12</i>				<i>Resultados ELISA para IFN-α</i>			
	CONTROLE	AGE	ARROZ		CONTROLE	AGE	ARROZ
DIA 2	5,91296	-7,2662	2,47256	DIA 2	21,1994	21,9283	18,717
DIA 4	-1,3491	-10,403	-4,6988	DIA 4	21,5645	17,2499	13,3764
DIA 10	-2,1553	-7,009	-1,6031	DIA 10	25,6879	17,2483	26,082
<i>Resultados ELISA para IFN-γ</i>				<i>Resultados ELISA para TNF-α</i>			
	CONTROLE	AGE	ARROZ		CONTROLE	AGE	ARROZ
DIA 2	42,5712	39,401	35,951	DIA 2	2,7634	-0,4749	4,20729
DIA 4	196,445	42,1167	60,3296	DIA 4	-8,5174	-12,129	10,3364
DIA 10	141,806	35,5736	34,9849	DIA 10	-8,8164	-3,6932	11,4599

Quadro10: Resumo dos valores encontrados nas dosagens das citocinas pelo método Elisa

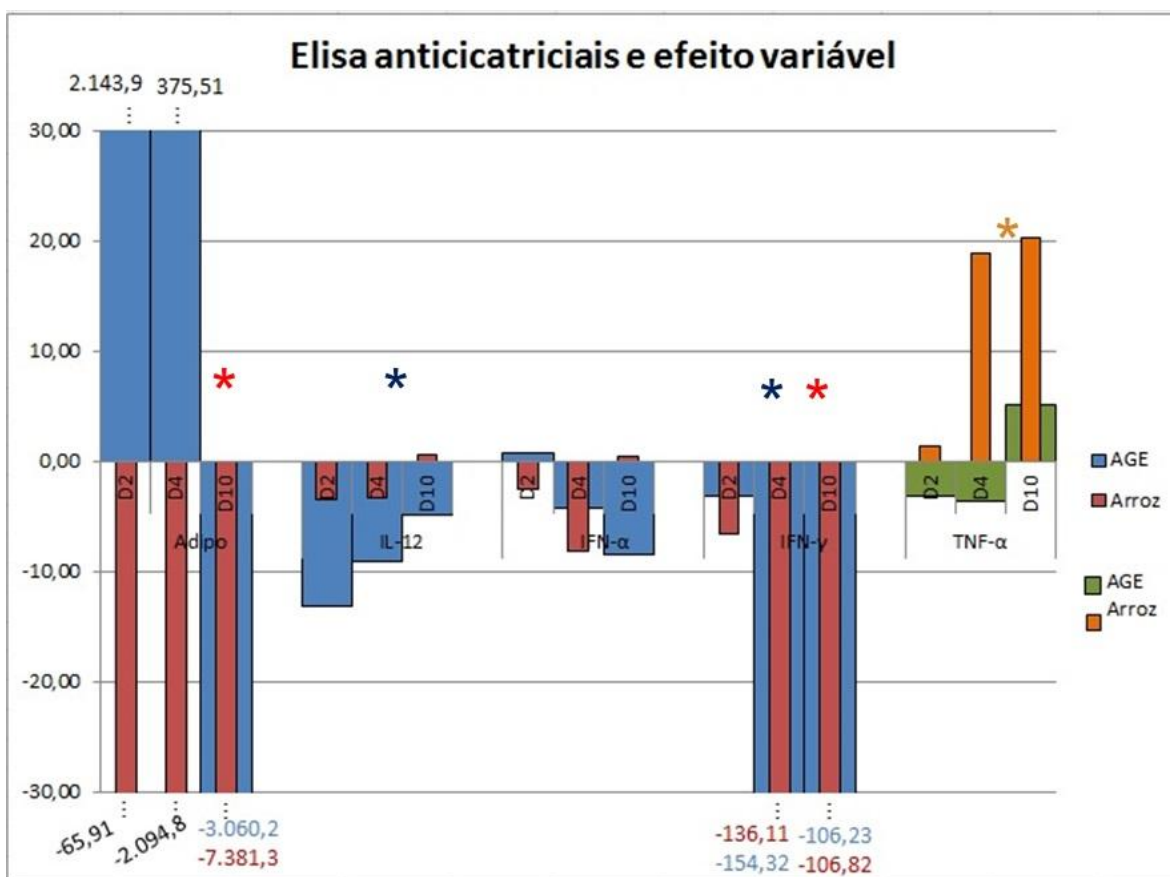
Abaixo estão resumidos os dados encontrados na análise de Elisa em forma de gráfico, para comparar os resultados obtidos. Nestes dois gráficos (quadros 11 e 12) estão

resumidos os dados dos grupos tratados com AGE e óleo de arroz, já subtraído os valores encontrados no grupo controle, mostrando então a diferença entre os tratamentos e o controle. As colunas que estão com reticências tiveram seus valores alterados para que o gráfico mostrasse os valores das outras amostras (os valores reais estão especificados acima das colunas)e os asteriscos evidenciam as análises com diferença estatística significativa.



Quadro 11: gráfico com os dados de Elisa das citocinas pró-cicatriciais.

No Quadro 12 abaixo, os resultados obtidos com adiponectina e TNF- α exemplificam bem a ação sistêmica dos tratamentos.



Quadro 12: gráfico com os dados de Elisa das citocinas anticitricatriciais e com efeito variável.

5.4.1 Análise estatística de Elisa

O objetivo da análise estatística deste teste foi avaliar a existência de diferenças entre os grupos em estudo e os dias após a lesão em que foram avaliados os animais. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) considerando um experimento com dois fatores e em seguida foi aplicado o teste de médias de Scott-Knott à 5% de significância.

Teste ELISA para Leptina

Tabela 51. Teste de ANAVA – Elisa – Leptina.

Analysis of Variance Table

Response: Leptina

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor(grupo)	2	0.52896	0.26448	2.5288	0.10768
factor(dia)	2	0.67230	0.33615	3.2140	0.06404
factor(grupo):factor(dia)	4	0.47770	0.11942	1.1419	0.36864
Residuals	18	1.88259	0.10459		

De acordo com a análise estatística realizada, não houve diferenças entre os grupos e dias analisados.

Teste ELISA para IL-2

Retirando a observação considerada um *outlier*, todas as pressuposições da ANAVA foram atendidas.

Tabela 52. Teste de ANAVA – Elisa – IL-2.

Analysis of Variance Table

Response: IL2

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor(grupo)	2	2426	1213.2	0.2828	0.7571
factor(dia)	2	554	277.0	0.0646	0.9377
factor(grupo):factor(dia)	4	29139	7284.7	1.6983	0.1967
Residuals	17	72920	4289.4		

De acordo com a tabela de Anava acima, os valores encontrados para IL-2 nenhum dos fatores em estudo apresentou significância, nem mesmo a interação.

