



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - PPGCBM**

ANTONIO DE PÁDUA ROCHA NÓBREGA NETO

**EFEITOS DA BROMELAÍNA (derivada do *Ananas comosus*) EM PELE E MÚSCULO
ESTRIADO ESQUELÉTICO APÓS INJÚRIA EXPERIMENTAL NA PATA DE RATAS**

PARNAÍBA – PI

2017

ANTONIO DE PÁDUA ROCHA NÓBREGA NETO

EFEITOS DA BROMELAÍNA (derivada do *Ananas comosus*) EM PELE E MÚSCULO ESTRIADO
ESQUELÉTICO APÓS INJÚRIA EXPERIMENTAL NA PATA DE RATAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biomédicas – PPGCBM, da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de Concentração: Marcadores Epidemiológicos em Saúde
Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos

PARNAÍBA – PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba

Serviço de Processamento Técnico

N337e Nóbrega Neto, Antonio de Pádua Rocha.

Efeitos da bromelaína (derivada do *Ananas comosus*) em pele e músculo estriado esquelético após injúria experimental na pata de ratas [manuscrito] / Antonio de Pádua Rocha Nóbrega Neto. – 2017.

56 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos.

Área de Concentração: Marcadores Epidemiológicos em Saúde

1. Biomedicina. 2. Produtos naturais. 3. Bromeliaceae. 4. Neutrófilos. 5. Inflamação. 6. Estresse Oxidativo. I. Título.

CDD: 610

ANTONIO DE PÁDUA ROCHA NÓBREGA NETO

EFEITOS DA BROMELAÍNA (derivada do *Ananas comosus*) EM PELE E MÚSCULO ESTRIADO
ESQUELÉTICO APÓS INJÚRIA EXPERIMENTAL NA PATA DE RATAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biomédicas – PPGCBM, da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos (Presidente)
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof^a. Dra. Karina Oliveira Drumond (Membro Interno)
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras (Membro Interno)
Universidade Federal do Piauí – UFPI

PARNAÍBA – PI

2017

A minha família gratidão, pelo apoio incondicional em todas as fases da minha formação, carinho, compreensão, amor, sensibilidade e generosidade.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, te agradeço pelo caminho percorrido, pelos dias de alegrias e tristezas, pelas dificuldades encontradas, foram momentos assim que me fizeram melhor como pessoa e possibilitaram o conhecimento de que posso sempre me construir e reconstruir, gratidão eterna, incansavelmente sou grato pelas graças alcançadas e por sua energia transbordar meu interior.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Daniel Fernando Pereira Vasconcelos**, sua dedicada e minuciosa orientação me ensinaram olhar tudo com olhos vitoriosos, sua paciência, amizade, profissionalismo, humildade, simplicidade e calma me ensinaram que tudo pode ficar melhor amanhã, sua competência técnica e sua grandiosidade como ser humano me ensinaram a ter certeza que ninguém é tão grande que não se possa aprender algo novo e que ninguém é tão pequeno que não se possa ensinar alguém, sua generosidade me acolhendo sempre nas preocupações me fizeram acreditar na conclusão desta dissertação, renovando meu entusiasmo, obrigado por sempre me ver melhor do que eu realmente sou, e principalmente pelo incentivo na realização dos experimentos.

Aos colegas de Mestrado "*Pelos olhos da fé*" pelo incentivo durante o processo de seleção em especial **José Lopes Pereira Júnior**, pela amizade construída e apoio amigo durante essa trajetória.

Aos colegas do laboratório de histologia - LAPHIS da UFPI pela generosidade, companheirismo e disposição desde os experimentos até as coletas de dados, sem vocês essa construção teria caminhos mais longos.

Aos laboratórios BIOTEC, LAFFEX, GEHMED e BIOMIC por terem me recebido me proporcionando auxílios e pela participação direta ou indireta na realização dessa pesquisa.

Aos Professores da Comissão Examinadora da Qualificação, Prof. Dr. **Jefferson Soares de Oliveira** e Prof. Dr. **André Luiz dos Reis Barbosa** pela grandiosa contribuição e

sugestões sábias e ao Prof. Dr. **Marcelo de Carvalho Filgueiras** pela disponibilidade de suplência desta banca.

A amiga e Prof^a. Msc. **Any Carolina Cardoso Guimarães Vasconcelos** pelo apoio e incentivo incansável na construção da minha formação acadêmica, lembro-me do abraço amigo e sincero que ganhei minutos após o resultado da seleção do PPGCBM quando cheguei em sala de aula na graduação, ao mesmo tempo percebia que ser feliz pela vitória do próximo é joia rara, grato eterna amiga e orientadora.

Aos meus pais, **Paulo de Sávio e Fernanda da Silva**, minha irmã, **Monnicy Aguiar**, minha avó, **Lourdes Aguiar**, minhas tias, **Marcela Aguiar e Elizabeth Aguiar** e meu tio **Elias Vaz** por me ensinarem que o amor verdadeiro simplesmente existe, e que a família é base sólida nos momentos de angústias e felicidades, eternamente grato a Deus por me oportunizar conviver com vocês, ao mesmo tempo sou grato por entenderem a necessidade das minhas ausências durante essa jornada.

A minha namorada, **Jeisse Moraes de Oliveira Lima**, que comigo convive e participa ativamente na minha construção como pessoa, dando-me suporte emocional e amigo no enfrentamento dos caminhos tortuosos sempre com calma e sabedoria.

Ao **Felipe Rodolfo Pereira da Silva** pelo incentivo e construção do conhecimento durante a seleção do PPGCBM me fazendo acreditar no êxito do processo.

Aos técnicos de laboratório da UFPI e a colega operador de micro, **Maria Laurentina de Brito Veras** (Paulinha) por sempre me receber com disposição e ter contribuído de maneira amiga e generosa para a realização das minhas atividades, obrigado por ter sido tão proativa comigo.

Os meus agradecimentos a CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro a mim concedido para a realização do meu projeto de Mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTAS DE TABELAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO	3
2.1. ASPECTOS TECIDUAIS DA PELE E MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO APÓS INCISÃO EXPERIMENTAL	3
2.1.1. Inflamação.....	3
2.1.2. Estresse oxidativo	4
2.1.3. Aspectos macroscópicos e histopatológicos do reparo da pele	5
2.1.4. Histomorfometria do músculo estriado esquelético	7
2.2. PRODUTOS NATURAIS	9
2.3. BROMELAÍNA (<i>Ananas comosus</i> – abacaxi)	10
2.3.1. Aspectos gerais.....	10
2.3.2. Produção da bromelaína	13
2.3.3. Potenciais terapêuticos	13
2.3.3.1. Agente anti-inflamatório	13
2.3.3.2. Aplicabilidade em distúrbios dermatológicos	16
2.3.3.3. Agente antioxidante.....	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo geral	18

3.2. Objetivos específicos.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Obtenção do composto	19
4.2. Animais.....	19
4.3. Grupos experimentais	19
4.4. Procedimento prévio a confecção da injúria por incisão tecidual na pata.....	19
4.5. Modelo de confecção da injúria por incisão tecidual na pata.....	20
4.6. Ensaio Bioquímicos	22
4.6.1. Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO)	22
4.6.2. Avaliação da atividade de glutatona (GSH) e malonaldeído (MDA).....	23
4.7. Análise macroscópica	23
4.8. Processamento histológico	24
4.9. Análise histomorfométrica	24
5. Análise estatística	25
6. RESULTADOS	26
6.1. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	26
6.2. Determinação da atividade de glutatona (GSH) e malonaldeído (MDA)	26
6.3. Avaliação macroscópica e histopatológica da pele	28
6.3.1. Avaliação macroscópica da pele.....	28
6.3.2. Avaliação histopatológica da pele	29
6.4. Avaliação histomorfométrica do gastrocnêmio.....	31
7. DISCUSSÃO	33
8. CONCLUSÃO.....	41
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

APÊNDICES
ANEXOS

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância

E.P.M – Erro Padrão da Média

I.P –Intraperitoneal

PO – Pós - operatório

TA – Tibial anterior

ON – Óxido Nítrico

WOMAN – Índice de saúde do joelho

IL-13 – Interleucina 13

IL-6 – Interleucina 6

IL – 8 – Interleucina 8

MMP – Metaloproteinases de Matriz

MPO – Mieloperoxidase

GSH – Glutathiona

MDA – Malonaldeído

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio

PGE₂– Prostaglandina E₂

TXA₂ – Tromboxano A₂

OA –Osteoartrite

TNF – *Tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

UMPO – Unidades de MPO

T CD4+ – Linfócitos T CD4+

T CD8+ – Linfócitos T CD8+

CD25+ – Linfócitos CD25+

UFPI – Universidade Federal do Piauí

LAPHIS – Laboratório de Análise e Processamento Histológico

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA - *Ethylenediaminetetracetic acid* (ácido etilendiamino tetra-acético)

HE – Hematoxilina e eosina

MRO – Metabólitos reativos de oxigênio

ITCs – Isotiocianatos

ATC – Articulação talocrural

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidase

GLs - Glucosinolatos

GMG - Glucomoringina

CD128a (CXCR1) – Molécula receptor de IL-8

CD128b (CXCR2) - Molécula receptor de IL-8

CD62L (L-selectina) – Molécula de adesão celular

IFN γ – Interferon γ

GMCSF – Fator estimulante de colônias

COX 2 – Ciclo-oxigenase - 2

ELD – Extensor longo dos dedos

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem representativa de manifestações teciduais na pele e no músculo estriado esquelético TA após injúria experimental por incisão demonstrando a cascata de evento inflamatório, infiltrado neutrofílico com liberação de MPO produzindo ERO em excesso como: ânions superóxido, hipocloreto e peróxido de hidrogênio e consequente estresse oxidativo tecidual..... **5**
- Figura 2.** Imagem representativa do *Ananas comosus* – abacaxi em um corte sagital ilustrando sua constituição: Coroa (seta verde em A); ápice (seta vermelha em B); casca (seta azul em C); poupa (estrelas pretas em C); eixo central (retângulo vertical com bordas pretas em C) e base (seta laranja em C) **11**
- Figura 3.** Imagem ilustrativa evidenciando o caule do *Ananas comosus*, local de concentrações elevadas da bromelaína **12**
- Figura 4.** Imagem representativa dos possíveis mecanismos de ação da bromelaína melhorando a progressão e o desenvolvimento de periodontite, indicados por cinco pontos. (a) A bromelaína pode diminuir o crescimento do microrganismo periodontal; (b) A bromelaína proteoliticamente pode remover moléculas de superfície de célula importantes em leucócitos; (c) A bromelaína pode reduzir a migração de neutrófilos para locais periodontais; (d) A bromelaína regula os mediadores de inflamação; (e) A bromelaína pode diminuir o processo de osteoclastogênese com redução da perda óssea alveolar na periodontite..... **16**
- Figura 5.** Imagem do momento cirúrgico demonstrando após a tricotomia e antissepsia local com iodopolvidona, a realização da incisão de aproximadamente 4cm em pele (P) e epimísio (cabeça de seta preta) do músculo TA até a região do terço médio do osso tibial esquerdo (O), e periósteo..... **20**
- Figura 6.** Imagem do animal posicionado em decúbito lateral direito após o procedimento cirúrgico demonstrando a sutura com 6 pontos simples e separados (setas amarelas) após o reposicionamento da camada muscular e pele (estrela amarela) da pata esquerda e nova antissepsia da área operada com iodopolvidona..... **21**
- Figura 7.** Imagem ilustrativa da administração da bromelaína na dosagem 15 mg/kg por via i.p uma vez/dia durante 7 dias consecutivos **21**

Figura 8. Fluxograma representando as fases do ensaio experimental de confecção da injúria tecidual desde o início do período destinado a ambientação dos animais em cada grupo analisado até o início das coletas de dados.....	22
Figura 9. Esquema representando a análise histomorfométrica do músculo gastrocnêmio do ensaio experimental de confecção da injúria tecidual na pata.....	25
Figura 10. Atividade anti-inflamatória da bromelaína 15mg/kg sobre a pele (A) e musculatura estriada esquelética TA (B) após o procedimento na pata esquerda	26
Figura 11. Atividade antioxidante (GSH) e (MDA) da bromelaína 15mg/kg sobre a musculatura estriada esquelética TA (A e B, respectivamente) e pele (C) após o procedimento na pata esquerda.....	27
Figura 12. Imagens ilustrativas da análise macroscópica da pele no PO antes e após o tratamento com a bromelaína na dosagem de 15mg/kg por via i.p	29
Figura 13. Imagens ilustrativas da análise histopatológica da pele que sofreu incisão tecidual e posteriormente foi tratada com a bromelaína na dosagem de 15mg/kg por via i.p	30
Figura 14. Imagens ilustrativas da análise histomorfométrica da gastrocnêmio da pata que sofreu incisão tecidual e posteriormente foi tratada com a bromelaína na dosagem de 15mg/kg por via i.p.....	32
Figura 15. Imagens ilustrativas do modelo de injúria por incisão experimental na pata	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisão dos grupos e procedimentos realizados **19**

Tabela 2. Dados histomorfométrico (área e diâmetro) das fibras, contagens de células, número de núcleos e núcleos/células do músculo estriado esquelético gastrocnêmio após a confecção da injúria por incisão tecidual na região da pele e TA **31**

RESUMO

Título: EFEITOS DA BROMELAÍNA (derivada do *Ananas comosus*) EM PELE E MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO APÓS INJÚRIA EXPERIMENTAL NA PATA DE RATAS.

A bromelaína (derivada do *Ananas comosus* - abacaxi) da família das proteases, conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família das *Bromeliaceae*, é conhecida por uma variedade de efeitos farmacológicos, apresentando propriedades fibrinolíticas, antitrombóticas e anti-inflamatórias. No entanto, de acordo com o nosso conhecimento, não há estudos sobre os efeitos da bromelaína extraída do caule do *Ananas comosus* em pele e músculo estriado esquelético tibial anterior (TA) em modelo de injúria por incisão experimental e concomitante análise histomorfométrica do gastrocnêmio homolateral em ratas. Então, objetivou-se avaliar os efeitos da bromelaína extraída do caule do *Ananas comosus* em pele e músculo estriado esquelético após modelo de injúria por incisão experimental na pata de ratas. O estudo foi conduzido com ratas (Wistar) separadas em três grupos: controle (n = 06), incisão (n = 04) e bromelaína (n = 05). A bromelaína foi administrada uma vez/dia, via i.p na dose 15 mg/kg durante 07 dias consecutivos. O potencial anti-inflamatório foi testado com atividade de mieloperoxidase (MPO) e análise macroscópica e histopatológica da pele. O potencial antioxidante foi testado com níveis de glutathiona (GSH) e malondialdeído (MDA). Foi analisado histomorfometricamente o gastrocnêmio usando Software ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*) para medição de área e diâmetro de fibras, contagem de células, núcleos e núcleos/células. No grupo incisão os animais tiveram aumento da atividade de MPO, níveis de GSH reduzidos e MDA aumentado ($p \leq 0,05$) em pele e músculo TA, além de aumento na área das fibras do gastrocnêmio ($p \leq 0,05$). Contudo, a bromelaína conseguiu reverter esses achados ($p \leq 0,05$) e favoreceu o processo de cicatrização na pele. Em conclusão, nossos dados indicam que a bromelaína extraída do caule do *Ananas comosus* reduziu atividade de MPO e estresse oxidativo nos tecidos incisados. Além disso, favoreceu o processo de cicatrização na pele e reverteu o aumento na área das fibras do gastrocnêmio. Recomenda-se mais estudos com tempo superior para determinar a contribuição em diâmetros, contagem de células, núcleos e núcleos/células. Nosso modelo experimental é promissor e pode funcionar como um modelo inovador de avaliação de danos e reparo no músculo estriado esquelético, além disso, trouxe dados inéditos da bromelaína revertendo atividade de MPO e níveis de GSH e MDA.

Palavras-chaves: Produtos naturais; bromeliaceae; neutrófilos; inflamação; estresse oxidativo

ABSTRACT

Title: EFFECTS OF BROMELAIN (derived from *Ananas comosus*) IN SKIN AND SKELETAL STRIATED MUSCLE AFTER EXPERIMENTAL INJURY IN THE PAW OF RATS

Bromelain (derived from *Ananas comosus* - pineapple) from the protease family, a set of proteolytic enzymes found in plants of the Bromeliaceae family, is known for a variety of pharmacological effects, exhibiting fibrinolytic, antithrombotic and anti-inflammatory properties. However, according to our knowledge, there is no study about the effects of bromelain extracted from the stem of *Ananas comosus* on skin and skeletal striated muscle tibialis anterior (TA) in an injury model by the experimental incision and concomitant histomorphometric analysis of the homolateral gastrocnemius in rats. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of bromelain extracted from the stem of *Ananas comosus* on tissue manifestations in the skin and skeletal striated muscle after experimental incision injury in the paw of rats. The study was conducted with rats (Wistar) separated into three groups: control (n = 06), incision (n = 04) and bromelain (n = 05). Bromelain: 15 mg/kg, once/day, via i.p., for 7 consecutive days. The anti-inflammatory potential was tested with myeloperoxidase (MPO) activity and macroscopic and histopathological skin analysis. The antioxidant potential was tested with glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels. The gastrocnemius was analyzed histomorphometrically using ImageJ Software (*Image Processing and Analysis in Java*) for fiber area and diameter measurement, cell counts, nuclei and nuclei / cells. In incision group, the animals had an increase in MPO activity, reduced GSH levels and increased MDA ($p \leq 0,05$) in the skin and TA muscle, besides increased in the area of the gastrocnemius fibers ($p \leq 0.05$). However, bromelain was able to reverse these findings ($p \leq 0.05$) and favored the healing process in the skin. In conclusion, our data indicate that bromelain, extracted from the stem of *Ananas comosus*, reduced MPO activity and oxidative stress in the incised tissues, in addition, favored the healing process in the skin and reversed the increase in the area of the gastrocnemius fibers. It is recommended further studies with time superior to determine the contribution in diameters, cell counts, nuclei and nuclei/cells. Our experimental model is promising and can act as innovation in the assessment of damage and repair in skeletal striated muscle. Moreover, it has brought unpublished bromelain data reversing MPO activity and levels of GSH and MDA.

Keywords: Natural products; bromeliaceae; neutrophils; inflammation; oxidative stress

1. INTRODUÇÃO

O interesse em potenciais anti-inflamatórios e antioxidantes de produtos naturais e sua participação no processo de cicatrização vem crescendo atualmente (MACIEJ et al., 2016; SCHEIBE et al., 2016).

