

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**JANDREY PAULO JULIÃO DE SOUZA**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE  
FOLHAS DE *Chenopodium ambrosioides* L. NA BEXIGA DE RATOS  
SUBMETIDOS À CISTOTOMIA**

São Luís

2014

**JANDREY PAULO JULIÃO DE SOUZA**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE  
FOLHAS DE *Chenopodium ambrosioides* L. NA BEXIGA DE RATOS  
SUBMETIDOS À CISTOTOMIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Flávia Raquel Fernandes  
do Nascimento.

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Gonçalves Filho.

São Luís

2014

Souza, Jandrey Paulo Julião de

Efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. na bexiga de ratos submetidos à cistotomia/Jandrey Paulo Julião de Souza.-2014.

63f.

Impresso por computador (Fotocópia).

Orientadora: Flávia Raquel F. do Nascimento.

Coorientador: Antonio Gonçalves Filho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

1.*Chenopodium ambrosioides* 2.Cistotomia 3.Cicatrização  
4.Inflamação I.Título

CDU 615.451.

**CANDIDATO: Jandrey Paulo Julião de Souza**

**Título da Dissertação: Efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. na bexiga de ratos submetidos à cistotomia.**

A Banca Examinadora julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 26/06/2014, considerou o (a) candidato (a)

APROVADO

REPROVADO

1) Examinador: \_\_\_\_\_

Dr. Plínio da Cunha Leal

2) Examinador: \_\_\_\_\_

Dr. Orlando José dos Santos

3) Examinador: \_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup>. Lucilene Amorim Silva

4) Presidente: \_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup>. Flávia Raquel F. do Nascimento

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Jossival de Souza Ferreira e Iracema Julião de Souza, exemplos de determinação e luta, pelo amor incondicional, por apoiarem as minhas escolhas e por entenderem que a distância se faz necessária para o meu crescimento profissional. Pelas palavras de incentivo, pela paciência infinita e por sempre terem sido exemplos de como sermos pessoas melhores a cada dia... Agradeço pela educação que me proporcionaram durante toda minha vida!

À minha esposa Danielle Santos Melo de Souza, pelo incentivo, companheirismo e apoio nos momentos difíceis. Pelas incontáveis horas que você pacientemente me ouviu e me aconselhou. Pela compreensão nos períodos de ausência para completar mais esta jornada. Agradeço por fazer cada dia diferente do anterior, por me fazer a cada dia mais feliz e por fazer minha vida valer a pena. Obrigado por preencher meu coração de amor e alegria.

À pessoa que chegou de maneira inesperada, porém de forma tão intensa, trazendo paz para meu coração e sentido especial a minha vida, fonte infinita de alegria, a minha filha Marina Melo de Souza.

Vocês são muito especiais para mim.

## AGRADECIMENTOS

**A Deus**, pela força durante cada minuto de apreensão e dificuldade, por me mostrar os caminhos a seguir, por me dar saúde durante esta longa jornada, por colocar pessoas maravilhosas perto de mim e, principalmente, por me fazer acreditar em um futuro que vai além do que me limitei a sonhar.

**À minha Família**, pelo carinho e pelo apoio às minhas escolhas. Mesmo quando estamos distantes, sei que posso e sempre poderei contar com vocês.

**À minha orientadora, Professora Dra. Flávia Raquel Fernandes Nascimento**, pelo apoio à pesquisa proposta, pela disponibilização de seu laboratório, discussão dos métodos e resultados, além dos ensinamentos ao longo da execução dos experimentos, e ainda por suas importantes considerações durante a finalização desta dissertação.

**Ao meu coorientador, Professor Dr. Antônio Gonçalves Filho** pelo apoio, dedicação e paciência e por permitir que o sonho de fazer um mestrado se tornasse realidade. Por acreditar em mim e me incentivar a seguir adiante, apesar das dificuldades. Por me fazer acreditar que somos capazes de transformar o mundo por meio da ciência e da educação.

**Ao Médico Patologista Pablo Gustavo Ribeiro Furtado** pela realização dos exames anatomopatológicos.

**À Médica Patologista Paula Carvalho de Abreu e Lima** pela realização dos exames imuno-histoquímicos.

**Às Professoras, Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos e Dra. Lucilene Amorim Silva**, exemplos de profissional, sempre muito atenciosas e prestativas. Muito obrigado pelo grande empenho e esmero em suas importantes considerações para a melhoria da dissertação.

**À Professora Dra. Flávia Maria Mendonça do Amaral** por gentilmente nos fornecer o extrato hidroalcoólico de mastruz utilizado no estudo.

**Aos demais Professores** das disciplinas cursadas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFMA (PPGCS-UFMA), durante o curso de mestrado.

Agradeço, ainda, a todos do Laboratório de Imunofisiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFMA (CCBS-UFMA): **Graciomar Costa, Thiare Fortes, Mayara Cristina, Diego Arruda, Izabel Serra, Kátia Nascimento, Ana Karlla Sousa, Mádyllon Andrade, Luís Douglas, Raimundo Junior, Johnny Ramos** pela convivência prazerosa e pela ajuda na realização dos experimentos.

**Aos amigos e colegas** de curso de mestrado do PPGCS-UFMA. Obrigado por compartilharem seus conhecimentos, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

A todos que direta, ou indiretamente, fizeram parte desta importante fase da minha vida e que contribuíram para a concretização deste trabalho, cujos nomes não figuram neste texto, mas estão na memória e principalmente no coração. Muito obrigado!

*"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;  
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar".*

*Chico Xavier*

## RESUMO

A cicatrização da bexiga apresenta diversas particularidades. O contato do tecido vesical com urina e seus constituintes, a necessidade de uso de cateteres intra-vesicais que a impeça de encher e sofrer distensão precoce durante o período de cicatrização implicam em risco de complicações como infecção, fístula e formação de cálculos. A busca de produtos cicatrizantes alternativos tem sido constante. Neste contexto, a espécie vegetal *Chenopodium ambrosioides* L., conhecida popularmente como mastruz, mastruço e erva-de-Santa-Maria, que tem sido relatada pela população como anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante, parece uma boa perspectiva. O presente estudo investigou os efeitos do extrato hidroalcoólico (EHA) de folhas de *Chenopodium ambrosioides* na cicatrização da bexiga urinária em ratos da linhagem Wistar. Trinta e seis ratos foram submetidos a cistotomia e cistorrafia, e, em seguida, divididos em três grupos, tratados por gavagem, nos três primeiros dias de pós-operatório com: solução tamponada com fosfato (PBS) (grupo controle); EHA de *Chenopodium ambrosioides* (grupo mastruz), em dose diária de 5 mg/kg ou solução oral de piroxicam (grupo piroxicam), em dose diária de 0,3 mg/kg. Os animais foram sacrificados no 3º, 7º e 14º dias pós-cirúrgicos, a bexiga urinária foi retirada e preparada para análise histopatológica e imunohistoquímica para avaliação de miofibroblastos. Foram pesquisados, ainda, o índice de aderências, a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por células peritoneais e de óxido nítrico (NO) por células dos linfonodos e o número de células no peritônio e linfonodos. O EHA de *Chenopodium ambrosioides* foi capaz de diminuir a necrose isquêmica e a neoformação capilar, bem como, a proliferação fibroblástica, colagenização e inflamação crônica na parede vesical, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, o EHA não alterou o índice de aderências, a produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, a celularidade do peritônio e linfonodos e a expressão de alfa-actina em miofibroblastos quando comparado ao grupo controle. No presente estudo, o tratamento com EHA das folhas de *Chenopodium ambrosioides* apresentou ação anti-inflamatória crônica e anti-fibrótica sobre a bexiga urinária, após cistotomia seguida de cistorrafia, em ratos.

Palavras-chave: *Chenopodium ambrosioides*. Cistotomia. Cicatrização. Inflamação.

## ABSTRACT

Healing of the bladder has several particularities. The contact of the bladder tissue with urine and its constituents, the need for use of intra-bladder catheters to prevent it from filling and suffer early distension during the healing period means at risk of complications such as infection, fistula and calculus formation. The search for alternative healing products has been constant. In this context, the plant species *Chenopodium ambrosioides* L., popularly known as mastruz, mastruço and erva-de-Santa-Maria, has been reported by the population as antiinflammatory, analgesic and healing, seems a good prospect. The present study investigated the effects of the hydroalcoholic extract (HAE) of leaves of *Chenopodium ambrosioides* in the healing of the urinary bladder in Wistar rats. Thirty-six rats had been underwent cystotomy and reconstruction of the bladder and then divided into three groups, treated, by gavage, in the first three days postoperatively with: phosphate buffer solution (PBS) (control group); *Chenopodium ambrosioides* HAE (mastruz group) in daily dose of 5 mg/kg or oral solution piroxicam (piroxicam group) at a daily dose of 0.3 mg/kg. The animals were sacrificed at 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days post-surgery, the urinary bladder had been removed and prepared for histopathological and immunohistochemistry analysis to myofibroblast. The rate of adhesions, the production of oxygen peroxide in the peritoneum and nitric oxide in lymph nodes and cellularity of these organs were also surveyed. *Chenopodium ambrosioides* HAE was able to histologically decrease capillary neoformation and ischemic necrosis, as well as fibroblast proliferation, collagen and chronic inflammation of the bladder when compared to the control group. However, the HAE did not change adhesion, the production of oxygen peroxide and nitric oxide and cellularity of the peritoneum and lymph nodes and myofibroblasts actin productions when compared to the control group. In the present study, *Chenopodium ambrosioides* HAE showed chronic antiinflammatory and anti-fibrotic activity on the urinary bladder after cystotomy followed by bladder suture, in rats.

Keywords : *Chenopodium ambrosioides*. Cystotomy. Healing. Inflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Modelo multifatorial de mecanismos celulares e moleculares envolvendo a cicatrização. ....	19
Figura 2 -	Regulação do desenvolvimento da fibrose na lesão tecidual. ....	21
Figura 3 -	Histologia normal da parede vesical de rato, com epitélio mucoso intacto (E), lâmina própria (L), camada muscular lisa (SM) e serosa (S). ....	22
Figura 4 -	Aspecto geral (A) e detalhe das partes aéreas da planta (B) <i>Chenopodium ambrosioides</i> . ....	24
Figura 5 -	Fluxograma do experimento. ....	29
Figura 6 -	Procedimento de sacrifício: lavado peritoneal (A) e identificação de aderências (B). ....	32
Figura 7 -	Aspectos histológicos da bexiga urinária de ratos coradas com hematoxilina e eosina. Seta menor – infiltração de células polimorfonucleares. Seta maior – congestão vascular. ....	33
Figura 8 -	Aspectos histológicos da bexiga urinária de ratos coradas com Tricrômio de Masson. Seta – fibras colágenas coradas em azul. ....	34
Figura 9 -	Aspectos histológicos da bexiga urinária de ratos coradas pela técnica imuno-histoquímico com anticorpo anti $\alpha$ -actina de músculo liso. Seta – miofibroblastos de formato fusiforme com núcleo de coloração azulada e citoplasma acastanhado. ....	35
Figura10 -	Aspectos histopatológicos das bexigas urinárias de ratos, coradas pela técnica de hematoxilina e eosina, tratados com solução PBS (CONTROLE – A, D e G), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM – B, E e H), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (MASTRUZ – C, F e I), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 3°, 7° e 14° dias de pós-operatório. ....	40
Figura11 -	Aspectos histopatológicos das bexigas urinárias de ratos, coradas pela técnica de Tricrômio de Masson, tratados com solução PBS (CONTROLE – A), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM – B), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (MASTRUZ – C), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 14° dias de pós-operatório. ....	40

Figura12 -	Avaliação da atividade miofibroblástica pela expressão de $\alpha$ -actina de músculo liso em bexiga de animais tratados com solução PBS (CONTROLE), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (MASTRUZ), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 3°, 7° e 14° dias de pós-operatório. ...	41
Figura13 -	Aspectos imuno-histoquímicos (anticorpo 1A4 anti- $\alpha$ actina de músculo liso) das bexigas urinárias de ratos tratados com solução PBS (CONTROLE – A, D e G), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM – B, E e H), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (MASTRUZ – C, F e I), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 3°, 7° e 14° dias de pós-operatório. ....	42
Figura14 -	Contagem celular total e diferencial no lavado peritoneal. Os animais foram submetidos a cistotomia e cistorrafia e tratados com solução PBS (CONTROLE), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (MASTRUZ), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia. Os animais foram sacrificados após 3 (A), 7 (B) e 14 (C) dias e o lavado peritoneal realizado. ....	43
Quadro 1 -	Escore de Adesão Peritoneal de Nair. ....	32

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Escala de aderências de animais tratados com solução PBS (CONTROLE), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* (MASTRUZ), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 3°, 7° e 14° dias de pós-operatório. .... 38
- Tabela 2 - Avaliação histopatológica das bexigas de animais tratados com solução PBS (CONTROLE), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* (MASTRUZ), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 3°, 7° e 14° dias de pós-operatório. ... 39
- Tabela 3 - Concentração de peróxido de hidrogênio no líquido peritoneal, em  $\mu\text{M}$ , de animais tratados com solução PBS (CONTROLE), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* (MASTRUZ), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 3°, 7° e 14° dias de pós-operatório. .... 44
- Tabela 4 - Concentração de óxido nítrico no sobrenadante de células linfonodais ilíacas e mesentéricas, em  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^-$ , de animais tratados com solução PBS (CONTROLE), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* (MASTRUZ), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 3°, 7° e 14° dias de pós-operatório. .... 44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO<sub>2</sub> – Gás Carbônico

CONTROLE – Grupo Controle

COX – Ciclooxygenase

DAB – 3, 3'-diaminobenzidina

DPO – Dia Pós-Operatório

ECM – Matriz Extracelular

E – Epitélio Mucoso Vesical

EHA – Extrato Hidroalcoólico

FGF – Fator de Crescimento Fibroblástico

G - Gauge

HE – Hematoxilina-Eosina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio

IL – Interleucina

iNOS – Óxido Nítrico Sintetase

L – Lâmina Própria Vesical

LAP – Proteína Associada a Latência

LPS – Lipopolissacarídeo

MASTRUZ – Grupo Matruz

MMP – Metaloproteinase de Matriz

NF-κB – Fator Nuclear Kappa B

NO – Óxido Nítrico

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - Nitrito

NaNO<sub>2</sub> – Nitrito de sódio

p – Nível de Significância

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PGE – Fator de Crescimento Epidérmico

PIROXICAM – Grupo Piroxicam

RPMI – Meio de solução produzido no Instituto Memorial Park Roswell

S – Camada Serosa Vesical

SM – Camada Muscular Lisa Vesical

TGF- $\alpha$  – Fator de Crescimento Transformador - alfa

TGF- $\beta$  – Fator de Crescimento Transformador – beta

TLR – Receptor tipo Toll

TM – Tricrômio de Masson

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral – alfa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>18</b>
2.1 A resposta inflamatória e o reparo tecidual	18
2.2 Cicatrização e a bexiga urinária	23
2.3 <i>Chenopodium ambrosioides</i> L	25
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>29</b>
4.1 Animais	29
4.2 Preparo do extrato de folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	29
4.3 Delineamento do experimento	30
4.3.1 Procedimento cirúrgico	30
4.3.2 Tratamento dos animais	31
4.3.3 Sacrifício dos animais e coleta de material para análise	31
4.4 Avaliação macroscópica	32
4.5 Análise microscópica da bexiga	33
4.5.1 Análise histológica	33
4.5.2 Análise imuno-histoquímica	35
4.6 Contagem total e diferencial de células no peritônio	36
4.7 Obtenção e contagem de células dos linfonodos	37
4.8 Avaliação da secreção do peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	37
4.9 Avaliação da produção do óxido nítrico (NO)	38
4.10 Análise estatística	38
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>39</b>
5.1 Escala de aderências peritoneais	39
5.2 Achados histopatológicos	39
5.3 Achados imuno-histoquímicos	42
5.4 Contagem celular total e diferencial no peritônio e níveis de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no peritônio e NO nos linfonodos ilíacos e mesentéricos	43
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>53</b>
<b>APÊNDICE A</b> - Ficha protocolo de procedimentos cirúrgicos e sacrifício.	
<b>APÊNDICE B</b> - Ficha protocolo de análise histológica.	
<b>APÊNDICE C</b> - Ficha protocolo de análise imuno-histoquímica.	
<b>ANEXO 1</b> - Comitê de ética em pesquisa.	