Teste ELISA para IL-4

Tabela 53. Teste de ANAVA – Elisa – IL-4.

Analysis of Variance Table

Response: IL4

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor(grupo)	2	174.79	87.397	2.4107	0.1181
factor(dia)	2	35.21	17.604	0.4856	0.6232
factor(grupo):factor(dia)	4	121.47	30.367	0.8376	0.5191
Residuals	18	652.57	36.254		

De acordo com a tabela de Anava acima, os valores encontrados para IL-4 nenhum dos fatores em estudo apresentou significância, nem mesmo a interação.

Teste ELISA para IL-6

Tabela 54. Teste de ANAVA – IL-6.

Analysis of Variance Table

Response: IL6

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor(grupo)	2	165672	82836	166.7577	2.421e-12 ***
factor(dia)	2	1501	751	1.5112	0.2473
factor(grupo):factor(dia)	4	3143	786	1.5818	0.2220
Residuals	18	8941	497		

Aplicou-se o teste de Scott-Knott para identificar as diferenças existentes entre os grupos.

Tabela 55. Teste de Scott-Knott para grupos – Elisa – IL-6.

SCOTT-KNOTT ORIGINAL TEST

Confidence Level: 0.95

Independent variable: factor(grupo)

GRUPOS	MEANS
1	271.12750 A
2	246.00127 B
3	93.82657 C

De acordo com o teste de Scott-Knott, os valores variaram nos três grupos, sendo que o maior valor foi encontrado no grupo 1, seguido pelos grupos 2 e 3, respectivamente.

Teste ELISA para IGF-1

Tabela 56. Teste de ANAVA – Elisa – IGF-1.

Analysis of Variance Table

Response: IGF1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor(grupo)	2	1.1177e+11	5.5885e+10	1.2624	0.3069
factor(dia)	2	1.4780e+11	7.3898e+10	1.6692	0.2163
factor(grupo):factor(dia)	4	1.4121e+11	3.5303e+10	0.7974	0.5423
Residuals	18	7.9687e+11	4.4271e+10		

De acordo com a tabela de Anava acima, os valores encontrados para IGF-1 não apresentaram diferenças estatísticas.

Teste ELISA para adiponectina

Tabela 57. Teste de ANAVA – Elisa – adiponectina.

Analysis of Variance Table

Response: adipo

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor(grupo)	2	57455650	28727825	3.9735	0.037212 *
factor(dia)	2	128824711	64412356	8.9091	0.002044 **
factor(grupo):factor(dia)	4	45181536	11295384	1.5623	0.227104
Residuals	18	130138548	7229919		

Aplicou-se o teste de Scott-Knott para identificar as diferenças existentes entre os grupos e os dias.

Tabela 58. Teste de Scott-Knott para grupos – Elisa – adiponectina.

SCOTT-KNOTT ORIGINAL TEST

Confidence Level: 0.95

Independent variable: factor(grupo)

GRUPOS	MEANS
1	11278.579 A
2	11098.307 A
3	8097.882 B

De acordo com o teste de Scott-Knott, o grupo 3 apresenta quantidades inferiores aos grupos 1 e 2 (superiores e iguais estatisticamente).

Tabela 59. Teste de Scott-Knott para dias – adiponectina.

SCOTT-KNOTT ORIGINAL TEST

Confidence Level: 0.95
Independent variable: factor(dia)

DIAS	MEANS
10	13045.859 A
2	9664.842 B
4	7764.066 B

De acordo com o teste acima, os valores de adiponectina encontrados no dia 10 foram superiores aos encontrados nos dias 2 e 4.

Teste ELISA para IL-12

Tabela 60. Teste de ANAVA – Elisa – IL-12.

Analysis of Variance Table

Response: IL12

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
factor(grupo)	2	402.44	201.222	10.8997	0.0007917	***
factor(dia)	2	160.78	80.388	4.3545	0.0286780	*
factor(grupo):factor(dia)	4	56.76	14.190	0.7687	0.5594931	
Residuals	18	332.30	18.461			

Em seguida, aplicou-se o teste de Scott-Knott para identificar as diferenças existentes entre os grupos e os dias.

Tabela 61. Teste de Scott-Knott para grupos – Elisa – IL-12.

SCOTT-KNOTT ORIGINAL TEST

Confidence Level: 0.95
Independent variable: factor(grupo)

GRUPOS	MEANS
1	0.8028573 A
3	-1.2764643 A
2	-8.2262440 B

De acordo com o teste de Scott-Knott, o grupo 2 apresentou quantidades inferiores de IL-12 em relação aos grupos 1 e 3 (superiores e iguais estatisticamente).

Tabela 62. Teste de Scott-Knott para dias – Elisa – IL-12.

SCOTT-KNOTT ORIGINAL TEST

Confidence Level: 0.95
Independent variable: factor(dia)

DIAS	MEANS
2	0.3730942 A
10	-3.5891525 B
4	-5.4837926 B

As quantidades de IL-12 foram superiores no dia 2, enquanto os valores encontrados nos dias 4 e 10 foram inferiores e iguais estatisticamente.

Teste ELISA para IFN- α

Tabela 63. Teste de ANAVA – Elisa – IFN- α .

Analysis of Variance Table

Response: INFalfa

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor(grupo)	2	84.42	42.211	0.6805	0.5189
factor(dia)	2	142.61	71.303	1.1496	0.3390
factor(grupo):factor(dia)	4	182.66	45.666	0.7362	0.5793
Residuals	18	1116.48	62.027		

De acordo com a análise estatística realizada, não houve diferenças estatísticas entre os grupos nem entre os dias analisados.

Teste ELISA para IFN- γ

Após a transformação por Box-Cox, as pressuposições da ANAVA foram atendidas.

Tabela 64. Teste de ANAVA – IFN- γ .

Analysis of Variance Table

Response: INFgT

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
factor(grupo)	2	1.2128e-09	6.0638e-10	4.6435	0.023651	*
factor(dia)	2	2.4475e-09	1.2238e-09	9.3714	0.001625	**
factor(grupo):factor(dia)	4	4.9994e-10	1.2498e-10	0.9571	0.454588	
Residuals	18	2.3506e-09	1.3059e-10			

Aplicou-se o teste de Scott-Knott para identificar as diferenças existentes entre os grupos e os dias.

Tabela 65. Teste de Scott-Knott para grupos – Elisa – IFN- γ .

SCOTT-KNOTT ORIGINAL TEST

Confidence Level: 0.95

Independent variable: factor(grupo)

GRUPOS	MEANS
1	126.94089 A
3	43.75516 B
2	39.03040 B

De acordo com o teste acima, é possível verificar que o grupo 1 apresentou quantidades superiores que os grupos 2 e 3, respectivamente.

Tabela 66. Teste de Scott-Knott para dias – Elisa – IFN- γ .