A bromelaína, conjunto de enzimas proteolíticas da família das proteases é encontrada nos vegetais e em todas as espécies da família das *Bromeliaceae*, na qual o *Ananas comosus* – abacaxi é o mais conhecido. Está presente no caule, folhas, raízes e no fruto do abacaxi, o caule e fruto produzem quantidades elevadas, no entanto, as concentrações em caules são superiores às dos frutos (RAMLI et al., 2016). É conhecida por uma variedade de efeitos farmacológicos, apresentando propriedades fibrinolíticas, antitrombóticas, dentre outras (KAUR; CORSCADDEN; LOTT, 2016; SAHBAZ et al., 2015). Além de ser objetivo de estudo no tratamento do câncer, modulação da replicação imune, potencialização de efeitos antibióticos, ações mucolíticas, gastrointestinais, efeitos circulatórios, inflamação, dentre outros (BHATTACHARYYA, 2008; SANKARAN; VADANASUNDARI; HEMAVATHY, 2011; COSTA et al., 2014). E atualmente, tem sido utilizada no tratamento clínico de distúrbios inflamatórios, incluindo do sistema músculo esquelético (RAMLI et al., 2016).

No entanto, de acordo com o nosso conhecimento, não há estudos sobre os efeitos da bromelaína extraída do caule do *Ananas comosus* em pele e músculo estriado esquelético TA em modelo de injúria por incisão experimental e concomitante análise histomorfométrica do gastrocnêmio homolateral em ratas.

A medida que a pele e o epimísio do músculo esquelético são incisados e comprometidos ocorre uma resposta inflamatória crescente (JARVINEN et al., 2005; SHIN et al., 2014). O processo de regeneração desses tecidos em resposta a lesões é tipicamente dividido em quatro fases: amplificação da lesão, proliferação, diferenciação precoce e terminal (BIRESSI; RANDO, 2010; JACKSON et al., 2011; MILLER, 2012).

Os neutrófilos, conhecidos como leucócitos polimorfo nucleados, são os primeiros a chegar nessas áreas de inflamação, atuando para iniciar a fase de amplificação da lesão, aumentando atividade de MPO, uma enzima abundante nos granulócitos dos neutrófilos que atua como biomarcador inflamatório (SERRANO et al., 2011; SHIN et al., 2014). Além disso, os neutrófilos liberam espécies reativas de oxigênio (ERO) que incluem ânions superóxido, hipocloreto e peróxido de hidrogênio (SILVEIRA, 2016; BUTTERFIELD; BEST; MERRICK, 2006). Nesse contexto, ERO em excesso são conhecidas por reduzir níveis de

GSH, um antioxidante endógeno e aumentar concentrações de MDA e consequente peroxidação lipídica celular, ambos biomarcadores de estresse oxidativo. Assim, contribuindo para o aumento da injúria tecidual e prejudicando o processo de cicatrização (PHAN et al., 2001; SILVEIRA, 2016). Portanto, restringir a atividade de ERO em excesso, quer bloqueando a neutrofilia ou bloqueando a atividade dos neutrófilos, limitaria o dano ao tecido resultado da injúria por incisão (BUTTERFIELD; BEST; MERRICK, 2006).

As fases de regeneração são reguladas por um série de interações moleculares entre células progenitoras e células do infiltrado inflamatório (TIDBALL & VILLALTA, 2010). Embora a transição entre essas fases possa ocorrer de forma previsível, fatores como extensão da lesão, infecção, dentre outros, podem influenciar no mecanismo de desregulação do processo de cicatrização normal podendo perpetuar em infiltrado inflamatório crônico, fibroses excessivas e cicatrização incompleta (BAOGE et al., 2012; SHIN et al., 2014).

Com base nas considerações acima, substâncias que estimulam a capacidade de reparo e defesa anti-inflamatória e antioxidante são importantes para reduzir níveis de células inflamatórias e produção de radicais livres em excesso, permitindo possivelmente a recuperação de lesões por incisão tecidual na pele e músculo esquelético. Portanto, é promissor acreditar que os efeitos conhecidos da bromelaína podem abrir portas nos tratamentos de tecidos envolvidos nessa lesão. Apostando em avanços sobre seus efeitos biológicos, questiona-se qual seria seu comportamento sobre a pele e músculos estriados esqueléticos, após uma injúria por incisão tecidual na pata de ratas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS TECIDUAIS DA PELE E MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO APÓS INCISÃO EXPERIMENTAL

2.1.1. Inflamação

Inflamação é uma resposta de defesa natural que surge em qualquer tecido contra diferentes estímulos nocivos, tais como produtos químicos, infecção ou exposição a toxinas microbiológicas, trauma de dano tecidual, dentre outras (RAJAN et al., 2016), podendo causar múltiplas doenças sistêmicas (COUSSENS & WERB, 2002; RANKIN, 2004; KIM et al., 2014). Danos teciduais sobretudo incluindo a pele e músculo esquelético desencadeiam uma cascata de eventos bioquímicos e moleculares que iniciam um rápido, mas altamente complexo processo de reparação de tecidos (Figura 1) (MARTIN & LEIBOVICH, 2005). Esses dados também desencadeiam uma sequência previsível de eventos incluindo degeneração, inflamação, reparo, regeneração e formação de tecido cicatricial (BEST & HUNTER, 2000; SHIN et al., 2014).

A cicatrização de feridas é um dos eventos biológicos mais complexos e resulta das interações entre diferentes estruturas de tecidos e um grande número de células infiltrativas, incluindo principalmente neutrófilos, macrófagos, mastócitos e linfócitos, que servem como células efetoras imunes (SILVEIRA, 2016).

Os neutrófilos ativados, liberam ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN), durante esse processo, ERO e ERN desempenham um papel crucial na cicatrização de feridas, particularmente na fase inflamatória (SERARSLAN et al., 2007; SILVEIRA, 2016). Contudo, quando em excesso, produz excesso de superóxido, alterando o estado redox celular e retardando o processo de reparo tecidual, culminando em estresse oxidativo (SILVEIRA; STRECK; PINHO, 2007; SILVEIRA, 2016). Assim, contribuindo para o aumento da lesão tecidual em eventos como feridas, sendo conhecidas nesse contexto como elementos que prejudicam o processo de cicatrização (PHAN et al., 2001; SILVEIRA, 2016).

Embora a inflamação induzida por lesão tecidual e estímulos ambientais, seja uma resposta biológica concebida para proteger os órgãos dos danos, a exposição prolongada a tais estímulos pode resultar em inflamação crônica, que é considerada um indutor de doenças

inflamatórias e cancro. Várias cascatas de sinalização estão associadas aos estágios desde a iniciação até à manutenção destas condições inflamatórias (KIM et al., 2014).

2.1.2. Estresse oxidativo

Estresse oxidativo é um evento comum em lesões teciduais, sobretudo em injúrias de pele e músculo esquelético, que ocorre por consequência de um desequilíbrio entre geração e remoção de ERO por defesas celulares, podendo levar a oxidação de vários constituintes como lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA) (GAO et al., 2016). As ERO, tais como ânions superóxido, hipocloreto e peróxido de hidrogênio, podem ser geradas por células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos durante o processo de cicatrização decorrente a injúria tecidual (Figura 1) (VAN LINTHOUT; MITEVA; TSCHÖPE, 2014; XIAO & MIWA, 2016). Tais condições podem desenvolver disfunção celular aguda, degeneração tecidual crônica ou morte celular (BETANCOR et al., 2013; GAO et al., 2016). Detalhadamente, os agentes patogênicos liberam citocinas pró-inflamatórias do hospedeiro levando ao recrutamento de células inflamatórias (XIAO & MIWA, 2016). Essas células produzem ERO através de uma explosão oxidativa, catalisada por nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidase (NADPH) para eliminar os agentes patogênicos e promover resposta inflamatória (GUO & DIPIETRO, 2010).

Esse processo é conhecido como evento normal dos estágios de cicatrização tecidual, em condições fisiológicas, os patógenos são removidos e o tecido é reparado como consequência (XIAO & MIWA, 2016). Porém em situações de processos inflamatórios persistente, células inflamatórias resultarão em alto grau de liberação de ERO, aumentando o dano oxidativo tanto local quando sistemicamente e acelerando o processo de senescência celular, aumentando a peroxidação lipídica e consequente níveis de MDA e reduzindo níveis de antioxidante endógenos (GSH), além de carbonilação de proteínas celulares e NADPH (COLAVITTI & FINKEL, 2005). Por conseguinte prejudicando a cicatrização e a regeneração tecidual, portanto, a remoção de ERO por antioxidantes parece ser uma estratégia favorável para cicatrização tecidual em doenças inflamatórias. (XIAO & MIWA, 2016).

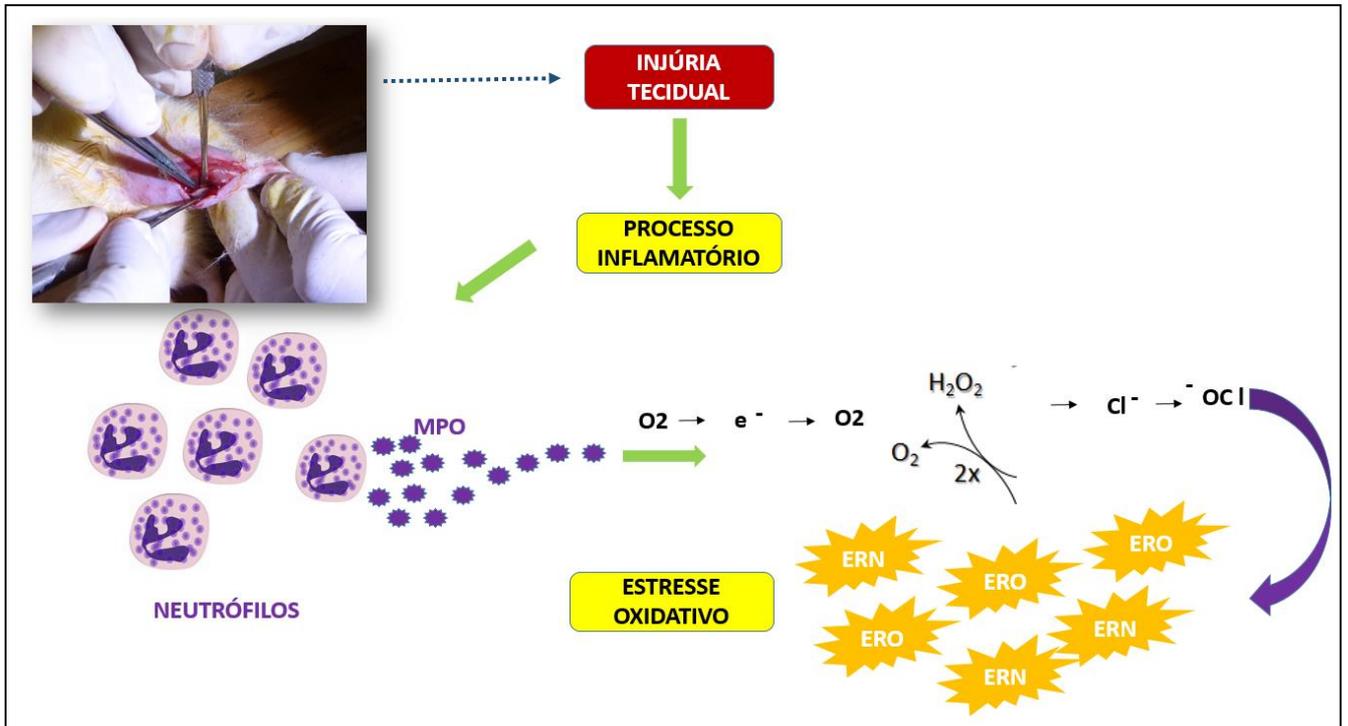


Figura 1 – Imagem representativa de manifestações teciduais na pele e no epimísio do músculo estriado esquelético TA após injúria experimental por incisão demonstrando a cascata de evento inflamatório, infiltrado neutrofílico com liberação de MPO produzindo ERO em excesso como: ânions superóxido, hipocloreto e peróxido de hidrogênio e consequente estresse oxidativo tecidual. Fonte: Autoria própria.

2.1.3. Aspectos macroscópicos e histopatológicos do reparo da pele

Os processos de regeneração e reparo de tecidos consistem numa sequência de eventos moleculares e celulares que ocorrem após o início de uma lesão tecidual para restaurar o tecido danificado (GONZALEZ et al., 2016). As fases de remodelação da matriz exsudativa, proliferativa e extracelular são eventos sequenciais que ocorrem através da integração de processos dinâmicos envolvendo mediadores solúveis, células sanguíneas e células parenquimatosas. Fenômenos exsudativos que ocorrem após a lesão contribuem para o desenvolvimento de edema tecidual. O estágio proliferativo procura reduzir a área de lesão tecidual ao contrair miofibroblastos e fibroplasia. Nesta fase, a angiogênese e os processos de reepitelização podem ainda ser observados. As células endoteliais são capazes de se diferenciar em componentes mesenquimatosos, e esta diferença parece ser finamente orquestrada por um conjunto de proteínas sinalizadoras que foram estudadas na literatura. Este caminho é conhecido como Hedgehog (MARTINS et al., 2006; GONZALEZ et al., 2016).

As lesões teciduais, ao atingir as diferentes camadas da pele, alteram sua estrutura anatômica e fisiológica e desencadeiam este processo de reparação tecidual (GARCÍA-GUBERN; COLON-ROLON; BOND, 2010; DE BRUIN et al., 2011). Os eventos celulares e bioquímicos na reparação podem ser divididos nas seguintes fases: reação inflamatória, proliferação celular e síntese dos elementos que compõem a matriz extracelular e no período posterior, denominado remodelação (NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2009).

Inicialmente, as mudanças teciduais decorrem da fase inflamatória, que compreende pelo influxo de leucócitos no local da lesão, eliminando os microrganismos invasores e o restante de células da matriz. Essa resposta é muito rápida e coincide com os principais sinais de inflamação, que são revelados pelo edema e hiperemia no local da lesão. Normalmente, a resposta celular é estabelecida nas primeiras 24 horas e pode prolongar-se por até dois dias. Uma ativação rápida das células imunes no tecido também pode ocorrer, como ocorre com mastócitos, células gama-delta e células de Langerhans, que secretam quimiocinas e citocinas, que possivelmente coordenam processos celulares como, migração, proliferação, síntese de matriz e assim por diante, até o final do processo de reparo, possibilitando restaurar a função protetora e integridade da pele (WERNER; GROSE, 2003; MEDRADO et al., 2003; SHAW; MARTIN, 2009; GONZALEZ et al., 2016).

A inflamação é uma resposta tecidual localizada e protetora que é desencadeada pela lesão, causando a destruição dos tecidos. As células inflamatórias desempenham um papel importante na cicatrização das feridas e contribuem para a libertação de enzimas lisossômicas e ERO, bem como para facilitar a limpeza de vários detritos celulares (MEDRADO et al., 2003).

Os neutrófilos são conhecidos por expressar citocinas pró-inflamatórias e grande quantidade de substâncias antimicrobianas altamente ativas, como ERO, peptídeos catiónicos e proteases na localização da lesão. A resposta inflamatória continua com o recrutamento ativo dos neutrófilos em resposta à ativação do sistema do complemento, desgranulação plaquetária e produtos de degradação bacteriana (GURTNER et al., 2008). Estes são atraídos por inúmeras citocinas inflamatórias produzidas por plaquetas ativadas, células endoteliais e produtos de degradação de agentes patogênicos. Assim, os neutrófilos são as principais células ativadas e recrutadas que desempenham um papel na limpeza do tecido, bem como contribuem para a morte de agentes invasores.

Na fase proliferativa o objetivo é reduzir a área de tecido lesionada por contração e fibroplasia, estabelecendo uma barreira epitelial viável para ativar queratinócitos. Este estágio

é responsável pelo fechamento da própria lesão, que inclui angiogênese, fibroplasia e reepitelização. Estes processos começam no microambiente da lesão dentro das primeiras 48 horas e podem desdobrar até o 14º dia após o início da lesão (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

A terceira fase consiste em remodelação, que começa duas a três semanas após o início da lesão e pode durar um ano ou mais. O objetivo principal desta etapa é conseguir a máxima resistência à tração através da reorganização, degradação e ressíntese da matriz extracelular. Nesta fase final da cicatrização da lesão ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura do tecido normal e o tecido de granulação é gradualmente remodelado, formando um tecido cicatricial menos celular e vascular (GONZALEZ et al., 2016), e que exibe um aumento progressivo na concentração de fibras de colágeno. Este estágio é marcado pelo amadurecimento dos elementos com profundas alterações na matriz extracelular e a resolução da inflamação inicial. Assim que a superfície da lesão é coberta por uma monocamada de queratinócitos, a sua migração epidérmica cessa e uma nova epiderme estratificada com uma lâmina basal subjacente é restabelecida das bordas da ferida para a sua porção interior (MARTIN, 1997). Vários instrumentos são utilizados para avaliação macroscópica e histopatológica destes processos, tais como régua, paquímetro, fotografias e micrografias, respectivamente (DELODE et al., 2001).

2.1.4. Histomorfometria músculo estriado esquelético

O músculo estriado esquelético fornece múltiplas funções, tais como locomoção, estabilização e estrutura. Essas funções dependem de contratilidade, função básica desse tecido (SHIN et al., 2014). Ao nível celular, essa contratilidade é realizada por unidades motoras funcionais. (SHIN et al., 2014). As miofibrilas são organelas dispostas em feixes longitudinais que preenchem quase totalmente o citoplasma das células musculares, e individualmente são rodeadas por uma membrana de tecido conjuntivo (endomísio), conjuntos de fibras musculares são agregadas pelo perimísio e agrupadas em fascículos para formar o ventre muscular sendo revertido pelo epimísio (SHIN et al., 2014).

As miofibrilas são compostas por filamentos de actina e miosina que em resposta a um estímulo elétrico e uma adenosina dependente de trifosfato, ocorre o deslizamento do complexo fino de actina sobre o filamento grosso de miosina (MILLER, 2012). Esse deslizamento resulta na contração muscular e fornece movimento articular, estabilização esquelética e mobilidade. Em resultado da contração muscular repetida, os filamentos de

actina e miosina são recrutados, aumentando assim a contração e o tamanho do músculo, afetando o contorno da estrutura miofibrilar, sendo a magnitude desta resposta dependente da lesão e localização da injúria (SHIN et al., 2014).

Os principais determinantes estruturais da função muscular incluem, área transversal e diâmetro da fibra muscular, número de fibras musculares, número de núcleos, número de sarcômeros em série, a organização das fibras dentro do músculo e as propriedades do tecido conjuntivo (BENARD et al., 2011).