## 1 INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória pós-cirúrgica envolvendo a bexiga urinária é caracterizada por particularidades decorrentes do contato do tecido com urina e seus constituintes, da necessidade de uso de materiais de sutura absorvíveis e de uso cateteres intravesicais (RATLIFF, 1995; LAURENCE et al., 1997; DRINKA, 2006; BORIN et al., 2008; BILBAO et al., 2014). No período pós-operatório, esses fatores alteram o padrão inflamatório e influenciam o processo de cicatrização neste órgão.

Substâncias anti-inflamatórias são usadas quase que rotineiramente no período pós-operatório de procedimentos cirúrgicos, no intuito de reduzir a dor e a resposta inflamatória. Essas drogas afetam a inflamação e a resposta imune local, que são necessárias para promover um adequado reparo tecidual, podendo contribuir para os surgimento de complicações pós-operatórias indesejáveis. Tais complicações incluem deiscência de feridas, infecção, fístulas, e são decorrentes do retardo na síntese de colágeno e consequente redução na força tênsil da ferida (BUSTI et al., 2005).

Tais motivos levaram pesquisadores a investigar substância com propriedades químicas capazes de modular a resposta inflamatória e imune e acelerar o processo cicatricial em bexigas urinárias, permitindo um menor tempo de permanência de cateter intravesical e reduzindo os riscos de complicações pós-operatórias (LUCENA et al., 2006; FERREIRA et al, 2006, GONÇALVES-FILHO et al., 2006; GONÇALVES-FILHO, 2013; BILBAO et al., 2014).

Algumas espécies vegetais são ricas em compostos fenólicos, flavonoides e alcaloides, capazes de agir por via inibitória das enzimas ciclooxigenase e 5-lipoxigenase, interferindo no metabolismo das prostaglandinas e do ácido araquidônico, promovendo efeitos anti-inflamatórios (CALIXTO, OTUKI e SANTOS, 2003; CASTRO et al, 2004). Além da ação sobre as prostaglandinas, os flavonoides parecem ter efeito parcial sobre o sistema antioxidante, os radicais de oxigênio e a superprodução de óxido nítrico (NO), que desempenha um importante papel em diversos modelos de inflamação (CUZZOCREA et al., 1998). Outro grupo químico envolvido no efeito anti-inflamatório de plantas medicinais é o dos terpenos. Sua ação anti-inflamatória se deve a inibição das prostaglandinas (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2007).

A avaliação fitoquímica dos extrato etanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. mostrou a predominância de compostos terpênicos, alcaloides, taninos condensados, saponinas e flavonoides (NEIVA et al., 2011).

*Chenopodium ambrosioides*, além de efeito anti-inflamatório comprovados em estudos feitos por Ibironke e Ajiboye (2007), Pereira (2009), Grassi et al. (2013) e Gonçalves-Filho (2013), apresentou também efeito cicatrizante em pesquisas desenvolvidas por Sérvio et al. (2011) e Grassi et al. (2013) em modelos de cicatrização de feridas cutâneas e por Pinheiro-Neto et al. (2005) utilizando modelos de cicatrização óssea.

Apesar de haver evidências empíricas e experimentais do efeito cicatrizante de *Chenopodium ambrosioides* L., não há na literatura relatos de experimentos mostrando o efeito dessa espécie vegetal na cicatrização de bexiga urinária. Diante disto, nosso grupo decidiu investigar se o extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* apresentaria atividade anti-inflamatória e cicatrizante na bexiga urinária de ratos, submetidos à cistotomia seguida de cistorrafia.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

O reparo tecidual é um processo dinâmico que envolve a interação complexas entre mediadores inflamatórios solúveis, células residentes e leucócitos e moléculas constituintes da matriz extracelular. O objetivo primordial da cicatrização é a reconstituição da integridade e homeostase tecidual (EMING, KRIEG e DAVIDSON, 2007).

O processo de cicatrização de tecidos envolve uma sequência de estágios independentes e sobrepostos, tais como: inflamação, quimiotaxia e proliferação celular, diferenciação e remodelação tecidual. Estes são agrupados, para melhor entendimento, em três fases: (1) inflamatória, (2) proliferativa - formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular - e (3) de remodelação (CLARCK, 2005).

A participação da inflamação no reparo tecidual é um fenômeno complexo e nem sempre benéfico para o tecido. O reparo do tecido lesado normalmente está associado à formação de tecido cicatricial e fibrose, sendo este fenômeno um resultado direto das interações inflamatórias do sistema imune e fibroblastos no sítio da lesão (HARTY et al., 2003).

Meshner e Neff (2005) propuseram que a evolução do sistema imune de mamíferos gerou interações celulares inflamatórias nos sítios de injúria proporcionando maior defesa contra micro-organismos e facilitação do reparo tecidual, embora prejudicando a capacidade regenerativa do tecido.

O conhecimento dos diversos fatores de crescimento, citocinas e peptídeos bioativos envolvidos na cicatrização é a chave para o desenvolvimento de produtos capazes de estimular o processo cicatricial ou substituir os tecidos lesados (METCALFE e FERGUNSON, 2007).

### **2.1 A resposta inflamatória e o reparo tecidual**

A resposta inflamatória se inicia tão logo haja injúria tecidual. Os primeiros eventos ocorridos envolvem a ativação da cascata de coagulação e atuação dos componentes do sistema imune inato (LEE e KARULI, 2010).

As plaquetas liberam fibrinogênio que, uma vez convertidos a fibrina pela trombina, adiciona fibrina ao coágulo. A trombina tem ainda efeito de aumentar a

permeabilidade vascular e facilitar a migração de células inflamatórias para o sítio da lesão. As plaquetas circulantes se agregam no local da lesão e vários mediadores inflamatórios são liberados, tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador alfa (TGF- $\alpha$ ) e beta (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento fibroblástico (FGF) (HOJO et al., 2003; GU et al., 2004).

Células do sistema imune inato são ativadas através de receptores de reconhecimento de padrões moleculares, capazes de ligarem-se a moléculas estruturais de patógenos, normalmente não encontradas em mamíferos. São uma família de proteínas conhecidas como receptores tipo Toll (Toll-like receptors - TLR) (LEE e KARULI, 2010).

O TLR-2, que é capaz de reconhecer peptidoglicanos estruturais de bactérias, e o TLR-4, que é ativado por lipopolissacarídeos (LPS, ou endotoxina), uma vez estimulados, ativam o fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), molécula capaz de induzir a expressão de genes envolvidos no processo inflamatório. A translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo celular, estimula a produção de citocinas, isto é, interleucinas tipo 6 e 8 (IL-6 e -8) e fator de necrose tumoral (TNF), a maquinaria para liberação de prostaglandina (via ativação de enzima ciclooxigenase 2 [COX-2]) e genes que regulam a matriz extracelular (ECM) (HARTY et al., 2003; EMING, KRIEG e DAVIDSON, 2007).

A segunda onda da resposta inflamatória em tecidos lesados é caracterizada pelo influxo inicial de neutrófilos, no qual o número mantém-se aumentado, atingindo o máximo por volta de 24-48 horas após a lesão. Quando o número de neutrófilos começa a cair, os macrófagos passam a controlar e repovoar o sítio da ferida. Os neutrófilos e macrófagos possuem papel importante na injúria, pela sua atividade microbicida e fagocítica de modo a garantir não só a destruição de agentes infecciosos, mas promovendo a remoção de restos celulares que possam amplificar a inflamação e atrapalhar o processo de reparo do tecido (Figura 1).

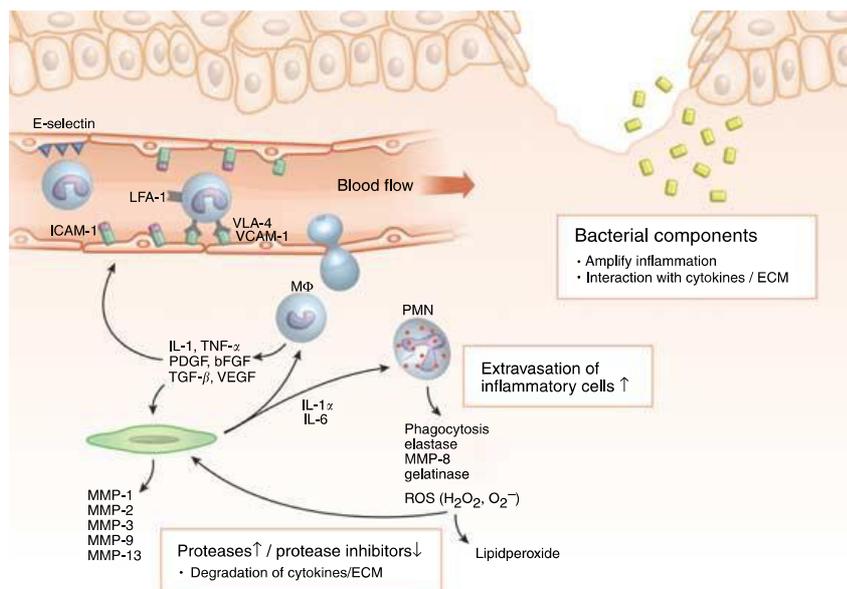


Figura 1 – Modelo multifatorial de mecanismos celulares e moleculares envolvendo a cicatrização (Fonte: EMING, KRIEG e DAVIDSON, 2007).

Citocinas como a IL-1 e TNF- $\alpha$  são liberadas por macrófagos e fibroblastos ativados. IL-1 e TNF- $\alpha$  reforçam a migração de células inflamatórias para o local da lesão, são o gatilho para a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais e estimulam a apresentação de antígenos (HARTY et al., 2003). Em adição, eles aumentam e ativam enzimas como a colagenase e estromelisina, degradadoras de ECM, e estimulam a síntese de outros mediadores inflamatórios, tal qual prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) por fibroblastos.

As citocinas pro-inflamatórias são o gatilho para a ativação da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) e a produção de NO. A liberação de NO regula a formação de colágeno, a proliferação celular e a contração da ferida. (HESSE et al., 2001; WITTE e BARBUL, 2002). A resposta inflamatória aguda é o passo inicial de recrutamento de células de defesa que protegem os tecidos lesados de micro-organismos invasores, promovem a remoção de restos celulares mortos e criam um ambiente propício à proliferação de células envolvidas na reconstituição do padrão tecidual inicial.

O fim da fase de resposta inflamatória coincide com a migração de fibroblastos e células endoteliais e a formação de tecido de granulação. Citocinas e fatores de crescimento regulam a quimiotaxia e a proliferação de fibroblastos, a

síntese de colágeno, ECM e a angiogênese. Angiogênese e fibroplasia, então, acontecem. Com fibroblastos se mostrando o tipo celular dominante (HINZ, 2007).

A reepitelização também ocorre ao mesmo tempo que a fibroplasia, com os queratinócitos migrando através do tecido de granulação da borda da ferida. Tão breve os queratinócitos tenham restabelecida a barreira epitelial, eles assumem o fenótipo das células basais locais e se diferenciam no epitélio original (EMING, KRIEG e DAVIDSON, 2007).

Durante a inflamação, linfócitos T são polarizados em células efectoras  $T_H1$  ou  $T_H2$  com perfis distintos de produção de citocinas. As chamadas citocinas  $T_H1$  incluem IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-18 e produzem imunidade por ativar linfócitos T citotóxicas ( $CD8^+$ ), células *natural killers* (NK) e macrófagos. Citocinas  $T_H2$ , notadamente IL-4, IL-5, IL10 e IL-13 estimulam uma resposta imune humoral. A remodelagem tecidual associada com padrão de citocinas  $T_H1$  promove a regeneração do tecido, enquanto citocinas  $T_H2$  favorecem a ativação de fibroblastos, produção de colágeno e fibrogênese (SHÄFFER e BARBUL, 1998; HARTY et al., 2003; AZOUZ et al., 2004).

O padrão de resposta inflamatória tipo  $T_H2$  induz a produção de colágeno por vários mecanismos, contudo a IL-13 parece ser o mediador crucial através da estimulação de TGF- $\beta$ 1 por macrófagos. TGF- $\beta$ , citocina produzida principalmente por fibroblastos, algumas células endoteliais, macrófagos e células T, é uma substância com forte capacidade de atrair fibroblastos, célula responsável pela síntese de colágeno e fibronectina (SHÄFFER e BARBUL, 1998).

Existem três isoformas de TGF- $\beta$  em mamíferos – TGF-  $\beta$ 1, TGF-  $\beta$ 2 e TGF-  $\beta$ 3. Os níveis elevados de TGF- $\beta$ 1 (e TGF-  $\beta$ 2) na fase inicial de cicatrização, deve-se à liberação dessas moléculas pela degranulação de plaquetas e, subsequentemente, por células inflamatórias, tais como monócitos e macrófagos. O TGF-  $\beta$ 1 é um fator de crescimento armazenado de forma inativa, como um homodímero que é não covalentemente acoplado a uma proteína associada a latência (LAP). A ligação do fator de crescimento aos seus receptores requer a dissociação da LAP, um processo catalizado por vários agentes, entre eles plasminogênio, trombospondina e metaloproteinases de matrix (MMP). IL-13, além de induzir a produção de TGF-  $\beta$  latente, promove a expressão de MMP que clivam o complexo TGF-  $\beta$ /LAP (SHAH, FOREMAN e FERGUNSON, 1994a; SHAH, FOREMAN e FERGUNSON, 1995).

Outro mecanismo provável na resposta de reparo tecidual com padrão de citocinas  $T_H2$  é a indução da expressão de iNOS em macrófagos, uma vez que regula a produção de colágeno (HESSE et al, 2001; WITTE e BARBUL, 2002).

Fibroblastos e outras células estruturais expressam o receptor de superfície CD40 e são, por isso, capazes de receber ativação adicional por CD40L, molécula presente na superfície de linfócitos T auxiliares, mastócitos, basófilos, eosinófilos e plaquetas. A sinalização via CD40 em fibroblastos ativa o fator de transcrição NF- $\kappa$ B que estimula a síntese de citocinas adicionais, componentes da ECM e COX-2, com consequente produção de  $PGE_2$ .  $PGE_2$  está envolvida em vários aspectos da inflamação como dor e febre, além de estimular a produção de citocinas  $T_H2$  promovendo a fibrose (MESHER e NEFF, 2005) (Figura 2).

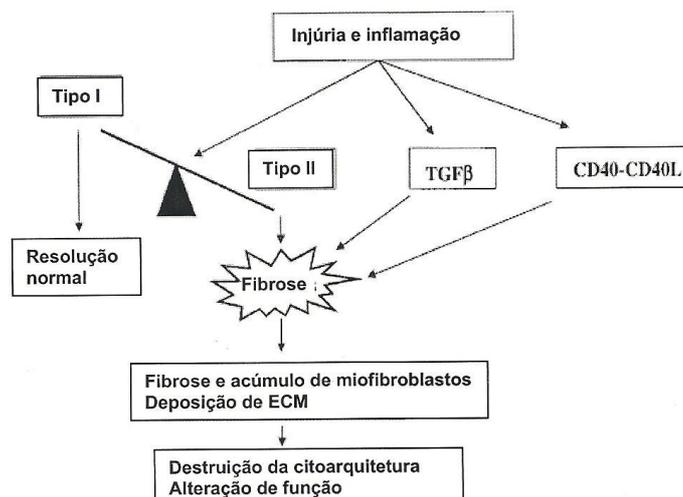


Figura 2 – Regulação do desenvolvimento da fibrose na lesão tecidual (Fonte: SIME e O'REILLY, 2001).

A remodelação do colágeno ocorre através da ação das MMP produzidas por fibroblastos e macrófagos, esta é uma fase da reparo tecidual que pode durar meses e é caracterizada pela formação de cicatriz. O balanço entre o colágeno recentemente formado e a destruição do colágeno antigo é responsável pelas características finais da cicatriz (EMING, KRIEG e DAVIDSON, 2007). Feridas em embriões, que curam sem cicatrizes, exibem um número maior de diferenças em relação a de tecidos adultos, tais como: ausência de coágulo de fibrina e plaquetas; resposta inflamatória marcadamente mais reduzida, consistindo de um pequeno número de células

inflamatórias pobremente diferenciadas e níveis elevados de moléculas envolvidas na morfogênese e crescimento do epitélio (CHIN et al., 2000).

## 2.2 Cicatrização e a bexiga urinária

A bexiga urinária é o órgão responsável por armazenar temporariamente a urina até que o organismo promova sua eliminação em um momento oportuno. Três camadas constituem a parede da bexiga urinária. Uma camada externa, a adventícia, composta de tecido areolar; uma camada intermediária, a muscular e a mais profunda, a mucosa, uma membrana formada por epitélio transicional e uma lâmina própria (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004) (Figura 3).