SCOTT-KNOTT ORIGINAL TEST

Confidence Level: 0.95

Independent variable: factor(dia)

DIAS	MEANS
4	99.63055 A
10	70.78818 B
2	39.30772 B

Segundo o teste de Scott-Knott para o dia analisado, os valores encontrados no dia 4 foram superiores aos demais dias.

Teste ELISA para TNF- α

Tabela 67. Teste de ANAVA – Elisa – TNF- α .

Analysis of Variance Table

Response: TNFa

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor(grupo)	2	1146.20	573.10	16.5878	8.239e-05 ***
factor(dia)	2	141.71	70.86	2.0508	0.15763
factor(grupo):factor(dia)	4	428.50	107.13	3.1006	0.04176 *
Residuals	18	621.89	34.55		

De acordo com a tabela de análise de variância acima pode-se observar que a interação foi significativa. Quando a interação é significativa deve-se apenas desdobrar a interação, não sendo necessário o estudo dos fatores isoladamente.

Tabela 68. Teste de ANAVA dentro de cada nível de dias – Elisa – TNF- α .

Analysis of Variance Table

	DF	SS	MS	Fc	Pr.Fc
Dia	2	141.71018	70.85509	2.0508	0.1576
Dia:Grupo 2	2	34.49396	17.24698	0.4992	0.6152
Dia:Grupo 4	2	873.21079	436.60540	12.6371	4e-04
Dia:Grupo 10	2	666.99210	333.49605	9.6527	0.0014
Residuals	18	621.88987	34.54944		
Total	26	2338.29689	89.93450		

Tabela 69. Teste de Scott-Knott dos grupos para o dia 2 – Elisa - TNF- α .

SCOTT-KNOTT ORIGINAL TEST

GRUPO	MEANS
1	2.7634016 A
2	-0.4748754 A
3	4.2072926 A

Quando o dia analisado foi 2, não houve diferenças entre os grupos.

Tabela 70. Teste de Scott-Knott dos grupos para o dia 4 – Elisa – TNF- α .

SCOTT-KNOTT ORIGINAL TEST

GRUPO	MEANS
3	10.336397 A
1	-8.517377 B
2	-12.129156 B

Quando o dia analisado foi 4, os valores encontrados no grupo 3 foram superiores aos encontrados nos grupos 1 e 2, respectivamente.

Tabela 71. Teste de Scott-Knott dos grupos para o dia 10 – Elisa - TNF- α .

SCOTT-KNOTT ORIGINAL TEST

GRUPO	MEANS
3	11.459894 A
2	-3.693223 B
1	-8.816402 B

Quando o dia analisado é 10, os valores encontrados no grupo 3 foram superiores aos encontrados nos grupos 1 e 2, respectivamente.

6. Discussão

6.1. Clínica

Houve evidente diferença clínica na cicatrização do lado em que só foi realizada a limpeza com soro fisiológico e o lado tratado com óleo mineral nos animais do grupo 1. Esta observação reforça o conhecimento descrito desde 1945 de que a cicatrização é mais efetiva mantendo-se o ambiente úmido (Field e Kerstein, 1994). Os animais do grupo 3 (óleo de arroz) apresentaram melhor processo cicatricial clinicamente, do que os outros grupos. Os ratos tratados com óleo de arroz apresentaram a melhor recuperação ao longo do período de 10 dias de tratamento, tendo sido possível observar melhora já a partir do terceiro dia.

6.2. Área de cicatrização

Os resultados encontrados com a medida das áreas das úlceras não mostraram maior velocidade de cicatrização de forma crescente com o óleo mineral, AGE e óleo de arroz, como observado na clínica. Isto se deu, possivelmente, porque a área cicatricial por vezes era difícil de ser mensurada pela presença de crostas que não se destacavam com a limpeza realizada de forma delicada. O grupo 3 apresentou resultados com variação muito grande no dia 10, devido à presença das crostas, o que inviabilizou a medição mais correta da área cicatrizada. As crostas que persistiam à tentativa suave de remoção não eram retiradas porque fazê-lo insistentemente removeria também células a elas aderidas, interferindo no processo cicatricial natural. Portanto, a avaliação objetiva histológica foi o parâmetro considerado mais relevante.

6.3. Avaliação histológica

A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os grupos, à avaliação subjetiva. Embora não significantes, os resultados observados já no segundo dia

apontavam para um processo de cicatrização mais rápido nos animais que utilizaram o óleo de arroz. No quarto dia, havia menor celularidade e mais colagenização nos grupos AGE e óleo de arroz, mas o preenchimento da área removida era maior nos animais do grupo sem tratamento. Finalmente, no dia 10 do experimento, o preenchimento foi maior nas lesões dos animais do grupo tratado com o óleo de arroz.

A avaliação objetiva, no 10º dia, mostrou redução mais rápida da celularidade, nas úlceras tratadas com óleo de arroz, quando comparadas com o lado contralateral, em que as úlceras foram tratadas com óleo mineral, o que demonstrou uma melhor cicatrização com este óleo. Comparando com os animais do grupo 1, as úlceras tratadas com óleo de arroz e, depois, com AGE, apresentaram resultados melhores em relação às aquelas tratadas apenas com óleo mineral e soro fisiológico. Os resultados encontrados sugerem uma possível ação também sistêmica do óleo de arroz, pois, quando considerada a contagem de células, o processo de cicatrização também foi mais rápido nas lesões do lado controle dos animais do grupo do óleo de arroz, em relação às dos animais do grupo 1.

Embora sem diferenças significantes, talvez pelo tamanho das amostras, quando estudadas as médias das contagens de células de cada grupo, pode-se notar que, nas lesões dos animais do grupo 3, houve redução numérica expressiva em relação às do grupo 1. De qualquer forma, foi encontrada diferença estatística entre a menor quantidade de células nos animais do grupo 3, em relação aos do lado sem tratamento do grupo 1.

6.4. Avaliação das citocinas inflamatórias no tecido cicatricial (PCR *real time*) e no soro (Elisa)

Foi feita a avaliação tecidual com PCR *real time* para procurar entender a ação local do produto utilizado e avaliação sorológica por Elisa para avaliar possível ação sistêmica do produto utilizado sobre a derme.

As citocinas inflamatórias avaliadas têm diferentes ações sobre o processo cicatricial e algumas têm ação mais intensa nas fases iniciais da cicatrização. Por esta razão as dosagens, além da avaliação histológica, também foram feitas nas diferentes fases da cicatrização: D2, fase inflamatória; D4, fase proliferativa e D10, início da fase de remodelação que se estende por meses. São apresentadas inicialmente as citocinas pró-cicatriciais.