Em condições de lesão tecidual envolvendo a pata de ratos, fisiologicamente o sistema nervoso processa a informação e informa o animal sobre o potencial da injúria, na tentativa de manter a integridade física local, podendo culminar em sobrecarga mecânica (ALMEIDA et al., 2006; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008). A sobrecarga induzida pelo esforço físico ou dano mecânico promove o aumento da tensão muscular e a produção de energia tornando o músculo esquelético suscetível a alterações (TAKEKURA et al., 2001; BRITO et al., 2006; ZISSLER et al., 2016). Uma das possíveis adaptações notável é a hipertrofia e hiperplasia das fibras musculares (WERNIG, 2003; ARGAW; DESAULNIERS; GARDINER, 2004). Essa adaptações histomorfométricas das fibras musculares induzida por esforço físico repetitivo é possível estudar mensurando as dimensões histomorfométricas das secções transversais das fibras (BRITO et al., 2006).

Assim, estudos histomorfométricos do tecido muscular são frequentemente utilizados para avaliar essas dimensões em cortes transversais como diâmetro e área dessa estrutura, além de possibilitar contagem de células, núcleos e núcleos/células (MATTIELLO-SVERZUT et al., 2005; BERTOLINI; OLIVEIRA; CARARO, 2010).

2.2 PRODUTOS NATURAIS

Nos últimos anos são utilizados como medidas preventivas e curativas por 80% da população mundial em condições de diversas natureza (SALEEM et al., 2011). A curcumina, principal ingrediente ativo do açafrão foi avaliada em um extenso ensaio clínico, observando seu potencial anti-inflamatório e antinociceptivo (SRIVASTAVA & SRIMAL, 1985; SATOSKAR; SHAH; SHENOY, 1986). Parthenolide é frequentemente encontrado em plantas medicinais da Índia e apresenta propriedades anti-inflamatórias sendo utilizado pelos índios no tratamento de infecção na pele e outros órgãos (HEINRICH et al., 1998; LIWEBER et al., 2002). Assim como extratos de frutas de damascos, maçãs, pêssegos, peras, papaias, flavonoides, dentre outras (MURAD, 2003; MACIEJ et al., 2016).

Cannabis sativa L. (hemp) e *Moringa oleifera* são as plantas medicinais folclóricas mais importantes usadas culturalmente, em especial no sul da Ásia há séculos (RAJAN et al., 2016). Os efeitos benéficos de compostos naturais derivados destas e de outras plantas medicinais com atividades anti-inflamatórias e antioxidantes em doenças inflamatórias têm sido estudados nos últimos anos (GAUTAM, & JACHAK, 2009; ABOURASHED, 2013). Os canabinóides, compostos ativos presentes na planta *C. sativa* L. (cânhamo), são potentes agentes anti-inflamatórios pertencentes a uma classe de meroterpenoides únicos obtidos a partir da alquilação de um alquil-resorcinol com uma unidade de monoterpeneo (APPENDINO; CHIANESE; TAGLIALATELA-SCAFATI, 2011).

Os glucosinolatos (GLs) também são compostos naturais, contendo enxofre e azoto, presentes em grande parte nas espécies da ordem Brassicales. Após hidrólise pela β -tioglucosidase endógena chamada microssinase (EC 3.2.1.147), os GLs produzem uma série de produtos bioativos importantes, entre os quais os isotiocianatos (ITCs) são definitivamente os mais marcantes (HALKIER & GERSHENZON, 2006). Os ITCs estão bem documentados por seus efeitos antioxidantes (VALGIMIGLI & IORI, 2009; GIACOPPO et al., 2015). Glucomoringina (GMG) (4- (α -l-rhamnopiranosiloxi) benzilo) é um membro incomum da família GL presente em vegetais pertencentes à família Moringaceae: *M. oleifera* comumente chamado de "rabanete", é o mais amplamente distribuído. O composto glicosilado isotiocianato de 4- (α -l-rhamnopiranosiloxi) benzilo (moringina), resultante da hidrólise de mirosinase (> 99%) de GMG em estado neutro, demonstrou exibir muitos elementos biológicos como atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (GIACOPPO et al., 2015).

Outro exemplo é o chá verde (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae), que contém uma ampla gama de polifenóis com forte atividade antioxidante, anticancerígena e antimutagênica (ELHALWAGY; DARWISH; ZAHER, 2008) também conhecida como catequinas de chá verde. Incluem catequina, epicatequina, epicatequina-3-galato, epigallocatequina, epigallocatequina-3-galato e gallocatequinateato (ABDEL-RAHEEM et al., 2010; MARTÍN et al., 2010; CHEN et al., 2015). Está documentado que o chá verde tem efeitos preventivos contra diversas doenças crônicas, incluindo obesidade, aterosclerose, doenças neurodegenerativas e câncer (CHEN et al., 2015). O Chá, através da ingestão de antioxidantes, pode tornar-se benéfico em condições de estresse oxidativo (COIMBRA, 2006) como em lesões inflamatórias teciduais, dentre outras (VELJKOVIĆ et al., 2016). Entre as catequinas, a epigallocatequina-3-galato é o polifenol mais abundante na sua composição e o antioxidante mais potente (COIMBRA, 2006). Tem também atividade anti-inflamatória e antiproliferativa e é capaz de inibir o crescimento celular e induzir a apoptose de várias células cancerosas humanas sem afetar adversamente as células normais (SYED et al., 2007; VERGOTE et al., 2002).

2.3 BROMELAÍNA (*Ananas comosus* – abacaxi)

2.3.1 Aspectos gerais

O *Ananas comosus* é uma espécie frutífera de importância econômica e social cultivado em áreas tropicais e subtropicais, incluindo regiões do mundo como China, Indonésia, Malásia, Tailândia, Filipinas, Quênia e Índia. É também o segunda planta mais popular do mundo devido à sua utilização como alimento e suplemento medicinal (Figura 2) (FRANÇA-SANTOS et al., 2009; CORZO; WALISZEWSKI; WELTI-CHANES, 2012; SAHBAZ et al., 2015). Além do *Ananas comosus* todas as outras espécies de *Ananas* são encontradas no Brasil, um dos principais centros de exportação desses produtos e seus derivados.

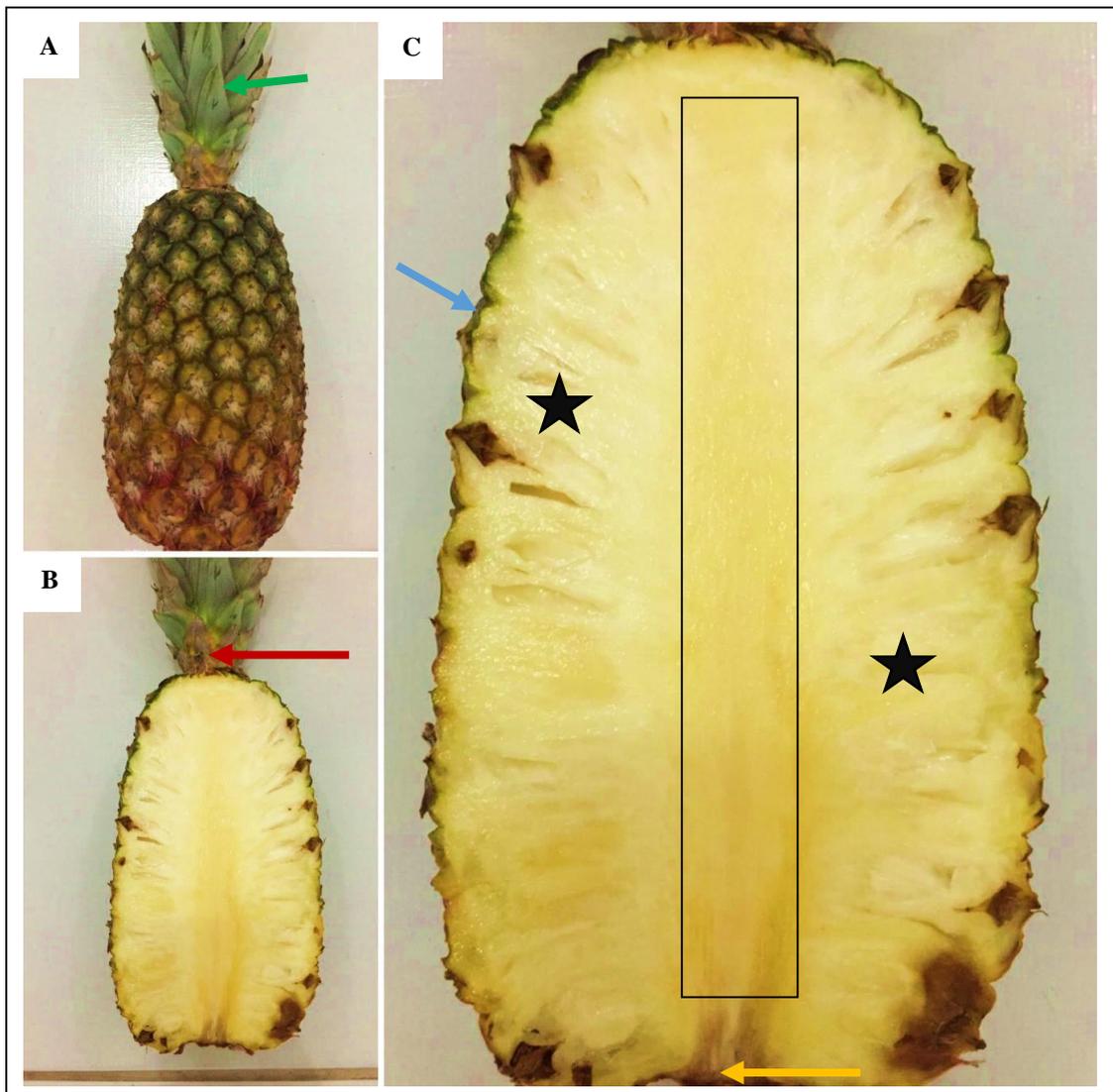


Figura 2 – Imagem representativa do *Ananas comosus* – abacaxi em um corte sagital ilustrando sua constituição: Coroa (seta verde em A); ápice (seta vermelha em B); casca (seta azul em C); poupa (estrelas pretas em C); eixo central (retângulo vertical com bordas pretas em C) e base (seta laranja em C). Fonte: Autoria própria.

As excelentes características qualitativas do fruto abacaxizeiro refletem sua importância socioeconômica (GORGATTI NETTO et al., 1996; FRANÇA-SANTOS et al., 2009). O fruto era conhecido por “fortalecer” o estômago, curar enjôos e aumentar o apetite (ROCHFORD, 1658). Portanto, “se o fruto apresentava efeitos benéficos até então não comprovados” acreditava-se que a raiz apresentava propriedades com os mesmos efeitos (TAUSSIG & BATKIN, 1988).

Assim, os primeiros usos do abacaxi pelos nativos tornaram-se justificados até então, justamente pela descoberta de um conjunto de enzimas proteolíticas da família das proteases encontrada nas folhas, raízes, fruto e principalmente no caule (Figura 3) do *Ananas comosus*: bromelaína, contendo proteínas de caráter enzimático e carboidratos, entre as proteínas

destacam-se endopeptidases, fosfatases, glicosidases, peroxidases, celulases, nucleases e inibidores de proteases (CHITTENDEN; JOSLIN; MEARA, 1891; PECKOLDT et al., 1948; MAURER, 2001; RAMLI et al., 2016).



Figura 3 – Imagem ilustrativa evidenciando o caule do *Ananas comosus*, local de concentrações elevadas da bromelaína (setas pretas). Fonte: Autoria própria.

A bromelaína tem inúmeras aplicações biotecnológicas, especialmente em setores de alimentos, cosméticos, farmacêuticos e clínicos (RAMLI et al., 2016). Em meados dos anos 1950, quando se tornou comercialmente ativa, aproximadamente 800 artigos científicos

buscaram analisar suas propriedades químicas, farmacológicas e possíveis aplicações clínicas (TAUSSIG & BATKIN, 1988).

Assim, a partir de então o composto tem sido proposto ser útil em terapias de doenças que demandam o sistema imunológico (MAURER, 2001; FITZHUGH et al., 2008). E passou a ser objeto de estudo relacionado a agregação plaquetária, fibrinólise, tratamento do câncer, modulação da replicação imune, potencialização de efeitos antibióticos, ações mucolíticas, gastrointestinais, efeitos circulatórios, inflamação, dentre outros (BHATTACHARYYA, 2008; SANKARAN; VADANASUNDARI; HEMAVATHY, 2011; COSTA et al., 2014), sendo utilizada em múltiplos ensaios clínicos em seres humanos e animais. Embora a via de administração, as dosagens e qualidade dos estudos variarem, os efeitos benéficos foram sugeridos numa variedade de doenças e modelos experimentais, incluindo condições inflamatórias (FITZHUGH et al., 2008).

2.3.2 Produção da bromelaína

A bromelaína não está presente nos estágios iniciais do desenvolvimento do *Ananas comosus*, mas os níveis aumentam rapidamente à medida que a planta amadurece (RAMLI et al., 2016). O processo de produção elencam algumas fases como: extração, purificação, secagem e embalagem, sendo a purificação uma fase crítica pela influência na pureza do produto final (ARSHAD et al., 2014).

Geralmente é preparada a partir do suco de abacaxi, a extração da bromelaína do *Ananas comosus* inicia com a trituração sem água das porções escolhidas para purificação, obtendo um extrato bruto enzimático que será centrifugado – ultrafiltrado – liofilizado, resultando em um pó amarelado (BHATTACHARYYA, 2008; BALA et al., 2011; RAMLI et al., 2016).

2.3.3. Potenciais terapêuticos

2.3.3.1. Agente anti-inflamatório

A bromelaína têm sido previamente testada clinicamente como agente anti-inflamatório em artrite reumatóide, lesões de tecidos moles, dor e asma crônica (MAURER,

2001; JABER, 2002; HALE et al., 2005). Seu principal mecanismo de ação parece ser proteolítico (TOCHI et al., 2008).

Em um modelo de alergia das vias do trato respiratório induzida por ovalbumina em ratos, o tratamento com a bromelaína reduziu significativamente os resultados iniciais da indução do modelo experimental: leucócitos totais (eosinófilo e linfócitos), IL – 13, células T CD4+, T CD8+, CD25+. Estes resultados indicam que o tratamento sistêmico com a bromelaína reduziu o processo inflamatório das vias aéreas induzida por ovalbumina, contribuindo para a caracterização e sua utilização na administração em condições inflamatórias mediadas por células T (SECOR et al., 2005).

Yuan et al., (2006) descrevem a bromelaína como um potencial anti-inflamatório em lesões esportivas agudas e que pesquisas mostram um potencial produto para o tratamento de osteoartrite, desde que pela primeira vez em 1964, seu potencial anti-inflamatório foi relatado no tratamento de artrite reumatóide e pacientes com osteoartrite (OA).

Walker et al., (2002) investigaram os efeitos da bromelaína sobre a dor aguda de duração inferior a 3 meses em joelho com osteoartrite. O estudo composto por 77 indivíduos nos quais foram avaliados previamente pelo índice de saúde do joelho (WOMAC) e o índice de bem-estar psicológico. Foram administradas doses de 200mg/dia ou 400 mg/dia. Nos grupos tratados, todos os sintomas relacionados aos escores (WOMAC), foram significativamente menores quando comparados à linha de base ($p = 0,0001$ e $<0,0001$, respectivamente). Melhorias na pontuação total de sintomas ($p = 0,036$), a rigidez ($p = 0,026$) e a função física ($p = 0,021$) foram significativamente maiores no grupo de dose elevada (400 mg/dia), em comparação com o grupo de dose menor (200mg/dia). Em comparação à linha de base, bem-estar psicológico geral foi significativamente melhor em ambos os grupos após tratamento ($p = 0,015$ e $p = 0,0003$), e uma significativa relação dose-resposta foi observada.

Os resultados mostram que a bromelaína pode ser eficaz na melhoria dos sintomas físicos e melhorar o bem-estar geral em adultos saudáveis que sofrem de dor leve no joelho de modo dose dependente. Sugere – se então que o mecanismo de ação anti-inflamatória da bromelaína é mediada pelo aumento da atividade fibrinolítica, reduzindo os níveis de fibrinogênio no plasma e os níveis de bradicinina, resultando em redução da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, reduzindo edema e dor por diminuição dos níveis de prostaglandina E₂ (PGE₂) e tromboxano A₂ (TXA₂) e por modulação de células imunitárias e moléculas de adesão da superfície.

Apesar dos resultados promissores do tratamento com bromelaína em modelos animais e ensaios clínicos em seres humanos, os mecanismos de ação são os principais responsáveis pelos seus efeitos anti-inflamatórios, no entanto, ainda não estão claros (FITZHUGH et al., 2008). Sabe-se que a bromelaína foi associada pelo menos a 14 moléculas de superfície celular com adesão e/ou ativação de leucócitos (HALE et al., 2002). Dentre as moléculas sensíveis a ela foram identificadas CD62L (L-selectina), CD128a (CXCR1) e CD128b (CXCR2). As duas últimas moléculas constituem o receptor para a IL – 8, uma quimiocina que regula a ativação de neutrófilos e a quimiotaxia para locais de inflamação aguda (MURPHY, 1997; FITZHUGH et al., 2008).

Em resumo, os estudos apresentados por Fitzhugh et al., (2008), apoiam a remoção dos receptores de quimiocinas CD128 como um mecanismo para efetivamente a bromelaína reduzir neutrófilos induzidos pela IL-8.

Da Silva et al., (2016) apontam para a bromelaína como uma potencial estratégia no tratamento adjuvante da periodontite, um processo inflamatório que acomete os tecidos que dão suporte ao dente. Baseado em estudos anteriores que demonstram que a bromelaína pode atuar diminuindo o crescimento de microrganismos por clivagem proteolítica de moléculas de superfície celular importantes em leucócitos, reduzindo a migração de neutrófilos para os locais periodontais, por regulação nos níveis de mediador de inflamação, e pela diminuição da perda óssea alveolar na periodontite. Os autores acreditam que (1) A bromelaína pode diminuir o crescimento do microrganismo periodontal, (2) a bromelaína pode remover proteoliticamente moléculas de superfície celular (CD25) importantes nos leucócitos; (3) A bromelaína pode reduzir a migração dos neutrófilos para os locais periodontais; (4) Bromelaína pode regular os mediadores de inflamação tais como IFN γ , TNF, GMCSF e Cox-2; e (5) A bromelaína pode diminuir o processo de osteoclastogênese com uma diminuição da perda óssea alveolar na periodontite (Figura 4).