Em algumas situações específicas como trauma ou procedimentos cirúrgicos os mecanismos de proteção do tecido vesical são quebrados, e as células são expostas a agentes constituintes da urina, que iniciam uma resposta inflamatória local, comprometendo de certa forma o processo cicatricial (BILBAO et al., 2014). O contato do material de sutura com a urina aumenta o risco de complicações em cirurgias vesicais como formação de cálculos e fístulas urinárias (HOLMES, JAMES e WHITFIELD, 1992; OOSTERLINK et al., 1993).

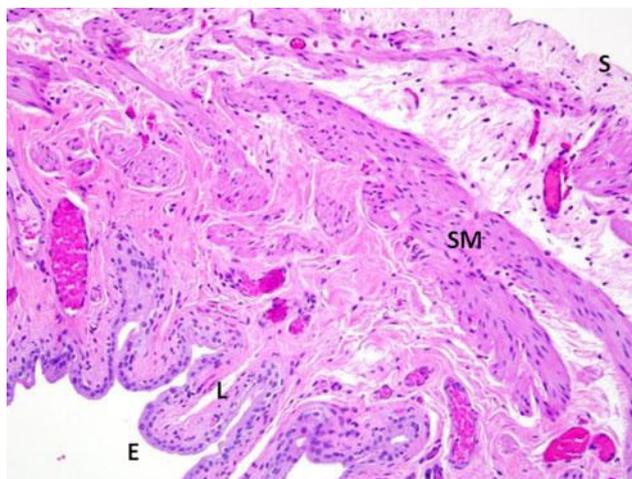


Figura 3 – Histologia normal da parede vesical de rato, com epitélio mucoso intacto (E), lâmina própria (L), camada muscular lisa (SM) e serosa (S) (Fonte: BILBAO et al., 2014).

Na reconstrução da bexiga urinária o tipo de material de sutura utilizado influencia consideravelmente a resposta inflamatória local e o resultado final da cicatrização. As suturas absorvíveis reduzem a tensão do tecido em ferida vesicais,

observando-se a reestruturação completa da musculatura lisa por volta do 21 dias de cicatrização. Fios de sutura não absorvíveis como seda e mersilene apresentam maior reação tecidual, o que não é observado com fios monofilamentares como polipropileno, embora todos aumentem o risco de formação de cálculos quando expostos ao lúmen vesical. Os fios de sutura absorvíveis como catgut simples e polyglactina-910 apresentam menor reação tecidual, sendo este considerado o fio ideal para sutura de bexiga (HASTINGS et al., 1975).

A implementação de medidas auxiliares à sutura do tecido lesado na reconstrução da bexiga urinária pode ser aceita. Por se tratar de um órgão distensível, há a recomendação do uso de cateter vesical no período pós-cirúrgico até que a integridade vesical seja restaurada. Se por um lado o cateter vesical diminui o risco de deiscência e formação de fístulas, por outro, aumenta o risco de infecção e resposta inflamatória local comprometendo a cicatrização (DRINKA, 2006).

O uso de medicações tradicionais com efeito analgésico e anti-inflamatório durante o período pós cirúrgico influencia a cicatrização tecidual, em geral, reduzindo a força tênsil da ferida (BUSTI et al., 2005). As particularidades da cicatrização da bexiga urinária e as potenciais complicações consequentes de um reparo tecidual deficiente motivam pesquisas por um melhor entendimento do processo cicatricial envolvendo este órgão (RATLIFF, 1995; LAURENCE et al., 1997; BORIN et al., 2008; BILBAO et al., 2014) e por produtos alternativos com potencial de promover sua cicatrização de forma mais rápida e com melhor qualidade (GONÇALVES-FILHO et al., 2006; LUCENA et al., 2006; FERREIRA et al., 2006).

Os produtos naturais tem sido a maior fonte de fármacos por séculos, como demonstrado com o isolamento da morfina a partir do ópio no início do século XIX e o isolamento de outros fármacos. Estima-se que atualmente 30% dos medicamentos utilizados derivam direta ou indiretamente de produtos naturais (CALIXTO e SIQUEIRA JR, 2008). Desta forma a propriedade farmacodinâmica, anti-inflamatória, imuno-reguladora e cicatrizante dos produtos naturais têm sido testadas em diversos tecidos (MORAES et al., 2013).

### 2.3 *Chenopodium ambrosioides* L.

A espécie *Chenopodium ambrosioides* é originária das Américas Central e do Sul e atualmente é uma espécie de distribuição global, na forma silvestre ou cultivada. É um arbusto da família Amaranthaceae que pode atingir até um metro de altura, de forte aroma. Apresenta caule piloso e sulcado, folhas inteiras e simples, sendo as superiores sésseis e as inferiores pecioladas, de dimensões variadas e providas de pelos (LORENZI e MATOS, 2002) (Figura 4).



Figura 4 - Aspecto geral (A) e detalhe das partes aéreas da planta (B) *Chenopodium ambrosioides* (Fonte: PATRÍCIO, 2011).

A utilização de *Chenopodium ambrosioides* no tratamento popular é hábito comum praticado por povos nativos das Américas. Chá, infusão ou cataplasma das folhas, raízes e inflorescências da planta são as maneiras de preparo da planta mais comuns utilizadas pela população do nordeste brasileiro (LIMA et al., 2006).

Neiva et al. (2011) avaliaram a constituição química dos extratos hidroalcoólicos de *Chenopodium ambrosioides* de amostra obtidas no Município de São Luís, Estado do Maranhão, preparados por diferentes métodos de extração (maceração, percolação e extração por Soxhlet) e hidromódulos (relação droga/solvente). Extrato hidroalcoólico (etanol a 70%) das folhas de *Chenopodium ambrosioides* obtidos por método de percolação na relação de hidromódulo de 1:5 apresenta resultado mais expressivo de constituintes químicos. Os testes mostraram-se positivos para presença de ácidos orgânicos, saponinas, taninos condensados, esteroides, triterpenos, flavonóis e flavonas (NEIVA et al., 2011).

O extrato etanólico de folhas e caule de *Chenopodium ambrosioides* mostraram a presença dos monoterpenos ascaridol e 1,2,3,4-tetrahidroxi-*p*-metano nas proporções de 0,089% e 0,045% de massa de planta seca, respectivamente, em estudo realizado por Grassi et al. (2013). O extrato hidroalcoólico (etanol a 70%) obtido pelo método de percolação mostrou-se seguro e não induziu toxicidade quando usado em doses de 5, 50 e 500 mg/kg por via oral em modelos murinos (PEREIRA et al., 2010).

Compostos químicos, como flavonoides, terpenoides, esteróis e fenóis apresentam propriedades farmacológicas antioxidantes e efeito imunoestimulante, anti-inflamatório, analgésico e cicatrizante (CASTRO et al., 2004; CALIXTO e SIQUEIRA JR, 2008). O efeito imunoestimulante pode ser decorrente da ativação de macrófagos e do recrutamento de células pelos órgãos linfoides secundários, como baço e os linfonodos (CRUZ et al. 2007). *Chenopodium ambrosioides* apresentou potencial imunoestimulante também através do aumento da proliferação de linfócitos murinos (ROSSI-BERGMANN, COSTA e MORAES, 1997).

Quando testada a dosagem de 5 mg/Kg de extrato hidroalcoólico de *C. ambrosioides* por via oral, em modelos murinos, esta apresentou efeito anti-inflamatório em modelos de edema de pata e de granuloma por implantes subcutâneos de bola de algodão, embora não tenha sido capaz de alterar a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peritoneal em modelos de peritonite induzida por lipopolissacarídeos (PEREIRA, 2009).

O extrato metanólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides*, em doses que variavam de 300 a 700 mg/kg de peso animal, possuíam efeito anti-inflamatório, reduzindo o edema de pata induzido por carregenina e a formação de granuloma por implante de bola de algodão em ratos (IBIRONKE e AJIBOYE, 2007). Gonçalves-Filho (2013) comprovou o efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico (EHA) de *C. ambrosioides* semelhante ao do diclofenaco sódico, utilizando modelo de cistite hemorrágica induzidas por ciclofosfamida em ratos.

Ibironke e Ajiboye (2007) detectaram ainda efeito analgésico, pelo aumento do tempo de latência no teste de estimulação da placa térmica e redução no número de contorções induzidas por ácido acético. O extrato aquoso de *Chenopodium ambrosioides* também demonstrou efeito analgésico em modelos de ácido acético em camundongos (SOUSA et al., 2012).

Sérvio et al. (2011) verificaram efeito cicatrizante do EHA de *Chenopodium ambrosioides* em feridas cutâneas de ratos, com ou sem curativo de cobertura com

gazes. Esse extrato mostrou ainda atividade cicatrizante sobre fraturas ósseas (PINHEIRO-NETO et al., 2005). Grassi et al. (2013) confirmaram os efeitos anti-inflamatório, anti-nociceptivo e cicatrizante do extrato etanólico de *Chenopodium ambrosioides* em modelos de roedores.

Sendo assim, os extratos obtidos a partir da planta *Chenopodium ambrosioides* são de baixo custo e fácil obtenção (NEIVA et al., 2011), baixa toxicidade (PEREIRA et al., 2010) e apresentaram efeito anti-inflamatório (IBIRONKE e AJYBOYE, 2007; PEREIRA, 2009; GRASSI et al., 2013; GONÇALVES-FILHO, 2013), analgésico (IBIRONKE e AYBOIE, 2007; SOUSA et al., 2012; GRASSI et al., 2013) e cicatrizante (PINEIRO-NETO et al., 2005; SÉRVIO et al. 2011; GRASSI et al, 2013). Tais propriedades abrem perspectivas no sentido de tornar *Chenopodium ambrosioides* uma alternativa terapêutica eficaz em incrementar o processo de cicatrização vesical.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico (EHA) das folhas de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) na cicatrização de bexigas urinárias em ratos.

#### 3.2 Objetivos específicos

Analisar as alterações macroscópicas encontradas em modelos cirúrgicos na bexiga urinária de ratos tratados com EHA de *Chenopodium ambrosioides*.

Avaliar as alterações histopatológicas encontradas na bexiga urinária de ratos tratados com EHA de *Chenopodium ambrosioides*.

Investigar as alterações na expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso na bexiga urinária de ratos tratados com EHA de *Chenopodium ambrosioides* por meio de análise imunohistoquímica.

Investigar o efeito sistêmico do tratamento do EHA de *Chenopodium ambrosioides* em modelos cirúrgicos na bexiga urinária de ratos por meio da contagem diferencial de leucócitos no peritônio.

Avaliar o efeito anti-inflamatório do EHA de *Chenopodium ambrosioides* sobre a produção *ex-vivo* de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi realizado no Laboratório de Imunofisiologia (LIF) do Departamento de Patologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e no Laboratório de Fitofármacos, do Departamento de Farmácia do CCBS da UFMA.

### 4.1 Animais

Foram utilizados 36 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia Mammalia) da linhagem WISTAR, adultos, machos, com idade aproximada de 60 dias, pesando entre 200 e 250 g. Os ratos foram mantidos em 9 gaiolas de 0,15m<sup>2</sup>, com 4 animais por gaiola, recebendo água e ração padrão para espécie, sendo adaptados em condições ambientes de temperatura e umidade, em ciclo claro-escuro de 12 horas. Passaram por uma fase de adaptação prévia de uma semana até o início do experimento. O uso dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão, sob protocolo 23115-012975/2008-43 (Anexo 01).

### 4.2 Preparação do extrato de folhas de *Chenopodium ambrosioides*

Foram coletadas folhas da parte aérea de uma mesma planta *Chenopodium ambrosioides* do Horto Medicinal Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Berta Lange de Morretes, UFMA, armazenadas em saco plástico e, em seguida, levadas ao Laboratório de Fitofármacos da UFMA. O material foi identificado e ficou catalogado no Herbário Ático Seabra da UFMA (São Luís, MA) sob exsicata n<sup>o</sup> 1148.

As folhas de *C. ambrosioides*, depois de limpas, foram secas em estufa a 39°C. Depois de trituradas em moinho de facas, obtendo pó com granulometria entre 250 e 710 µm, resultando em 594g de matéria prima pulverizada, estas foram percoladas em uma solução hidroalcolica a 70%, com hidromódulo de 1:5. O processo de percolação e repercolação ocorreram durante uma semana, sendo em

seguida submetida à filtração e concentração em rota evaporador, para obtenção do extrato seco. Posteriormente, o extrato seco foi pesado para o cálculo do rendimento. (Neiva et al., 2011). Foi obtido um rendimento de 16,03% em relação às folhas secas trituradas.

### 4.3 Delineamento do experimento

Os 36 animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos (12 animais / cada) após o término da cirurgia inicial (cistotomia e rafia vesical), denominados grupo Controle, grupo Mastruz e grupo Piroxicam. Quatro animais por grupo foram sacrificados no 3º, 7º e 14º dias pós-operatórios (DPO). O delineamento experimental obedeceu aos passos descritos na Figura 5.

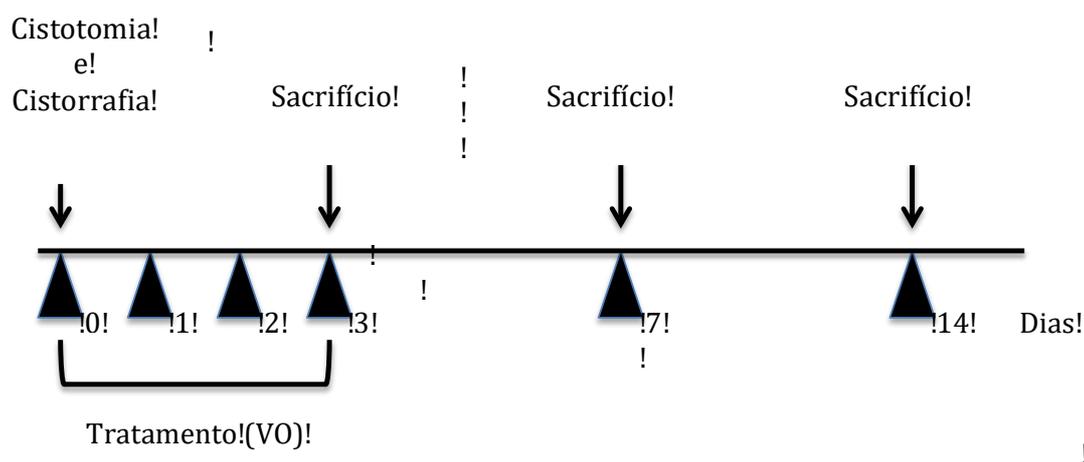


Figura 5 – Fluxograma do experimento.

#### 4.3.1 Procedimento cirúrgico

Os ratos foram mantidos em jejum por 6 horas prévias ao procedimento cirúrgico. Os animais foram pesados e submetidos à anestesia, por aplicação intramuscular de 50 mg/Kg de cloridrato de ketamina (Dopalen® - SESPO) e 10 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Kensol® - KONINGLAB), na face posterior da coxa do animal. A anestesia foi considerada eficaz após o animal estar inconsciente, sem movimentos voluntários e sem reação ao manuseio cirúrgico.

Após a anestesia, foram realizadas: epilação da metade inferior do abdome; anti-sepsia da região abdominal com solução degermante de clorexidina 4% (Hioex® -

Rioquímica); colocação de campo fenestrado estéril sobre o animal, expondo o sítio operatório; incisão mediana infraumbilical de 2 cm, com bisturi de lâmina nº 11, interessando pele, aponeurose e peritônio, expondo-se a cavidade abdominal.

Foi realizada a abertura da bexiga urinária com perfuração da cúpula vesical com o bisturi, introdução de uma das metades de uma tesoura e a secção da parede ventral, respeitando o limite de um cm (marcação feita previamente na tesoura), seguida do fechamento vesical com fio de poliglactina 910 5-0 (Safil® - B. Braun), com agulha cilíndrica de 1,7 cm, em plano único total, transfixando a parede da bexiga, com quatro pontos distantes 2 mm entre si e da borda incisional.

A síntese da parede abdominal foi realizada com fio de nylon 5-0 (Mononylon Ethilon® - Ethicon/Johnson & Johnson), com agulha cortante de 2,0 cm, em dois planos, músculo-aponeurótico e cutâneo, com sutura contínua. A ferida foi limpa com gaze embebida em solução de cloreto de sódio a 0,9% (HalexIstar).

Ao fim do procedimento, os animais foram distribuídos por sorteio, para comporem os grupos e subgrupos.

#### **4.3.2 Tratamento dos animais**

Os animais foram avaliados diariamente no período pós-operatório, verificando-se o peso, as condições da ferida operatória e as possíveis complicações, utilizou-se ficha de acompanhamento específica (apêndice A).