A leptina teve seu valor sistêmico aumentado em relação ao grupo tanto no grupo tratado com AGE como no tratado com óleo de arroz nos dias 2 e 10 (em ambos os dias o aumento maior foi no grupo tratado com óleo de arroz) e diminuição dos valores obtidos no dia 4 (diminuição maior no grupo tratado com AGE). Quanto aos valores de expressão local, os animais tratados com AGE tiveram seu valor aumentado nos dias 4 e 10 em relação grupo controle. De acordo com a revisão bibliográfica, é interessante que a quantidade de leptina esteja aumentada no início da cicatrização, uma vez que ela favorece a proliferação dos queratinócitos (Nascimento e Costa, 2006), tendo sido encontrado um valor três vezes maior no grupo tratado com óleo de arroz em relação ao grupo controle.

Estatisticamente, contudo, pode-se dizer que em nenhum dos grupos e em nenhum dos dias os animais apresentaram quantidades de leptina diferentes sistemicamente. Quanto à expressão local do gene, no D4, as quantidades de leptina (em relação ao grupo 1) são maiores no grupo 2 e no D10, as quantidades maiores encontradas foram no grupo 3. Quando foram comparados o lado tratamento e controle de cada animal, estatisticamente não foram encontradas diferenças.

A IL-2, produzida por neutrófilos e responsável pela proliferação de queratinócitos e colágeno (Armour *et al*, 2007), é interessante que seja encontrada no início do processo cicatricial e que seu nível decresça, para evitar que seja formada cicatriz hipertrófica. Os níveis de IL-2 dos animais tratados com óleo de arroz foram os mais altos nos dia 2 e 4 comparando com os grupos controle e AGE, resultado obtido tanto pelo método de Elisa quanto pela PCR *real time*; sistemicamente é possível notar uma diminuição no dia 10.

Este resultado é consoante com encontrado no trabalho realizado por Sierra e colaboradores (Sierra *et al*, 2005). Também pela técnica Elisa, os animais tratados com AGE apresentam diminuição nos dias 2 e 4 e aumento no dia 10; já localmente, a expressão gênica detectada no dia 4 foi maior que o grupo controle, porém menor que o grupo tratado com óleo de arroz. Porém, de acordo com a tabela de análise de variância do teste de Elisa pode-se observar que em nenhum dos grupos e em nenhum dos dias os animais apresentaram quantidade de IL-2 diferentes estatisticamente no sangue.

Na análise estatística dos dados de PCR *real time*, em relação ao grupo 1, apenas o grupo 3 apresentou quantidades maiores, uma vez que os grupos 1 e 2 foram estatisticamente iguais. Nos dados relativos ao animal como seu próprio controle, a quantidade de IL-2, quando comparada com a ferida contralateral foi maior no grupo 3 e o teste de Scott-Knott indicou que nos dias 2 e 4 as quantidades de IL-2 foram estatisticamente iguais e superiores as quantidades encontradas no sangue dos animais avaliados no dia 10.

A IL-4 teve seu nível aumentando sistemicamente no grupo tratado com óleo de arroz em relação ao grupo controle nos dias 2 e 10 e diminuído no dia 4. Já o grupo tratado com AGE teve seus valores sistêmicos diminuídos ao longo do todo o tratamento. A IL-4 não foi detectável pelo PCR *real time*. Esta citocina tem sua função na fase inicial da cicatrização, pela deposição de tenascina no tecido lesado; é uma citocina pouco expressa no adulto, sendo reexpressa nos processos cicatriciais (Makhluf *et al*, 1996). O resultado apresentado pelo óleo de arroz é o melhor dentre os grupos, pois foi o que apresentou a maior quantidade desta no dia 2 da cicatrização. Este resultado foi diferente do encontrado por Sierra, onde o orizanol diminuiu a quantidade de IL-4 em camundongos (Sierra *et al*, 2005).

De acordo com a tabela de análise de variância, contudo, pode-se dizer que em nenhum dos grupos e em nenhum dos dias os animais apresentaram quantidades sanguíneas de IL-4 diferentes estatisticamente.

A IL-6 apresentou seus menores valores no grupo tratado com óleo de arroz ao longo de todo o processo cicatricial tanto local quanto sistemicamente. O grupo tratado com AGE apresentou queda sistêmica nos dias 2 e 10 em relação ao grupo controle e não houve diferença no dia 4. Na análise local, apresentou diminuição do valor expresso no dia 2 e aumento no dia 10. Como foi explicitado na introdução, a IL-6 é uma citocina importante no início do processo cicatricial, onde os maiores níveis, tanto local quanto sistemicamente, deveriam ser encontrados. Em outros experimentos foi observado também que a ausência total de IL-6 em ratos com nocaute gênico o tempo de cicatrização chega a ficar três vezes maior (Lin *et al*, 2003).

De acordo com a tabela de análise de variância em relação aos dias para testes de Elisa pode-se dizer que os animais apresentaram a mesma quantidade de IL-6 no sangue em todos os dias em que foram avaliados. Os 3 grupos apresentaram diferenças. Em primeiro lugar, o grupo que apresentou maior quantidade de IL-6 foi o grupo 1, em seguida foi o grupo 2 e por fim o grupo que apresentou menor quantidade de IL-6 foi o grupo 3. Na análise estatística dos resultados da PCR *real time*, quando a análise é feita levando em consideração o animal como seu próprio controle, o grupo apresentou a menor quantidade, comparando com os grupos 1 e 2 (estatisticamente iguais e com quantidade superiores de IL-6), o que indica maior ação sistêmica do grupo 3, uma vez que a diferença nas quantidades de IL-6 na ferida com tratamento e na ferida com controle foi a menor de todos os grupos. Quando os grupos foram comparados com o grupo controle, o grupo 3 foi o que apresentou as maiores quantidades de IL-6 dado aumento expressivo no D10. Observando os valores obtidos, nota-se que os níveis de IL-6 foram mais baixos que os valores encontrados no D2 e D4 e houve grande elevação já na fase de remodelação. Talvez, caso houvesse sido feita dosagem posterior teria havido elevação sistêmica dos níveis desta citocina, considerando que a elevação no local de aplicação deva ser prévia à sistêmica.

O IGF-1 está elevado na fase inicial (dia 2) do processo cicatricial o que pode ser tanto quando tratado com óleo de arroz quanto com AGE, resultado observado tanto no teste

de Elisa quanto na PCR *real time*. A partir do dia 4, o óleo de arroz apresentou queda na quantidade de IGF-1 até o dia 10, tanto na PCR quanto no Elisa, e o AGE continuou aumentando no dia 4 e caiu no dia 10, em ambos os testes. Como esta substância atua indiretamente na cicatrização (ela aumenta a função de outras substâncias, como o PDGF-2) e está relacionada com o aumento da espessura da pele, é esperado a quantidade circulante não seja alta na segunda e terceira etapas da cicatrização, pois uma alta quantidade desta substância pode levar ao desenvolvimento de cicatriz hipertrófica (Chen *et al*, 2008).