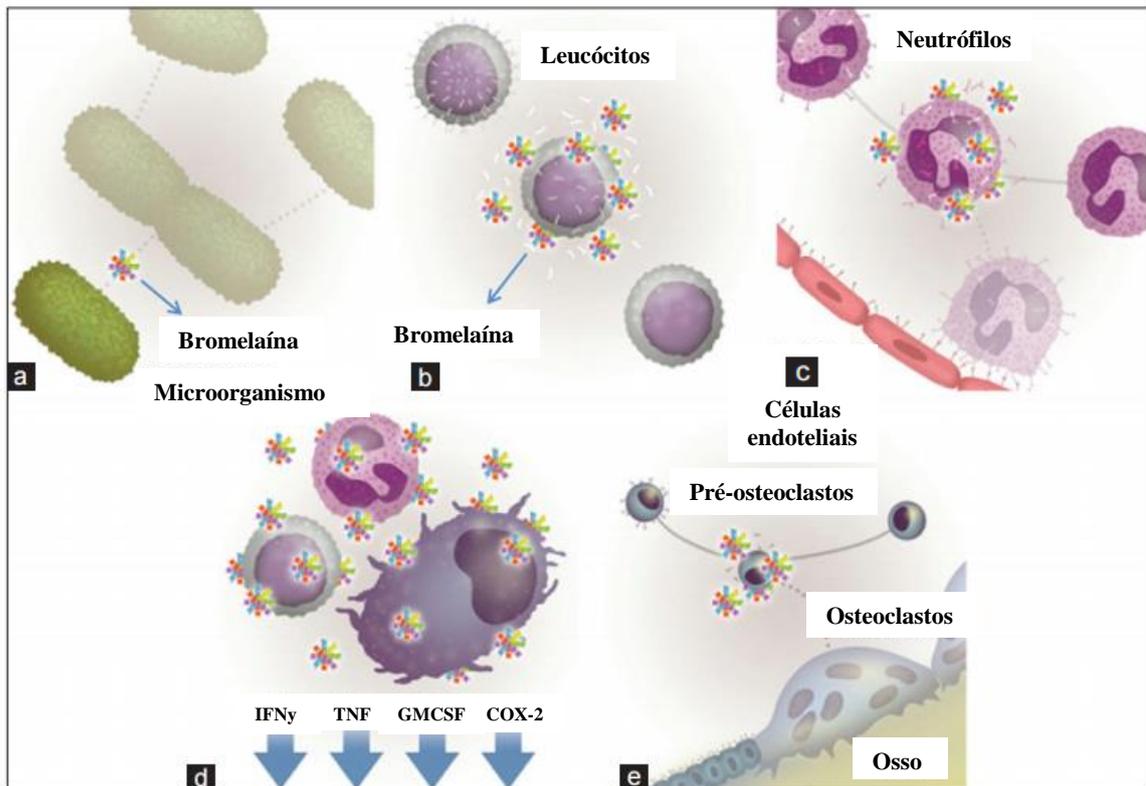


Figura 4 – Imagem ilustrativa representando os possíveis mecanismos de ação da bromelaína melhorando a progressão e o desenvolvimento de periodontite, indicados por cinco pontos. (a) A bromelaína pode diminuir o crescimento do microrganismo periodontal; (b) A bromelaína proteoliticamente pode remover moléculas de superfície de célula importantes em leucócitos; (c) A bromelaína pode reduzir a migração de neutrófilos para locais periodontais; (d) A bromelaína regula os mediadores de inflamação; (e) A bromelaína pode diminuir o processo de osteoclastogênese com redução da perda óssea alveolar na periodontite. Fonte: DA SILVA et al., 2016.

2.3.3.2. Aplicabilidade em distúrbios dermatológicos

Murad (2003) descreveu métodos de tratamentos dermatológicos com extratos de frutas de damascos, maçãs, pêssegos, pêras, papaias e *Ananas comosus*, nos quais demonstraram desempenhar um papel importante no tratamento de distúrbios dermatológicos. As composições do extrato derivado do *Ananas comosus* são supostamente úteis para o tratamento destes distúrbios tais como: pele seca, rugas, falta de firmeza na pele.

Rosenberg et al., (2004) e Maurer (2001) concluíram também que as complicações de infecções, contaminação e sepse reduziram consideravelmente, assim como os índices de morbidade e mortalidade após tratamento com bromelaína em lesões por queimaduras. Desta maneira é encorajador acreditar que a bromelaína possa ser útil também no processo de reparo da pele (TOCHI et al., 2008).

2.3.3.3. Agente antioxidante

Em um artigo de revisão com a finalidade de avaliar os fatores nutricionais associados com a OA, observou-se associação direta entre a condição clínica, estresse oxidativo, e liberação de ERO (WANG et al., 2007; MILLER; NICKLAS; LOESER, 2008). ERO está intimamente ligada com a fisiopatologia de uma gama de condições relacionadas com a idade, da mesma forma pode ser considerada como um protótipo de idade e doenças degenerativas (SACHIN AVASTHI & SINGH, 2009). Há evidências de que existam células no interior do complexo articular que produzam ERO e que o dano oxidativo é fisiologicamente importante, dentro dos limites fisiológicos (SACHIN AVASTHI & SINGH, 2009).

Surapaneni et al., 2007 avaliaram o estresse oxidativo e a capacidade antioxidante em pacientes com OA e os níveis de peroxidação lipídica: Concentrações de MDA, GSH, ácido ascórbico, vitamina E no plasma e atividades de enzimas antioxidantes foram quantificadas nessa população. O estudo sugere maior radical livre de oxigênio evidenciado pelo aumento da produção de MDA, diminuição de GSH, ácido ascórbico, vitamina E, e atividade da enzima catalase, evidenciando o estresse oxidativo na OA. Os autores ainda retratam que o aumento das atividades de enzimas antioxidantes pode ser uma regulação compensatória em resposta ao estresse oxidativo.

Micronutrientes podem mediar o processo na OA, bloqueando o dano oxidativo. O óxido nítrico (ON) e ERO inibem a síntese de colágeno e proteoglicanos, ativa metaloproteinases (MMP), aumentando a susceptibilidade a lesões da cartilagem (SACHIN AVASTHI & SINGH, 2009).

No artigo de revisão realizado por Sachin Avasthi & Singh, (2009), a bromelaína apareceu como um dos extratos de frutas a participar de nove ensaios clínicos em pacientes com OA de joelho, justamente pelos seus efeitos anti-inflamatórios, antitrombóticos, analgésico e fibrinolíticos anteriormente testados, sendo sugestivo de que tenha correlação com a melhora do quadro clínico de OA nos indivíduos dos estudos e influência sobre o estresse oxidativo deflagrado no complexo articular com OA.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar os efeitos da bromelaína extraída do caule do *Ananas comosus* em pele e músculo estriado esquelético após modelo de injúria por incisão experimental na pata de ratas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a atividade da MPO no músculo estriado esquelético TA e pele da pata incisada;
- ✓ Analisar reparo da pele incisada através da análise macroscópica e histopatológica;
- ✓ Investigar o estresse oxidativo no músculo estriado esquelético TA e pele da pata incisada por meio do ensaio de GSH e/ou MDA;
- ✓ Medir histomorfometricamente a área e diâmetro do músculo estriado esquelético gastrocnêmio da pata incisada;
- ✓ Quantificar número de células, núcleos e núcleos/células no músculo estriado esquelético gastrocnêmio da pata incisada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do composto

Foi obtida da Sigma Aldrich® a bromelaína do caule do abacaxi B4882-10G: 1,0 micromole de p-nitrofenol a partir de éster p-nitrofenílico de N-alfa-CBZ-L-lisina por minuto a pH 4,6 a 25 °C.

4.2 Animais

Ratos Wistar fêmeas (150 ± 15 g), obtidos no Biotério Central da Universidade Federal do Piauí - UFPI. Foram mantidos em gaiolas de polipropileno sob ciclo claro e escuro de 12/12h durante 07 dias para ambientação, recebendo ração e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos de manipulação dos animais foram aprovados e realizados de acordo com normas institucionais designadas pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da UFPI (Protocolo nº 073/15) (Anexo A) e de acordo com o “Guia de cuidados em uso de animais de laboratório” do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.3 Grupos experimentais

Tabela 1: Divisão dos grupos e procedimentos realizados.

GRUPOS	PROCEDIMENTOS
Controle (n=6)	Salina (0.9% NaCl)
Incisão (n=4)	Incisão experimental + Salina (0.9% NaCl)
Bromelaína (n=5)	Incisão experimental + Bromelaína 15mg/kg

Fonte: Autoria própria.

4.4 Procedimento prévio à confecção da injúria por incisão tecidual na pata

Os animais foram pesados e anestesiados via intramuscular na pata direita com solução de Quetamina: 70mg/kg (Francotar®) e cloridrato de Xylasina: 10mg/kg (Virbaxil®).

4.5 Modelo de confecção da injúria por incisão tecidual na pata

Após anestesiados, foi realizada tricotomia e a antissepsia local com iodopolvidona (Povidine®), e realizada uma incisão de aproximadamente 04 cm na pele e no epimísio do músculo TA no sentido céfalo-caudal até a exposição da região do terço médio tibial esquerdo e periósteo, utilizando-se lâmina de bisturi nº 5 (Swann-Morton®), a hemostasia foi feita por compressão digital com gases (Figura 5).



Figura 5 – Imagem do momento cirúrgico demonstrando após a tricotomia e antissepsia local com iodopolvidona, a realização da incisão de aproximadamente 04 cm em pele (P) e epimísio (cabeça de seta preta) do músculo TA até a região do terço médio do osso tibial esquerdo (O), e periósteo. Fonte: Autoria própria.

Após exposição dos tecidos, camada muscular e a pele foram reposicionados e suturados com 06 pontos simples e separados: Fio de nylon 3.0 (Shalon®), e receberam nova antissepsia na área operada com iodopolvidona (Povidine®) (Figura 6). Em seguida, foram realizadas administrações uma vez/dia por via intraperitoneal (i.p) da bromelaína na dose de 15 mg/kg durante de 07 dias consecutivos (Figura 7).

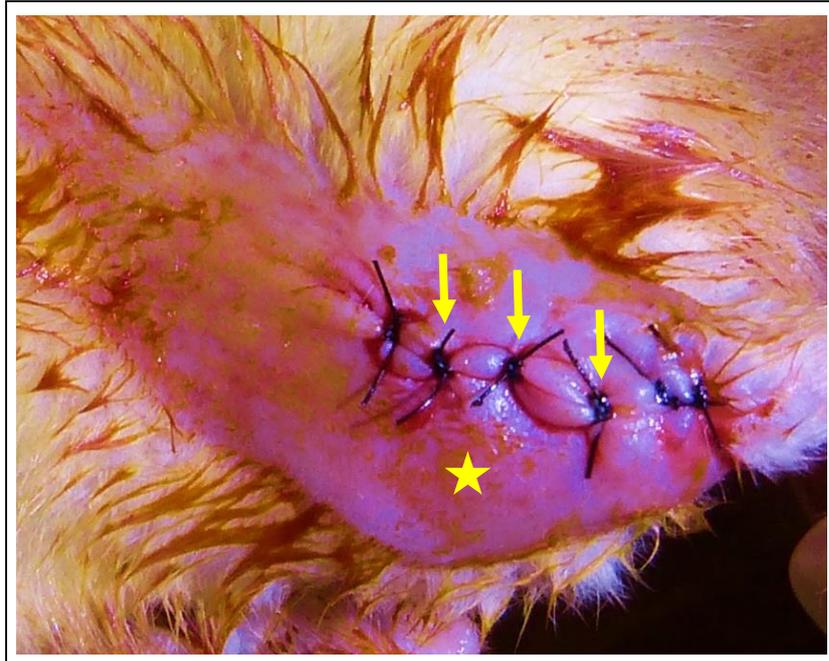


Figura 6 – Imagem do animal posicionado em decúbito lateral direito após o procedimento cirúrgico demonstrando a sutura com 06 pontos simples e separados (setas amarelas) após o reposicionamento da camada muscular e pele (estrela amarela) da pata esquerda e nova antisepsia da área operada com iodopolvidona. Fonte: Autoria própria.



Figura 7 – Imagem ilustrativa da administração da bromelaína na dosagem 15 mg/kg por via i.p uma vez/dia durante 07 dias consecutivos. Fonte: Autoria própria.

Após eutanásia, pele, TA e gastrocnêmios foram removidos para determinação dos marcadores bioquímicos e processamento histológico de rotina e análises, respectivamente (Figura 8).

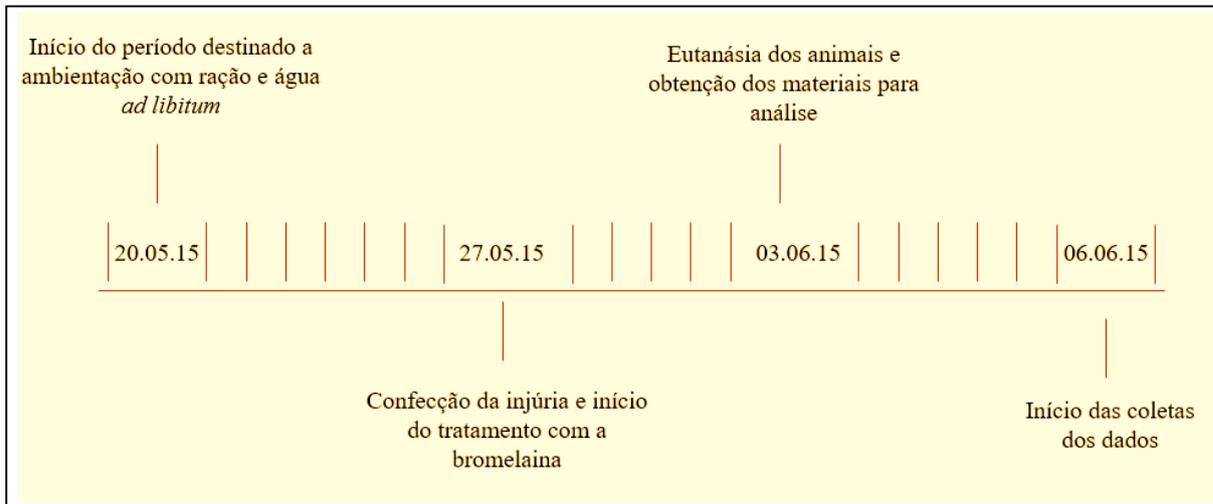


Figura 8 – Fluxograma representando as fases do ensaio experimental de confecção da injúria tecidual desde o início do período destinado a ambientação dos animais em cada grupo analisado até o início das coletas de dados. Fonte: Autoria própria.

4.6 Ensaio Bioquímicos

4.6.1 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A migração neutrofílica na pele e no músculo TA que sofreu a incisão cirúrgica foi indiretamente avaliada por meio do ensaio MPO. Assim, após a eutanásia dos animais, houve a remoção dos tecidos inflamados e mantidos a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das dosagens. Realizada maceração dos fragmentos de tecidos em 1mL de tampão fosfato de potássio com 0,5% de hexadecil-trimetil-amônio brometo (HTAB), na proporção de 1mL de tampão para 20mg de tecido. O homogeneizado foi centrifugado a $40.000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C . Ao término desse processo, houve pipetagem do material em duplicata, $10\mu\text{L}$ do sobrenadante e $200\mu\text{L}$ de uma solução de o-dianisidina ($5\text{mg}/3\text{ mL}$ tampão fosfato) contendo $15\mu\text{L}$ de H_2O_2 1%, nos poços de uma placa de ELISA. Foi avaliada a mudança na absorbância, a 450nm , entre os tempos 0 e 1 minuto e os resultados foram expressos como Unidades de MPO/mg de tecido (SILVA et al., 2012).

4.6.2 Avaliação da atividade da glutathiona (GSH) e malondialdeído (MDA)

O estresse oxidativo na pele e no músculo TA foi indiretamente avaliado por meio do ensaio GSH e/ou MDA. Então, após a eutanásia dos animais, houve a remoção dos tecidos incisados e mantidos a - 70 °C até o momento das dosagens. Homogenato de tecido muscular (0,25 ml de uma solução a 5% de tecido preparada de EDTA 0,02 M) foi adicionado a 320 ul de água destilada e 80 ul de TCA a 50%. As amostras foram então centrifugadas a 3000 rpm durante 15 min a 4 ° C. O sobrenadante (400 ul) foi adicionado a 800 ul de tampão Tris 0,4 M a pH 8,9 e 20 ul de DTNB 0,01 M. A absorbância de cada amostra foi medida a 420 nm, e os resultados foram registrados como unidades de GSH/mg de tecido muscular (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2013).

Para avaliar a peroxidação lipídica, a produção de MDA foi medida com uma reação do ácido tiobarbitúrico no tecido muscular e na pele. Homogenato dos tecidos (0,25 ml de tecido a 10% preparada em 0,15 M de KCl) foi adicionado a uma solução de ácido tiobarbitúrico (1,5 mL de 1% de H₃PO₄ e 500 ul de um 0.6% de solução aquosa de ácido tiobarbitúrico), e a mistura será colocada em banho de água aquecida durante 45 min a 100 ° C. A seguir, 2 ml de n-butanol P.A. foi adicionado, e a mistura será homogeneizada e em seguida centrifugada a 12.000 rpm durante 15 min a 4 ° C. A absorbância da camada de butanol será medida a 520 nm (A1) e 535 nm (A2) (Genesys 10s UV-VIS, THERMA Scientific, Inglaterra) A concentração de malonaldeído foi calculada como (A2 - A1), expressos como nmol de MDA por grama de tecido muscular e pele (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2013).

4.7 Análise macroscópica:

Foram realizadas fotografias da pata esquerda utilizando câmera digital (Panasonic Lumix®) após a confecção da injúria e no 7º dia de pós operatório (P.O) nos diferentes grupos. A análise teve finalidade de avaliar integridade tecidual, presença edema, hiperemia, secreção no local incisado, permanência dos fios de sutura, formação de crosta e tecido de granulação.

4.8 Processamento histológico:

As amostras de pele e músculo gastrocnêmio medindo aproximadamente 02cm de comprimento e 01cm de diâmetro foram fixadas em formol a 10% tamponado neutro pH = 7,2 por no mínimo 24h. Foram desidratadas em soluções crescentes de etanol (Dinamica®), diafanização com xileno (Cromoline®) e incluídas em parafina (Dinâmica®). Cortes seriados transversais para pele e músculo gastrocnêmio (5 µm) foram obtidos utilizando um micrótomo MRP09 LUPETEC® com navalha de tungstênio, de acordo com o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Análise e Processamento Histológico – LAPHIS da UFPI (Apêndice A). Os cortes foram montados em lâminas, sendo três ou quatro cortes por lâmina, corados com Hematoxilina e Eosina – HE (Apêndice B) e posteriormente utilizados para análise histopatológica e histomorfométrica, respectivamente.

Os parâmetros histopatológicos investigados foram a integridade tecidual, lesões celulares reversíveis (degenerações) e irreversíveis (necrose), infiltrado inflamatório, congestão e extravasamento de sangue.

4.9 Análise histomorfométrica:

Os tecidos foram processados como de rotina conforme apresentado na seção processamento histológico e posteriormente analisados por dois examinadores independentes e previamente calibrados (L.F.C.F e L.S.R) com nível de concordância mínima de 95%. As imagens foram digitalizadas com objetiva de 40x utilizando um microscópio óptico LEICA®. Foram utilizadas 375 fibras, o que representa aproximadamente o dobro do número que tem sido frequentemente usado na literatura (BRITO et al., 2006).