Os animais do grupo controle receberam 1 mL/kg de solução PBS; os do grupo mastruz, 5 mg/kg de solução de EHA de *Chenopodium ambrosioides*, a 5 mg/mL e os do grupo piroxicam, 0,3 mg/kg de solução piroxicam (Feldene® - Pfiser), na concentração de 0,3 mg/mL. A aplicação das substâncias iniciou-se no pós-operatório imediato, após o animal estar recuperado da anestesia, por via oral, utilizando-se sonda de gavagem metálica, e foi repetida mais duas vezes, com intervalos de 24 horas.

#### **4.3.3 Sacrifício dos animais e coleta de material para análise**

O sacrifício dos animais foi realizado no 3º, 7º, 14º dias de pós-operatório, de acordo com o grupo a qual pertenciam. Os animais receberam anestesia intramuscular, com cloridrato de xilazina e cloridrato de ketamina, em doses

progressivas até a morte, caracterizada pela ausência de reflexos e parada respiratória. Foram sacrificados 4 animais em cada subgrupo, totalizando 12 animais por data de sacrifício.

Após a morte, os animais foram exanguinados por uma punção cardíaca para-esternal oblíqua, com agulha 21G (gauge) e aspiração de sangue com seringa de 20 mL. O abdome foi epilado completamente e procedeu-se ao lavado peritoneal: uma punção com agulha 21G foi feita no flanco direito do animal, instalado 5 mL de solução PBS, o abdome foi agitado com a borda de uma pinça de dissecação, nova punção foi feita no flanco contralateral e aspirado o líquido previamente infundido contendo células peritoneais. O líquido do lavado peritoneal foi acondicionado em tubo estéril de polipropileno de fundo cônico, para contagem celular e análise de espécies reativas de oxigênio.

Foi realizada a abertura da parede abdominal. Duas incisões longitudinais lateralmente eram continuadas por uma incisão transversa infracostal, permitindo o levantamento do retalho da parede abdominal. Prosseguiu-se a isso, a lise de aderências, quando estas estavam presentes, retirada da bexiga urinária por secção do colo vesical com bisturi lâmina nº 11. A bexiga urinária era seccionada lateralmente para abertura do órgão e fixada com agulhas estéreis em placas de isopor e depois imersas em recipiente com solução de formalina tamponada a 10%, de modo que a superfície do suporte contendo o espécime cirúrgico ficasse em contato com o líquido.

O cólon do animal foi retirado por meio de secção com tesoura, expondo a cadeia linfonodal ilíaca bilateralmente. Um linfonodo da cadeia ilíaca externa, distando aproximadamente 01 cm inferiormente da bifurcação da artéria aorta foi retirado, pesado e processado para análise bioquímica. Outro linfonodo da cadeia mesentérica foi escolhido aleatoriamente e retirado, pesado e passou pelo mesmo processo do primeiro.

#### **4.4 Avaliação macroscópica**

Após o sacrifício dos animais e aberta da parede abdominal foi realizado um inventário à procura de infecções, aderências peritoneais e entre os órgãos, deiscência da sutura vesical, formação de cálculos e fístulas urinárias. Neste tempo, os achados macroscópicos foram anotados e foi realizada a documentação fotográfica (Figura 6).

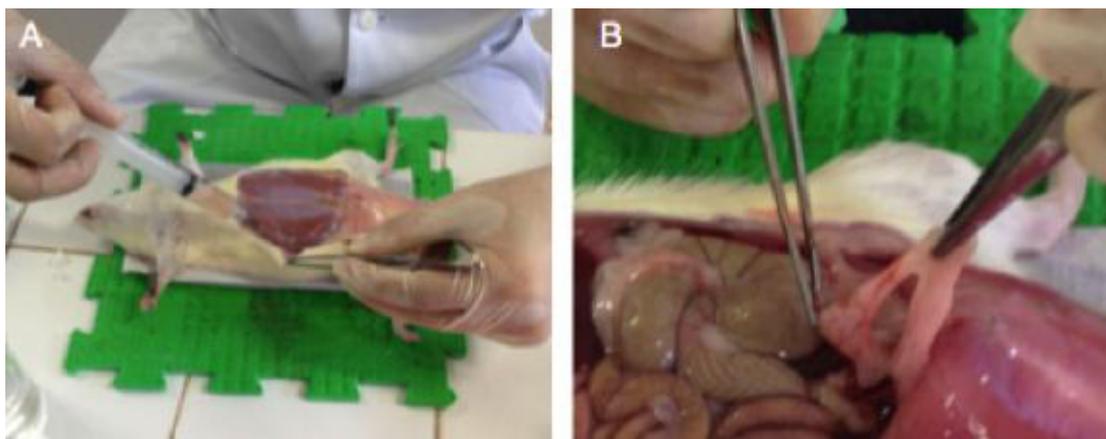


Figura 6 – Procedimento de sacrifício: lavado peritoneal (A) e identificação de aderências (B) (Fonte: arquivo próprio).

Quando encontradas aderências, estas foram classificadas pelo escore de NAIR (NAIR, BHAT e AURORA, 1974) (Quadro 1).

Quadro 1. Escore de Adesão Peritoneal de Nair (Fonte: NAIR, BHAT e AURORA, 1974).

ESCORE (grau)	ACHADO
0	Sem adesão
1	Adesão única entre dois órgãos ou entre um órgão e a parede abdominal
2	Duas adesões entre órgãos ou um órgão e a parede abdominal
3	Mais de duas adesões entre órgãos ou uma massa de adesão generalizada do intestino sem aderir à parede abdominal
4	Aderências generalizadas entre órgãos e a parede abdominal ou aderência maciça entre todos os órgãos

## 4.5 Análise microscópica da bexiga

### 4.5.1 Análise histológica

As bexigas dos animais foram fixadas em formol a 10% tamponado, quando então foram colocadas em cápsulas para histotécnica e lavadas em água corrente por 15 minutos para retirada do excesso de formol do tecido. Depois, no autotécnico, sofreram desidratação em álcool etílico a 70%, 80%, 90% e posteriormente diafanização em xilol, impregnação por parafina a 58% com formação de blocos.

Para cada bloco de parafina foram preparadas 03 lâminas de fragmentos da bexiga, envolvendo a linha de sutura e os bordos da ferida. Os cortes foram realizados por micrótomo SPENCER<sup>®</sup> 820, regulado para 5  $\mu$ m, conforme técnica descrita por Bancroft e Stevens (2012). A primeira lâmina foi corada pela técnica de hematoxilina-eosina (HE), para verificação do processo de reparo tecidual, avaliando-se os parâmetros: inflamação aguda, necrose isquêmica, reação gigantomcelular tipo corpo estranho, reepitelização, coaptação das bordas da sutura, extensão do infiltrado celular de parede, neoformação capilar e inflamação crônica (Apêndice B) (Figura 7). A segunda lâmina foi corada pela técnica de tricrômio de Masson (TM) para avaliação da proliferação fibroblástica e colagenização (Apêndice B) (Figura 8).

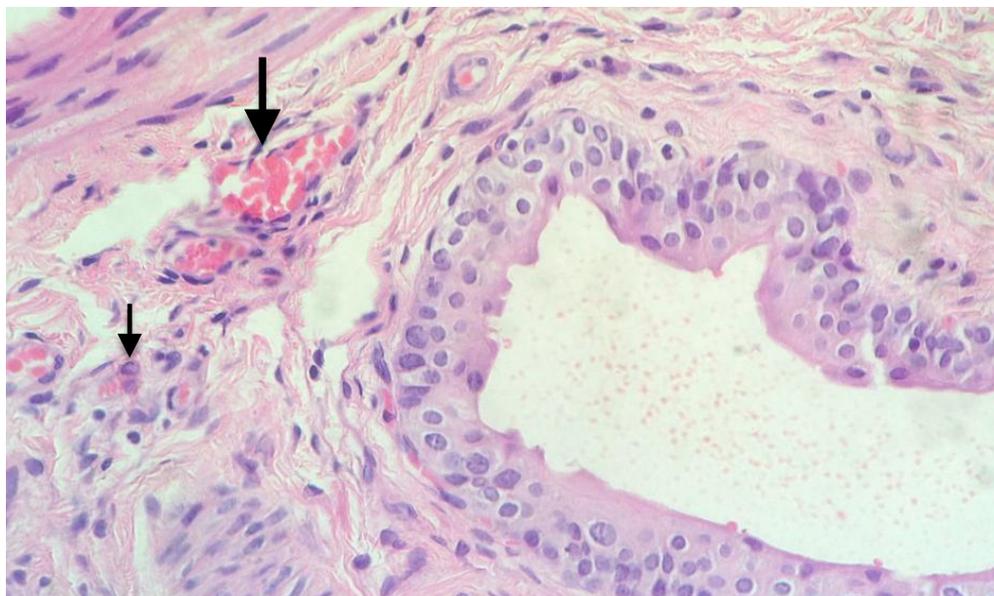


Figura 7 – Aspectos histológicos da bexiga urinária de ratos coradas com hematoxilina e eosina. Seta menor – infiltração de células polimorfonucleares. Seta maior – congestão vascular (Fonte: arquivo próprio).

Foi realizado estudo microscópico do tecido vesical dos animais em microscópio óptico binocular (OLYMPUS<sup>®</sup> EX-41). O avaliador desconhecia o grupo do animal correspondente à lâmina estudada. Foram estudados todos os campos da lâmina com objetivas de 4 x, 10 x e 40 x e ocular de 10 x. As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se câmera digital (Nikon<sup>®</sup> COOLPIX S100) acoplada ao microscópio.

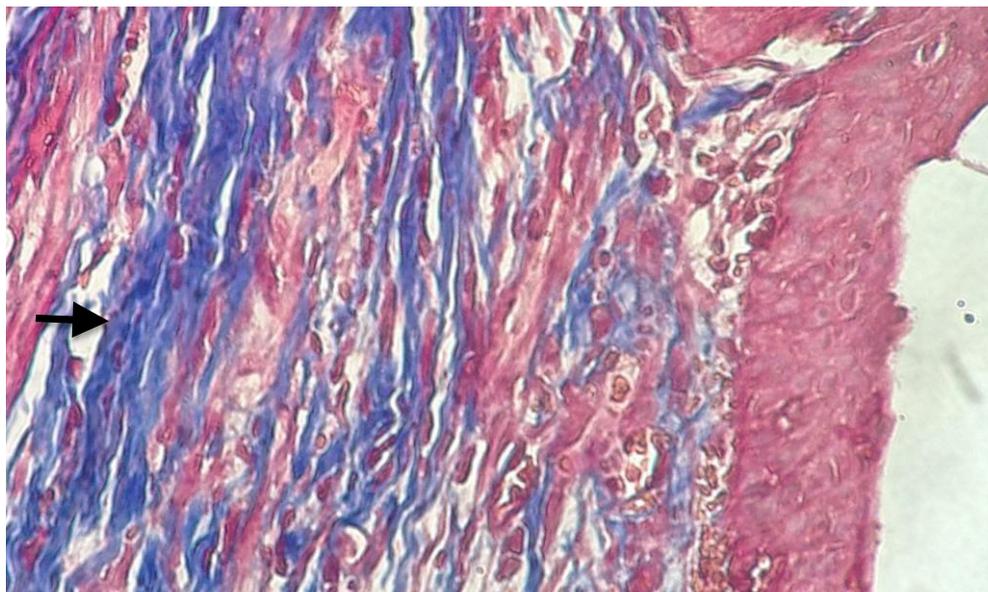


Figura 8 – Aspectos histológicos da bexiga urinária de ratos coradas com Tricrômio de Masson. Seta – fibras colágenas coradas em azul (Fonte: arquivo próprio).

Os parâmetros de inflamação aguda, extensão do infiltrado celular de parede, necrose isquêmica e neoformação capilar foram analisados nos animais sacrificados no 3º dia pós-operatórios. Os pontos referentes a reepitelização, coaptação das bordas da sutura e reação gigantocelular tipo corpo estranho foram estudados nos animais sacrificados no 7º dia pós-operatório. Os quesitos referentes a inflamação crônica, proliferação fibroblástica e colagenização foram analisados nos animais sacrificados no 14º dia pós-operatório. O escore histológico atribui a cada quesito estudado um valor numérico permitindo quantificar o processo cicatricial e a comparação entre os grupos, modificado de Ramzi (1999).

#### 4.5.2 Análise imuno-histoquímica

Para as reações de imuno-histoquímica foram utilizados cortes histológicos de bexiga obtidos dos blocos de parafina e anticorpos para  $\alpha$ -actina de músculo liso, da marca Sigma®. Os clones utilizados foram 1A4, monoclonal, na titulação de 1:200. A recuperação antigênica foi realizada por 04 minutos em solução de ácido cítrico 10 mM (pH 6.0), seguida por tratamento com PBS. A incubação com o anticorpo primário anti- $\alpha$ -actina de músculo liso deu-se por 18h a 4°C. Os anticorpos secundários foram conjugados ao sistema estreptoavidina-biotina-peroxidase por 30 minutos seguidos da aplicação de 3, 3'- diaminobenzidina (DAB) como cromógeno.

As lâminas foram montadas com Bálsamos do Canadá e analisadas no microscópio OLYMPUS® EX-41 (Figura 9).

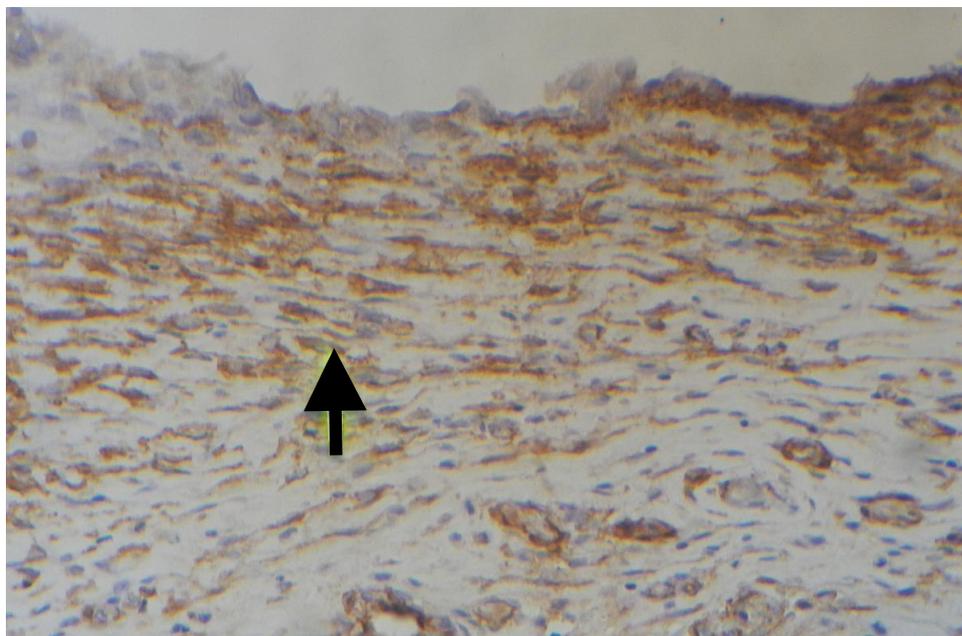


Figura 9 – Aspectos histológicos da bexiga urinária de ratos coradas pela técnica imuno-histoquímica com anticorpo anti  $\alpha$ -actina de músculo liso. Seta – miofibroblastos de formato fusiforme com núcleo de coloração azulada e citoplasma acastanhado (Fonte: arquivo próprio).

Para a leitura das lâminas, elaborou-se um protocolo de análise imuno-histoquímica (Apêndice C), considerando-se a distribuição e a intensidade da expressão em todos os campos. A leitura das lâminas foi realizada de forma cega.

#### 4.6 Contagem total e diferencial de células no peritônio

As células peritoneais foram obtidas por lavagem do peritônio com PBS estéril, 5 mL, gelado imediatamente após o sacrifício dos animais. Para determinação do número total de células, 90  $\mu$ L da suspensão celular foram fixadas e coradas em 10  $\mu$ L de solução de cristal violeta 0,05% dissolvidos em ácido acético 30% e contadas sob microscópio óptico de luz comum com auxílio de câmera de Neubauer. Para a realização da contagem diferencial, foi feito um ajuste de células para  $4 \times 10^6$  células/mL. Desse rendimento, uma alíquota de 200 $\mu$ L foi colocada em *spin* para a preparação de lâminas com células peritoneais que foram posteriormente coradas e contadas em microscópio de luz comum.

#### 4.7 Obtenção e contagem das células dos linfonodos

Os linfonodos ilíacos (colhidos a uma distância de 1 cm da bifurcação da artéria aorta, a nível da artéria ilíaca) e mesentéricos (colhidos aleatoriamente da cadeia mesentérica inferior) foram macerados com 1 mL de solução PBS. As suspensões celulares destes órgãos passaram por processo de diluição (9 partes/1 parte) em solução a 0,05% de cristal violeta em ácido acético a 30% e a contagem celular foi feita em câmara de Neubauer.