Porém, de acordo com a tabela de análise de variância para o teste de Elisa pode-se dizer que em nenhum dos grupos e em nenhum dos dias os animais apresentaram quantidade de IGF-1 diferentes. Na análise estatística da PCR *real time*, é possível dizer que, quando comparados com o grupo controle, o dia não interfere nos resultados do grupo e que os grupos 1 e 3 foram estatisticamente iguais e as quantidades de IGF-1 foram maiores no grupo 2. Quanto à análise em relação à ferida contralateral, não foi possível estabelecer diferença estatística, pois houve alta variação entre as amostras de um mesmo dia e mesmo grupo. De modo semelhante ao que foi visto com TNF- α , as diferenças estatísticas não seriam relativas a uma real diferença entre os grupos, e sim devido a esta alta variação.

Em relação às citocinas que possuem ação anticicatrizal, quanto à expressão de adiponectina, pode-se notar que, com o óleo de arroz, houve diminuição sistêmica na quantidade presente no soro em relação ao grupo controle e AGE; a partir do dia 2 a diminuição foi pequena, mas nos dias 4 e 10 houve uma diminuição significativa. Na expressão local desta substância, foi possível verificar que desde do dia 2 sua quantidade foi menor do que o expresso nos grupos controle e AGE. Quanto ao AGE, há um aumento sistêmico na quantidade circulante nos dias 2 e 4, diminuindo no dia 10; analisando os resultados de PCR, foi possível verificar que os valores aumentam nos dias 4 e 10. Como a adiponectina é antiinflamatória, o ideal é que seus níveis estejam baixos no início da cicatrização e aumentem próximo ao final do processo (Berg *et al*, 2001), o que foi

verificado com o óleo de arroz (os níveis de adiponectina, embora menores que os dos outros grupos, apresentam tendência de aumento ao longo do processo cicatricial).

O teste de Scott-Knott indicou que os grupos 1 e 2 foram estatisticamente iguais e as quantidades de adiponectina encontrada no sangue dos animais foi maior que a quantidade encontrada no sangue dos animais do grupo 3. Nesse grupo, apenas os animais que foram analisados no dia 10 apresentaram quantidade de adiponectina superior aos demais dias.

As análises estatísticas para PCR *real time* mostraram que em nenhum dos grupos e em nenhum dos dias os animais apresentaram quantidades diferentes de adiponectina, em relação ao grupo 1 e em relação ao próprio lado controle.

Quanto à IL-12, o óleo de arroz apresentou diminuição da expressão local e sistêmica desta citocina nos dias 2 e 4 em relação ao grupo controle. Esta diminuição da IL-12 é desejável também em outras doenças inflamatórias como a psoríase, por exemplo. O grupo AGE apresentou aumento da expressão gênica local em todos os dias, mas em nível sistêmico foi notado diminuição ao longo de todo o tratamento. O papel da IL-12 na cicatrização é de estimular a produção de interferons pelos macrófagos, sendo importante o seu aumento (Ishida *et al*, 2004) que deve se dar nas fases finais da cicatrização.

De acordo com a tabela de análise de variância pode-se observar pela técnica de Elisa que a interação entre grupos e dias não foi significativa, indicando que o dia não interfere nos resultados dos grupos e vice-versa. Com isso foi avaliado cada fator em separado e neste caso os dois fatores foram significativos, ou seja, existem diferenças entre os grupos e entre os dias em que os animais foram avaliados. O teste de Scott-Knott indicou que os grupos 1 e 3 foram estatisticamente iguais e as quantidades de IL-12 encontradas foram maiores que as quantidades encontradas no sangue dos animais do grupo 2. Apenas os animais que foram analisados no dia 2 apresentaram quantidade de IL-12 superior aos demais dias. Os animais dos dias 4 e 10 apresentaram quantidades de IL-12 estatisticamente iguais e inferiores aos animais do dia 2.

A análise estatística da PCR *real time* em relação ao grupo controle permite dizer que houve diferença estatística entre os grupos apenas no dia 4, onde as quantidades encontradas no grupo 2 foram superiores às dos grupos 1 e 3 (estatisticamente iguais). Em relação ao próprio animal, apenas o grupo 2 apresentou quantidades superiores, comparando com os grupos 1 e 3.

O IFN- α apresentou diminuição sistêmica nos dias 2 e 4, e leve diminuição no dia 2 e aumento no dia 4 na expressão gênica local, no grupo 3 em relação ao grupo controle. O grupo tratado com AGE apresentou pequeno aumento dia 2 e diminuição nos dias 4 e 10 (os valores mantiveram-se praticamente iguais nestes dias) em relação ao grupo controle. O IFN- γ apresentou diminuição ao longo de todo o tratamento nos grupos tratados com óleo de arroz e AGE, porém em relação à expressão local, o grupo tratado com óleo de arroz apresentou aumento no dia 2 e o tratado com AGE apresentou aumento nos dias 4 e 10, em relação ao grupo controle. Como ambos possuem ação anticicatrizial, é importante que seu valor seja diminuído, principalmente nas etapas iniciais da cicatrização, para que a deposição do colágeno possa ocorrer (Tredget *et al*, 2000), o que ocorreu no grupo tratado com óleo de arroz e pouco menos no tratado com AGE. A redução sistêmica do IFN- γ é também desejável em certas doenças inflamatórias como a psoríase, por exemplo.

Mas, também de acordo com a tabela de análise de variância, pode-se dizer que estatisticamente em nenhum dos grupos e em nenhum dos dias os animais apresentaram quantidades de IFN- α diferentes sistemicamente. Nas análises estatísticas da PCR *real time*, em relação ao grupo controle, o teste de Scott-Knott permite dizer que os grupos 1 e 3 apresentam as maiores quantidades médias de IFN- α , sendo estatisticamente iguais e superiores ao grupo 2. Nos resultados referentes ao animal como seu próprio controle, o teste de Scott-Knott mostra que todos os grupos apresentam diferença, sendo que as maiores quantidades são as apresentadas pelo grupo 3, 1 e 2, respectivamente.

O teste de Scott-Knott indicou que apenas o grupo 1 apresentou quantidade de IFN- γ superior aos demais grupos. A quantidade de IFN- γ encontrada no sangue dos animais dos grupos 3 e 2 puderam ser considerados estatisticamente iguais e inferiores as quantidades

encontradas no grupo 1. Apenas os animais que foram analisados no dia 4 apresentaram quantidade de IFN- γ superior aos demais dias. Nas análises estatísticas da PCR *real time* em relação ao grupo 1, quando o dia foi 2 não houve diferenças estatísticas. Quando o dia foi 4 e 10, o grupo 2 foi o que apresentou as maiores quantidades de IFN- γ . Na análise relacionando o lado tratado com o lado controle de cada animal, não foram encontradas diferenças estatísticas comparando-se os grupos e os dias de tratamento. Os resultados dos testes foram todos não significativos devido à grande variabilidade ocasionada pela grande quantidade de valores não detectados. Observando o conjunto de dados, apenas para o grupo 1 existe maior número de dados e nos demais grupos poucas amostras detectaram a substância.