A análise foi realizada com a finalidade de mensurar o diâmetro e área das fibras do músculo gastrocnêmio da pata esquerda, além da contagem de células musculares, respectivos núcleos e número de núcleos por células nos diferentes grupos (Figura 9), para tal foi utilizado o Software ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*), cujos os valores foram armazenados numa planilha no formato do programa “Excel”.

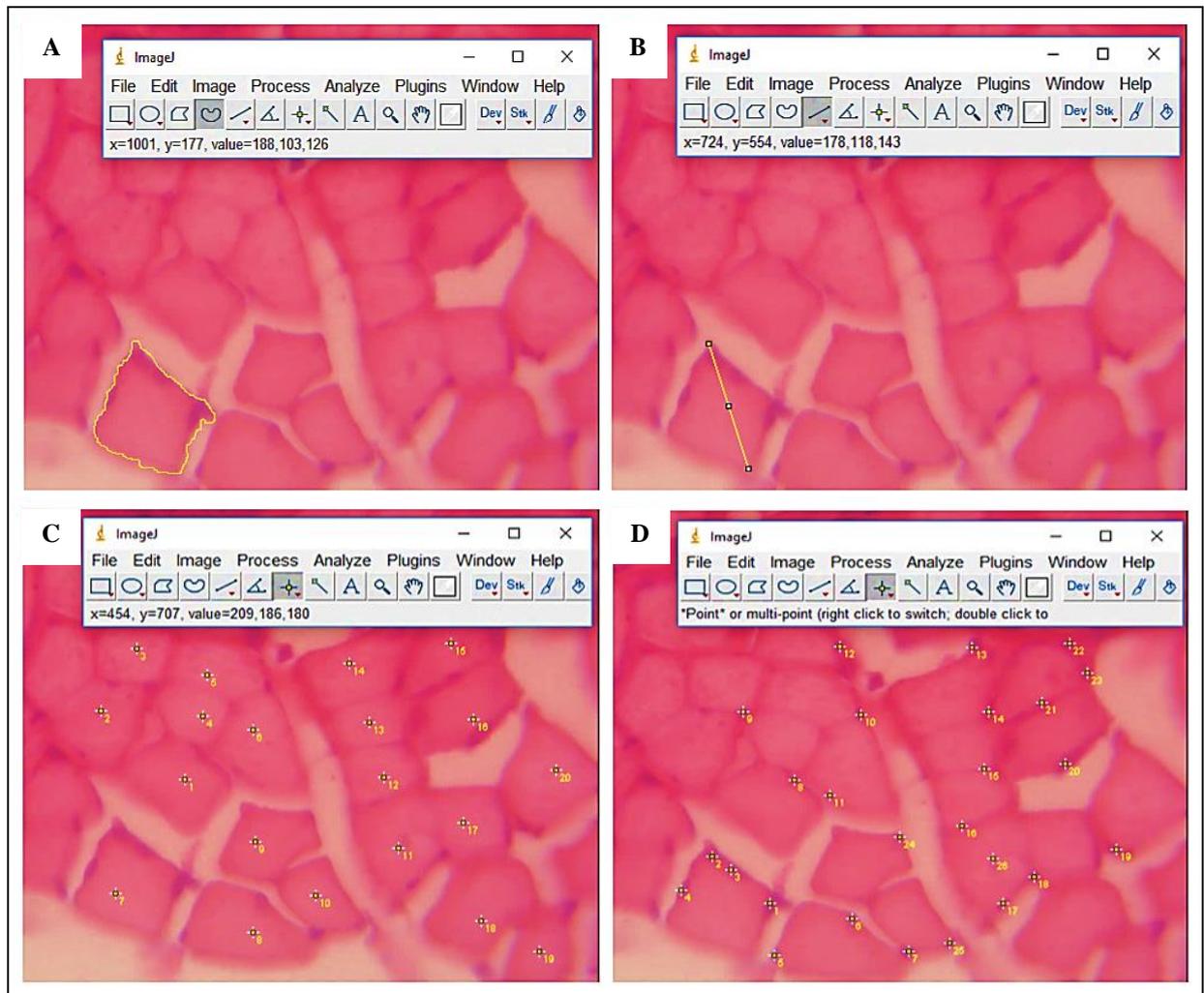


Figura 9 – Esquema representando a análise histomorfométrica do músculo gastrocnêmio do ensaio experimental de confecção da injúria tecidual na pata. Nota-se a medição da área das fibras (contorno amarelo) (A); medição de diâmetro da mesma fibra (reta amarela) (B); contagem de células (pontos amarelos) (C) e contagem de núcleos (pontos amarelos nas extremidades das células) (D). Fonte: Autoria própria.

5. Análise Estatística

Foi realizada no software GraphPad Prism 5.0. Teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar distribuição normal dos dados. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M) com o auxílio do teste análise de variância (ANOVA) um critério com subsequente teste de Tukey. A diferença estatística foi considerada significativa quando p valor $\leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

O gráfico na figura 10 (A) demonstra que os animais do grupo incisão tiveram aumento da atividade de MPO ($18,08 \pm 4,61$) estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle ($1,58 \pm 0,47$). E o tratamento com a bromelaína reduziu ($5,77 \pm 4,29$) significativamente esse achado na pele.

O gráfico na figura 10 (B) revela que os animais do grupo incisão também tiveram aumento da atividade de MPO ($10,34 \pm 1,94$) estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle ($2,04 \pm 0,38$). E o tratamento com a bromelaína conseguiu reduzir ($1,16 \pm 0,51$) significativamente esse achado no músculo TA.

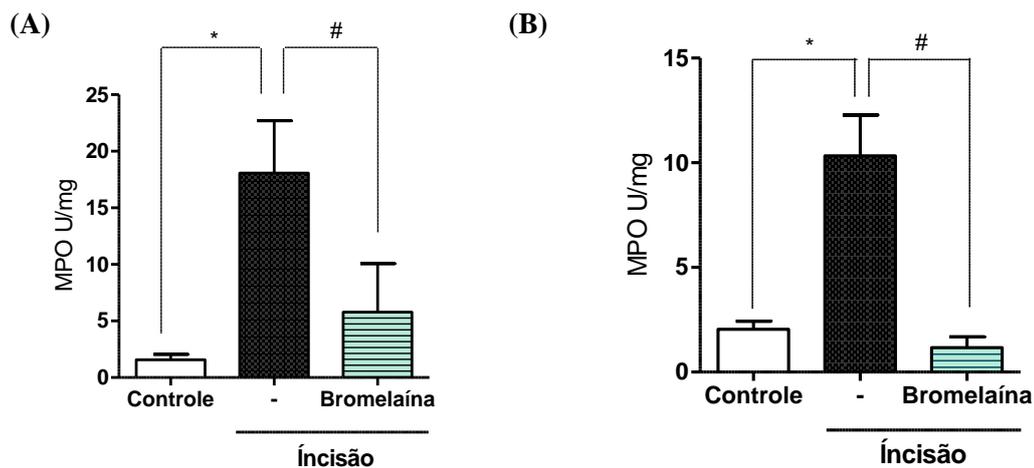


Figura 10 – Atividade anti-inflamatória da bromelaína 15mg/kg sobre a pele (A) e musculatura estriada esquelética TA (B) após o procedimento na pata esquerda. Os valores são dados como média \pm erro padrão da média. *($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. # ($p < 0,05$) em relação ao grupo incisão (ANOVA/Tukey).

6.2 Determinação da atividade de glutathiona (GSH) e malondialdeído (MDA)

O gráfico na figura 11 (A) mostra que os animais do grupo incisão tiveram redução da atividade de GSH ($109,5 \pm 41,14$) estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle ($361,6 \pm 51,03$) e o tratamento com a bromelaína aumentou os níveis de antioxidante endógeno ($383,2 \pm 42,26$) significativamente quando comparado ao grupo incisão no músculo TA.

O gráfico na figura 11 (B) determina que os animais do grupo incisão tiveram aumento da atividade de MDA ($727,6 \pm 173,9$) estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle ($401,1 \pm 17,73$) e o tratamento com a bromelaína reduziu a peroxidação lipídica ($335,3 \pm 48,86$) significativamente quando comparado ao grupo incisão no músculo TA.

O gráfico na figura 11 (C) indica que os animais do grupo incisão tiveram aumento da atividade de MDA ($486,0 \pm 62,39$) estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle ($234,9 \pm 41,42$) e o tratamento com a bromelaína reduziu a peroxidação lipídica ($276,0 \pm 55,33$) significativamente quando comparado ao grupo incisão na pele.

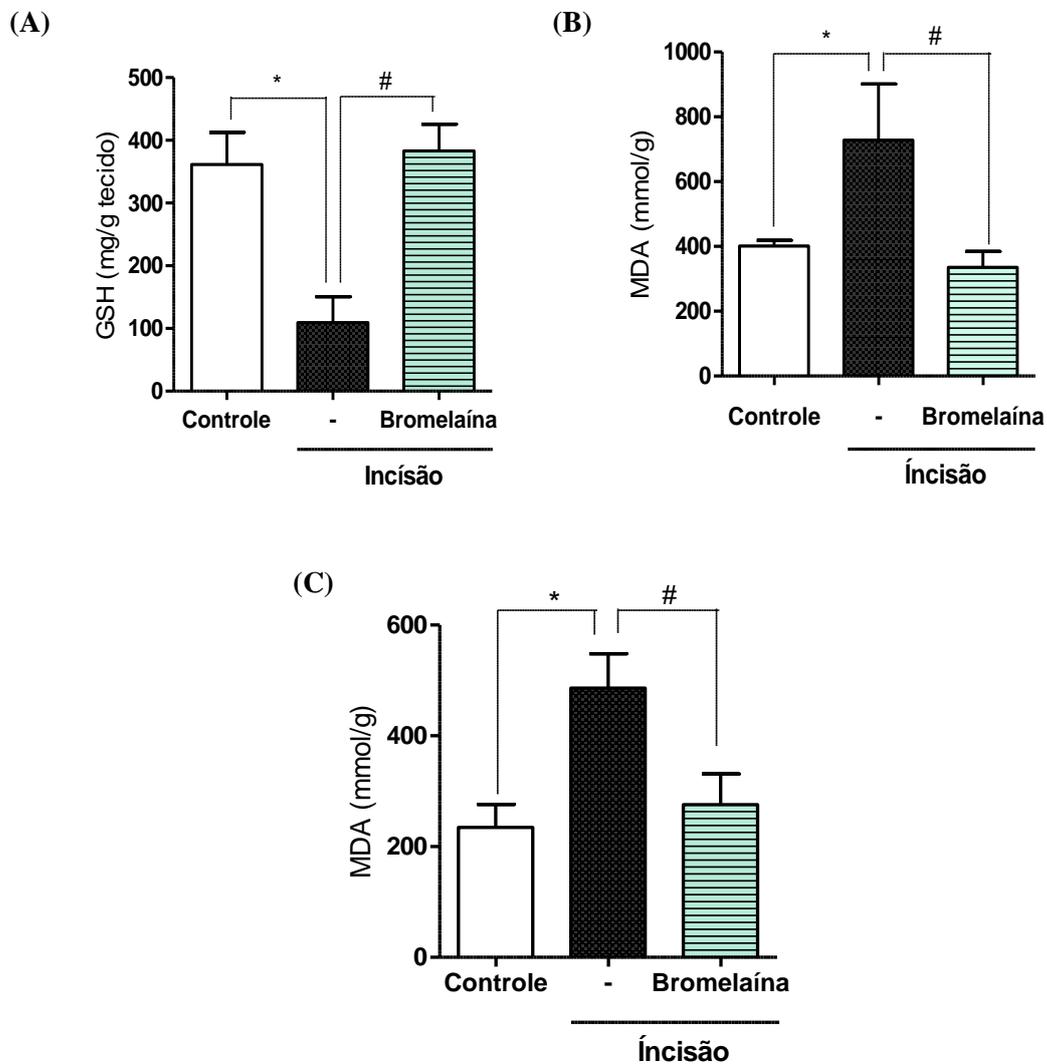


Figura 11 – Atividade antioxidante (GSH) e (MDA) da bromelaína 15mg/kg sobre a musculatura estriada esquelética TA (A e B, respectivamente) e pele (C) após o procedimento na pata esquerda. Os valores são dados como média \pm erro padrão da média. * ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle. # ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo incisão (ANOVA/Tukey).

6.3 Avaliação macroscópica e histopatológica da pele

6.3.1 Avaliação macroscópica da pele

Na macroscopia da pele dos animais do grupo controle observou-se integridade tecidual, visto que o tecido não sofreu o procedimento cirúrgico. No 1º dia de P.O, foi observado edema, hiperemia e presença de secreção no local incisado nos grupos que receberam a injúria. No 7º dia de P.O, os animais do grupo incisão apresentaram ausência de edema, porém pequena quantidade de secreção no local incisado com aparecimento de uma crosta parcial de aspecto granular espessa e permanência dos fios de sutura em 2/4 animais. O grupo bromelaína apresentou evolução superior, no 7º dia de P.O, os animais apresentaram ausência de edema, aparecimento de crosta seca e sem secreção no local incisado de aspecto regular e menos espessa, houve também desprendimento dos fios de sutura em 5/5 animais (Figura 12).

Não houve ocorrência de óbito durante o período do ensaio experimental, estavam todos em bom estado de higiene. Não foram observados sinais de autoagressão ou mordedura de outros animais sobre a área cirúrgica. A manipulação dos animais foi à mesma nos três grupos, não produzindo estresse que interferisse no processo de cicatrização.

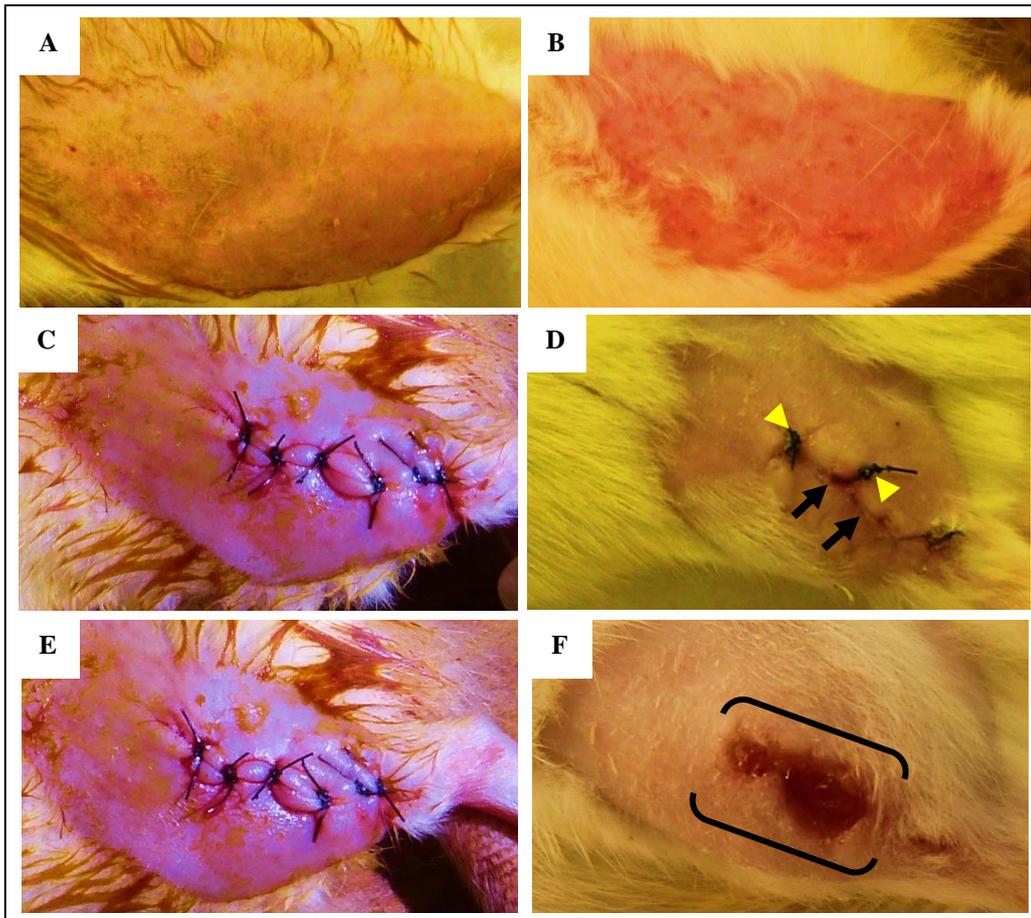


Figura 12 – Imagens ilustrativas da análise macroscópica da pele no P.O antes e após o tratamento com a bromelaína na dosagem de 15mg/kg por via i.p, demonstrando a integridade tecidual da pele no grupo controle e assepsia com iodopolvidona antes (A) e após (B) o período de 07 dias. Sutura realizada em 06 pontos simples, separados e assepsia com iodopolvidona no grupo incisão após sua confecção e reposição da camada muscular e pele, antes (C) e após o período de 07 dias, notar formação de crosta parcial (setas pretas) e permanência de pontos de sutura (cabeça de seta amarela) (D). Sutura realizada em 06 pontos simples, separados e assepsia com iodopolvidona no grupo bromelaína após a confecção da incisão e reposição da camada muscular e pele, antes (E) e após o tratamento com a bromelaína, notar formação de crosta de aspecto regular e menos espessa, seca sem secreção, sem fios de sutura (colchete duplo preto) (F). Fonte: Autoria própria.

6.3.2 Avaliação histopatológica da pele

Na análise histopatológica da pele dos animais do grupo controle observou-se integridade tecidual, tecido epitelial e conjuntivo contínuo, uniforme, organizado, visto que não receberam a incisão cirúrgica. Em relação à pele dos animais do grupo incisão observa-se ao 7º dia de P.O, afastamento entre as bordas da ferida e intenso infiltrado inflamatório adjacente e na região do tecido conjuntivo. A pele dos animais do grupo bromelaína demonstra-se com o epitélio regenerado, mostrando-se contínuo e uniforme. O tecido

conjuntivo está em organização, mostrando-se contínuo e uniforme e exibindo pouco infiltrado inflamatório (Figura 13).