#### 4.8 Avaliação da secreção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

A determinação da liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizada pelo método de vermelho de fenol dependente de peroxidase (NASCIMENTO et al., 2003). As células peritoneais foram quantificadas e ressuspensas em solução de vermelho de fenol. Para o preparo desta solução foram feitas 3 soluções diferentes, da seguinte forma: Solução A: 40g de NaCl, 1g de KCl, 5,75g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em 400 mL de água deionizada. Solução B: solução de CaCl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O a 1,3% (p/v) em água deionizada. Solução C: solução de MgCl<sub>2</sub>:6H<sub>2</sub>O a 2,1% (p/v) em água deionizada. A solução final foi constituída de 0,8 mL da solução A, 0,1 mL da solução B, 0,1 mL da solução C, 1 mL da solução de glicose à 1% (p/v) em água deionizada, 0,1 mL de meio vermelho de fenol à 10% (p/v) em água deionizada, 0,1 mL de peroxidase de raiz forte tipo II (Sigma) numa concentração de 0,5 mg/ml de PBS e 7,8 mL de água destilada.

As alíquotas de 100 µL de suspensão celular (2x10<sup>6</sup> células/mL) de vermelho de fenol foram transferidas para cada poço da placa de 96 poços de cultura. Os ensaios foram feitos em duplicatas. A placa foi incubada à 37°C em estufa contendo 5 % de CO<sub>2</sub> e atmosfera úmida por 1 hora. Após esse período, a placa foi centrifugada e o sobrenadante transferido para outra placa. A reação foi interrompida pela adição de 10 µL de NaOH 1N por poço. A absorbância foi mensurada a 620 nm em leitor de microplacas (Titertek-Multiscan<sup>®</sup>). Os resultados obtidos em densidade óptica (D.O.) foram transformados em µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mediante equação linear com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio (5, 10, 20 e 40 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### 4.9 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

As células linfonodais foram quantificadas e ressuspensas em meio RPMI 1640 (Sigma<sup>®</sup>) completo. Alíquotas de 100  $\mu$ L de suspensão celular ( $2 \times 10^6$  células/mL) em meio RPMI completo foram adicionadas a cada poço da placa de 96 poços de cultura. Os ensaios foram feitos em duplicata. A placa foi incubada à 37° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas.

A produção de NO foi determinada pela concentração de nitritos presentes no sobrenadante de culturas de células linfonodais, conforme protocolo proposto por Ding et al. (1988). Para isso, 50  $\mu$ L do sobrenadante da cultura de células linfonodais foram incubados com mesmo volume do reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% naftilenodiamina dihidroclorido e 2,5% ácido ortofosfórico), por 10 minutos, à temperatura ambiente. Absorbância das amostras em 540 nm foi determinada em espectrofotômetro (Titertek-Multiscan<sup>®</sup>). Os resultados foram expressos como  $\mu$ M de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), fundamentado em curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas (5- 60  $\mu$ M) de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) diluído em meio RPMI.

#### 4.10 Análise estatística

Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão ( $\pm$  DP) dos 04 animais de cada subgrupo. As variáveis foram analisadas pelo teste não-paramétrico de *Kruskal-Wally* seguido do teste de comparação múltipla de *Dunn*. O nível de significância (p) adotado para se rejeitar a hipótese da nulidade foi de 5% (p < 0,05). Os dados foram analisados utilizando-se o programa *GraphPad Prism* versão 5.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Escala de aderências peritoneais

Não houve diferenças no número de aderência peritoneais entre os diferentes grupos de animais no 3º, 7º e 14º dias de pós-operatório de cistotomia e cistorrafia (Tabela 1). A aderências quando presentes se deram principalmente entre a bexiga e o mesentério e a bexiga e o peritônio parietal ou a ambos.

Tabela 1. Escala de aderências de animais tratados com solução PBS (CONTROLE), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* (MASTRUZ), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 3º, 7º e 14º dias de pós-operatório.

PÓS-OPERATÓRIO	GRUPOS		
	CONTROLE	PIROXICAM	MASTRUZ
3º DIA	1,5 ± 0,6	1,7 ± 0,5	2,2 ± 0,9
7º DIA	1,7 ± 0,6	2,3 ± 0,6	2,0 ± 1,0
14º DIA	1,0 ± 0,0	1,5 ± 1,0	1,5 ± 0,6

### 5.2 Achados histopatológicos

Os animais tratados com EHA de *C. ambrosioides* mostraram em menor grau necrose isquêmica e neoformação vascular quando comparados aos do grupo controle no 3º dia pós-cirúrgico. O grupo de animais tratados com piroxicam obteve menor extensão do infiltrado celular na parede vesical e menos neoformação capilar em relação ao grupo controle no mesmo período (Tabela 2) (Figura 10).

No 7º dia pós-operatório os animais que receberam PBS, Piroxicam e EHA de *C. ambrosioides* não diferiram nos quesitos reepitelização, coaptação de bordos e reação gigantocelular tipo corpos estranho (Tabela 2) (Figura 10).

Quando avaliados os quesitos inflamação crônica, proliferação fibroblástica e colagenização os animais que receberam EHA de *C. ambrosioides* mostraram resposta menos acentuada, nos três quesitos avaliados, quando comprados ao grupo controle. Em nenhum parâmetro avaliado, considerando os três momentos pós-cirúrgicos, o grupo mastruz diferiu do grupo Piroxicam (Tabela 2) (Figuras 10 e 11).

Tabela 2. Avaliação histopatológica das bexigas de animais tratados com solução PBS (CONTROLE), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* (MASTRUZ), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 3°, 7° e 14° dias de pós-operatório.

Variáveis histológicas	Escore Histológico		
	3° DIA		
	CONTROLE	PIROXICAM	MASTRUZ
Inflamação aguda	2,50 ± 0,54	2,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
Extensão do infiltrado celular	3,50 ± 0,54	2,75 ± 0,46*	3,00 ± 0,00
Neoformação capilar	2,75 ± 0,46	2,00 ± 0,00*	2,00 ± 0,00*
Necrose isquêmica	2,50 ± 0,53	2,00 ± 0,00	1,50 ± 0,53*
	7° DIA		
	CONTROLE	PIROXICAM	MASTRUZ
Reepitelização	1,33 ± 0,52	1,67 ± 0,52	1,33 ± 0,52
Coaptação de bordas	1,67 ± 0,52	1,33 ± 0,52	1,00 ± 0,00
Reação gigantocelular	3,33 ± 0,52	3,33 ± 0,52	3,33 ± 0,52
	14° DIA		
	CONTROLE	PIROXICAM	MASTRUZ
Inflamação crônica	3,0 ± 0,89	2,25 ± 0,46	2,00 ± 0,00*
Proliferação fibroblástica	3,0 ± 0,89	2,25 ± 0,46	1,25 ± 0,46*
Colagenização	3,00 ± 0,89	2,25 ± 0,46	1,25 ± 0,46*

\*p<0,05 quando comparado ao grupo controle (teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

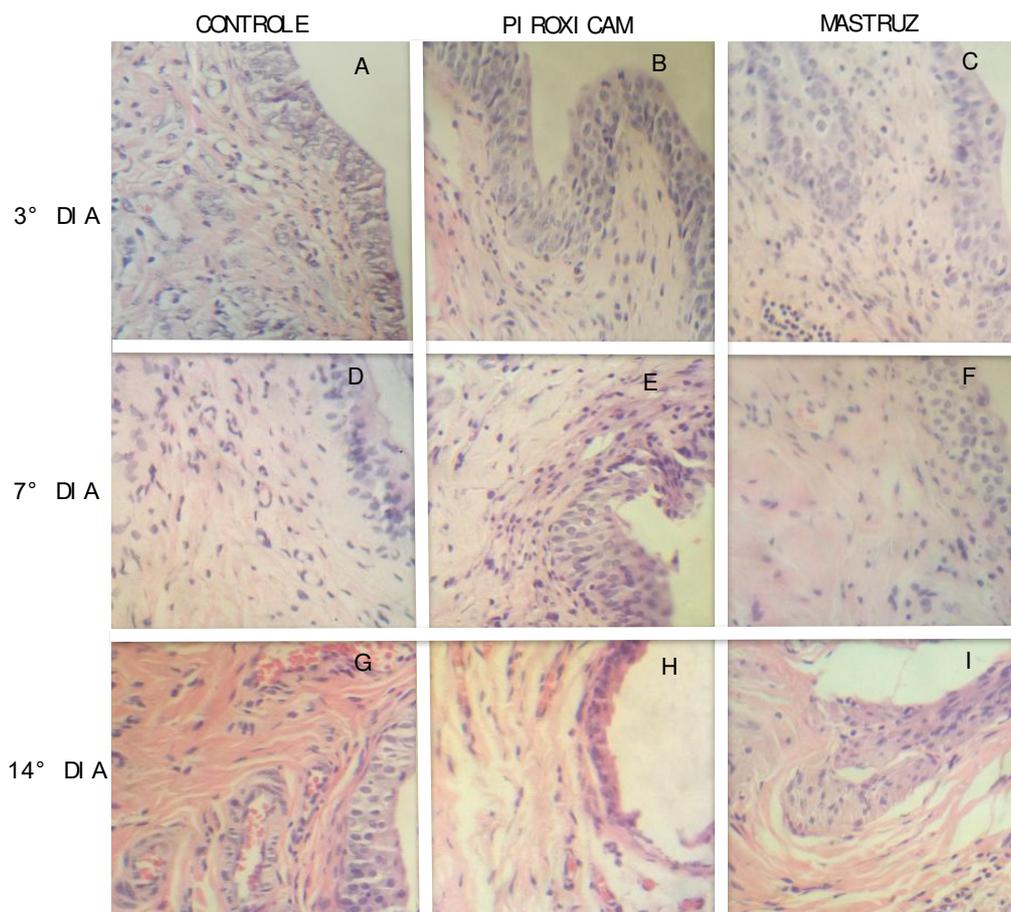


Figura 10 – Aspectos histopatológicos das bexigas urinárias de ratos, coradas pela técnica de hematoxilina e eosina, tratados com solução PBS (CONTROLE – A, D e G), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM – B, E e H), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* (MASTRUZ – C, F e D), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 3°, 7° e 14° dias de pós-operatório.

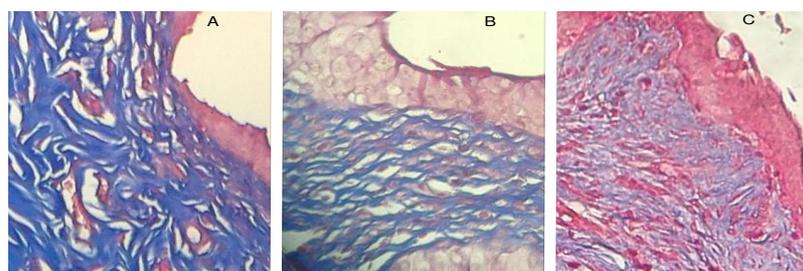


Figura 11 – Aspectos histopatológicos das bexigas urinárias de ratos, coradas pela técnica de Tricrômio de Masson, tratados com solução PBS (CONTROLE – A), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM – B), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* (MASTRUZ – C), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 14° dias de pós-operatório.

### 5.3 Achados imuno-histouímicos

Para avaliarmos a intensidade de atividade dos miofibroblastos utilizamos um escore imuno-histoquímico para anticorpo anti- $\alpha$ -actina de músculo liso, um forte marcador para este tipo de célula. Os grupos de animais testados não diferiram entre si, nos três momentos pós-cirúrgicos estudados. Apesar disso, houve uma tendência a maior expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso no grupo tratado com EHA de *C. ambrosioides* em relação ao grupo controle no 3º dia pós-operatório (Figura 12 e 13).

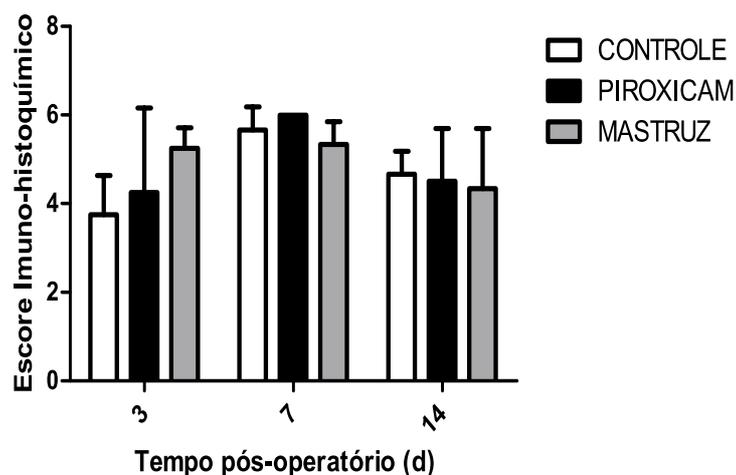


Figura 12. Avaliação da atividade miofibroblástica pela expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso em bexiga de animais tratados com solução PBS (CONTROLE), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* (MASTRUZ), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 3º, 7º e 14º dias de pós-operatório.

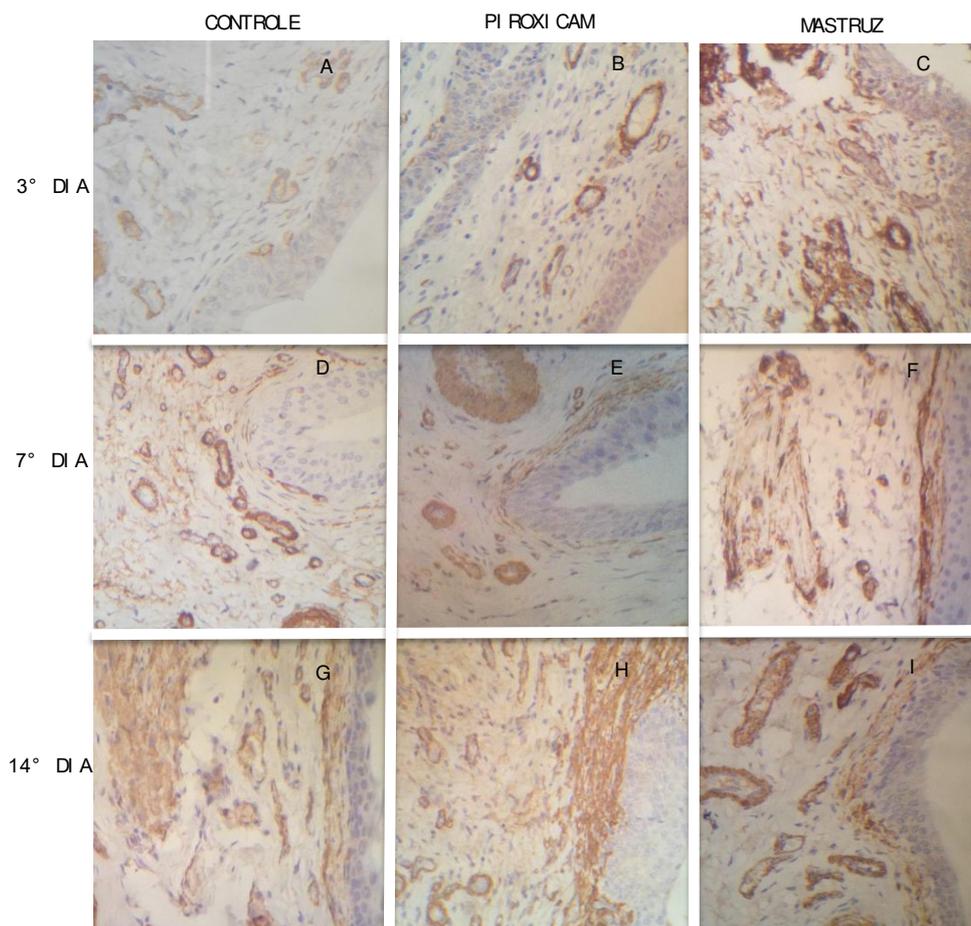


Figura 13 – Aspectos imuno-histoquímicos (anticorpo 1A4 anti- $\alpha$  actina de músculo liso) das bexigas urinárias de ratos tratados com solução PBS (CONTROLE – A, D e G), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM – B, E e H), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* (MASTRUZ – C, F e I), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 3°, 7° e 14° dias de pós-operatório.