Algumas diferenças entre valores encontrados nos testes de PCR *real time* e Elisa podem ser explicadas pelo fato de que nem todo o DNA que está sendo expresso e quantificado em forma de RNA torne-se realmente proteína; o tempo para que isto ocorra pode variar de gene para gene.

De acordo com a revisão bibliográfica realizada, o TNF- α possui efeito cicatricial variável no organismo, dependendo da concentração circulante desta substância (Mast e Schultz, 1996). O TNF- α teve seu valor sistêmico aumentado ao longo de todo o tratamento com o óleo de arroz em relação ao grupo controle. Como este fator é um dos responsáveis pelo início da cascata de eventos da cicatrização e atua também na tensão cicatricial, deve ser expresso ao longo de toda a cicatrização (Mast e Schultz, 1996), o que pode ser visto sistemicamente com o óleo de arroz. O aumento encontrado neste trabalho é consoante com o encontrado por Sierra e colaboradores no seu estudo sobre efeito imunológico do óleo de arroz realizado com camundongos (Sierra *et al*, 2005).

De acordo com a tabela de ANAVA do desdobramento de dia de tratamento, pode-se observar que as quantidades de TNF- α , em relação aos grupos, foram significativas apenas nos dias 4 e 10. No segundo dia, os grupos não tiveram comportamentos diferentes, ou seja, neste dia as quantidades de TNF- α não foram afetadas nos grupos. No D4 e D10 as

quantidades de TNF- α dos grupos tiveram comportamentos diferentes entre si, ou seja, nesse dia as quantidades de TNF- α do grupo 3 foram superiores a dos demais grupos.

Nas análises estatísticas dos dados de PCR *real time*, não foi possível verificar diferença estatística tanto na análise em relação ao grupo controle quanto em relação à ferida contralateral. Isso se deve ao fato de haver grande variação entre os dados de cada dia e de cada grupo, onde as possíveis diferenças calculáveis seriam devido a esta variação e não a uma real diferença entre os tratamentos. A análise possivelmente poderia ser realizada se o número de amostras para o teste fosse maior.

Contudo, ao se observar as médias dos valores desta substância obtidas no tecido em cada grupo (Quadro 6, página 71) nota-se que no grupo tratado com óleo de arroz apresentou menor quantidade de TNF- α nos três dias analisados. Isto pode sugerir uma ação anti-TNF- α tecidual do óleo de arroz e consequente elevação sistêmica observada nos dias 4 e 10.

Como foi mencionada, a ação do TNF- α pode variar de acordo com a quantidade administrada no local de lesão, onde uma quantidade baixa acelera o processo e uma quantidade alta torna o processo mais lento (Mast e Schultz, 1996). Neste sentido, a elevação sistêmica tardia pode estar relacionada à redução deste estímulo no período de remodelação.

Várias drogas imunobiológicas, como as usadas em psoríase, tem ação anti-TNF- α o que aparentemente ocorreu no tecido.

Citocina	Acao na cicatrização	Resultado encontrado no tecido (PCR)	Resultado encontrado sangue (Elisa)	Observações
Leptina	Pro-cicatrizial (inicio da cicatrizacao)	Aumentado em D4 e 10 com AGE e em D10 com OA	Aumenta com OA e AGE em D2, diminui em D4 e aumenta em D10 (AGE=OM)	Sem diferença estatística no Elisa. Na qPCR: maior no G2 no D4 e maior em G3 no D10, em relação ao G1. Sem diferença estatística em relação à ferida contralateral
IL-2	Pró-cicatrizial	Aumenta em D2, 4 e 10 com OA. Com AGE aumenta em D4	Aumenta com OA em D2 e D4. Diminui em D10. Com AGE diminui em D2 e 4 e aumenta em D10	Sem diferença estatística no Elisa. Na qPCR em relação ao G1, o G3 é estatisticamente maior que G1 e 2. Em relação à ferida contralateral, G3>2 e 1.
IL-4	Pró-cicatrizial	Não detectável	Aumenta com OA em D2 e 10. Diminui em D4. Com AGE diminui em D2 e D4	Sem diferença estatística no Elisa. Não detectável na qPCR.
IL-6	Pro-cicatrizial (inicio da cicatrizacao)	Diminuído em D2, 4 com OA e AGE. Em D10 diminui com OA e aumenta com AGE	Diminui com OA em D2, 4 e 10. Diminui com AGE em D2 e 10	Estatisticamente maior no G1 e menor no G3, no Elisa. Na qPCR em relação à ferida contralateral, G3 é estatisticamente inferior aos G1 e 2.
IGF-1	Pro-cicatrizial (inicio da cicatrizacao)	Aumento com OA e AGE no D2. Diminui no D4 e 10 com OA e aumenta com AGE no D4	Aumenta com OA no D2 e diminui em D4 e D10. Com AGE aumenta em D4	Sem diferença estatística no Elisa e qPCR da ferida contralateral. G2 é estatisticamente maior que G3 e G1 na qPCR em relação ao G1.
Adiponectina	Anticicatrizial	Diminuição no D2 e D4 com OA; no D4 aumenta com AGE e D10 com AGE e OA	Diminui em D4 e D10 com OA. Aumenta com AGE em D2	G3 estatisticamente menor que G1 e G2. Aumenta em D10. Não há diferenças estatísticas na qPCR em relação ao G1 e à ferida contralateral
IL-12	Anticicatrizial	Aumenta em D2, 4 e 10 com AGE. Diminui em D2 e 4 e aumenta em D10 com OA	Diminui em D2, 4 e 10 com AGE e AO	G1 e G3 estatisticamente superior ao G2. D2 superior ao D4 e 10 estatisticamente, no Elisa. Na qPCR em relação à ferida contralateral, G2 estatisticamente maior que G1 e G3.
IFN- α	Anticicatrizial	Diminui em D2, 4 e 10 com AGE. Diminuição discreta em D2 e aumento em D4 com OA	Diminui com OA em D2 e D4. Diminui com AGE em D4 e mantém em D10	Sem diferença estatística no Elisa. Na qPCR em relação ao G1, G3 e G1 estatisticamente maiores (e iguais) que G2. Em relação à ferida contralateral, G3>G1>G2 estatisticamente.
IFN- γ	Anticicatrizial	Aumento em D2 com OA e em D4 e D10 com AGE. Em D10 diminui com OA	Diminui com OA e AGE em D2, 4 e 10. Com OA diminui mais em D2.	G2 e G3 iguais e inferiores ao G1 estatisticamente. Na qPCR em relação ao G1, G2 superior estatisticamente ao G1 e G3 (D4 e D10). Sem diferenças na qPCR em relação á ferida contralateral.
TNF-a	Efeito variável	Diminuído em D2, 4 e 10 com OA. Em D2 e 4 aumentado com AGE	Aumenta com OA e diminui com AGE	Avaliando os dias de tratamento, nos D4 e 10 foram estatisticamente superiores no G3 no Elisa. Na qPCR em relação ao G1 e à ferida contralateral, sem diferenças estatísticas devido à grande variação, mas aparente redução.

Quadro 13: Resumo da ação e achados das citocinas inflamatórias avaliadas.

7. Conclusão

O experimento permitiu constatar que o óleo de arroz foi mais eficaz que o óleo mineral e o AGE em promover cicatrização nas feridas produzidas nos ratos. Isto foi observado na clínica e na avaliação histológica.

Os resultados obtidos na análise da celularidade das lesões apontam para um efeito sistêmico do óleo ainda que não tenha sido possível documentar estatisticamente, pois houve menor celularidade dos dois lados do grupo 3 (Quadros 1 e 2). O dado de celularidade é o mais objetivo dos resultados obtidos no experimento, pois permite quantificar a ação do tratamento nas lesões e inferir a deposição de colágeno maduro na área cicatricial.

Ao nível local, estes óleos estimularam ou inibiram a produção de várias das citocinas estudadas.

O TNF- α teve seu valor aumentado sistemicamente com uso do óleo de arroz. Para análise estatística mais fidedigna da sua ação local, será necessário o emprego de um maior número de animais. No tecido, a ação anti-TNF- α observada, embora sem significância estatística, poderia ser empregada, também, em lesões de outras doenças inflamatórias, como a psoríase. Como observado nesta citocina, o efeito do óleo de arroz sobre a IL-12 e IFN- γ sugere ação favorável do uso do óleo de arroz nesta doença. O uso de imunomoduladores tópicos tem sido pouco estudado nestas doenças, mas os resultados encontrados reforçam a necessidade de novos estudos.

Podem ser citadas também a leptina, IL-2, IL-6 (pró-cicatriciais), a adiponectina e IFN- γ (anti-cicatriciais) e o TNF- α (efeito variável) como substâncias que foram mais influenciadas pelo óleo de arroz em relação ao grupo do óleo mineral, apontando este como um possível medicamento imunomodulador.

No caso da adiponectina, sua quantidade foi aumentada sistemicamente no último dia, quando é interessante que substâncias anti-inflamatórias atuem na lesão.

Tanto a IL-6 como a IL-12 mostraram que a redução sistêmica levou a uma menor diferença entre a ferida onde o produto foi aplicado (óleo de arroz e AGE,

respectivamente) e a ferida contralateral. Isto reforça a ação sistêmica do produto aplicado topicamente.

Algumas substâncias imunomoduladoras importantes para a cicatrização (e outras doenças relacionadas), como a IL-12, o IGF-1 e INF- α tiveram melhores resultados quando tratados com AGE do que com óleo de arroz. Isto indica a possibilidade de tratamento utilizando óleo de arroz e AGE em conjunto, com a finalidade de se obter resultados melhores com a produção e/ou inibição maior de citocinas.

Frente aos resultados obtidos, o uso tópico do óleo de arroz para o tratamento de feridas cutâneas em ratos mostrou-se eficaz, com significância estatística quando comparados com os animais sem tratamento. Estes resultados permitem considerar-se a produção de um produto de uso tópico a ser patenteado. A ação sistêmica sugerida pelos resultados exigirá novos estudos para possível uso oral ou parenteral do óleo de arroz como tratamento sistêmico de úlceras e, potencialmente, de outras doenças inflamatórias, como a psoríase.

As análises de leptina, IL-2, IL-6, adiponectina, IFN- γ e TNF- α corroboram com a melhor cicatrização observada clínica e histologicamente quando foi usado o óleo de arroz. O resultado obtido com as demais citocinas que apresentaram diferenças estatísticas podem ter diferido dos resultados esperados quer pelo pequeno número de animais, quer pela interação com outras substâncias neste modelo *in vivo*.

8. Referências bibliográficas

Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem.* 1990;59:783-836.

Armour A, Scott PG, Tredget EE. Cellular and molecular pathology of HTS: basis for treatment. *Wound Repair Regen.* 2007;15 Suppl 1:S6-17.

Avrameas S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. *Immunochemistry.* 1969; (6): 43-52.

Basu S, Laffineuse L, Presley L, Minium J, Catalano PM, Hauguel-de Mouzon S. In utero gender dimorphism of adiponectin reflects insulin sensitivity and adiposity of the fetus. *Obesity* 2009; 17(6):1144-9.

Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med.* 2001; 7(8):947-53.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15:749-95.

Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One.* 2008;3(4):e1886.

Clark, RAF. Cutaneous tissue repair. Basic biologic considerations. *J Am Acad Dermatol.* (13) p.701. 1985.

Dantas SRPE. Aspectos históricos do tratamento de feridas. In: Jorge SA. Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas, cap. 1, p. 3-6, São Paulo: Atheneu, 2003.

Dealey C. Cuidando de Feridas: um guia para as enfermeiras. São Paulo, Atheneu Editora, 2ª edição, 2001, capítulo 3: p. 49-65, capítulo 4: p. 68-89; cap. 9: p. 200-7.

Dhara R, Dhar P, Ghosh M. Dietary Effects of Pure and Diacylglycerol-rich Rice Bran Oil on Growth Pattern and Lipid Profile of Rats. *J Oleo Sci.* 2012;61(7):369-75.

Diegelmann RF, Cohen IK, Kaplan AM. The role of macrophages in wound repair: a review. *Plast Reconstr Surg.* 1981; (68):107-13.

Doillon, C.J.; Dunn, M.G.; Bender, E. et al. Collagen fiber formation in repair tissue. Development of strength and toughness. *Collagen Rel Res.* 1985; (5) p.481.

Duansak D, Somboonwong J, Patumraj S. Effects of Aloe vera on leukocyte adhesion and TNF-alpha and IL-6 levels in burn wounded rats. Clin Hemorheol Microcirc. 2003; 29(3-4):239-46.

Engvall E, Perlmann P. Enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. 1971; (8):871-875.

Ereno D. Curativo de Borracha. Revista Pesquisa Fapesp, 2003;88 (6) , disponível em <http://www.fapesp.org.br/www.revistapesquisa.fapesp.br>.

Faga A, Nicoletti G, Gregotti C, Finotti V, Nitto A, Gioglio L. Effects of thermal water on skin regeneration. Int J Mol Med. 2012; 29(5):732-40.

Ferrantini M, Capone I, Belardelli F. Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use. Biochimie. 2007; 89(6-7): 884-893.

Field FK, Kerstein MD. Overview of wound healing in moist environment. Am J Surg. 1994; 167(1A):2S-6S.

Gentilhomme E, Neveux Y, Lebeau, J.; Desmouliere, A.; Bergier, J.; Schmitt, D.; Haftek, M. Modulation of a fibrotic process induced by transforming growth factor beta-1 in dermal equivalents. Cell Biol Toxicol. 1999; 15(4) p.229-38.

Ghatak SB, Panchal SJ. Investigation of the Immunomodulatory Potential of Orizanol Isolated from Crude Rice Bran Oil in Experimental Animal Models. Phytother Res. 2012; 26(11): 1701-8.

Goldsmith MA, Greene WC *in* The Cytokine Handbook, 2^a ed., Academic Press, Nova York, (1994) p. 57.

Hamza T, Barnett JB, Li B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. Int J Mol Sci. 2010 Feb 26;11(3):789-806.

Hirano T, Matsuda T, Nakajima K. Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily. Stem Cells. 1994; 12(3):262-77.

Ho JN, Son ME, Lim WC, Lim ST, Cho HY. Anti-Obesity Effects of Germinated Brown Rice Extract through Down-Regulation of Lipogenic Genes in High Fat Diet-Induced Obese Mice. Biosci Biotechnol Biochem. 2012; 76(6):1068-74

Huang ZR, Lin YK, Fang JY. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*. 2009; 14(1):540-54.

Humbel RE. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem*. 1990; 190(3):445-62.

Ishida Y, Kondo T, Takayasu T, Iwakura Y, Mukaida N. The essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TGF-beta in the skin wound-healing process. *J Immunol*. 2004 Feb 1;172(3):1848-55.

Jayaraj AP, Tovey FI, Lewin MR, Clark CG. Duodenal ulcer prevalence: experimental evidence for the possible role of dietary lipids. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 15(6):610-6.

Kanzaki M, Morris PL. Identification and regulation of testicular interferon-gamma (IFNgamma) receptor subunits: IFNgamma enhances interferon regulatory factor-1 and interleukin-1beta converting enzyme expression. *Endocrinology*. 1998; 139(5):2636-44.

Kawai K, Kageyama A, Tsumano T, Nishimoto S, Fukuda K, Yokoyama S, Oguma T, Fujita K, Yoshimoto S, Yanai A, Kakibuchi M. Effects of adiponectin on growth and differentiation of human keratinocytes--implication of impaired wound healing in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 374(2):269-73.

Krause CD, Pestka S. Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. 2005; 106(3): 299-346.

Kubista M, Andrade JM, Bengtson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006; 27(2-3):95-125.

Lai MH, Chen YT, Chen YY, Chang JH, Cheng HH. Effects of rice bran oil on the blood lipids profiles and insulin resistance in type 2 diabetes patients. *J Clin Biochem Nutr*. 2012;51(1):15-8.

Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008; 63(8):879-84.

Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol*. 2003; 73(6):713-21.

Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. J Clin Invest. 1989; 84(2):640-6.

Makhluf HA, Stepniakowska J, Hoffman S, Smith E, LeRoy EC, Trojanowska M. IL-4 upregulates tenascin synthesis in scleroderma and healthy skin fibroblasts. J Invest Dermatol. 1996; 107(6):856-9.

Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. An Bras Dermatol 2003; 78(4):393-410.

Manosroi A, Chutoprapat R, Abe M, Manosroi W, Manosroi J. Anti-aging efficacy of topical formulations containing niosomes entrapped with rice bran bioactive compounds. Pharm Biol. 2012; 50(2):208-24.

Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. Wound Repair Regen. 1996; 4(4):411-20.

Mosher DF, Furcht LT. Fibronectin: review of its structure and possible functions. J Invest Dermatol. 1981; (77): 175.

Morari, J. A proteína PGC-1 α modula a expressão de interleucina-10 no fígado - avaliação da sua interação com os fatores de transcrição *NF κ B* e c-Maf. 2009. 83f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Médica). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987; 155:335-50.

Nakane PK, Pierce GB. Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. J Cell Biol. 1967; (33):307-318.

Nascimento AP, Costa AM. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. Br J Nutr. 2006; 96(6):1069-77.

Neumann H, Schmidt H, Wilharm E, Behrens L, Wekerle H. Interferon gamma gene expression in sensory neurons: evidence for autocrine gene regulation. J Exp Med. 1997; 186(12):2023-31.

Ortonne JP, Clévy JP. Physiologie de la cicatrisation cutanée. Ver Prat 1994; 44(13): 1733-4.

de Paepe K, Hachem JP, Vanpee E, Roseeuw D, Rogiers V. Effect of rice starch as a bath additive on the barrier function of healthy but SLS-damaged skin and skin of atopic patients. *Acta Derm Venereol.* 2002; 82(3):184-6.

Pittman, J. Effect of aging on wound healing: current concepts. *J Wound Ostomy Continence Nurs.* Jul-Aug; 34(4) p. 412-5. 2007.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2012. Viena, Áustria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <http://www.R-project.org>.

Sasidharan S, Logeswaran S, Latha LY. Wound Healing Activity of *Elaeis guineensis* Leaf Extract Ointment. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 336-47.

Shailajan S, Menon S, Pednekar S, Singh A. Wound healing efficacy of Jatyadi Taila: in vivo evaluation in rat using excision wound model. *J Ethnopharmacol.* 2011; 138(1):99-104.

Sierra S, Lara-Villoslada F, Olivares M, Jiménez J, Boza J, Xaus J. Increased immune response in mice consuming rice bran oil. *Eur J Nutr.* 2005 Dec;44(8):509-16.

Takayama C, de-Faria FM, de Almeida AC, Valim-Araújo Dde A, Rehen CS, Dunder RJ, Socca EA, Manzo LP, Rozza AL, Salvador MJ, Pellizzon CH, Hiruma-Lima CA, Luiz-Ferreira A, Souza-Brito AR. Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol.* 2011; 135(1):147-55.

Tredget EE, Wang R, Shen Q, Scott PG, Ghahary A. Transforming growth factor-beta mRNA and protein in hypertrophic scar tissues and fibroblasts: antagonism by IFN-alpha and IFN-gamma in vitro and in vivo. *J Interferon Cytokine Res.* 2000; 20(2):143-51.

Tumen I, Akkol EK, Süntar I, Keleş H. Wound repair and anti-inflammatory potential of essential oils from cones of Pinaceae: preclinical experimental research in animal models. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137(3):1215-20.

van Winkle, W. The fibroblast in wound healing. *Surg Gynecol Obstet* (124) p.369. 1967.

Ware CF, VanArsdale S, VanArsdale TL. Apoptosis mediated by the TNF-related cytokine and receptor families. *J Cell Biochem.* 1996; 60(1):47-55.

Yano W, Kubota N, Itoh S, Kubota T, Awazawa M, Moroi M, Sugi K, Takamoto I, Ogata H, Tokuyama K, Noda T, Terauchi Y, Ueki K, Kadowaki T. Molecular mechanism of moderate insulin resistance in adiponectin-knockout mice. *Endocr J.* 2008; 55(3):515-22.