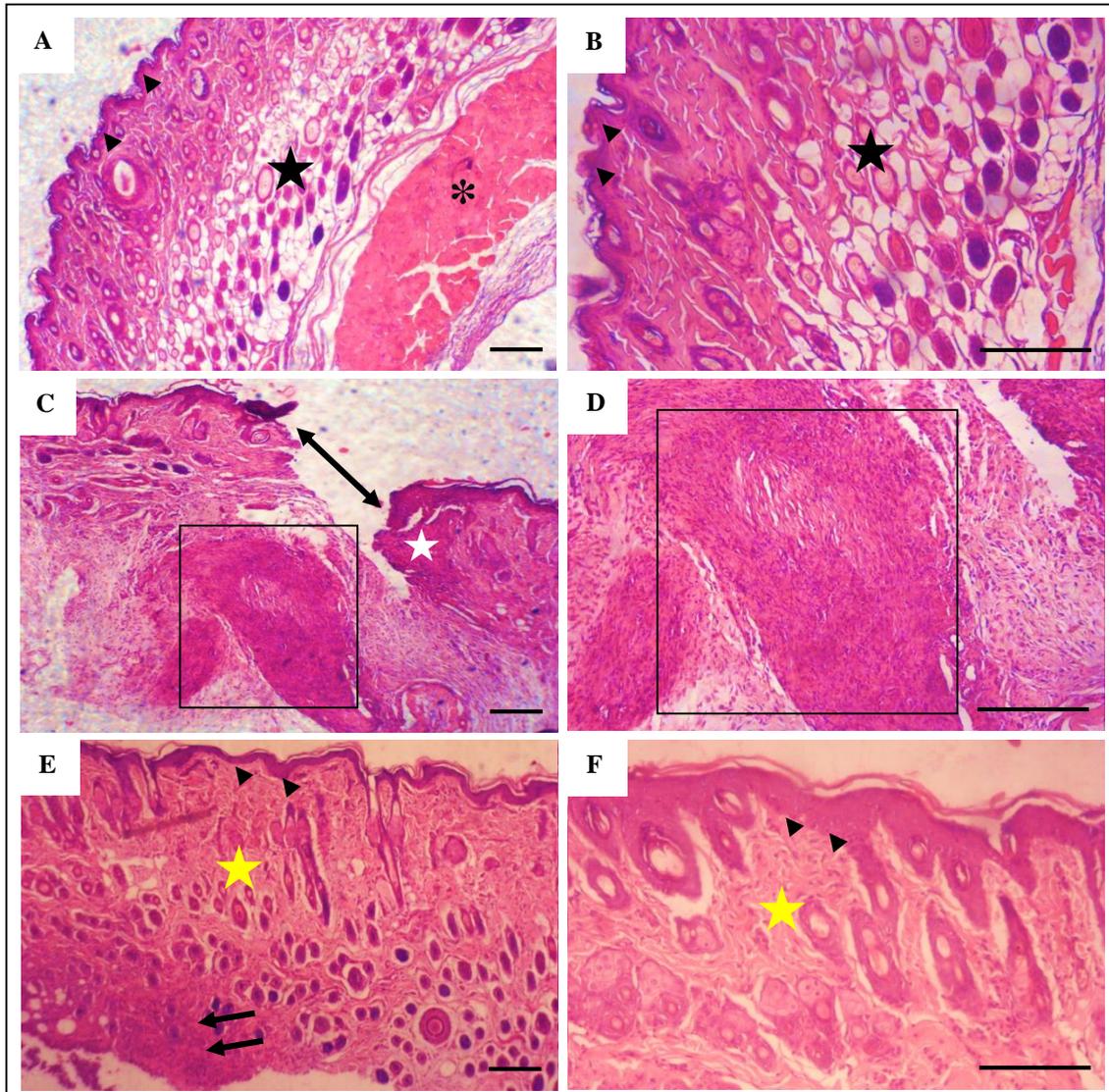


Figura 13 – Imagens ilustrativas da análise histopatológica da pele que sofreu incisão tecidual e posteriormente foi tratada com a bromelaína na dosagem de 15mg/kg por via i.p. Coloração: HE. Objetiva 4x e Bar 50 μ m (coluna esquerda: A, C e E) e Objetiva 10x e Bar 20 μ m (coluna direita: B, D e F).

A e B) Pele dos animais do grupo controle, demonstrando integridade tecidual. Notar epitélio (cabeças de setas pretas), tecido conjuntivo (estrela preta) e camada sub - dérmica de musculatura estriada esquelética (asterisco preto).

C e D) Pele dos animais do grupo incisão, demonstrando ao 7º dia de PO, afastamento entre as bordas da ferida (seta dupla preta) e intenso infiltrado inflamatório adjacente (estrela branca) e na região do tecido conjuntivo (retângulo com bordas pretas).

E e F) Pele dos animais do grupo bromelaína, demonstrando o epitélio regenerado, mostrando-se contínuo e uniforme (cabeças de setas pretas). O tecido conjuntivo (estrela amarelas) está em organização, mostrando-se contínuo e uniforme e exibindo pouco infiltrado inflamatório (setas pretas).

Fonte: Autoria própria.

6.4 Avaliação histomorfométrica do gastrocnêmio

Na tabela 2, mostra-se o aumento estatisticamente significativo da áreas das fibras do músculo gastrocnêmio nos animais do grupo incisão quando comparado ao grupo controle. E que a bromelaína conseguiu reverter estatisticamente essa modificação histomorfométrica. Não houve diferença estatisticamente significante para diâmetro das fibras, número de células, número de núcleos e núcleos/células.

Na figura 14, apresenta-se um corte transversal com aumento significativo na área das fibras musculares (B) quando comparado ao grupo controle (A). E que a bromelaína conseguiu reverter essa modificação histomorfométrica (C). Nos três grupos observa-se padrão fascicular normal delimitado pelo perímio e cada fibra circundada pelo endomísio. As fibras possuem em maioria contornos poligonais, tendo um ou mais núcleos posicionados perifericamente.

Tabela 2: Dados histomorfométricos (área e diâmetro) das fibras musculares e contagens de células, número de núcleos e núcleos/células do músculo gastrocnêmio após a confecção da injúria por incisão tecidual na região da pele e TA e do tratamento com a bromelaína na dosagem 15 mg/kg por via i.p durante 07 dias consecutivos.

GRUPOS	Área (Pixels ²)	Diâmetro (Pixels ²)	Nº de Células	Nº de Núcleos	Nº de Núcleos/Células
Controle (n=6)	13.229 ± 720	167 ± 4,50	37 ± 1,92	60 ± 2,20	1,78 ± 0,08
Incisão (n=4)	17.864 ± 1685*	165 ± 4,97	37 ± 2,83	56 ± 2,66	1,73 ± 0,09
Bromelaína (n=5)	14.215 ± 457#	164 ± 3,35	38 ± 1,45	53 ± 2,21	1,50 ± 0,06

* ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle. # ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo incisão (ANOVA/Tukey).

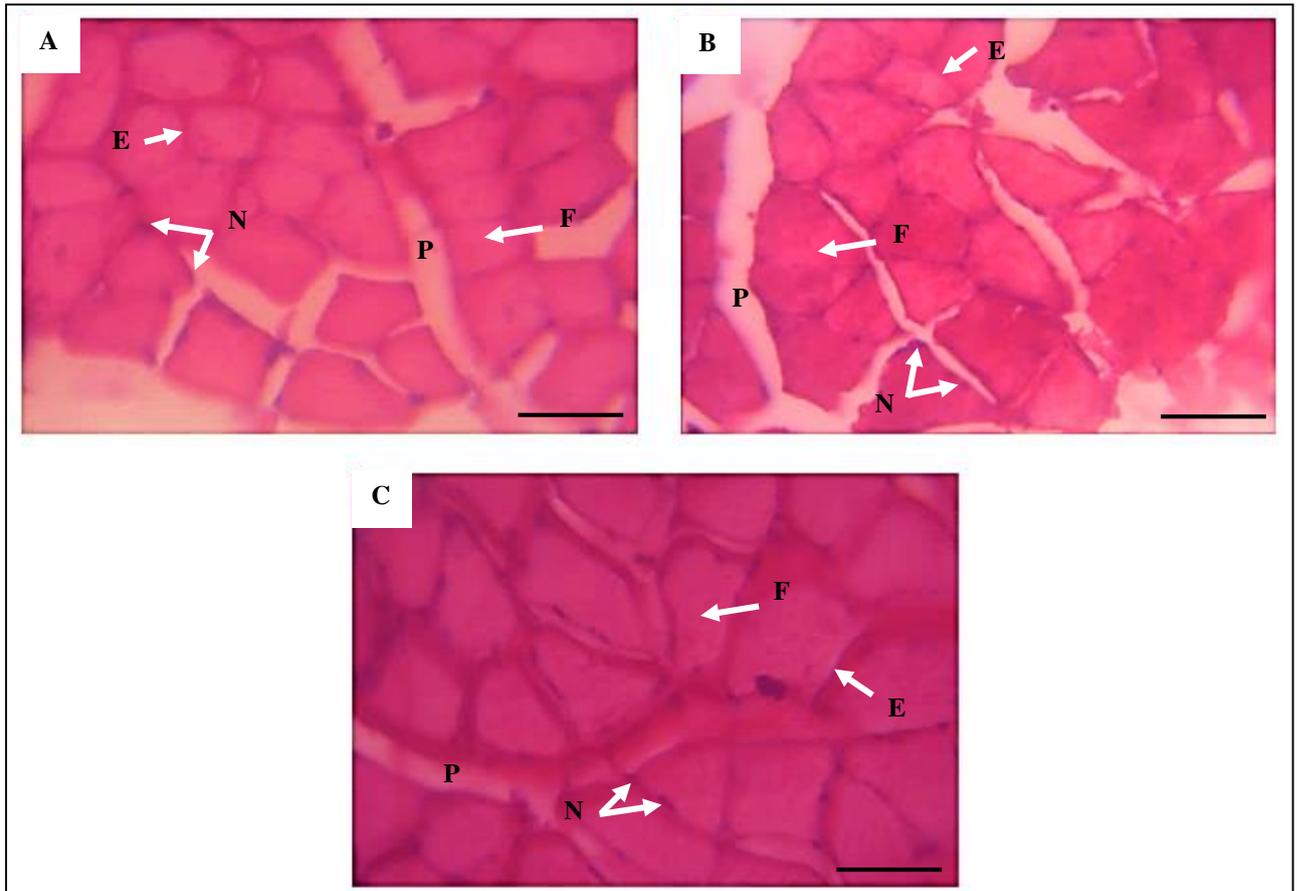


Figura 14 – Imagens ilustrativas da análise histomorfométrica da gastrocnêmio da pata que sofreu incisão tecidual e posteriormente foi tratada com a bromelaína na dosagem de 15mg/kg por via i.p. Coloração: HE. Objetiva 40x. Bar 5µm. Fonte: Próprio autor.

A) Gastrocnêmio dos animais do grupo controle, demonstrando padrão fascicular normal delimitado pelo perímísio (P), cada fibra (F) circundada pelo endímísio (E) possuindo contornos poligonais, tendo um ou mais núcleos posicionados periféricamente (N).

B) Gastrocnêmio dos animais do grupo incisão, demonstrando ao 7º dia de PO, aumento significativo na área das fibras (F), padrão fascicular delimitado pelo perímísio (P), cada fibra (F) circundada pelo endímísio (E) possuindo contornos poligonais, tendo um ou mais núcleos posicionados periféricamente (N).

C) Gastrocnêmio dos animais do grupo bromelaína, demonstrando ao 7º dia de PO, redução significativo na área das fibras (F), padrão fascicular delimitado pelo perímísio (P), cada fibra (F) circundada pelo endímísio (E) possuindo contornos poligonais, tendo um ou mais núcleos posicionados periféricamente (N). Fonte: Autoria própria.

7. DISCUSSÃO

Acredita-se que a estratégia experimental utilizada neste trabalho possa ser viável e promissora na avaliação e reparo de lesões músculo esqueléticas na pata de ratas, pois de acordo com nosso conhecimento, não há resultados publicados na literatura com os aspectos analisados no presente estudo utilizando esse modelo experimental. Os nossos resultados mostraram que o grupo de animais sem tratamento, tiveram aumento significativo dos parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo nos tecidos incisados, além de aumento da área das fibras do gastrocnêmio da mesma pata, quando comparado com seus respectivos controles.

Assim, uma proposta por nós sugerida foi a de estudar a influência da bromelaína sobre parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo de uma injúria por incisão tecidual experimental na pele e músculo TA.

Uma das características principais da resposta inflamatória a patógenos e a injúrias teciduais por estímulos químicos ou físicos é o recrutamento de células polimorfas nucleadas para o foco da inflamação como os neutrófilos. Após serem ativados por substâncias inflamatórias os neutrófilos produzem citocinas e quimiocinas, que atraem outros neutrófilos e outras células do sistema imune, além de aumentar significativamente a produção de ERO culminando em aumento do estresse oxidativo (SCHWACHA, 2003; DAL SECCO et al., 2006). O estresse oxidativo ocorre quando um aumento na produção de oxidantes excede a capacidade do organismo de armazená-los, através de uma coordenação complexa do sistema endógeno de defesa antioxidante (JACKSON et al., 2010).

Estudo recente reforça também que a regeneração de lesões traumáticas em músculo estriado esquelético requer o comportamento sincronizado de múltiplas células que participam no reparo. A cascata inflamatória que é rapidamente iniciada após a injúria, guiando a progressão da cicatrização e influenciando o reparo tecidual (SAN EMETERIO et al., 2016).

Um estudo realizado por Brickson et al., (2001) mostrou que uma injúria por estiramento no músculo TA de coelhos culminou aproximadamente em uma atividade de MPO 100% superior quando comparado a pata controle, assim como o estresse oxidativo foi significativamente maior no músculo lesionado quando comparado aos seus controles, havendo também interação entre tempo e lesão, a análise revelou maior aumento do estresse oxidativo durante às 48h quando comparado às 24h após lesão. Outro estudo avaliando também atividade leucocitária após uma injúria no músculo TA de ratos, mostrou que lesões

neste tecido recrutou monócitos exibindo perfil inflamatório que rapidamente converteram-se em anti-inflamatórios que estimularam a miogênese e regeneração tecidual (ARNOLD et al., 2007). Reforçando a importância de estudar parâmetros inflamatórios e oxidativos em resposta a lesões no músculo estriado esquelético. Esses dados corroboram com os nossos, visto que foi observado também atividade leucocitária respondendo a injúria tecidual, na qual os animais que receberam apenas a incisão no músculo TA, tiveram aumento da atividade de MPO e indiretamente maior infiltração de neutrófilos, além de reduzir os níveis de antioxidante endógenos (GSH) e aumentar a peroxidação lipídica (MDA), aumentando assim o estresse oxidativo quando comparado aos seus controles.

Um estudo realizado por Aiyegbusi et al., (2010) investigou os efeitos do extrato aquoso de diferentes partes da planta de abacaxi sobre a proliferação tenoblástica e os níveis de MDA no estágio inicial de cicatrização em uma lesão por esmagamento no tendão de Aquiles de ratos. A carne e o extrato de casca induziram uma proliferação de tenoblastos que, no entanto, não era significativamente diferente da do tendão não tratado enquanto que as folhas e os extratos de núcleo reduziram a população dos tenócitos. O extrato de carne significativamente ($p < 0,05$) reduziu o nível de MDA, enquanto o extrato de folhas e de núcleo significativamente ($p < 0,001$) o aumentou. O extrato de casca não teve impacto significativo sobre o nível de MDA em comparação com o tendão não tratado. Este estudo sugere que os constituintes antioxidantes da planta de abacaxi são concentrados na carne, enquanto a casca e extratos de carne têm o potencial para promover a cicatrização, estimulando a proliferação de tenoblastos.

O mesmo ocorreu com a lesão realizada no músculo TA no presente estudo, além do aumento significativo na atividade de MPO, a injúria por incisão reduziu e aumentou significativamente os níveis de GSH e MDA, respectivamente, também quando comparados aos seus respectivos controles. Contudo, o tratamento com a bromelaína extraída do caule do abacaxi em apenas 07 dias, reverteu significativamente os parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo induzidos pela lesão.

Esses resultados são inéditos pois até onde se sabe, nenhum outro estudo analisou ação da bromelaína extraída do caule do *Ananas comosus* em lesão por incisão em músculo esquelético quantificando atividade de MPO e níveis de GSH e MDA.

Essas respostas também são observadas na pele após injúria tecidual, um estudo realizado por Mikhalchik et al., (2016) revelou o papel da MPO de neutrófilos no desenvolvimento de inflamação após injúria por queimaduras térmicas na pele. Sugerindo que

a resposta inflamatória aguda induzida por lesão térmica envolve a ativação de neutrófilos e é acompanhada pela liberação de MPO no plasma. Esse estudo difere do nosso no modelo experimental (queimadura) e na metodologia de quantificação da atividade de MPO (plasma) ao contrário do nosso que o modelo experimental foi uma incisão e a quantificação de MPO no próprio tecido envolvido. Todavia, para essa análise os resultados dos dois estudos corroboraram. Nossos resultados também demonstraram que a atividade de MPO aumentou significativamente na pele incisada quando comparado aos seus controles.

Embora as queimaduras tenham sido tradicionalmente consideradas como um tipo especial de ferida que requer protocolos de tratamento especializados, em muitos aspectos, a cicatrização de feridas não é diferente de qualquer outra forma de cicatrização, que ocorre independentemente da origem da lesão (ATIYEH; GUNN; HAYEK, 2005; SILVEIRA, 2016).

Sabe-se que os macrófagos são também os principais produtores de mediadores pró-inflamatórios além de sua capacidade de produzir mediadores como a PGE₂, os intermediários reativos do nitrogênio, a interleucina - IL6 e o fator de necrose tumoral – TNF (CHOUDHRY et al., 2001; KOWAL-VERN et al., 2005; SENER et al., 2005; TOKLU et al., 2006). Essa resposta inflamatória, que leva à hiperativação dos neutrófilos teciduais, contribui ativamente para lesões oxidativas da célula/tecido (SCHWACHA, 2003). Assim, parece que a lesão tecidual após uma injúria por queimadura é mediada tanto por metabólitos reativos de oxigênio (MRO) quanto por neutrófilos e macrófagos ativados. Existem inúmeros relatos indicando que a peroxidação lipídica é aumentada após essas lesões teciduais (SENER et al., 2005; ALTAVILLA et al., 2005; SANDRE et al., 2006). A peroxidação lipídica em excesso é um mecanismo autocatalítico que leva à destruição oxidativa das membranas celulares, e sua destruição pode levar à produção de metabólitos tóxicos, reativos e morte celular, evento comum após injúrias por incisão tissular que culminam em processo inflamatório (HORTON et al., 2001).