#### 5.4 Contagem celular total e diferencial no peritônio e níveis de $H_2O_2$ no peritônio e NO nos linfonodos ilíacos e mesentéricos

Não houve diferenças na migração de células para cavidade peritoneal entre os diferentes grupos de animais no 3° e 7° dias de pós-operatório de cistotomia e cistorrafia (Figuras 14A e 14B). Entretanto, no 14° dia pós-cirúrgico, houve um aumento no número de células no grupo mastruz quando comparado ao grupo controle, o qual foi predominantemente constituído por linfócitos (Figura 14C).

Os níveis de  $H_2O_2$  no peritônio dos ratos submetidos a cistotomia e cistorrafia não diferiram entre os grupos controle, piroxicam e mastruz no 3° dia pós-operatório e se mostraram indetectáveis ou muito reduzido nos momentos pós-cirúrgicos seguintes, 7° e 14° dias pós-operatórios (Tabela 3).

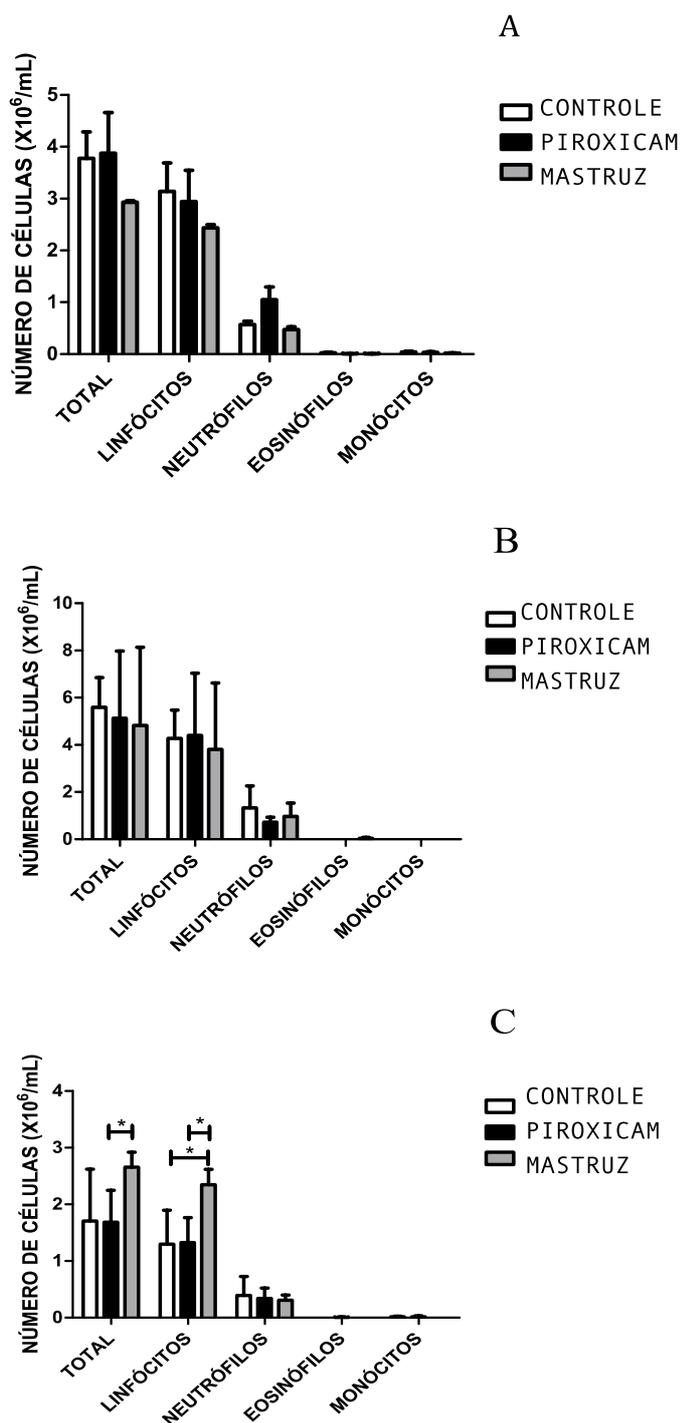


Figura 14. Contagem celular total e diferencial no lavado peritoneal. Os animais foram submetidos a cistotomia e cistorrafia e tratados com solução PBS (CONTROLE), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* (MASTRUZ), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia. Os animais foram sacrificados após 3 (A), 7 (B) e 14 (C) dias e o lavado peritoneal realizado. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo mastruz (teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

Tabela 3. Concentração de peróxido de hidrogênio no líquido peritoneal, em  $\mu\text{M}$ , de animais tratados com solução PBS (CONTROLE), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* (MASTRUZ), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 3°, 7° e 14° dias de pós-operatório.

PÓS-OPERATÓRIO	Concentração de $\text{H}_2\text{O}_2$ , em $\mu\text{M}$ , no peritônio		
	CONTROLE	PIROXICAM	MASTRUZ
3° DIA	1,4 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,0
7° DIA	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
14° DIA	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1

Os níveis de NO nos linfonodos ilíacos dos ratos submetidos a cistotomia e cistorrafia detectados no 3° dia pós-operatório não diferiram entre os grupos estudados. No 7° dia pós-cirúrgico os animais do grupo mastruz mostraram níveis de NO em linfonodos ilíacos mais reduzidos do que os encontrados no grupo piroxicam, porém sem diferença em relação aos do grupo controle. No 14° dia pós-operatório, não foi identificado NO nos linfonodos ilíacos em nenhum dos grupos de animais estudados (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração de óxido nítrico no sobrenadante de células linfonodais ilíacas e mesentéricas, em  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^-$ , de animais tratados com solução PBS (CONTROLE), 1mL/Kg, solução de piroxicam (PIROXICAM), 0,3 mg/Kg, e extrato hidroalcoólico de folhas de *Chenopodium ambrosioides* (MASTRUZ), 5mg/Kg, por via oral a cada 24 h, durante os três primeiros dias após cirurgia de cistotomia e cistorrafia, e sacrificados no 3°, 7° e 14° dias de pós-operatório

Sítio Linfonodal	Concentração de NO, em $\mu\text{M}$ de $\text{NO}_2^-$		
	3° DIA		
	CONTROLE	PIROXICAM	MASTRUZ
Linfonodos ilíacos	1,1 $\pm$ 2,3	1,6 $\pm$ 1,7	1,2 $\pm$ 1,2
Linfonodos mesentéricos	1,5 $\pm$ 0,00	1,5 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,0
	7° DIA		
	CONTROLE	PIROXICAM	MASTRUZ
Linfonodos ilíacos	6,8 $\pm$ 2,2	12,7 $\pm$ 5,4	2,7 $\pm$ 2,1*
Linfonodos mesentéricos	0,4 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 5,3	0,0 $\pm$ 0,0
	14° DIA		
	CONTROLE	PIROXICAM	MASTRUZ
Linfonodos ilíacos	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Linfonodos mesentéricos	1,56 $\pm$ 0,00	1,56 $\pm$ 0,00	1,56 $\pm$ 0,00

\* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo piroxican (teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

A concentração de NO nos linfonodos mesentéricos dos ratos submetidos a cistotomia e cistorrafia detectados no 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias pós-operatório não diferiram entre os grupos tratados com PBS, Piroxican e EHA de *Chenopodium ambrosioides* (Tabela 4).

O número de células obtidas do processamento dos linfonodos ilíacos e mesentéricos não diferiram entre os grupos testados nos três momentos pós-cirúrgicos estudados (dados não mostrados).

## 6 DISCUSSÃO

A resposta inflamatória pós-cirúrgica envolvendo a bexiga urinária é caracterizada por particularidades decorrentes do contato do tecido com urina e seus constituintes, da necessidade de uso de materiais de sutura absorvíveis e de cateteres intravesicais (RATLIFF et al., 1995; LAURENCE et al., 1997; DRINKA et al., 2006; BORIN et al., 2008; BILBAO et al., 2014). No período pós-operatório, esses fatores alteram o padrão inflamatório e influenciam o processo de cicatrização da bexiga urinária.

Substâncias anti-inflamatórias são usadas quase que rotineiramente após procedimentos cirúrgicos, no intuito de reduzir a dor pós-operatória e resposta inflamatória. Essas drogas afetam a inflamação e a resposta imune local, que são necessárias para promover um adequado reparo tecidual no período peri-operatório, podendo contribuir para os surgimento de complicações pós-cirúrgicas indesejáveis. Tais complicações incluem deiscência de feridas, infecção e retardo na síntese de colágeno, resultando em atraso no reparo tecidual (BUSTI et al., 2005).

Algumas espécies vegetais são ricas em compostos fenólicos, flavonóis e alcaloides, capazes de agir por via inibitória das enzimas ciclooxigenase e 5-lipoxigenase, interferindo no metabolismo das prostaglandinas e do ácido araquidônico, promovendo efeitos anti-inflamatórios (CALIXTO et al., 2003). Além da ação sobre as prostaglandinas, os flavonóis parecem ter efeito parcial sobre o sistema antioxidante, com ação sobre os radicais de oxigênio, superprodução de NO, que também desempenha um importante papel em diversos modelos de inflamação (CUZZOCREA et al., 1998). Outro grupo químico envolvido no efeito anti-inflamatório de plantas medicinais é o dos terpenos. Sua ação anti-inflamatória se deve a inibição das prostaglandinas (VIEGAS JUNIOR et al., 2006).

A avaliação fitoquímica dos extrato etanólico de *Chenopodium ambrosioides* mostrou a predominância de compostos terpênicos, alcaloides, taninos condensados, saponinas e flavonoides. Extrato hidroalcoólico (EHA), etanol a 70%, das folhas de *Chenopodium ambrosioides* obtidos por método de percolação na relação de hidromódulo de 1:5 apresenta resultado mais expressivo destes constituintes químicos (NEIVA et al., 2011).

Os componentes do *Chenopodium ambrosioides* demonstraram efeito anti-inflamatório agudo e crônico em modelos experimentais (IBIRONKE e AJIBOYE, 2007; PEREIRA et al., 2009; GRASSI et al., 2012; GONÇALVES-FILHO, 2013). Mostrou também efeito cicatrizante em pesquisas desenvolvidas por Grassi et al. (2012) em modelos de cicatrização de feridas cutâneas e por Pinheiro-Neto (2005) utilizando modelos de cicatrização óssea. A dose oral de 05 mg/kg de peso, por via intra-peritoneal, foi suficiente para mostrar ação anti-neoplásica em modelos de tumor de Erlich em camundongos (NASCIMENTO et al., 2006) e efeito anti-inflamatório em modelos de granuloma de corpo estranho em ratos, quando usada a mesma dose por via oral (PEREIRA, 2009).

O modelo de cistotomia seguido de cistorrafia se mostrou eficaz em permitir o estudo da atividade anti-inflamatória e cicatricial sobre a bexiga urinária de ratos (LUCENA et al., 2006; FERREIRA et al., 2006; GONÇALVES-FILHO et al., 2006; BILBAO et al., 2013). O EHA de *Chenopodium ambrosioides* foi testado no pós-operatório de cirurgia de cistotomia em ratos e comparado a um grupo placebo que recebeu solução tampão fosfato e um grupo controle positivo que recebeu piroxicam, um conhecido agente anti-inflamatório não hormonal. O Piroxicam age inibindo a enzima cicloxigenase, reduzindo a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas (OLIVEIRA JUNIOR, 2007).

Os animais se comportaram de maneira similar durante o pós-operatório de cistotomia e cistorrafia, não sendo evidenciado complicações relacionadas a ferida operatória abdominal, que deu acesso ao procedimento vesical. O EHA de *Chenopodium ambrosioides*, na dose de 05mg/Kg de peso do animal, não se mostrou capaz de alterar achados macroscópicos como escalas de aderências peritoneais quanto comparado aos animais do grupo controle e piroxicam.

Lucena et al. (2006) estudando o efeito de *Schinus terebinthifolius Raddi*, Aroeira, sobre a cicatrização de bexiga de ratos, evidenciou maior nível de aderências peritoneais no grupo tratado com extrato hidroalcoólico de Aroeira, na dose de 100mg/Kg, por via peritoneal, quando comparado ao grupo placebo, que recebera solução salina. As aderência foram únicas e se deram principalmente entre a bexiga urinária e o mesentério ou o peritônio da parede abdominal. A administração intra-peritoneal das substâncias pode contribuir para a formação de aderências, tanto pelo

fato de invadir a cavidade peritoneal, como pelo efeito irritante dessas substância sobre a membrana peritoneal. A opção pela via de administração oral das substâncias afasta esse viés relacionado a violação da cavidade peritoneal.

Resultados como os obtidos por Patrício et al. (2008) mostram que, a depender da via de administração e o tipo de inflamação, pode-se obter dados bem diferentes. Eles mostraram que camundongos com patas infectadas com *Leishmania amazonensis* apresentavam aumento de sua espessura quando tratados por via intra-peritoneal com extrato bruto hidroalcoólico (EBH) de *C. ambrosioides* na dose de 5mg/kg. No entanto, quando tratados por via oral havia diminuição do tamanho da espessura da pata, mesmo não estando relacionado à carga parasitária presente, sendo o resultado dependente da via de administração.

Em nosso experimento, o EHA de *Chenopodium ambrosioides* não mostrou efeito anti-inflamatório capaz de alterar o padrão celular no peritônio, nem os níveis de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas células peritoneais. Em apenas um momento, 7º dia-pós operatório de cistotomia, os animais que receberam EHA de *Chenopodium ambrosioides* apresentaram níveis de NO produzidos pelas células linfonodais menores que os do grupo controle. Portanto, o EHA de *Chenopodium ambrosioides* não mostrou resultados consistentes em reduzir aos níveis de NO quando utilizada a dose de 05 mg/kg, por via oral em modelos cirúrgicos de bexiga em ratos.

Extrato etanólico bruto (EEB) de *Chenopodium ambrosides* mostrou efeito anti-inflamatório em modelos de edema de orelha, edema de pata e granuloma de corpo estranho em camundongos, nas doses de 150, 300 e 500 mg/kg, por via oral. EEB de *C. ambrosioides* nas doses de 300 e 500 mg/kg também foi capaz de reduzir os níveis de NO e TNF- $\alpha$  (GRASSI et al., 2013), importantes mediadores da resposta inflamatória.

Em estudos com modelos de cistite induzida por ciclofosfamida, Gonçalves-Filho (2013) verificou efeito anti-inflamatório do EBH de *Chenopodium ambrosides* em ratos, com doses de 50 mg/kg, por via oral. O EBH de *Chenopodium ambrosides* foi capaz de inibir a inflamação vesical aguda e reduzir os níveis de NF $\kappa$ B, importante fator de transcrição nuclear para mediadores inflamatórios. A dose de EHA de *Chenopodium ambrosioides* testada em nosso experimento, 5 mg/kg, bem

menor que a avaliada por outros autores, parece explicar a ausência de efeito anti-inflamatório agudo.

A resposta inflamatória aguda secundária ao trauma tecidual é o gatilho inicial para a cicatrização da ferida, ela é marcada por intensa migração celular e produção de mediadores inflamatórios locais que modulam a atividade de células responsáveis pela defesa local e revitalização de tecido necrótico, num ambiente caracterizado por edema e intensa congestão vascular (METCALFE e FERGUNSON, 2005; FIRESTEIN, 2012).

A análise histológica da bexiga dos animais sacrificados no 3º dia pós-cirúrgico, não mostrou alteração do quesito inflamação aguda que levava em consideração a celularidade do tecido, o edema e a congestão vascular, embora o uso de *C. ambrosioides* tenha promovido menor grau de neoformação vascular e necrose isquêmica quando comparadas ao grupo controle.

O uso de EHA de *Chenopodium ambrosioides* não foi capaz de promover alterações histológicas consideráveis em relação ao grupo controle, quando se avaliaram os quesitos reepitelização, coaptação de bordos e reação gigante celular no 7º dia pós-cistotomia e cistorrafia. A síntese meticulosa da bexiga promove uma boa coaptação dos bordos da ferida vesical já por volta do 6º dia pós-operatório (BILBAO et al., 2014). O uso de sutura poligalactina 910, 5-0, contribue para uma menor reação tecidual e uma rápida epitelização (HOLMES, JAMES e WHITFIELD, 1992; OOSTERLINK et al., 1993; HANKE et al., 1994). A cicatrização parece sofrer forte influência de fatores relacionados à técnica cirúrgica empregada, assim como ao tipo de material utilizado na sutura, o que pode repercutir em maior ou menor resposta inflamatória.

Durante a fase proliferativa que tem seu pico entre 6 e 10 dias após a lesão, surgem os fibroblastos que se multiplicam e produzem componentes do tecido conjuntivo, tais como fibronectina e colágeno. Este é a proteína mais abundante do tecido conectivo em fase de cicatrização. As várias diferenças na composição química do colágeno determinam as suas funções biológicas. A rica presença de glicina e prolina é necessária para que a molécula de colágeno assuma a estrutura de tripla hélice. O tecido de granulação, característico da fase proliferativa da cicatrização, expressa 30 a 40 % de colágeno tipo III, sendo considerado imaturo (WITTE e

BARBUL, 1997). Nesta fase, também se observa o surgimento de células conhecidas como miofibroblastos que possuem semelhanças morfológicas com fibroblastos; mas que, por conterem uma quantidade aumentada de filamentos de actina e de miosina, possuem atividade contrátil, participando assim da redução do tamanho da ferida após a lesão (HINZ, 2007; CAMPOS, BORGES- BRANCO e GROTH, 2007).

As alterações histológicas observadas nas bexigas urinárias dos animais do 14º dia pós-operatório de cistostomia e cistorrafia mostraram efeito anti-inflamatório crônico do EHA de *C. ambrosioides*. Observou-se redução nos parâmetros inflamação crônica, proliferação fibroblástica e colagenização, em relação aos animais do grupo controle. *Chenopodium ambrosioides* não foi capaz de influenciar a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso por miofibroblastos, importante marcador da atividade deste tipo celular.

A reorganização da nova matriz extracelular é um processo importante na cicatrização. O balanço entre a síntese de novo colágeno e sua degradação vai influenciar a qualidade da restauração tecidual. O padrão de resposta imune tipo T<sub>H</sub>1 promove a regeneração tecidual, enquanto o tipo T<sub>H</sub>2 favorece a ativação de fibroblastos, produção de colágeno e fibrogênese (SIME e O'REILLY, 2001).

As collagenases são responsáveis pela degradação do colágeno e sofrem influencia das citocinas liberadas por células inflamatórias, endoteliais, fibroblastos e queratinócitos (CAMPOS, BORGES- BRANCO e GROTH, 2007). Espécies reativas de oxigênio afetam vias de sinalização para a ativação de fatores de transcrição de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, 6 e TNF-  $\alpha$ ), quimiocinas e enzima proteolítica como as metaloproteinases de matriz (MMPs) e serinas proteases (EMING, KRIEG e DAVIDSON, 2007). A finalização do processo inflamatório é essencial para a restauração das proteínas estruturais da matriz extracelular. O quadro contrário é responsável por feridas crônicas (HINZ, 2007).

Ibironle e Ajiboyie (2007) e Grassi et al. (2013) observaram efeito anti-inflamatório crônico do *Chenopodium ambrosioides* em modelos experimentais de granuloma de corpo estranho. Pereira (2009) também comprovou efeito anti-inflamatório crônico do EHA de *Chenopodium ambrosioides* com dose de 05 mg/Kg de peso, em modelos de granuloma de corpo estranho em ratos.

Sérvio et al. (2011) avaliando o efeito tópico do extrato aquoso de *Chenopodium ambrosioides* a 1,3%, em modelos de cicatrização cutânea em dorso de ratos, observou efeito anti-inflamatório semelhante ao da solução salina à análise histológica, apesar de constatarem maior concentração de fibroblastos no sítio cirúrgico à análise histológica e maior contração das feridas.

Avaliando a cicatrização cutânea em ratos, Grassi et al. (2013) testaram pomadas a base de polietilenoglicol associada a extrato etanólico de *C. ambrosioides*, nas concentrações de 1, 3 e 5%, apenas a formulação de maior concentração mostrou reduzir a área de cicatrização, quando aplicadas topicamente.

Apesar do EHA de *Chenopodium ambrosioides*, na dose testada de 05 mg/kg, por via oral, não ter mostrado resultados consistentes em reduzir os parâmetros inflamatórios agudos em modelos cirúrgicos de bexiga urinária em ratos, ele promoveu menos inflamação crônica, proliferação fibroblástica e deposição de colágeno, contribuindo para a finalização adequada do processo cicatricial, evitando assim a formação de tecido fibrótico excessivo e de lesões crônicas.

Tais dados suportam a hipótese de que o EHA de *Chenopodium ambrosioides* apresenta efeito anti-inflamatório crônico, em doses tão baixas quanto 05 mg/kg (PEREIRA, 2009), e que a capacidade de inibir a inflamação aguda requer doses maiores, a partir de 50 mg/kg (IBIRONKE e AJIBOYE, 2007; GONÇALVES-FILHO, 2013; GRASSI et al. 2013).

Dentre os fatores limitantes do nosso estudos estão o reduzido número de animais por grupo, o emprego de uma única dose teste para o EHA de *Chenopodium ambrosioides* e a avaliação histológica por microscopia simples, método subjetivo e sujeito a variações dependentes da experiência do examinador. Estudos futuros serão necessários para melhor esclarecimento do efeito do *C. ambrosioides* sobre a cicatrização vesical e quais substâncias constituintes do extrato são responsáveis por seus efeitos anti-inflamatório crônico e anti-fibrótico.

## 7 CONCLUSÃO

O EHA de *Chenopodium ambrosioides* apresenta atividade sistêmica anti-fibrótica e anti-inflamatória crônica em modelos de cicatrização de bexiga urinárias em ratos, ao ser capaz de reduzir os parâmetros histológicos:

- I. necrose isquêmica<sup>[1][2]</sup>
- II. neoformação capilar<sup>[1][2]</sup>
- III. proliferação fibroblástica
- IV. colagenização<sup>[1][2]</sup>
- V. inflamação crônica.

O EHA de folhas de *Chenopodium ambrosioides* não apresenta atividade sobre os seguintes fatores envolvidos na cicatrização de bexiga urinária de ratos:

- I. a celularidade total e diferencial do peritônio
- II. os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no líquido peritôneal
- III. os níveis de NO no sobrenadante de cultura de células linfonodais ilíacas e mesentéricas
- IV. inflamação aguda
- V. atividade miofibroblástica.

As evidências da atual investigação indicam que o *Chenopodium ambrosioides* pode se constituir em alternativa terapêutica futura no pós-operatório de cirurgias vesicais, com potencial atividade anti-inflamatória crônica e anti-fibrótica.

Estudos futuros serão necessários para melhor entendimento dos efeitos do *Chenopodium ambrosioides* sobre a cicatrização de bexigas urinária e quais substâncias constituintes do extrato são as responsáveis por seu efeito anti-inflamatório crônico e anti-fibrótico.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Azouz, A.; Razzaque, M. S.; El-Hallak, M.; Taguchi, T. H. Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. **Medical Electron Microscopy**, v. 37, n. 3, p. 141-148, 2004.

Bancroft, J. D.; Estevens, A. **Theory and practice of histological techniques**. London: Churchill Livingstone, 2012.

Bilbao, M. A.; Spaniol, A.; Bearss, J.; Schellhase, C.; Shippey, S.; Aungst, M. Histology surrounding cystotomy healing in a Sprague-Dawley rat model. **International Urogynecology Journal**. vol. 25, n. 1, p. 97-101, 2014.

Borin, J. F.; Deane, L. A.; Sala, L. G.; Abdelshehid, C. S.; White, S. M.; Poulson, A. k.; Khan, F.; Edwards, R. A.; MacDougall, E. M.; Clayman, R. V. Comparison of healing after cystotomy and repair with fibrin glue and sutured closure in the porcine model. **Journal of Endourology**, vol. 22, n. 1, p. 145-150, 2008.

Busti, A. J.; Hooper, J. S.; Amaya, C. J.; Kazi, S. Effects of Perioperative Antiinflammatory and Immunomodulating Therapy on Surgical Wound Healing. **MBBS Pharmacotherapy**. vol. 25, n. 11, p. 1566-1591, 2005.

Castro, H. G.; Ferreira, F. A.; Silva, D. J. H.; Mosquim, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos secundários**. Viçosa: UFV, 2004, p. 113.

Calixto, J. B.; Siqueira Jr, J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. vol. 78, p. 98-106, 2008.

Calixto, J. B.; Otuki, M. F.; Santos, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor B (NF- $\kappa$ B). **Planta Médica**. vol. 69, p. 973-983, 2003.

Campos, A. C. L.; Borges-Branco, A.; Groth, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva**. vol. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

Chin, G. S.; Stelnicki, E. J.; Gittes, G. K.; Longaker, M. T. Characteristics of fetal wound repair. In: Garg, H. G.; Longaker, M. T. **Scarless wound healing**. New York: Marcel Dekker, inc., 2000, p. 239-262.

Clark, R. A. F. Wound repair. In: Kumar, V.; Robbins, S. L.; Cotran, R. S. **Pathologic Basis of Disease**. Philadelphia: Ed. Saunders, 2005, p. 112.

Cruz, G. V.; Pereira, P. V.; Patrício, F. J.; Costa, G. C.; Sousa, S. M.; Frazão, J. B. et al. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 115, p. 313-319, 2007.

Cuzzocrea, S.; Zinzgarelli, B.; Hake, P.; Salzman, A. L.; Szabo, C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger in carrageenan-induced models of inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**. vol. 24, p. 450-459, 1998.

Ding, A. H.; Nathan, C. F.; Stuehr, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology**. vol. 141, p. 2407-2412, 1988.

Drinka, P. J. Complications of chronic indwelling urinary catheters. **Journal of the American Medical Directors Association**. vol. 7, p. 388-392, 2006.

Eming, S. A.; Krieg, T.; Davidson, J. M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**. vol.127, p. 514-525, 2007.

Ferreira, E. C.; Matias, J. E.; Campos, A. C.; Filho, R.; Rocha, L. C.; Timi, J. R. et al. Análise da cicatrização da bexiga de ratos com uso do extrato aquoso da *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. vol. 21, n. 3, p. 33-39, 2006.

Gonçalves-Filho, A. **Efeitos do extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. na cistite induzida pela ciclofosfamida**. 2013. 47 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2013.

Gonçalves-Filho, A.; Torres, O. J.; Campos, A. C.; Tambara-Filho, L. C.; Lunedo, S. M.; Barbosa, R. E. et al. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* (maracujá) na cicatrização de bexiga em ratos: estudo morfológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**. vol. 21, n.2, p. 3-8, 2006.

Grassi, L. T.; Malheiros, A.; Meyre-Silva, C.; Buss, Z. S.; Monguilhott, E. D.; Frode, T. S. et al. From popular use to pharmacological validation: A study of anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 145, p. 127-138, 2013.

Gu, D. L.; Nguyen, T.; Gonzalez, A. M.; Printz, M. A.; Pierce, G. F.; Sosnowski, B. A. et al. Adenovirus encoding human platelet-derived growth factor-B delivered in collagen exhibits safety, biodistribution, and immunogenetics profiles favorable for clinical use. **Molecular Therapy**. vol. 9, p. 699-711, 2004.

Hanke, P. R.; Timm, P.; Falk, G.; Kramer, W. Behavior of different suture materials in the urinary bladder of the rabbit with special reference to wound healing, epithelization and crystallization. **Urologia Internationalis**. vol. 52, n.1, p. 26-33, 1994.

Harty, M.; Neff, A. W.; King, M. W.; Mescher, A. L. Regeneration or scarring: an immunologic perspective. **Developmental Dynamics**. vol. 226. p. 268-279, 2003.

Hastings, J. C.; Van Winkle, W.; Barker, E.; Hines, D.; Nichols, W. The effect of suture materials on healing wounds of the bladder. **The Journal of Surgery, Gynecology and Obstetrics**. vol. 140, n. 6, p. 933-937, 1975.

Hesse, M.; Modolell, M.; La Flamme, A. C.; Schito, M.; Fuentes, J. M.; Cheever, A. W.; Pearce, E. J.; Wynn, T. A. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **Journal of Immunology**. vol. 167, n. 11, p. 6533-6544, 2001.

Hinz, B. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. **Journal of Investigative Dermatology**. vol. 127, p. 526-537, 2007.

Hojo, M.; Inokuchi, S.; Kidokoro, M.; Fukuyama, N.; Tanaka, E.; Tsuji, C. et al. Induction of vascular endothelial growth factor by fibrin as a dermal substrate for culture skin substitute. **Plastic and Reconstructive Surgery**. vol. 111, p. 1638-1645, 2003.

Holmes, S. A.; James, M.; Whitfield, H. N. Potencial use of tissue adhesive in urinary tract surgery. **British Journal of Urology**. vol. 69, p. 647-650, 1992.

Ibironke, G. F.; Ajiboye, K. I. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chenopodium ambrosioides* leaf extract in rats. **International Journal of Pharmacology**. vol. 3, n.1, p. 111-115, 2007.

Junqueira, L. C.; Carneiro, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Laurence, S. B.; Ronald, S. S.; Axel, A. T.; Heip-Thiue, N.; Daniel, M. M.; Simon, W. H.; Yun, K. H.; Michael, D.; Gerald, R. C. Growth Factors in Bladder Wound Healing. **Journal of Urology**. vol. 157 n. 6, p. 2388-2395, 1997.

Lee, S. B.; Kaluri, R. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. **Kidney International**. vol. 78, p. 22-26, 2010.

Lima, J. L.; Furtado, D. A.; Pereira, J. P.; Baracunhy, J. G.; Xavier, H. S. **Plantas medicinais de uso comum no nordeste do Brasil**. Campina Grande: UFCG/CEDAC, 2006.

Lorenzi, H.; Matos, F. J. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

Lucena, P. L.; Ribas-Filho, J. M.; Nascimento, M. M.; Czezko, N. G.; Dietz, U. A.; Correa-Neto, M. A. et al. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus Terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. vol. 21, n.2, p. 46-51, 2006.

Meshner, A. L.; Neff, A. W. Regenerative capacity and the developing immune system. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**. vol. 93, p. 39-66, 2005.

Metcalf, A. D.; Ferguson, W. J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. **Journal of the Royal Society Interface**. vol. 4, p. 413-437, 2007.

Moraes, D. C.; Barros, P. O.; Tamos, E. F.; Zuim, N. R. B. Ação cicatrizante de substâncias ativas: D-pantenol, óleo de girassol, papaína, própolis e fator de crescimento de fibroblastos. **FOCO**. vol. 4, p. 83-98, 2013.

Nair S. K.; Bhat, I. K.; Aurora, A. L. Role of proteolytic enzyme in the prevention of postoperative intraperitoneal adhesions. **Archives of Surgery**. vol. 108, p. 849-853, 1974.

Nascimento, F. R.; Rodriguez, D.; Gomes, E.; Fernvik, E. C.; Russo, M. A method for multiple sequential analyses of macrophage functions using a small single cell sample. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. vol 36, p. 1221-1226, 2003.

Nascimento, F. R.; Cruz, G. V.; Pereira, P. V.; Maciel, M. C.; Silva, L. A.; Azevedo, A. P. et al. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**. vol. 78, p. 2650-2653, 2006.

Neiva, V. A.; Ribeiro, M. N.; Cartágenes, M. S.; Moraes-Coutinho, D. F.; Nascimento, F. R.; Reis, A. S. et al. Estudos pré-clínicos da atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* L. e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. **Revista de Ciências da Saúde**. vol. 13, n. 2, p. 155-165, 2011.

Oliveira Júnior, J.; Serrano, S.; Teodoro, A.; Dana, B. Os anti-inflamatórios não hormonais. **Revista Prática Hospitalar**. vol. 9, p. 173-178, 2007.

Oosterlink, W.; Cheng, H.; Hoebeke, P.; Verbeeck, R. Watertight sutures with fibrin glue: an experimental study. **European Urology**. vol. 23, p. 481-484, 1993.

Patrício, F. J. B. **Atividade imunoestimulante e anti-*Leishmania* de *Chenopodium ambrosioides* L. (mastruz)**. 2011. 123 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, São Luís. 2011.

Patrício, F. J.; Costa, G. C.; Pereira, P. V.; Aragão-Filho, W. C.; Sousa, S. M.; Frazão, J. V. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amanozenesis*. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 127, p. 602-605, 2008.

Pereira, W. S. ***Chenopodium ambrosioides* L.: avaliação toxicológica e ação na resposta inflamatória**. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís. 2009.

Pereira, W. S.; Ribeiro, B. P.; Sousa, A. I.; Serra, I. C.; Mattar, N. S.; Fortes, T. S. et al. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 127, p. 602-605, 2010.

Pinheiro-Neto, V. F.; Araújo, B. M.; Guerra, P. C.; Borges, A. C. Efeito do cataplasma das folhas de mastruz (*Chenopodium ambrosioides*) na reparação de tecidos moles e ósseos em rádio de coelho. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**. vol. 3, p. 62-66, 2005.

Ratliff, T. L. Role of the immune response in interstitial cystitis. **Clinical Immunology and Immunopathology**. vol. 74, n.3, p. 209-216, 1995.

Ramzi S. **Robins basis of disease**. Philadelphia: WB. Saunders, 1999.