O estudo de Toklu et al., (2007) mostrou que Silymarin, um complexo flavonóide, é um componente antioxidante da planta medicinal *Silybum marianum*, protegendo contra lesões de pele oxidativa induzida por queimadura, pois foi observado que a atividade de MPO foi indicador de infiltração neutrofílica no grupo de 48h de queimadura ($p < 0,001$), enquanto que animais que receberam o tratamento com a Silymarin tiveram redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$) comparado aos controles. E que os níveis de MDA, medidos como um índice de peroxidação lipídica tecidual, foram significativamente mais elevados no grupo de

queimados em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$), enquanto que os níveis de antioxidante endógeno (GSH), também marcador para estresse oxidativo nos tecidos, diminuíram significativamente após a lesão na pele. Contudo, o tratamento com Silymarin reverteu significativamente os níveis de MDA e GSH ($p < 0,01$ e $0,001$, respectivamente). Fortalecendo a importância de estudar potenciais de produtos naturais, os dados do estudo supracitado corroboram com nossos resultados, pois a pele dos animais que receberam apenas incisão tecidual houve aumento significativo na atividade de MPO, além de aumentar significativamente os níveis de MDA, ambos quando comparados aos seus respectivos controles, e a bromelaína também foi capaz de reverter significativamente a atividade de MPO e nível de MDA.

Nosso estudo também é inédito nessa análise, pois nenhum outro trabalho trouxe a ação da bromelaína extraída do caule do *Ananas comosus* revertendo a atividade de MPO e os níveis de MDA em lesão por incisão experimental na pele de ratas.

Nossos resultados também corroboram com os estudos de Rosenberg et al., (2004) e Maurer (2001) que concluíram que complicações como infecções, contaminação e sepse reduziram consideravelmente, assim como os índices de morbidade e mortalidade após tratamento com bromelaína em lesão tecidual por queimaduras. Embora nosso estudo não tenha objetivado avaliar quadro de septicemia e índices de morbidade e mortalidade, mas a bromelaína também foi eficiente no reparo da pele e músculo estriado esquelético após lesão tecidual por incisão experimental na pata.

A cicatrização de feridas é um processo complexo em uma sequência de estágios independentes descritos como fase inflamatória ou exudativa, fase de reconstrução (proliferativa), epitelização (fase regenerativa) e maturação (MARTINS et al., 2006; SCHEIBE et al., 2016). Nesse estudo foi observado que no 7º dia de P.O, os animais não tratados apresentaram ausência de edema, porém pequena quantidade de secreção no local incisado com aparecimento de uma crosta parcial de aspecto granular espessa e permanência dos fios de sutura em 2/4 animais. E os animais tratados com bromelaína apresentaram ausência de edema, aparecimento de crosta seca e sem secreção no local incisado de aspecto regular e menos espessa, houve também desprendimento dos fios de sutura em 5/5 animais, resultados semelhantes ao estudo de Martins et al., (2006) que avaliaram extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (Babaçu) na cicatrização da pele, os autores observaram macroscopicamente que os animais não tratados apresentaram ao 7º dia de P.O, crosta parcial

e secreção purulenta em 2/8 animais e os animais tratados com babaçu apresentaram crosta de bom aspecto sem secreção em 9/10 animais.

Os autores ainda relataram que não houve ocorrência de óbito durante o período do ensaio experimental, estavam todos em bom estado de higiene e não foram observados sinais de autoagressão ou mordedura de outros animais sobre a área cirúrgica, resultado semelhante ao deste estudo. Esses resultados merecem destaque, pois de acordo com nosso conhecimento, nenhum outro estudo apresentou o tratamento com bromelaína extraída do caule do *Ananas comosus* em aspectos macroscópicos no processo de reparo da pele em modelo de injúria por incisão experimental.

Estudos mostram que a pele ou qualquer outro tecido como músculo estriado esquelético ou órgão expostos a estímulos potencialmente nocivos induzirá uma sensação desagradável, informando o indivíduo sobre o perigo real ou potencial para sua integridade física. Portanto, a informação processada pode ser diferenciada como dor fisiológica ou dor patológica (FANTONI & MASTROCINQUE, 2002; ALMEIDA et al., 2006; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008). A dor fisiológica é aquela que induz respostas protetoras, como o reflexo de retirada ou reação de fuga, com intuito de interromper a exposição ao estímulo nocivo (FANTONI e MASTROCINQUE, 2002; HELLEBREKERS, 2002; KITAGAWA et al., 2005).

Intuitivamente, o grupo dos animais que receberam apenas incisão na pata sentiram dor, induzindo uma resposta protetora como reflexo de retirada do membro lesionado, influenciando na deambulação fisiológica do animal, pois foi visualmente observado o apoio ao solo do membro lesado em flexão plantar patológica. A flexão plantar patológica ocorre frequentemente após o reparo cirúrgico dos tecidos que envolve a articulação talocrural (ATC), incluindo a pele e músculos estriados esqueléticos possivelmente incisados (DE LA FUENTE et al., 2016).

Assim, outra proposta por nós sugerida foi a de estudar a influência de uma injúria por incisão tecidual experimental na pele e músculo TA sobre a histomorfometria do músculo gastrocnêmio homolateral – músculo motor primária na flexão plantar da ATC.

O músculo esquelético apresenta profunda capacidade de adaptação a cargas mecânicas transmitidas através das articulações (MENDIAS et al., 2016; RIEDL et al., 2016; ZISSLER et al., 2016). Esta adaptação envolve respostas coordenadas de fibras musculares que geram força e da matriz extracelular que transmite essa força para tendões e ossos,

podendo influenciar na histomorfometria dessas fibras (GUMUCIO; SUGG; MENDIAS, 2015; KJAER, 2004).

No nosso estudo os animais não tratados tiveram aumento estatisticamente significativo na área das fibras do gastrocnêmio quando comparado aos seus controles. Sugestivamente, o aumento na área dessas fibras, pode ser atribuída pela carga mecânica em flexão plantar como resposta de proteção pelo estímulo intenso na pele e TA incisados. Contudo, a bromelaína conseguiu reverter significativamente o aumento da área da região, observada no 7º dia PO.

A histomorfometria das fibras, tem-se mostrado essencial para fins de diagnóstico nas análises de biópsias musculares associadas a diferentes patologias e em condições experimentais, tais como, a hipertrofia provocada pelo estresse repetitivo e trabalho sustentado, a atrofia por desuso, por desnervação e a divisão longitudinal (splitting) de fibras (BRITO et al., 2006).

Em estudo analisando as dimensões geométricas das fibras do sóleo, músculo que também participa ativamente do movimento de flexão plantar, Brito et al., (2006) encontraram que diâmetros, área e perímetro das fibras musculares esqueléticas em cortes transversais aumentaram em ratos submetidos a treinamento físico, em comparação com seus respectivos ratos controle, indicando que ocorreu a hipertrofia muscular. Modificações no tamanho e no número de fibras musculares em ratos submetidos aos exercícios físicos foram também relatadas anteriormente (PAUL & ROSENTHAL, 2002). Ainda que no presente estudo não objetivou-se avaliar essas manifestações em treinamento físico, mas a carga mecânica imposta pelo modelo experimental dos estudos supracitados foram semelhantes observadas nos animais do nosso estudo.

A hipertrofia do músculo esquelético resulta em maior quantidade de tecido contrátil (PAUL & ROSENTHAL, 2002). Em roedores, os músculos da perna geralmente estudados tais como: sóleo, gastrocnêmios, extensor longo do dedo (ELD) e coxa, contêm fibras que se estendem continuamente de um tendão para o outro, com uma única zona de junções neuromusculares no meio. A hipertrofia destes músculos reflete um aumento no diâmetro da fibra muscular sem um aumento no número de fibras (TIMSON & DUDENHOEFFER, 1990). No nosso estudo, não foi observado diferença significativa nos diâmetros, contagem de células, núcleos e núcleos/células. Possivelmente esses achados se atribua ao curto período de 07 dias, não havendo tempo hábil para hipertrofia fibrilar, mas foi capaz de aumentar o volume da fibra e conseqüente a área. Acredita-se que em período de tempo superiores

haveria modificações significativas. Outro resultado que merece destaque, pois nenhum outro estudo buscou avaliar os efeitos da bromelaína extraída do caule do *Ananas comosus* na histomorfometria do gastrocnêmio após incisão experimental na pata de ratas.

Nosso modelo experimental é promissor e pode funcionar como um modelo inovador de avaliação de danos e reparo no músculo estriado esquelético (Figura 15), visto os resultados estatisticamente confiáveis.

Para o estudo da histomorfometria dos cortes transversais das fibras musculares de ratos, a metodologia utilizada neste trabalho mostra duas vantagens em relação ao processo de análise visual das imagens das fibras: a primeira é a agilidade do processo, visto que foi obtido um resultado estatístico confiável utilizando um número total de fibras superior do que vem sendo utilizado na literatura. E a segunda, é a eliminação da subjetividade do pesquisador (BRITO et al., 2006). Estudos como o nosso possibilitam enriquecer o cenário científico acerca das análises histomorfométrica de músculo esquelético em condições experimentais.

A partir desses resultados foi possível observar a participação promissora da bromelaína extraída do caule do *Ananas comosus* nas manifestações teciduais em pele e músculo TA após indução de injúria por incisão tecidual experimental na pata de ratas, além disso, favoreceu o processo de cicatrização da pele e preveniu alteração histomorfométrica na área das fibras do gastrocnêmio homolateral da pata lesionada.

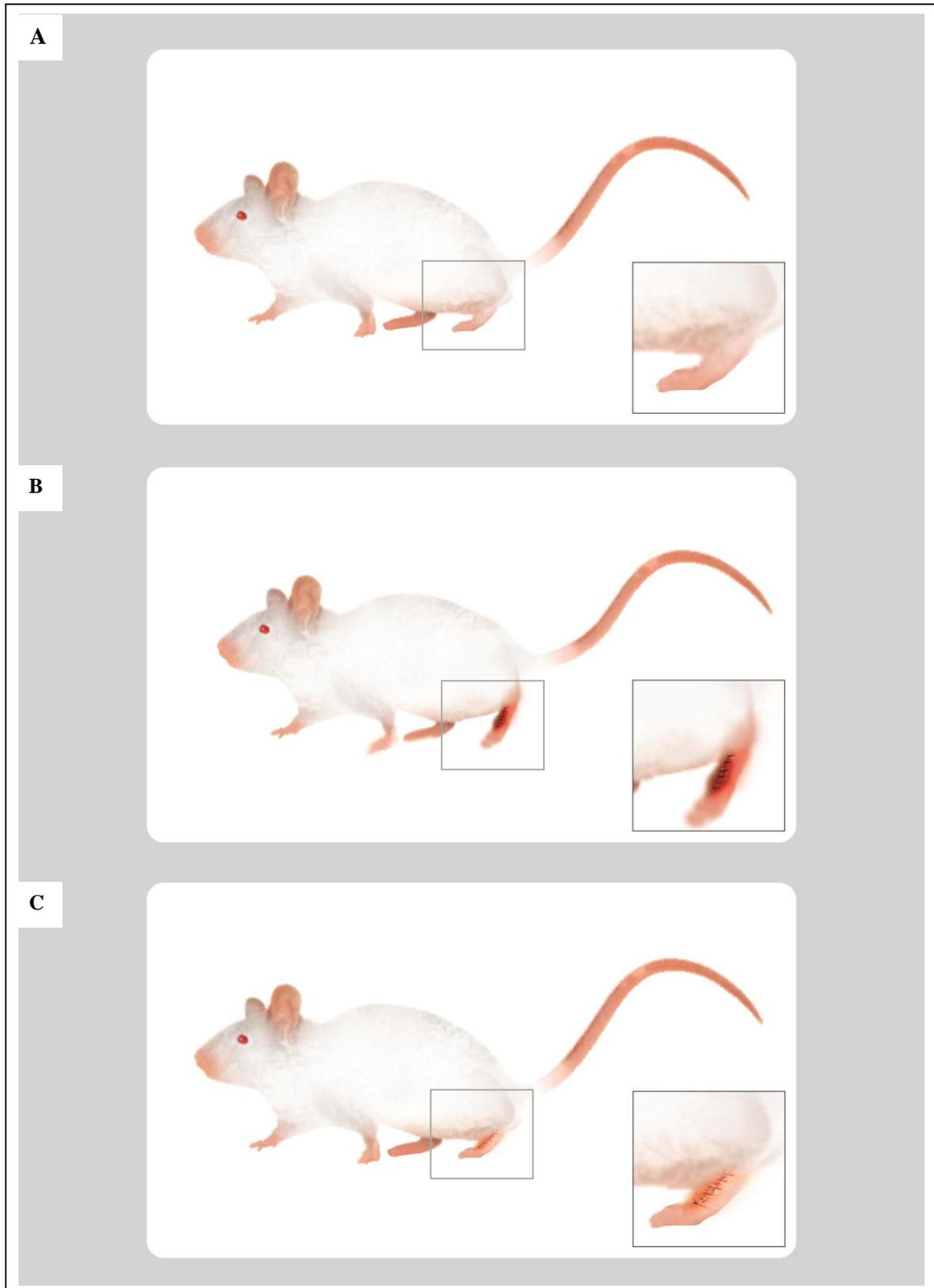


Figura 15 – Imagens ilustrativas do modelo de injúria por incisão experimental na pata. Notar a pata dos animais do grupo controle sem sutura e sem flexão plantar (A). Nos animais do grupo incisão notar sutura e simulação da marcha em flexão plantar patológica (B). Nos animais do grupo bromelaína notar sutura porém sem flexão plantar patológica (C). Fonte: Autoria própria.

8. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos dados indicam que a bromelaína extraída do caule do *Ananas comosus* reduziu a atividade de MPO e estresse oxidativo na pele e músculo TA induzidos após injúria por incisão tecidual. Além disso, favoreceu o processo de cicatrização na pele e reverteu o aumento na área das fibras do gastrocnêmio que sofreram alteração histomorfométrica pela carga mecânica em flexão plantar patológica como resposta de proteção a injúria na pata. Recomenda-se mais estudos com tempo superior para determinar a contribuição em diâmetros, contagem de células, núcleos e núcleos/células.

Nosso modelo experimental é promissor e pode funcionar como um modelo inovador de avaliação de danos e reparo no músculo estriado esquelético, visto os resultados estatisticamente confiáveis, além disso, trouxe dados inéditos da bromelaína revertendo atividade de MPO e níveis de GSH e MDA.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHEEM, Ihab T. et al. Green tea ameliorates renal oxidative damage induced by gentamicin in rats. **Pak J Pharm Sci**, v. 23, n. 1, p. 21-28, 2010.

ABOURASHED, Ehab A. Bioavailability of plant-derived antioxidants. **Antioxidants**, v. 2, n. 4, p. 309-325, 2013.

AIYEGBUSI, A. I. et al. The role of aqueous extract of pineapple fruit parts on the healing of acute crush tendon injury. **Nigerian quarterly journal of hospital medicine**, v. 20, n. 4, p. 223-227, 2010.

ALMEIDA, T. P.; MAIA, J. Z.; FISCHER, C. D. B.; PINTO, V. M.; PULZ, R. S.; RODRIGUES, P. R. C. Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária. **Veterinária em Foco**, v. 3, n. 2, p. 107-118, 2006.

ALTAVILLA, Domenica et al. Lipid peroxidation inhibition by raxofelast improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. **Shock**, v. 24, n. 1, p. 85-91, 2005.

APPENDINO, G.; CHIANESE, G.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Cannabinoids: occurrence and medicinal chemistry. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 7, p. 1085-1099, 2011.

ARAÚJO JÚNIOR, R. F. et al. Atorvastatin decreases bone loss, inflammation and oxidative stress in experimental periodontitis. **PloSone**, v. 10, p. e75322, 2013.

ARGAW, Anteneh; DESAULNIERS, Patrice; GARDINER, Phillip F. Enhanced neuromuscular transmission efficacy in overloaded rat plantaris muscle. **Muscle & nerve**, v. 29, n. 1, p. 97-103, 2004.

ARNOLD, Ludovic et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 5, p. 1057-1069, 2007.

ARSHAD, Zatul Iffah Mohd et al. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 17, p. 7283-7297, 2014.

ATIYEH, Bishara S.; GUNN, S. William; HAYEK, Shady N. State of the art in burn treatment. **World journal of surgery**, v. 29, n. 2, p. 131-148, 2005.

BALA, M. et al. Recovery of recombinant bromelain from *Escherichia coli* BL21-AI. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 81, p. 18829, 2011.

BAOGE, L. et al. Treatment of skeletal muscle injury: a review. **ISRN orthopedics**, v. 2012, 2012.

BENARD, Menno R. et al. Effects of growth on geometry of gastrocnemius muscle in children: a three-dimensional ultrasound analysis. **Journal of anatomy**, v. 219, n. 3, p. 388-402, 2011.

BERTOLINI, Sônia Maria Marques Gomes; DE OLIVEIRA, Priscila Daniele; CARARO, Deisy Carla. Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos da linhagem wistar pós-imobilização articular-DOI: 10.4025/actascihealthsci. v32i1. 5908. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 32, n. 1, p. 23-27, 2010.

BEST, T. M.; HUNTER, K. D. Muscle injury and repair. **Physical medicine and rehabilitation clinics of North America**, v. 11, n. 2, p. 251-266, 2000.

BETANCOR, M. B. et al. Oxidative status and histological changes in sea bass larvae muscle in response to high dietary content of docosahexaenoic acid DHA. **Journal of fish diseases**, v. 36, n. 5, p. 453-465, 2013.

BHATTACHARYYA, Barun K. Bromelain: an overview. 2008.

BIRESSI, Stefano; RANDO, Thomas A. Heterogeneity in the muscle satellite cell population. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press. p. 845-854, 2010.

BRICKSON, STACEY et al. Oxidant production and immune response after stretch injury in skeletal muscle. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 33, n. 12, p. 2010-2015, 2001.

BRITO, Maila K. et al. Dimensões geométricas das fibras do músculo sóleo de ratos exercitados em esteira rolante: a importância da análise por meio de imagens digitalizadas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 2, p. 103-107, 2006.

BUTTERFIELD, Timothy A.; BEST, Thomas M.; MERRICK, Mark A. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. **Journal of athletic training**, v. 41, n. 4, p. 457, 2006.

CHEN, Gang et al. Green tea polyphenols decreases uric acid level through xanthine oxidase and renal urate transporters in hyperuricemic mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 175, p. 14-20, 2015.

CHITTENDEN, Russell Henry; JOSLIN, Elliott P.; MEARA, Frank Sherman. **On the Ferments Contained in the Juice of the Pineapple, Ananassa Sativa, Together with Some Observations on the Composition and Proteolytic Action of the Juice**. 1891.

CHOUDHRY, Mashkoor A. et al. PGE2 suppresses intestinal T cell function in thermal injury: a cause of enhanced bacterial translocation. **Shock**, v. 16, n. 3, p. 183-188, 2001.

COIMBRA, Susana et al. The effect of green tea in oxidative stress. **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 5, p. 790-796, 2006.

COLAVITTI, Renata; FINKEL, Toren. Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence. **IUBMB life**, v. 57, n. 4-5, p. 277-281, 2005.

CORZO, Carlos A.; WALISZEWSKI, Krzysztof N.; WELTI-CHANES, Jorge. Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 631-635, 2012.