Rossi-Bergmann, B.; Costa, S. S.; Moraes, V. L. Brazilian medicinal plants: a rich source of immunomodulatory substances. **Ciência e cultura (SBPC), BRASIL**. vol. 49, p. 395-401, 1997.

Sérvio, E. M.; Araújo, K. S.; Nascimento, R. S.; Costa, C. L.; Mendes, L. M.; Maia-Filho, A. L. et al. Cicatrização de feridas com a utilização do extrato de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) e cobertura secundária estéril de gaze em ratos. **conScientiae Saúde**. vol. 10, n. 3, p. 441-448, 2011.

Shäffer, M. B.; Barbul, A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. **British Journal of Surgery**. vol. 85, p. 444-460, 1998.

Shah, M.; Foreman, D. M.; Ferguson, M. W. Neutralising antibody to TGF-beta 1, 2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. **Journal of Cell Science**. vol. 107, p. 1137-1157, 1994a.

Shah, M.; Foreman, D. M.; Ferguson, M. W. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. **The Journal of Cell Biology**. vol. 108, p. 985-1002, 1995.

Sime, P. J.; O'Reilly, K. M. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. **Clinical Immunology**. vol. 99, n. 3, p. 308-319, 2001.

Sousa, L. H.; Rios, C. E.; Assunção, A. K.; Fialho, E. M.; Costa, G. C.; Nascimento, F. R. Avaliação da ação analgésica do extrato hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* L. em ensaios pré-clínicos. **Revista Ciência da Saúde**. vol.14, n. 1, p. 73-82, 2012.

Witte, M. B.; Barbul, A. Role of nitric oxide in wound repair. **The American Journal of Surgery**. vol. 183, n. 4, p. 406-412, 2002.

Witte, M. B.; Barbul, A. Princípios gerais da cicatrização das feridas. In: Barbul, A. (Ed.). **Clínicas Cirúrgicas da América do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997, p. 509-527.

## Apêndice A – Ficha protocolo de procedimentos cirúrgicos e sacrifício

DROGA PESQUISADA: EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Chenopodium ambrosioides*

RATO N°: \_\_\_\_\_ TIPO DE MARCAÇÃO:  
 SACRIFÍCIO: ( ) 3 Dias ( ) 7 Dias ( ) 14 Dias  
 COMPLICAÇÕES ANESTÉSICAS: ( ) Sim ( ) Não  
 GRUPO: ( ) *C. ambrosioides* ( ) Controle ( ) Piroxicam  
 PESO INICIAL: \_\_\_\_\_ g  
 DOSE DO *C. ambrosioides*: \_\_\_\_\_ ml  
 ATO OPERATÓRIO:  
 Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
 Complicação intraoperatória: ( ) sim ( ) não  
 Tipo de complicação: \_\_\_\_\_  
 Fotografia n°: \_\_\_\_\_

### QUADRO 1 - EVOLUÇÃO DIÁRIA

DPO*	PESO	EVOLUÇÃO (condições comportamentais e o aspecto da ferida operatória)	DP O	EVOLUÇÃO (condições comportamentais e o aspecto da ferida operatória)
01			08	
02			09	
03			10	
04			11	
05			12	
06			13	
07			14	

\*DPO: dia de pós-operatório

ÓBITO: ( ) Sim ( ) Não

DIA DO ÓBITO: \_\_\_ DPO

CAUSA MORTE: \_\_\_\_\_

SACRIFÍCIO: ( ) ANESTESIA ( ) EXSANGUINAÇÃO

Infecção de sítio operatório: ( ) Sim ( ) Não

Deiscência de ferida operatória: ( ) Total ( ) Parcial ( ) Não houve

Deiscência de bexiga: ( ) total ( ) parcial ( ) não houve

Abscesso intra-abdominal: ( ) Sim ( ) Não

Fístula vesicocutânea: ( ) Sim ( ) Não

Hematoma: ( ) Sim ( ) Não

Formação de cálculos ( ) Sim ( ) Não

Aderências: ( ) Sim ( ) Não

Grau de adesão de NAIR: \_\_\_\_\_

Órgão aderido: \_\_\_\_\_

Exame da peça cirúrgica: \_\_\_\_\_

COLETA DE LÍQUIDO PERITONEAL: ( ) SIM ( ) NÃO ( ) ACIDENTE

RETIRADA DE ÓRGÃOS, PESO (g): FÍGADO \_\_, BAÇO \_\_, RIM DIR \_\_, RIM ESQ \_\_, LINF IL \_\_, LINF MESENT \_\_,

### QUADRO 2 - ESCORE DE ADESÃO DE NAIR

ESCORE (grau)	ACHADO
0	Sem adesão
1	Adesão única entre dois órgãos ou entre um órgão e a parede abdominal
2	Duas adesões entre órgãos ou um órgão e a parede abdominal
3	Mais de duas adesões entre órgãos ou uma massa de adesão generalizada do intestino sem aderir à parede abdominal
4	Aderências generalizadas entre órgãos e a parede abdominal ou aderência maciça entre todos os órgãos

FONTE: (NAIR, BHAT, AURORA, 1974

## Apêndice B – Ficha protocolo de análise histológica

RATO °: \_\_\_\_\_

### PROTOCOLO DE ANÁLISE HISTOLÓGICA

Lâmina N°: \_\_\_\_\_ ;

Fotografia N° : \_\_\_\_\_ ;

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### 1) Inflamação Aguda:

- (1) Somatório 0 (ausência de inflamação aguda)
- (2) Somatório 1 ou 2 (inflamação aguda discreta)
- (3) Somatório 3 ou 4 (inflamação aguda moderada)
- (4) Somatório 5 ou 6 (inflamação aguda acentuada)

Os critérios aplicados encontram-se no Quadro abaixo:

QUADRO 1 – CRITÉRIOS APLICADOS PARA AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO AGUDA

CRITÉRIOS	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2
NEUTRÓFILOS	ausentes	presente, em menos de 50% do campo	presente, em mais de 50% do campo
CONGESTÃO VASCULAR	ausente	presente, em menos de 50% do campo	presente, em mais de 50% do campo
EDEMA	ausente	presente, em menos de 50% do campo	presente, em mais de 50% do campo

#### 2) Reepitelização:

- (1) Ausente (área de sutura sem proliferação das células epiteliais)
- (2) Parcial (processo de reepitelização evidente nas bordas da sutura, mas sem união entre as margens)
- (3) Completa (área de sutura era totalmente recoberta pela proliferação epitelial)

#### 3) Coaptação das bordas da sutura:

- (1) Ausente (bordas da sutura não apresentavam coincidência)
- (2) Parcial (apenas uma parte de uma das bordas coincide com outra borda)
- (3) Completa (coincidência das bordas da sutura)

#### 4) Extensão do Infiltrado na Parede:

- (1) Até a mucosa
- (2) Até a submucosa
- (3) Até a muscular
- (4) Até a serosa

#### 5) Neoformação Capilar:

- (1) Ausente (ausência de vasos neoformados)
- (2) Discreta (pequena quantidade de vasos neoformados)
- (3) Moderada (moderada quantidade de vasos neoformados)
- (4) Acentuada (grande quantidade de vasos neoformados)

#### 6) Necrose Isquêmica:

- (1) Ausente (não existe focos de necrose isquêmica junto ao fio de sutura)
- (2) Discreta (ocasionais focos de necrose junto ao fio de sutura, sem envolver-los totalmente)
- (3) Moderada (necrose envolve toda a circunferência do fio de sutura)
- (4) Acentuada (necrose estende-se além do fio de sutura)

#### 7) Reação Gigantocelular tipo corpo estranho ao redor do fio de sutura:

- (1) Ausente (não existe reação gigantocelular ao redor do fio de sutura)
- (2) Discreta (pequena quantidade de reação gigantocelular ao redor do fio)
- (3) Moderada (moderada quantidade de reação gigantocelular ao redor do fio)
- (4) Acentuada (intensa reação gigantocelular ao redor do fio de sutura)

#### 8) Proliferação Fibroblástica:

- (1) Ausente ( não existe fibroblastos proliferados no campo de sutura)
- (2) Discreta (esparsos fibroblastos proliferados em meio ao tecido conjuntivo frouxo)
- (3) Moderada (pequenos feixes multidirecionais de fibroblastos)
- (4) Acentuada (fibroblastos constituindo feixes compactos arranjados multidirecionalmente)

#### 9) Fibrose (colagenização):

- (1) Ausente (não existe fibras colágenas depositadas)
- (2) Discreta (deposição de fibras colágenas de pequena intensidade, caracterizada por esparsas fibras depositadas em meio aos fibroblastos proliferados)
- (3) Moderada (fibras de colágeno depositadas formam feixes espessos eosinofílicos, intercaladas com áreas de tecido conjuntivo frouxo e fibroblastos proliferados)
- (4) Acentuada (grande deposição de fibras colágenas com feixes espessos e compactos em meio a fibroblastos proliferados e sem áreas de tecido conjuntivo frouxo).

#### 10) Inflamação Crônica:

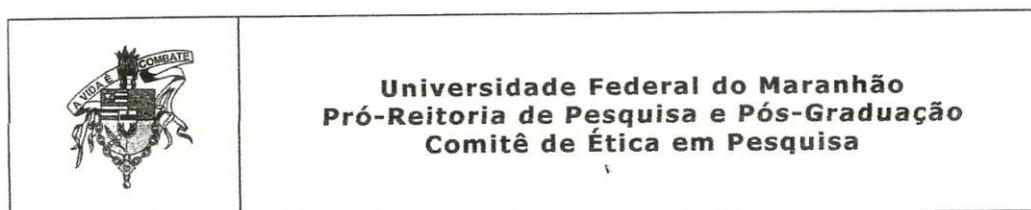
- (1) Ausente (não existe leucócitos mononucleares)
- (2) Discreta (leucócitos mononucleares isolados e esparsos)
- (3) Moderada (leucócitos mononucleares agregados atingindo parcialmente a área de sutura)
- (4) Acentuada (leucócitos mononucleares agregados e confluentes atingindo todo o campo da sutura)

**Apêndice C** – Ficha protocolo de análise imuno-histoquímica

Lâmina N°: \_\_\_\_\_ ;      Fotografia N° : \_\_\_\_\_ ;      Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

CRITÉRIOS DE ANÁLISE		
ESCORE	DISTRIBUIÇÃO	INTENSIDADE
0	Ausente	Ausente
1	Em até 1/3 dos campos	Leve
2	Em mais de 1/3 e menos de 2/3 dos campos	Moderada
3	Em mais de 2/3 dos campos	Intensa

## ANEXO 01 – Comitê de Ética em Pesquisa



## PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO DE PESQUISA	Número do Protocolo	23115-012975/2008-43
PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA	Data de entrada no CEP	15/04/2009
x TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO	Data da assembléia	01/06/2009

## I - Identificação:

Título do projeto:	Avaliação imunofarmacológica de espécies vegetais com potencial de uso profilático e terapêutico para Leishmaniose				
Identificação do Pesquisador Responsável:	Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> Flavia Raquel Fernandes do Nascimento				
Identificação da Equipe executora:	Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> Flavia Raquel Fernandes do Nascimento, Andréa Pires, Izabel Bogéa, Jeamile Bezerra e Wanderson Pereira				
Instituição onde será realizado:	Universidade Federal do Maranhão				
Área temática:	III	Multicêntrico:	Não	Data de recebimento:	05/05/2009
Cooperação estrangeira:	Não	Patrocinador:	Não	Data de devolução	18/05/2009

## II - Objetivos:

## Geral:

1. Avaliar as ações anti- ou pró- inflamatórias dos extratos e frações *Tephrosia cinerea*, *Julocroton triqueter*, *Chenopodium ambrosioides* em ensaios pré-clínicos utilizando camundongos

## Específicos:

1. Avaliar a atividade pró/anti-inflamatória dos extratos, frações e/ou substâncias isoladas em ensaios biológicos de piritonite, bolsão inflamatório, granuloma, edema de prata e cicatrização.

## III - Sumário do projeto:

A proposta, submetida pela pesquisadora responsável desta instituição, Profa. Dra. Flavia Raquel Fernandes do Nascimento, trata-se de um projeto de pesquisa, que foi anteriormente aprovado em Edital do CNPq (Jovem Pesquisador, processo nº 562248/2008-0), fato este que já pressupõe seu mérito científico, além do que em seu corpo técnico existem alunos de cursos de pós-graduação *stritu senso*, em nível de mestrado (2) e doutorado (2) trabalhando nesse projeto suas dissertações e teses, respectivamente, o que demonstra também o seu caráter acadêmico. O aumento do número de notificações dos casos de Leishmaniose no Brasil, têm despertado o interesse da biotecnologia no sentido de desenvolver alternativas profiláticas e terapêuticas mais viáveis. O tratamento da Leishmaniose é feito preferencialmente com medicamentos à base de antimoniais pentavalentes que foram descritos ainda na década de 40, os quais até o presente não demonstraram sua efetividade em todas as espécies de *Leishmania*, além de serem de alto custo e possuírem efeitos colaterais bastante graves, desde nefrotoxicidade, arritmias graves e morte súbita, dentre outros. Além disso, já estão descritos casos de resistência do parasito a estas drogas, principalmente por conta da administração de doses inadequadas e tratamentos descontínuos. As plantas são importantes fontes de matéria-prima para síntese de novos fármacos. Embora mais da metade dos medicamentos com efeitos antiparasitários, antitumorais, antibacterianos e antivirais, já comercializados, ou em fase de testes clínicos, sejam de origem natural, quando se tratam de plantas com efeito medicinal cientificamente comprovado, existe apenas uma pequena porcentagem que está sendo de fato estudada em nossa região, caracterizada pela grande diversidade de espécies vegetais utilizadas popularmente como medicamentos, que ainda não possuem qualquer comprovação científica desta natureza. Assim, a presente proposta visa a identificação e o desenvolvimento de bioprodutos derivados de algumas espécie vegetais, com potenciais de uso profilático e/ou terapêutico para as infecções por *Leishmania* sp.

**IV - Comentários do relator:**

Abordado e a possibilidade do desenvolvimento de terapia para o seu tratamento e cura, num grau maior acessibilidade da população e com potencial menos tóxico para seus usuários. Possui, portanto, tanto relevância social quanto científica, conforme preconiza a Res 196/96-III.1d. O projeto foi aprovado pela Assembléia Departamental de origem do proponente-pesquisador. A metodologia deixa clara a pertinência dos objetivos a serem alcançados.

O cronograma permite ser seguido nos prazos estabelecidos. O orçamento encontra-se perfeitamente detalhado conforme preconiza a Res. 196/96-VI.2.J, o que torna viável a realização da pesquisa proposta. Creemos ser importante a justificativa para o fato de que o presente projeto já foi iniciado antes de ter sido aprovado por este Comitê, em face de que algumas dissertações de mestrado e teses de doutorado estão sendo realizadas como parte integrante dos respectivos cursos têm prazo para serem cumpridos. Além do mais, a data de abertura do presente processo de análise do CEPUFMA data de 18/12/2009.

**V - Pendências:**

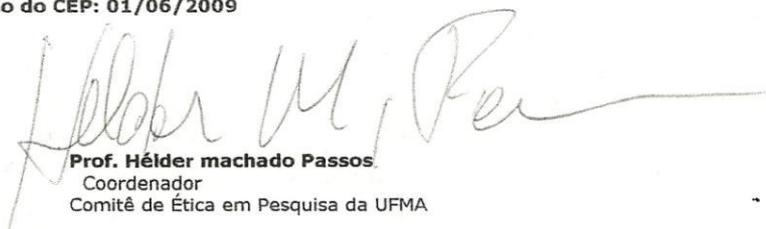
Nenhuma

**VI - Recomendações:**

1. Recomendamos juntar a este processo a cópia digitalizada em CD do presente projeto.

**VII - Parecer Consubstanciado do CEP:**

Deste modo, de acordo com relato acima exposto, o **Protocolo 23115-012975/2008-43**, referente ao **Trabalho Conclusão de pesquisa** sob o título "**Avaliação imunofarmacológica de espécies vegetais com potencial uso profilático e terapêutico para Leishmaniose**" é considerado por este CEP **COMO APROVADO**

**VIII - Data da reunião do CEP: 01/06/2009**


**Prof. Hélder machado Passos**  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMA

DATA DE RECEBIMENTO:	04/07/09
RELATÓRIO PARCIAL:	03/07/10
RELATÓRIO FINAL:	

**NOTA:**

1. Anexa folha do Relatório Parcial;
2. Pesquisas com duração acima de 6 meses deverão apresentar relatórios parciais semestrais;
3. Pesquisas com duração acima de 12 meses deverão apresentar relatórios anuais;
4. Após a conclusão da pesquisa deverá ser apresentado relatório final ao CEP/UFMA.