COSTA, Helber B. et al. A new procedure based on column chromatography to purify bromelain by ion exchange plus gel filtration chromatographies. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 163-168, 2014.

COUSSENS, Lisa M.; WERB, Zena. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

DA SILVA, Felipe Rodolfo Pereira et al. Bromelain: A potential strategy for the adjuvant treatment of periodontitis. **Dental Hypotheses**, v. 7, n. 3, p. 88, 2016.

DAL SECCO, Daniela et al. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 1, p. 77-86, 2006.

DE BRUIN, Simone R. et al. Impact of disease management programs on healthcare expenditures for patients with diabetes, depression, heart failure or chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review of the literature. **Health Policy**, v. 101, n. 2, p. 105-121, 2011.

DE LA FUENTE, Carlos I. et al. Medial Gastrocnemius Myotendinous Junction Displacement and Plantar-Flexion Strength in Patients Treated With Immediate Rehabilitation After Achilles Tendon Repair. **Journal of Athletic Training**, 2016.

DELODE, J. et al. Methode de suivi de la cicatrisation. **ITBM-RBM**, v. 1, n. 22, p. 49-52, 2001.

ELHALWAGY, Manal EA; DARWISH, Nevine S.; ZAHER, Enass M. Prophylactic effect of green tea polyphenols against liver and kidney injury induced by fenitrothion insecticide. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 91, n. 2, p. 81-89, 2008.

FANTONI, D. T.; MASTROCINQUE, S. Fisiopatologia e Controle da Dor. In: FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em Cães e Gatos**. São Paulo: Rocca. p. 323-334, 2002.

FITZHUGH, David J. et al. Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation. **Clinical Immunology**, v. 128, n. 1, p. 66-74, 2008.

FRANÇA-SANTOS, A. et al. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do Ananas comosus (abacaxi). **Scientia Plena**, v. 5, n. 11, p. 1-6, 2009.

GAO, Chenguang et al. Protective effect of Schizandrin B against damage of UVB irradiated skin cells depend on inhibition of inflammatory pathways. **Bioengineered**, p. 1-9, 2016.

GARCÍA-GUBERN, Carlos F.; COLON-ROLON, Lissandra; BOND, Michael C. Essential concepts of wound management. **Emergency medicine clinics of North America**, v. 28, n. 4, p. 951-967, 2010.

GAUTAM, Raju; JACHAK, Sanjay M. Recent developments in antiinflammatory natural products. **ChemInform**, v. 40, n. 47, p. i, 2009.

GIACOPPO, Sabrina et al. 4 (α -l-Rhamnosyloxy)-benzyl isothiocyanate, a bioactive phytochemical that attenuates secondary damage in an experimental model of spinal cord injury. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 1, p. 80-88, 2015.

GIACOPPO, Sabrina et al. An overview on neuroprotective effects of isothiocyanates for the treatment of neurodegenerative diseases. **Fitoterapia**, v. 106, p. 12-21, 2015.

GONZALEZ, Ana Cristina de Oliveira et al. Wound healing-A literature review. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614-620, 2016.

GORGATTI NETTO, A. et al. Abacaxi para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita. **Brasília: Embrapa-SPI**, 1996.

GUMUCIO, Jonathan P.; SUGG, Kristoffer B.; MENDIAS, Christopher L. TGF- β superfamily signaling in muscle and tendon adaptation to resistance exercise. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 43, n. 2, p. 93, 2015.

GUO, S. al; DIPIETRO, Luisa A. Factors affecting wound healing. **Journal of dental research**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.

GURTNER, Geoffrey C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-321, 2008.

HALE, Laura P. et al. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. **International Immunopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 783-793, 2005.

HALE, Laura P.; GREER, Paula K.; SEMPOWSKI, Gregory D. Bromelain treatment alters leukocyte expression of cell surface molecules involved in cellular adhesion and activation. **Clinical Immunology**, v. 104, n. 2, p. 183-190, 2002.

HALKIER, Barbara Ann; GERSHENZON, Jonathan. Biology and biochemistry of glucosinolates. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 57, p. 303-333, 2006.

HEINRICH, Michael et al. Medicinal plants in Mexico: Healers' consensus and cultural importance. **Social Science & Medicine**, v. 47, n. 11, p. 1859-1871, 1998.

HELLEBREKERS, L. J. **Dor em Animais**. São Paulo: Manole. p. 69-79, 2002.

HORTON, Jureta W. et al. Antioxidant vitamin therapy alters burn trauma-mediated cardiac NF- κ B activation and cardiomyocyte cytokine secretion. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 50, n. 3, p. 397-408, 2001.

JABER, Raja. Respiratory and allergic diseases: from upper respiratory tract infections to asthma. **PrimaryCare: Clinics in Office Practice**, v. 29, n. 2, p. 231-261, 2002.

JACKSON, Janna R. et al. Mediation of endogenous antioxidant enzymes and apoptotic signaling by resveratrol following muscle disuse in the gastrocnemius muscles of young and old rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 299, n. 6, p. R1572-R1581, 2010.

JACKSON, Wesley M. et al. Differentiation and regeneration potential of mesenchymal progenitor cells derived from traumatized muscle tissue. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 15, n. 11, p. 2377-2388, 2011.

JARVINEN, Tero AH et al. Muscle injuries biology and treatment. **The American journal of sports medicine**, v. 33, n. 5, p. 745-764, 2005.

KAUR, Harmanpreet et al. Bromelain has paradoxical effects on blood coagulability: a study using thromboelastography. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 27, n. 7, p. 745-752, 2016.

KIM, Byung-Hak et al. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Astragalus sinicus* L. in cytokine-induced keratinocytes and skin. **Experimental & molecular medicine**, v. 46, n. 3, p. e87, 2014.

KITAGAWA, J.; KANDA, K.; SUGIURA, M.; TSUBOI, Y.; OGAWA, A.; SHIMIZU, K.; KOYAMA, N.; KAMO, H.; WATANABE, T.; REN, K.; IWATA, K. Effect of chronic inflammation on dorsal horn nociceptive neurons in aged rats. **Neurophysiology**, v. 93, p. 3594-3604, 2005.

KJAER, Michael. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiological reviews**, v. 84, n. 2, p. 649-698, 2004.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. PATOFISIOLOGIA DA DOR (Pathophysiology of pain). **Archives of veterinary science**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2008.

KOWAL-VERN, Areta et al. Circulating endothelial cell levels correlate with proinflammatory cytokine increase in the acute phase of thermal injury. **Journal of Burn Care & Research**, v. 26, n. 5, p. 422-429, 2005.

LI, Jie; CHEN, Juan; KIRSNER, Robert. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9-18, 2007.

LI-WEBER, Min et al. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone parthenolide suppresses IL-4 gene expression in peripheral blood T cells. **European journal of immunology**, v. 32, n. 12, p. 3587-3597, 2002.

MACIEJ, J. et al. Short communication: Effects of oral flavonoid supplementation on the metabolic and antioxidative status of newborn dairy calves. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 1, p. 805-811, 2016.

MARTÍN, María Angeles et al. Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by the flavonoid epicatechin. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 4, p. 503-509, 2010.

MARTIN, Paul. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75-81, 1997.

MARTIN, Paul; LEIBOVICH, S. Joseph. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in cell biology**, v. 15, n. 11, p. 599-607, 2005.

MARTINS, Nelson Lúcio Parada et al. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. 3, p. 66-75, 2006.

MATTIELLO-SVERZUT, A. C. et al. Effects of chronic heart disease on skeletal muscle fiber size. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 38, n. 2, p. 303-307, 2005.

MAURER, H. R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 58, n. 9, p. 1234-1245, 2001.

MEDRADO, Alena RAP et al. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers in surgery and medicine**, v. 32, n. 3, p. 239-244, 2003.

MENDIAS, Christopher L. et al. Changes in muscle fiber contractility and extracellular matrix production during skeletal muscle hypertrophy. **Journal of Applied Physiology**, p. jap. 00719.2016, 2016.

MIKHALCHIK, E. V. et al. The role of neutrophil myeloperoxidase in the development of inflammation after thermal skin burns. **Biomeditsinskaia khimiia**, v. 62, n. 5, p. 584, 2016.

MILLER MD. *Review of orthopaedics*, 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2012.

MILLER, Gary D.; NICKLAS, Barbara J.; LOESER, Richard F. Inflammatory Biomarkers and Physical Function in Older, Obese Adults with Knee Pain and Self-Reported Osteoarthritis After Intensive Weight-Loss Therapy. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 56, n. 4, p. 644-651, 2008.

MURAD, Howard. **Method of treating dermatological disorders with fruit extracts**. U.S. Patent n. 6,630,163, 7 out. 2003.

MURPHY, Philip M. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. In: **Seminars in hematology**. 1997. p. 311-318.

NAYAK, B. Shivananda; SANDIFORD, Steve; MAXWELL, Anderson. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 3, p. 351-356, 2009.

PAUL, Angelika C.; ROSENTHAL, Nadia. Different modes of hypertrophy in skeletal muscle fibers. **The Journal of cell biology**, v. 156, n. 4, p. 751-760, 2002.

PECKOLDT, T.; PECKOLDT, G. Quoted by de Sousa. **Revista da Sociedade Brasileira de Quimica**, v. 14, p. 67-80, 1948.

PHAN, Toan-Thang et al. Phenolic compounds of *Chromolaena odorata* protect cultured skin cells from oxidative damage: implication for cutaneous wound healing. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 12, p. 1373-1379, 2001.

RAJAN, Thangavelu Soundara et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of a combination of cannabidiol and moringin in LPS-stimulated macrophages. **Fitoterapia**, v. 112, p. 104-115, 2016.

RAMLI, Aizi Nor Mazila et al. Bromelain: From Production to Commercialisation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2016.

RANKIN, James A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Advanced Critical Care**, v. 15, n. 1, p. 3-17, 2004.

RIEDL, Isabelle et al. AMPK γ 3 is dispensable for skeletal muscle hypertrophy induced by functional overload. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 310, n. 6, p. E461-E472, 2016.

ROCHEFORT, César de. Histoire naturelle et morale des îles Antilles de l'Amérique. **Arnold Lucas, Rotterdam**, 1658.

ROSENBERG, Lior et al. Safety and efficacy of a proteolytic enzyme for enzymatic burn debridement: a preliminary report. **Burns**, v. 30, n. 8, p. 843-850, 2004.

SACHIN AVASTHI, M. S.; SINGH, Ajai. Nutritional factors and Osteoarthritis: A review article. **Internet Journal of Medical Update**, v. 4, n. 1, 2009.

SAHBAZ, Ahmet et al. Bromelain: a natural proteolytic for intra-abdominal adhesion prevention. **International Journal of Surgery**, v. 14, p. 7-11, 2015.

SALEEM, TK Mohamed et al. Anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Gendarussa vulgaris* Nees. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 147-149, 2011.

SAN EMETERIO, Cheryl L. et al. Selective recruitment of non-classical monocytes promotes skeletal muscle repair. **Biomaterials**, 2016.

SANDRE, Caroline et al. Kinetic changes of oxidative stress and selenium status in plasma and tissues following burn injury in selenium-deficient and selenium-supplemented rats. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 60, n. 3, p. 627-634, 2006.

SANKARAN K, VADANASUNDARI V and HEMAVATHY RV, A comparative study on determining the efficacy of salt precipitation and biphasic system in the extraction of bromelain from *Ananas comosus*. **Asian J Sci Technol** v. 2 n.1 p. 016-022, 2011.

SATOSKAR, R. R.; SHAH, S. J.; SHENOY, S. G. Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloylmethane) in patients with postoperative inflammation. **International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology**, v. 24, n. 12, p. 651, 1986.

SCHEIBE, Christian Lamar et al. *Schinus terebinthifolius raddi* (Aroeira) and *Orbignya phalerata* mart. (Babassu) effect in corneal healing in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 402-410, 2016.

SCHWACHA, Martin G. Macrophages and post-burn immune dysfunction. **Burns**, v. 29, n. 1, p. 1-14, 2003.

SECOR, Eric R. et al. Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. **Cellular immunology**, v. 237, n. 1, p. 68-75, 2005.

ŞENER, Göksel et al. Leukotriene receptor blocker montelukast protects against burn-induced oxidative injury of the skin and remote organs. **Burns**, v. 31, n. 5, p. 587-596, 2005.

SERARSLAN, G. et al. Caffeic acid phenethyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress. **Clinical and experimental dermatology**, v. 32, n. 6, p. 709-715, 2007.

SERRANO, Antonio L. et al. 7 Cellular and Molecular Mechanisms Regulating Fibrosis in Skeletal Muscle Repair and Disease. **Current topics in developmental biology**, v. 96, p. 167, 2011.

SHAW, Tanya J.; MARTIN, Paul. Wound repair at a glance. **Journal of cell science**, v. 122, n. 18, p. 3209-3213, 2009.

SHIN, Emily H. et al. Quality of healing: defining, quantifying, and enhancing skeletal muscle healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 22, n. S1, p. 18-24, 2014.

SILVA, Renan O. et al. A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Marine drugs**, v. 10, n. 12, p. 2618-2633, 2012.

SILVEIRA, Paulo CL et al. Effect of Low-Power Laser (LPL) and Light-Emitting Diode (LED) on Inflammatory Response in Burn Wound Healing. **Inflammation**, p. 1-10, 2016.

SILVEIRA, Paulo CL; STRECK, Emilio L.; PINHO, Ricardo A. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 86, n. 3, p. 279-282, 2007.

SRIVASTAVA, R.; SRIMAL, R. C. Modification of certain inflammation-induced biochemical changes by curcumin. **The Indian journal of medical research**, v. 81, p. 215, 1985.

SURAPANENI, Krishna Mohan et al. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with osteoarthritis. **Indian journal of medical sciences**, v. 61, n. 1, p. 9, 2007.

SYED, D. N. et al. Green tea polyphenol EGCG suppresses cigarette smoke condensate-induced NF- κ B activation in normal human bronchial epithelial cells. **Oncogene**, v. 26, n. 5, p. 673-682, 2007.

TAKEKURA, Hiroaki et al. Eccentric exercise-induced morphological changes in the membrane systems involved in excitation—contraction coupling in rat skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 533, n. 2, p. 571-583, 2001.

TAUSSIG, Steven J.; BATKIN, Stanley. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. **Journal of ethnopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 191-203, 1988.

TIDBALL, James G.; VILLALTA, S. Armando. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 5, p. R1173-R1187, 2010.

TIMSON, BENJAMIN F.; DUDENHOEFFER, GREGORY A. Skeletal muscle fibre number in the rat from youth to adulthood. **Journal of anatomy**, v. 173, p. 33, 1990.

TOCHI, Bitange Nipa et al. Therapeutic application of pineapple protease (bromelain): a review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 7, n. 4, p. 513-520, 2008.

TOKLU, Hale Z. et al. Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, protects against burn-induced oxidative skin injury. **Burns**, v. 33, n. 7, p. 908-916, 2007.

TOKLU, Hale Z. et al. β -glucan protects against burn-induced oxidative organ damage in rats. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 156-169, 2006.

VALGIMIGLI, Luca; IORI, Renato. Antioxidant and pro-oxidant capacities of ITCs. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 50, n. 3, p. 222-237, 2009.

VAN LINTHOUT, Sophie; MITEVA, Kapka; TSCHÖPE, Carsten. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. **Cardiovascular research**, v. 102, n. 2, p. 258-269, 2014.

VELJKOVIĆ, Milica et al. Morphological and morphometric study of protective effect of green tea in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Life sciences**, v. 147, p. 85-91, 2016.

VERGOTE, David et al. (-)-Epigallocatechin (EGC) of green tea induces apoptosis of human breast cancer cells but not of their normal counterparts. **Breast cancer research and treatment**, v. 76, n. 3, p. 195-201, 2002.

WALKER, A. F. et al. Bromelain reduces mild acute knee pain and improves well-being in a dose-dependent fashion in an open study of otherwise healthy adults. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 681-686, 2002.

WANG, Xuewen et al. Knee strength maintained despite loss of lean body mass during weight loss in older obese adults with knee osteoarthritis. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 62, n. 8, p. 866-871, 2007.

WERNER, Sabine; GROSE, Richard. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, p. 835-870, 2003.

WERNIG, A. [Regeneration capacity of skeletal muscle]. **Therapeutische Umschau. Revue thérapeutique**, v. 60, n. 7, p. 383-389, 2003.

XIAO, Li; MIWA, Nobuhiko. Hydrogen-rich water achieves cytoprotection from oxidative stress injury in human gingival fibroblasts in culture or 3D-tissue equivalents, and wound-healing promotion, together with ROS-scavenging and relief from glutathione diminishment. **Human Cell**, p. 1-16, 2016.

YUAN, Gaofeng et al. Natural products and anti-inflammatory activity. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 15, n. 2, p. 143, 2006.

ZISSLER, Angela et al. Extracorporeal Shock Wave Therapy Accelerates Regeneration After Acute Skeletal Muscle Injury. **The American journal of sports medicine**, 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE A**Protocolo de Inclusão em Parafina****Desidratação**

Álcool 30%

↓ 1h

Álcool 50%

↓ 1h

Álcool 70%

↓ 1h

Álcool 90%

↓ 1h

Álcool absoluto

↓ 1: 30h

Diafanização

Xilol 2 (mais contaminado)

↓ 45min

Xilol 1 (mais puro)

↓ 45min

Inclusão

Parafina líquida para banho (contaminada)

↓ 15 – 20 min 80°C

Parafina líquida para inclusão

↓ 60 – 80°C → **Inclusão**

APÊNDICE B

Coloração em Hematoxilina e Eosina (HE)

Desparafinação

Xilol 2 (mais contaminado)

↓ 7 min

Xilol 1 (mais puro)

↓ 3 min

Hidratação

Álcool absoluto

↓ 7 min

Álcool 90%

↓ 2 min

Álcool 75%

↓ 2 min

Álcool 50%

↓ 2 min

Álcool 30%

↓ 2 min

Água destilada 1

↓ 2 min

Água destilada 2

↓ 2 min

Coloração

Hematoxilina

↓ 2 min

Água corrente

↓ 3,5 min

Eosina

5 min

← Água corrente → 3 min → **Montagem**

ANEXOS

ANEXO A



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

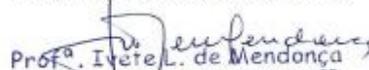


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Avaliação do potencial osteogênico da bromelaína sobre o defeito fenestrado em tibia de ratos**", protocolo nº **073/15**, sob a responsabilidade de **DANIEL FERNANDO PEREIRA VASCONCELOS**- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 26/06/2015.

Vigência do Projeto	Dezembro/ 2015 à Dezembro/ 2017
Espécie/ linhagem	Rato heterogênico/ wistar
Nº de Animais	32
Peso/ Idade	150 g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFPI

Teresina, 26 de Junho de 2015.


 Prof^a. Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora