



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM PATOLOGIA

BÁRBARA DE ARAÚJO LIMA DUTRA

**GOMA ARÁBICA E EUGENOL NA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA EM NOVO
MODELO DE INÓCULO DE SÍLICA SUBCUTÂNEO EM RATAS WISTAR**

FORTALEZA

2021

BÁRBARA DE ARAÚJO LIMA DUTRA

GOMA ARÁBICA E EUGENOL NA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA EM NOVO
MODELO DE INÓCULO DE SÍLICA SUBCUTÂNEO EM RATAS WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.
Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Conceição Aparecida Dornelas.

Coorientador Prof. Dr. João Crispim Moraes Lima Ribeiro.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D974g Dutra, Barbara.
Goma arábica e eugenol na angiogênese inflamatória em novo modelo de inóculo de sílica subcutâneo em ratas Wistar / Barbara Dutra. – 2022.
89 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas .
Coorientação: Prof. Dr. João Crispim Ribeiro.

1. angiogênese. 2. goma arábica. 3. eugenol. 4. inflamação. 5. sílica. I. Título.

CDD 571.9

BÁRBARA DE ARAÚJO LIMA DUTRA

GOMA ARÁBICA E EUGENOL NA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA EM NOVO
MODELO DE INÓCULO DE SÍLICA SUBCUTÂNEO EM RATAS WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre em
Patologia. Área de concentração: Patologia

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Conceição Aparecida Dornelas (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. João Crispim Moraes Lima Ribeiro
Universidade Christus

Prof. Dr. Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Wesley Lyevertton Correia Ribeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus, por me dar forças e por me abençoar até aqui.

Aos meus pais, por me apresentarem o caminho do trabalho e da determinação.

AGRADECIMENTOS

À Professora Conceição Dornelas, minha orientadora, pelo acolhimento e pela oportunidade de aprender mais a fazer ciência mesmo quando o caminho parece árduo. Obrigada, professora, por ser apaixonada pela pesquisa e pela docência e por contribuir tanto com a minha formação.

Ao Dr. João Crispim, meu coorientador, por me apresentar a oportunidade de fazer um mestrado e por ser um verdadeiro tutor durante a minha caminhada como médica. Obrigada pelo estímulo diário e por acreditar tanto em mim.

À minha amiga Carol Lyra por, assim como eu, abraçar o mestrado junto com a residência e compartilhar comigo cada alegria e cada dificuldade do processo.

À doutoranda e amiga Nayanna Oliveira, por abraçar meu experimento como se fosse dela e por não medir esforços para ajudar. Não tenho dúvidas que foi uma graça divina te (re)encontrar nessa vida.

Ao Gilson, pela disponibilidade e pela ajuda durante cada dia de experimento.

Aos técnicos Franzé e Deomar pela confecção das minhas lâminas histológicas.

Aos funcionários da patologia, em especial, Ramon, Tião e Valéria, por serem sempre solícitos.

Aos meus colegas de sala do mestrado, por serem inspirações quando eu estava desanimada.

Aos veterinários Wesley e Maurício, por abrirem as portas do biotério setorial e pela atenção durante os dias de experimento.

Aos professores Vagnaldo Fachine e Carolina Lindoso pela disponibilidade de engrandecer minha banca de qualificação.

“Reze e trabalhe, fazendo de conta que esta vida é um dia de capina com sol quente, que às vezes custa muito a passar, mas que sempre passa. E você ainda pode ter um muito pedaço bom de alegria (...) Cada um tem a sua hora e a sua vez: você há de ter a sua”.
(Guimaraes Rosa)

RESUMO

O processo de angiogênese é definido como a formação de novos vasos sanguíneos por um processo de germinação de brotos endoteliais a partir de vasos capilares preexistentes. Esse evento está relacionado a vários processos fisiológicos como morfogênese e cicatrização de feridas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da goma arábica e do eugenol na angiogênese inflamatória em um novo modelo de inóculo de sílica subcutâneo por meio da análise histológica de lâminas coradas pela hematoxilina-eosina e por meio da imunohistoquímica pelo CD 31. Noventa e seis ratas Wistar foram distribuídas em 16 grupos contendo 06 animais cada. As substâncias administradas, via gavagem, foram: água destilada, goma arábica PA (500 mg/100 g de peso) e eugenol (10 mg/100 g peso). Os grupos controles (I, II, III, IV, IX, X, XI e XII) receberam inóculo de 0,2 mL de água destilada estéril no subcutâneo. Os grupos experimentais (V, VI, VII, VIII e XIII, XIV, XV e XVI) foram submetidos ao inóculo de 0,2 mL de solução de sílica (50 mg/mL) no subcutâneo. Os grupos I e V receberam água destilada por 7 dias e os grupos IX e XIII receberam por 14 dias; os grupos II e VI receberam goma arábica e eugenol por 7 dias, e os grupos X e XIV por 14 dias; os grupos III e VII receberam goma arábica por 7 dias, e os grupos XI e XV por 14 dias; os grupos IV e VIII receberam eugenol por 7 dias, e os grupos VIII e XVI receberam por 14 dias. As lâminas foram avaliadas com magnificação de 400x em um total de 5 campos. Mesmo com quantidades de dias de tratamento diferentes, não houve diferença entre os achados histológicos entre os grupos. Os grupos que receberam goma arábica apresentaram diminuição da densidade vascular, tanto os tratados por 7 dias ($0,09 \mu\text{m}^2 \pm 0,02$) quanto os tratados por 14 dias ($0,08 \mu\text{m}^2 \pm 0,03$), porém não ocorreu de forma clinicamente significativa. Nos animais que receberam apenas eugenol por 7 dias, ocorreu uma redução da densidade vascular (angiogênese), entretanto, estatisticamente não significativa ($0,08 \mu\text{m}^2 \pm 0,03$). Nos grupos tratados por 14 dias, houve estímulo à angiogênese de forma estatisticamente significativa ($0,14 \mu\text{m}^2 \pm 0,02$). O modelo experimental inédito de inóculo de sílica no dorso de ratas Wistar foi desenvolvido com sucesso. O eugenol inibiu a angiogênese inflamatória nesse modelo, ao ser administrado durante 7 dias, e estimulou a angiogênese nos grupos tratados por 14 dias.

Palavras-chave: Inibidores da Angiogênese. Inflamação. Eugenol. Goma Arábica. Granuloma.

ABSTRACT

The process of angiogenesis is defined as the formation of new blood vessels by a process of endothelial sprouts germinating from preexisting capillaries. This event is related to several physiological processes such as morphogenesis and wound healing. The objective of this work was to evaluate the effects of gum arabic and eugenol on inflammatory angiogenesis in a new model of subcutaneous silica inoculum through histological analysis of slides stained with hematoxylin-eosin and through immunohistochemistry with CD 31. Ninety and six Wistar rats were distributed in 16 groups containing 06 animals each. The substances administered via gavage were: distilled water, gum arabic PA (500 mg/100 g of weight) and eugenol (10 mg/100 g of weight). Control groups (I, II, III, IV, IX, X, XI and XII) received an inoculum of 0.2 mL of sterile distilled water subcutaneously. The experimental groups (V, VI, VII, VIII and XIII, XIV, XV and XVI) were submitted to the inoculum of 0.2 mL of silica solution (50 mg/mL) subcutaneously. Groups I and V received distilled water for 7 days and groups IX and XIII received it for 14 days; groups II and VI received gum arabic and eugenol for 7 days, and groups X and XIV for 14 days; groups III and VII received gum arabic for 7 days, and groups XI and XV for 14 days; groups IV and VIII received eugenol for 7 days, and groups VIII and XVI received it for 14 days. Slides were evaluated at 400x magnification in a total of 5 fields. Even with different amounts of treatment days, there was no difference between the histological findings between the groups. The groups that received gum arabic showed a decrease in vascular density, both those treated for 7 days ($0.09 \mu\text{m}^2 \pm 0.02$) and those treated for 14 days ($0.08 \mu\text{m}^2 \pm 0.03$), but it did not occur in a similar way. clinically significant. In animals that received only eugenol for 7 days, there was a reduction in vascular density (angiogenesis), however, it was not statistically significant ($0.08 \mu\text{m}^2 \pm 0.03$). In the groups treated for 14 days, there was a statistically significant stimulus to angiogenesis ($0.14 \mu\text{m}^2 \pm 0.02$). The novel experimental model of silica inoculum on the back of Wistar rats was successfully developed. Eugenol inhibited inflammatory angiogenesis in this model, when administered for 7 days, and stimulated angiogenesis in the groups treated for 14 days.

Keywords: Angiogenesis inhibitors, Inflammation, Eugenol, Gum arabic, Granuloma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Angiogênese	16
Figura 2 – Processo inflamatório	18
Figura 3 – Acácia senegalesas	25
Figura 4 – Molécula do eugenol	26
Figura 5 – Desenho experimental	32
Figura 6 – A. Inoculação de 0,2 mL de sílica no dorso do animal. B. Pequena bolha formada após o inóculo de sílica	34
Figura 7 – Ambiente do Sistema de Quantificação da Angiogênese –SQAN (FECHINE -JAMACARU, 2006)	36
Figura 8 – Corte histológico de pele e subcutâneo de rata corado pela hematoxilina eosina, evidenciando, em subcutâneos, partículas de sílica envolvidas por numerosos vasos e por infiltrado inflamatório constituído por linfócitos. Em região central do granuloma, observa-se material fibrinóide. (Aumento 100x)	37
Figura 9 – Corte histológico de pele e subcutâneo de rata corado pela hematoxilina eosina, evidenciando, em subcutâneo, partículas de sílica envolvidas por numerosos vasos e por infiltrado inflamatório constituído por linfócitos (Aumento 200x).	38
Figura 10 – Corte histológico de pele e de subcutâneo de rata corado pela hematoxilina eosina, evidenciando, em subcutâneo, partículas de sílica envolvidas por vasos e por infiltrado inflamatório constituído por linfócitos. Em meio a este granuloma, observa-se material eosinofílico fibrinóide (Aumento 400x)	39

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Quantificação da angiogênese por meio da densidade vascular	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	Água destilada
ANG1	Angiopoetina 1
ANG2	Angiopoetina 2
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
COX-2	Ciclooxigenase-2
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DMBA	7,12-dimetilbenz [a] antraceno
E	Eugenol
ECP	Proteína catiônica do eosinófilo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GA	Goma arábica
GA + E	Goma arábica + eugenol
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-16	Interleucina-16
MBP	Proteína básica principal
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PGE2	Prostaglandina E2
PMN	Neutrófilo polimorfonuclear
TNF- α	fator de necrose tumoral α
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
UFC	Universidade Federal do Ceará
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Angiogênese	15
1.2	Inflamação	19
1.2.1	<i>Células da resposta inflamatória</i>	20
1.3	Granuloma	22
1.4	Sílica	24
1.5	Goma arábica	25
1.6	Eugenol	27
1.7	Ratas Wistar	28
1.8	Justificativa e relevância	29
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivos específicos	30
3	MÉTODOS	31
3.1	Animais	31
3.2	Substâncias utilizadas	31
3.2.1	<i>Sílica</i>	31
3.2.1	<i>Goma arábica</i>	31
3.2.1	<i>Eugenol</i>	31
3.3	Delineamento experimental	32
3.4	Inóculo de sílica	35
3.5	Eutanásia	35
3.6	Hematoxilina-Eosina	35
3.7	Imuno-histoquímica	36
3.8	Quantificação da angiogênese	36
3.9	Avaliação histológica microscópica	37
3.10	Análise estatística	39
4	RESULTADOS	38
4.1	Modelo experimental, evolução clínica e mortalidade	38
4.2	Análise da resposta inflamatória por meio da hematoxilina-eosina	40
4.3	Análise da resposta inflamatória por meio da imuno-histoquímica	40

5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51
	APÊNDICE A – TABELAS DE PESOS DOS ANIMAIS	55
	APÊNDICE B – TABELAS COM ACHADOS HEMATOXILINA- EOSINA	60
	APÊNDICE C – ARTIGO ENVIADO PARA TRADUÇÃO	68
	ANEXO A – PUREZA DO EUGENOL	77
	ANEXO B – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Angiogênese

O processo de angiogênese é definido como a formação de novos vasos sanguíneos por um processo de germinação de brotos endoteliais a partir de vasos capilares preexistentes. Esse evento está relacionado a vários processos fisiológicos como morfogênese e cicatrização de feridas (JOHNSON, 2001). Além disso, a angiogênese desregulada pode induzir ou aumentar diversas condições patológicas (SAJIB et. al, 2018) como artropatias crônicas, retinopatia diabética, glaucoma vascular, crescimento tumoral e disseminação metastática. (JOHNSON, 2001).

A angiogênese pode ocorrer por três mecanismos diferentes: brotamento, intussuscepção e formação de pontes celulares. No brotamento, as células do endotélio migram para o espaço extravascular formando brotos lateralizados. Na intussuscepção, ocorre a invaginação da parede do vaso através de células periendothelias, dividindo o vaso em duas partes longitudinais. Na formação de pontes celulares, há formação de um vaso único através das pontes transendotelial que fracionam a luz vascular, formando canalículos que se desprendem formando novos vasos (CONWAY, COLLEN, CARMELIET, 2001; DVORAK, 2003).

Esse processo inclui várias etapas caracterizadas por funções celulares endoteliais distintas, como proliferação, migração, formação de lúmen, diferenciação e maturação (SAJIB et. al, 2018). Cada etapa envolve múltiplos fatores de crescimento, receptores e moléculas, causando a diversidade de vias de sinalização que afetam a patogenicidade da angiogênese em diferentes doenças. (CARMELIET, 2000). Além disso, o envolvimento do microambiente, constituído principalmente por células mesenquimais e matriz extracelular, torna difícil a compreensão e a intervenção terapêutica da angiogênese (RIEDER et al., 2009; MONGIAT et al., 2016).

Durante a angiogênese, as células endoteliais são ativadas e linhas únicas de células começam a migrar de um vaso preexistente em direção a um gradiente de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um fator de crescimento produzido sob condições hipóxicas (GERHARDT, 2008).

O VEGF é o principal fator solúvel que modifica a barreira endotelial (MELINCOVICI, et al., 2018). Esse fator é secretado por neutrófilos, plaquetas, macrófagos, células T ativadas, células dendríticas, pericitos e as próprias células endoteliais (LAPEYRE-PROST et al., 2016). Originalmente, o VEGF era descrito como fator de permeabilização vascular devido a um de seus efeitos fisiológicos. O VEGF sustenta crucialmente a sobrevivência das células endoteliais e promove a angiogênese dos vasos sanguíneos (STURTZEL, 2017).

A expressão do VEGF é regulada pelo fator 1 induzido por hipóxia (HIF-1). Esse fator é composto por duas subunidades, fator 1 alfa (HIF-1 α) e fator 1 beta (HIF-1 β). A atividade biológica do HIF-1 depende da quantidade de HIF -1 α que, na maioria das vezes, é regulada pela tensão de oxigênio. Uma queda na concentração de O₂ e um aumento na concentração intracelular de HIF -1 α , que é uma proteína reguladora, estimulam a transcrição do gene VEGF que atua sobre as células do endotélio, levando a proliferação das mesmas, bem como a produção de proteases e formação de brotos. As células das extremidades dos brotos captam o gradiente de VEGF e se movem na direção da fonte desse (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003).

Os novos vasos são formados como brotamentos crescentes de células de ponta (STURTZEL, 2017). A célula de ponta expressa receptores de VEGF para detectar o gradiente dele. As células-tronco seguem imediatamente após a célula da ponta (FRAISL et al., 2009). Vários fatores podem selecionar uma célula para se tornar uma célula de ponta, incluindo vantagens metabólicas como glicólise elevada o que confere maior mobilidade ou melhor arranjo celular, orientando células em certas direções para facilitar a migração (JAKOBSSON et. al, 2010). Quando um broto encontra outro, eles irão realizar anastomoses e o sangue pode fluir através de um vaso recém-formado (BLANCO et al., 2013). Esse processo é frequentemente interligado por macrófagos através da conferência de fontes de receptores (notch), especialmente, em pontos de ramificação (OUTTZ et. al, 2011).

Muitos fatores, incluindo quimiocinas, têm capacidade pró-angiogênica, refletindo a necessidade interligada de novos vasos durante uma resposta imune (INOUE et. al, 2000). Por exemplo, a interleucina (IL)-8 (IL-8) é altamente angiogênica e sua expressão está associada a mau prognóstico em diferentes tipos de câncer, mas induz as células endoteliais na proliferação no miocárdio isquêmico (XIE et al., 2015).

Podemos citar também dentre os estimuladores deste processo, as angiopoetinas 1 e 2 (ANG1 e ANG2) que são responsáveis pela estabilização vascular ao se ligarem ao receptor tirosina quinase tie 2 (TIE2) e promoverem a sobrevida endotelial, através do recrutamento de pericitos. Os fatores de crescimento de fibroblastos são descritos como indutores de angiogênese e estimulam a proliferação e diferenciação de células do endotélio (EICHORN et al., 2007).

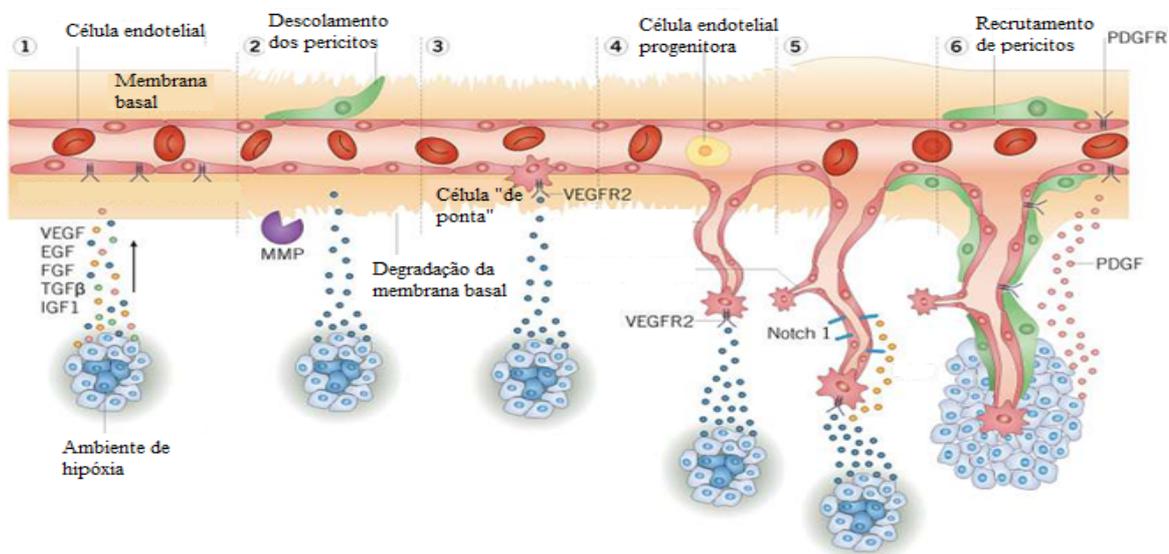
Os monócitos também podem ser um recurso adicional do VEGF, sendo necessários para o processo de arteriogênese e para a rápida maturação dos capilares colaterais nas artérias após uma oclusão da circulação arterial (GRUNEWALD et al., 2011).

Dentre os inibidores da angiogênese há a angiostatina que tem efeito inibitório na matriz extracelular, reduzindo a migração e a invasão de células endoteliais. A endostatina é proteoglicano encontrado na parede do vaso e inibe a migração, levando a apoptose (EICHORN et al., 2007). Os interferons, primeiros reguladores endógenos antiangiogênicos identificados, inibem a secreção do fator de crescimento de fibroblastos (LINDNER, 2002).

O desequilíbrio da atividade molecular entre estimuladores e inibidores da angiogênese contribui para o desenvolvimento de diversas doenças neoplásicas, inflamatórias, isquêmicas, infecciosas e imunológicas (CARMELIET, 2005).

Assim, Folkman, em 1971, sugeriu que o controle da angiogênese poderia ser útil no controle do crescimento tumoral (Figura 1) uma vez que a desregulação na angiogênese está associada ao crescimento de tumores e às doenças angioproliferativas (CHAVES, 2016). No entanto, o estímulo farmacológico da angiogênese pode ser benéfico em situações clínicas na qual sua ativação é terapêuticamente necessária, tais como na reparação de feridas e na isquemia (DETILLIEUX et al., 2003).

Figura 1. Angiogênese.



Disponível em: <https://www.tocris.com/cell-biology/angiogenesis>

Neste sentido, existem relatos na literatura sobre determinados produtos de origem vegetal, como a própolis vermelha (MELO et. al, 2018) que apresentam substâncias indutoras de angiogênese (WANG et al., 2004).

1.2 Inflamação

A inflamação é definida como a resposta fisiológica a agentes infecciosos ou não infecciosos. O processo de inflamação é ativado a fim de remover as células do tecido danificado e a fonte da lesão. O objetivo geral do processo inflamatório é a reparação do tecido danificado para restaurar a arquitetura típica do tecido, mantendo assim a homeostase celular/tecidual. (AGUILAR-CAZARES et. al, 2019). Desde a resposta inflamatória local até uma inflamação sistêmica total, ocorre uma ampla e complexa sequência de eventos (VARELA et.al, 2018).

A via de ativação desse processo consiste em indutores, sensores, mediadores e efetores. Os indutores podem ser organismos infecciosos ou estímulos não infecciosos, como toxinas, corpos estranhos, sinais de células necróticas e tecidos danificados. Sensores são moléculas especializadas ativadas pelos indutores, que acionam a produção de mediadores. Os mediadores são substâncias químicas endógenas que podem induzir a sensação de dor, promover ou inibir a inflamação e a reparação de tecidos e ativar os efetores - tecidos e células (MEDZHITOV, 2008). A combinação desses fatores gera muitas rotas alternativas na via inflamatória e essa via depende dos estímulos incitantes (MEDZHITOV, 2010).

Os indutores podem ser classificados como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são padrões moleculares de organismos infecciosos, e como padrões moleculares associados a danos (DAMPs), moléculas liberadas a partir de células danificadas do hospedeiro (MEDZHITOV, 2010). Cada um desses padrões é reconhecido por diferentes receptores em macrófagos e células dendríticas; receptores de dor também detectam danos nos tecidos. Citocinas inflamatórias são liberadas após a estimulação desses receptores (MILLS, 2011). Eles incluem o fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-1, IL-6, entre outros, que induzem alterações no endotélio, permitindo a passagem de células imunes pelas junções entre as células endoteliais (VARELA et. al, 2018).

As células imunológicas recrutadas dependem do estado inflamatório do tecido: a para-inflamação leva ao recrutamento de monócitos, enquanto uma inflamação completa também leva à translocação de neutrófilos para o tecido (MEDZHITOV, 2010). Essas células liberam enzimas que combatem organismos infecciosos e limpam as células mortas.

Como consequência dessa liberação enzimática, espécies reativas de oxigênio (ERO) se acumulam nos tecidos, podendo danificar células saudáveis (MEDZHITOV, 2008). As células endoteliais também liberam citocinas pró-inflamatórias que atraem ainda mais células inflamatórias. O plasma também transloca-se para os tecidos adjacentes, levando ao edema do

tecido. As plaquetas em circulação são ativadas e agregadas, enquanto a síntese de proteínas anticoagulantes é reduzida. Isso pode levar à trombose intravascular, que, em excesso, pode contribuir para a disfunção orgânica (GANDO, 2010 e SERHAN, 2010). A Figura 2 resume os eventos que levam aos sinais principais de inflamação.

Figura 2. Processo inflamatório.



Adaptado de: GERMOLEC et. al, 2018

Durante a inflamação aguda, a hiperpermeabilidade vascular permite que mediadores inflamatórios e células de resposta imune, incluindo, dentre outros, leucócitos e monócitos / macrófagos, infiltrem o local do dano (AGUILAR-CAZARES et. al, 2019). Em uma inflamação completa, os neutrófilos são as primeiras células imunes a chegar e translocar-se para os tecidos. Os neutrófilos sintetizam as EROs, estimuladas por fatores externos, como PAMPs e DAMPs, a fim de eliminar substâncias nocivas. Consequentemente, as ERO estão presentes tanto intracelularmente quanto extracelularmente. A ERO intracelular permite a formação de um grupo de proteínas que desencadeia mais inflamação através da clivagem de precursores de proteínas pró-inflamatórias. Os neutrófilos também liberam proteínas quimioatraentes que promovem a migração de monócitos para os tecidos. Aqui, os monócitos se diferenciam em macrófagos, M1 ou M2. Os macrófagos M1 ainda produzem ERO e recrutam outras células imunes, enquanto M2 age em uma fase posterior, pois promove o reparo tecidual liberando fatores de crescimento (MITTAL et. al, 2014 e GRIFFITHS et. al, 2017). O TNF- α é uma das citocinas inflamatórias mais importantes liberadas pelos macrófagos M1, pois induz efeitos sistêmicos (VARELA et. al, 2008, ATSUMI et. al, 2007, BACH et. al, 2014). O fenótipo dos macrófagos está fortemente ligado ao metabolismo, pois as células M1 são principalmente glicolíticas, enquanto M2 oxidam os ácidos graxos (GRIFFITHS et. al, 2017).

A depuração eficaz, por macrófagos, de neutrófilos que sofreram morte celular programada também é importante para diminuir o estímulo inflamatório (BAYIR e KAGAN, 2008). O momento para a resolução da inflamação é crítico, pois há risco de que o processo inflamatório permaneça ativo, portanto, crônico, e que os danos oxidativos prevaleçam (GRIFFITHS et. al, 2017).

As EROs acumuladas também desempenham um papel importante na definição do momento em que a inflamação desaparece (GRIFFITHS et. al, 2017), pois também servem como moléculas sinalizadoras importantes, regulando o crescimento celular, a diferenciação e a apoptose (MITTAL et. al, 2014). No entanto, as EROs em altas concentrações são prejudiciais aos tecidos, locais e distantes. Os hidroperóxidos, em particular, podem extravasar do tecido inflamado e atingir a circulação, havendo chance de danificar células sanguíneas, proteínas plasmáticas e atingir tecidos distantes por meio de pequenas vesículas chamadas exossomos (TAFANI et al, 2016).

1.2.1 Células da resposta inflamatória

Na fase aguda da inflamação, plaquetas e células granulocíticas como basófilos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos são ativadas e, por sua vez, produzem e liberam vários mediadores solúveis que estimulam e regulam a resposta inflamatória. Neutrófilos, que, às vezes, são chamados de polimorfonucleares (PMNs) devido à natureza lobulada de seus núcleos, são os principais mediadores celulares dos processos inflamatórios agudos. Seus grânulos contêm uma variedade de enzimas, peptídeos, e proteínas e podem liberar rapidamente EROs. A avaliação das substâncias produzidas pelos neutrófilos, principalmente a mieloperoxidase, pode ser usada para avaliar a gravidade da inflamação (GANDO, 2010). Neutrófilos migram do sangue para o local da lesão como resultado da vasodilatação e da permeabilidade vascular aumentada.

No entanto, existem inúmeras causas de aumento do número de neutrófilos circulantes (neutrofilia), e alguns deles podem não estar diretamente relacionados ao status imunológico, o que ressalta a necessidade de integrar todos os dados de um estudo em vez de avaliar componentes individuais separadamente (VARELA et. al, 2018).

Basófilos e mastócitos contêm grânulos citoplasmáticos que servem como reservatórios para mediadores solúveis que funcionam em muitos aspectos da resposta inflamatória. Reagentes de fase inicial liberados a partir de mastócitos, como produtos do

ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos) e da histamina medeiam vasodilatação e permeabilidade vascular aumentada da resposta vascular aguda. A secreção de fator de ativação plaquetária (PAF) pelos mastócitos também aumenta a permeabilidade e, ao mesmo tempo, estimula a liberação de mediadores de plaquetas, resultando na ativação de neutrófilos (VARELA et. al, 2018).

O tamanho e as características de coloração dos basófilos podem se sobrepor a outros tipos de células, o que dificulta categorizá-los. Foi demonstrado que instrumentos automatizados tendem a subestimar as contagens durante a basofilia verdadeira (SERHAN et. al, 2010). Além disso, os aumentos de basófilos raramente são significativos o suficiente para afetar sensivelmente a contagem total de leucócitos (SCHWARTZ et. al, 2011).

Os eosinófilos são as células inflamatórias predominantes associadas com respostas de hipersensibilidade e eliminação de infecções parasitárias. Os eosinófilos são recrutados para o local da inflamação por vários fatores incluindo IL-5, IL-2, IL-16, histamina, peptídeos de neutrófilos e algumas proteínas do complemento. A ativação de eosinófilos resulta na liberação de eosinófilos peroxidase, proteína básica principal (MBP), neurotoxina derivada de eosinófilos e proteína catiônica do eosinófilo (ECP). MBP e ECP são proteínas altamente básicas que degradam células próximas, como epitélio traqueal. Mudanças nos números de eosinófilos são fáceis de identificar nos diferenciais manuais de leucócitos, como seus grânulos citoplasmáticos têm uma alta afinidade por corantes ácidos que resulta em uma coloração rosa / vermelha característica. (GRIFFITHS et. al, 2017)

As plaquetas são fragmentos celulares circulantes anucleados derivado de megacariócitos. Elas são rapidamente recrutadas para locais de comprometimento vascular, lesão e infecção e são ativadas localmente. A principal função das plaquetas é facilitar a formação de coágulos e evitar extravasamento vascular. As plaquetas trabalham em conjunto com proteínas do sistema de coagulação, como fibrinogênio e fibronectina, nos locais de dano vascular. Na homeostase, as plaquetas também apresentam efeitos inflamatórios e antimicrobianos e, desse modo, vinculam-se à cascata de coagulação e ao sistema imunológico (BACH et. al, 2014). Exemplos de suas funções inflamatórias incluem a liberação de EROs, que podem contribuir para danos nos tecidos e para a produção de mediadores como heparina e serotonina que promovem o estado vasodilatador da resposta vascular aguda. Um número de agentes terapêuticos (por exemplo, procainamida, sulfametoxazol e sais de ouro) podem induzir trombocitopenias mediadas pelo sistema imune e/ou anemias aplásticas. A trombocitose pode se manifestar como resposta primária a

hemorragia, a inflamação aguda ou a infecções ou podem ocorrer como resultado secundário de algumas condições inflamatórias crônicas como artrite reumatóide ou durante a regeneração hepática, após hepatotoxicidade ou hepatectomia (BAYIR E KAGAN, 2008).

A infiltração linfocítica é frequentemente uma característica proeminente nas doenças inflamatórias crônicas. Os linfócitos T e B podem atuar como efetores específicos de citotoxicidade ou segregam anticorpos e citocinas que participam do dano tecidual ou do recrutamento de células inflamatórias. Células que não possuem receptores de antígenos linfocitários, também secretam citocinas que combatem infecções e contribuem para doenças inflamatórias de maneira inespecífica (TISONCIK et. al, 2012). Linfócitos tendem a estar mais concentrados em linfonodos ou nos locais da inflamação. De fato, a linfopenia induzida por estresse é um componente mais típico da inflamação. Uma notável exceção é o rato, onde a linfocitose não é incomum em respostas inflamatórias (MARIK e BELLOMO, 2013).

Os macrófagos tendem a se acumular no local da lesão após a infiltração linfocítica e também pode ser a resposta primária às doenças crônicas como infecções por micobactérias. Eles servem como células apresentadoras de antígenos e também ajudam a conduzir e a perpetuar a resposta imune liberando uma variedade de estimuladores de linfócitos, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que desempenham um papel predominante na regulação e na resolução do quadro inflamatório. Enzimas lisossômicas contidas em macrófagos podem participar da degradação fagocítica de corpos estranhos e de mediadores inflamatórios. Além disso, os monócitos podem ser recrutados para locais inflamatórios da medula óssea e continuam a se diferenciar em macrófagos. Monócitos e macrófagos desempenham um papel importante na remoção de células mortas ou anormais, e assim, o aumento do número dessas células pode ser indicativo de inflamação ou necrose tecidual (VARELA et. al, 2018).

1.3 Granuloma

A inflamação granulomatosa é um padrão histológico de reação tecidual que aparece após lesão celular. Ela é causada por uma variedade de condições, incluindo infecções, doenças autoimunes e alérgicas, causas medicamentosas, tóxicas e neoplásicas. O padrão de reação do tecido restringe o diagnóstico diferencial patológico e clínico e o gerenciamento clínico subsequente. Os padrões de reação comuns incluem granulomas necrotizantes, granulomas não necrotizantes, granulomas supurativos, inflamação granulomatosa difusa e

reação de corpo estranho de células gigantes. Exemplos de granulomas necrotizantes são vistos com infecções por micobactérias; já de granulomas não necrosantes com a sarcoidose (SHAH e ALEXANDER, 2017).

A histogênese dos granulomas depende de vários tipos de células. A composição típica é um centro de macrófagos/histiócitos com linfócitos na borda. A sequência de eventos que levam à formação do granuloma é regulada por vários tipos de células e citocinas: enquanto os mecanismos associados a Th1 promovem o desenvolvimento do granuloma, parece que as células T reguladoras, bem como os macrófagos M2, juntamente com a interleucina (IL) -10 e a IL-13 à sua dissociação e cicatrização dos tecidos. Existe uma forte correlação entre a estrutura e a função dos granulomas. As doenças cutâneas granulomatosas inflamatórias crônicas baseiam-se principalmente na modulação negativa disfuncional de processos inflamatórios que levam à formação de granuloma e mantêm a formação (VON STEBUT, 2017).

A arquitetura clássica do granuloma maduro consiste em um infiltrado de linfócitos concêntricos, cujo interior é predominantemente CD68 + células apresentadoras de antígeno (APC). Possui células epiteliais e gigantes multinucleadas, bem como células T CD4 + e células de memória CD45RO +, além de agregados sanguíneos e vasos linfáticos (VON STEBUT, 2017).

Os granulomas são ativados, classicamente, pelos chamados macrófagos M1. Sua função na formação de granuloma consiste na erradicação de patógenos. Macrófagos M2 ativados alternativamente (induzidos na presença de citocinas e IL-10, IL-4 e IL-13) parecem controlar a função das células M1. Eles tendem a ter uma função reguladora com um efeito positivo na regeneração de tecidos e cicatrização de feridas (ASAI, 2017). O desenvolvimento de macrófagos M2 contribuem para a cronicidade dos granulomas.

Os neutrófilos parecem ser necessários para a formação inicial dos granulomas e para a atração de macrófagos para o tecido, mas desnecessários para a manutenção do granuloma (BELKAID, 2000).

Em modelos animais, os mastócitos desempenham papel importante na formação de granuloma de corpo estranho. O TNF α secretado pelos mastócitos regula a imigração de neutrófilos, que por sua vez, via MIP-1 α / β e MIP-2, promovem o influxo de macrófagos para o local de formação do granuloma (MAURER, 2006 e VON STEBUT, 2003).

O granuloma representa a resposta do hospedeiro e é formado, sobretudo, por histiócitos, que são os macrófagos residentes no tecido (DALDON, 2007). Os granulomas não infecciosos podem ser divididos em (MCKEE, 2005):

1. Granulomas sarcóides: consiste no arranjo concêntrico de células epitelióides (histiócitos modificados). Pela participação dos linfócitos T no processo, são também denominados de granulomas imunológicos. O protótipo desse grupo é a sarcoidose.
2. Granulomas necrobióticos: caracterizam-se por degeneração do colágeno dérmico, denominada necrobiose, envolto por histiócitos e linfócitos dispostos em paliçada. São exemplos de enfermidade desse grupo o granuloma anular, o granuloma actínico e o nódulo reumatóide.
3. Granulomas de corpo estranho: o granuloma é provocado por substâncias incapazes de elucidar a resposta imune especializada (mediada pelos linfócitos T), sendo também denominados granulomas não imunológicos. Ao exame histopatológico, caracterizam-se por material estranho fagocitado por histiócitos, que se aglomeram em células gigantes multinucleadas (as células gigantes de corpo estranho). São exemplos os granulomas de corpo estranho provocado por fio de sutura e pêlos.

Granulomas de sílica têm sido descritos em vítimas de acidente automobilístico (ONESTI et. al, 2014) e em contaminações de tatuagens por dióxido de silício. (FERNANDEZ-FLORES, 2006; BOZTEPE, 2005). Trata-se de um processo inflamatório inicialmente agudo evoluindo para inflamatório crônico devido a persistência do agente (dióxido de silício), formando um complexo de granuloma de corpo estranho rodeado por colágeno.

1.4 Sílica (Silicose)

O composto químico dióxido de silício, também conhecido como sílica, é o óxido de silício cuja fórmula química é SiO_2 . Em seu estado natural, pode ser encontrado em diversas formas diferentes. Possui 17 formas cristalinas distintas, entre elas o quartzo, o topázio e a ametista. A princípio, qualquer processo que envolva o movimento da terra ou de produtos que contenham sílica, como alvenaria-alvenaria e / ou concreto, pode expor os trabalhadores à sílica (CASTRANOVA, 2004).

A exposição prolongada à forma cristalina da sílica induz a produção de quimiocinas, citocinas inflamatórias e fatores de crescimento. Esses mediadores têm-se revelado importantes para a iniciação e progressão de doenças pulmonares induzidas pela sílica

(CASTRANOVA, 2004). Além desses mediadores, a sílica cristalina poderá induzir toxicidade pela formação de espécies reativas de oxigênio (CASTRANOVA, 2004).

A silicose é uma das doenças respiratórias ocupacionais mais comumente encontradas em nosso meio. É causada pela inalação de sílica cristalina que desencadeia uma resposta fibrótica no parênquima pulmonar. Apresenta-se como doença intersticial difusa e a expressão clínica varia de formas assintomáticas à insuficiência respiratória crônica. O diagnóstico é baseado na história clínica e nos achados radiológicos. Não existe tratamento eficaz e, uma vez diagnosticado, o paciente deve evitar todas as fontes de exposição ocupacional. Nessas diretrizes, são revisados os aspectos clínicos, radiológicos e funcionais da silicose, e são propostas estratégias para diagnóstico, monitoramento e classificação dos pacientes, além de recomendações sobre as implicações ocupacionais dessa doença.

Acredita-se que a silicose (doença pulmonar ocupacional) por aspiração de sílica, seja iniciada por um número maior de macrófagos alveolares ativados, liberando numerosos mediadores inflamatórios, que desempenham papéis cruciais na ocorrência e desenvolvimento da doença (ZHANG, 2018).

A doença cutânea é um evento raro descrito pela primeira vez em 1916 como “pseudotuberculoma silicoto” (SHATTOCK, 1916). É caracterizada por um granuloma de corpo estranho produzido por implante acidental de sílica em uma ferida e a patogênese não é clara (KAYA, 2003). Alguns autores sugerem que é necessário tempo para essa transformação, levando em consideração o longo período de latência característico para o desenvolvimento de granuloma de sílica, o que pode variar de várias semanas a 59 anos (intervalo médio de aproximadamente 10 anos) (MOWRY, 1991; KAYA, 2003).

1.5 Goma arábica

Gomas naturais são exsudadas por algumas plantas como proteção em resposta à lesão mecânica ou invasão microbiana (MARQUES E XAVIER-FILHO, 1991). A goma arábica (GA) é um exsudado de ocorrência natural coletado de *Acacia senegalesas* (Figura 3), nativa da África (THEVENET, 1988), consistindo de um complexo mistura de polissacarídeos e proteínas (MAHFOUDHI et al., 2016).

Figura 3. *Acacia senegalesas*



Disponível em: <http://kolon.geologypu.org/acacia-senegal/>

Em pesquisas realizadas com GA, NASIF, em 2011, ilustrou alterações funcionais e bioquímicas associadas com alterações histopatológicas induzidas pela aspirina em um tratamento por 21 dias. Concluiu ainda um significativo papel da goma arábica para manter o equilíbrio das enzimas pancreáticas, intestinais e do conteúdo intestinal de ferro e de zinco em tratamento associado com aspirina em ratos. Além disso, a GA mostrou um potencial efeito gastroprotetor (NASIF, 2011).

A ingestão de GA diminuiu os níveis de fatores de transcrição angiogênicos (angiogenina 1, angiogenina 3 e angiogenina 4) dentro de 4 dias. Sabe-se que as angiogeninas estão relacionadas com a proliferação vascular (angiogênese) e, conseqüentemente, com o crescimento e metástases de tumores, bem como possibilita revascularização de tecidos isquêmicos (NASIR, 2010). Além disso, camundongos tratados com GA apresentaram declínio da genotoxicidade colônica, hepática e sistêmica e do estresse oxidativo em um modelo de carcinogênese colorretal (AVELINO, 2021). Esses resultados refletem o papel antioxidante do GA e podem levar ao desenvolvimento de tratamentos que inibam a carcinogênese colorretal. Então, a goma arábica pode ser um instrumento de tratamento para doenças inseridas nesse contexto.

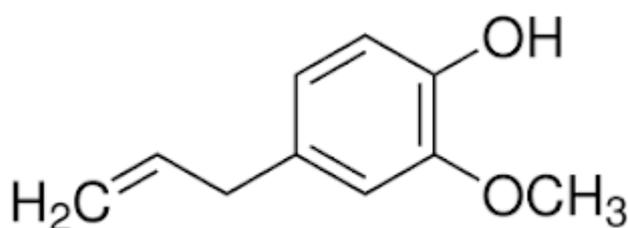
Avanços em nanotecnologia permitiram a utilização da goma arábica como estabilizante e como agente redutor na síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs) (KATTUMURI et al., 2007). A propriedade de superfície ativa da GA e sua biocompatibilidade, *in vitro* ou *in vivo*, têm mostrado sua utilização como molécula emulsificante e estabilizadora em nanotecnologia e como uma molécula liberadora de fármaco que é capaz de melhorar a estabilidade aquosa (WILLIAMS et. al, 2007). O TNF-a, uma citocina multifuncional, é primariamente ativada na inflamação sistêmica. Uma elevação significativa da concentração de TNF-a foi detectada em todos os tumores, o que dramaticamente diminuiu quando camundongos portadores de tumor foram submetidos a GA-AuNPs + laser (GAMAL-ELDEEN et al., 2017).

1.6 Eugenol

O Eugenol (E) é um composto aromático que está presente nos cravos. O cravo-da-índia é um tempero importante, com uma ampla variedade de usos medicinais (YAN et al., 2017), principalmente, como antibacteriano, antiviral, antioxidante, antiinflamatório (JAGANATHAN et al., 2012). O principal componente do cravo-da-índia (o isômero isoeugenol) é produzido a partir do eugenol por meio de uma reação que ocorre naturalmente nos dentes (CORTÉS-ROJAS, 2014).

O eugenol (Eu, 4-*alil*-2-metoxifenol) (Figura 4), e seus compostos relacionados são antioxidantes eficazes que podem impedir doenças mediadas por radicais livres, como câncer, condições inflamatórias (diabetes tipo 2 e doença cardiovascular), distúrbios neurodegenerativos e alterações periodontais (PRAKASH, 2005). Eles podem atuar como eliminadores ou geradores de radicais livres, dependendo da sua natureza e da sua concentração. Esse efeito duplo pode influenciar a viabilidade celular e a atividade anti-inflamatória em vários graus (CARRERAS, 2012).

Figura 4 – Molécula do Eugenol



Disponível em: <http://tudosobreoeugenol.blogspot.com/2015/10/>

Foi-se demonstrado um papel importante do eugenol na atividade inibitória da Cox-2. Durante um processo inflamatório, a Cox-2 é um dos principais contribuintes para o aumento do nível da prostaglandina E2, o que aumenta o processamento de estímulos nociceptivos após a inflamação. Efeitos inibitórios de compostos relacionados ao eugenol em macrófagos e linhas celulares ativadas com lipopolissacarídeos (LPS) foram investigadas e comprovadas (FUJISAWA, 2016)

Um estudo anterior demonstrou que o eugenol induz a apoptose e inibe a invasão e a angiogênese no modelo gástrico induzido pela N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG)(MANIKANDAN et al., 2010). Além disso, no HSC-2 (célula cancerígena escamosa oral), há morte celular não apoptótica induzida por eugenol (KOH, 2013). Embora o eugenol tenha demonstrado induzir apoptose em linhas celulares de câncer, não há relatos de efeitos do eugenol sobre as características marcantes de tumores induzidos quimicamente em modelos animais (YOO et al., 2005; PISANO et al., 2007; GHOSH et al., 2009).

Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que o eugenol, provavelmente, é capaz de manipular o equilíbrio entre proteínas pró e anti-apoptóticas (MANIKANDAN, 2011) e também tem especificidade de tipo de célula.

1.7 Ratas Wistar

O rato de laboratório, *Rattus norvegicus*, usado atualmente na maioria dos biotérios deriva de colônias provenientes dos EUA, embora seja originário da Ásia Central. Acredita-se que tenha sido a primeira espécie de mamífero domesticada para fins científicos. A grande difusão desse animal na pesquisa se deu com Henry H. Donaldson que, ao trabalhar no Wistar Institute, na Filadélfia, criou uma equipe que se dedicou a padronizar colônias de rato a partir de casais albinos. Desde então, por serem considerados mais dóceis, os exemplares albinos foram mantidos.

Os ratos Wistar são caracterizados pelas orelhas alongadas, cabeça grande e comprimento da cauda sempre menor que o comprimento corporal. A gestação dura de 20 a 22 dias e o desmame ocorre com 17 a 19 dias de idade. São considerados animais dóceis, de fácil manipulação e têm boa capacidade de aprendizado (WISEMAN E PARDUE, 2001).

Em 2001, o *Institute of Medicine* publicou uma revisão que enfatizava a necessidade de definições claras de sexo e gênero (WISEMAN E PARDUE, 2001). O sexo foi definido como "a classificação dos seres vivos, geralmente como masculino ou feminino, de acordo com seus órgãos reprodutivos e funções atribuídas pelo complemento cromossômico". Por outro lado, o gênero foi definido como "a autorrepresentação de uma pessoa como homem ou mulher, ou

como essa pessoa é respondida por instituições sociais com base na apresentação de gênero do indivíduo”.

Embora reconheçamos a importância de fatores ambientais e sociais para diferenciar humanos masculinos e femininos, aqui nos concentramos em diferenças biológicas de sexo em pesquisas pré-clínicas. O estudo de animais é frequentemente motivado por esse foco, porque animais (como seres humanos) compartilham genes e hormônios que tornam os dois sexos diferentes. Como a maioria dos animais não compartilha os complexos ambientes sociais de gênero dos seres humanos, o estudo de animais não é informativo sobre o gênero humano (WISEMAN E PARDUE, 2001).

O objetivo dos sistemas de roedores é ser experimentalmente mais tratável que os humanos, para que a causalidade entre variáveis possa ser comprovada sem dúvida. Dessa forma, o estudo com roedores produz informações mais precisas sobre a arquitetura básica dos sistemas metabólicos biológicos do que as obtidas em estudos com seres humanos.

1.8 Justificativa e relevância

As pesquisas de possíveis substâncias com propriedades angiogênicas são importantes pelo fato da angiogênese ser um denominador comum na fisiopatologia de doenças, que ainda não apresentam tratamento disponível.

O eugenol e outros compostos fenólicos apresentam atividades antioxidantes e antiinflamatórias, decorrentes da inibição da síntese de prostaglandinas e da quimiotaxia de neutrófilos (MURAKAMI et al., 2003). Além disso, o eugenol melhorou a modulação da inflamação e da remodelação pulmonar em um modelo de animais injetados com lipopolissacarídeos, reduzindo a infiltração de polimorfonucleares e a deposição de fibras colágenas no parênquima pulmonar. (MAGALHÃES, 2010).

Granulomas de sílica têm sido descritos em vítimas de acidente automobilístico e em contaminações de tatuagens por dióxido de silício. O quadro de inflamação e de fibrose induzido pela deposição de sílica cristalina, na maioria das vezes, é irreversível, necessitando investigar possibilidades terapêuticas. Novas abordagens direcionadas ao tratamento de inflamação e fibrose induzidas por sílica são urgentemente necessárias (BOZTEPE, 2005, FERNANDEZ-FLORES, 2006; ZHANG, 2018).

A ingestão de GA diminuiu os níveis de fatores de transcrição angiogênicos (angiogeninas) dentro de 4 dias (NASIR, 2010). Sabe-se que as angiogeninas estão relacionadas com a proliferação vascular (angiogênese).

A complexidade das propriedades biológicas da goma arábica e do eugenol, dentre as quais, a relação com a resposta inflamatória decorrente da influência na angiogênese, verificadas em estudos experimentais tornaram-na relevante como objeto de investigação farmacológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da goma arábica e/ou eugenol na angiogênese em modelo de inóculo de sílica subcutâneo.

2.2 Objetivos específicos

Criar um modelo de inóculo de sílica subcutâneo para avaliação de angiogênese

Avaliar o efeito da goma arábica e do eugenol na densidade microvascular em modelo de inóculo de sílica subcutâneo corado pelo CD 31 (imuno-histoquímica) no 7º e no 14º dia.

Avaliar o efeito da goma arábica e do eugenol no processo inflamatório em modelo de inóculo de sílica subcutâneo no 7º e 14º dias através de coloração pela hematoxilina-eosina.

3 MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (UFC) e teve início após a aprovação (CEUA nº 9407070619), seguindo as Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os experimentos foram realizados no Biotério Setorial do Porangabuçu – Professor Eduardo Torres, da UFC.

3.1 Animais

Foram utilizadas 96 ratas Wistar, com peso médio de 100 gramas.

Os animais foram mantidos em gaiolas com dimensões de 50x 60x 22cm com ração e água filtrada fresca *ad libitum*. Os animais eram mantidos sobre ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura média de $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ com exaustor e ar-condicionado.

Alguns materiais foram inseridos no ambiente animal, como túneis e objetos coloridos com o objetivo de promover oportunidades aos animais de exercerem seus repertórios sensorial, motor, cognitivo, social e comportamental.

O protocolo experimental foi categorizado com grau de invasividade 2 (causa estresse, desconforto ou dor, de leve intensidade).

3.2 Substâncias utilizadas

3.2.1 Sílica

Partículas de sílica cristalina dióxido de silício (malha 400) (di Luca Distribuidora-Comércio de Minérios) foram suspensas em solução de água destilada na concentração de 50 mg/mL após a esterilização ($121,3^{\circ}\text{C}$, 103, 4 kPa por 90 min). (ZHANG, 2018)

3.2.2 Goma arábica PA (APA Comércio de produtos médicos hospitalares e laboratoriais LTDA)

Foi utilizada na dose de 500 mg/100 g de peso (NASIF et al., 2011), diluída em água destilada 5 mL/kg de peso, aquecida a 60°C e centrifugada, administrada por gavagem. (NASIF et al, 2011).

3.2.3 Eugenol

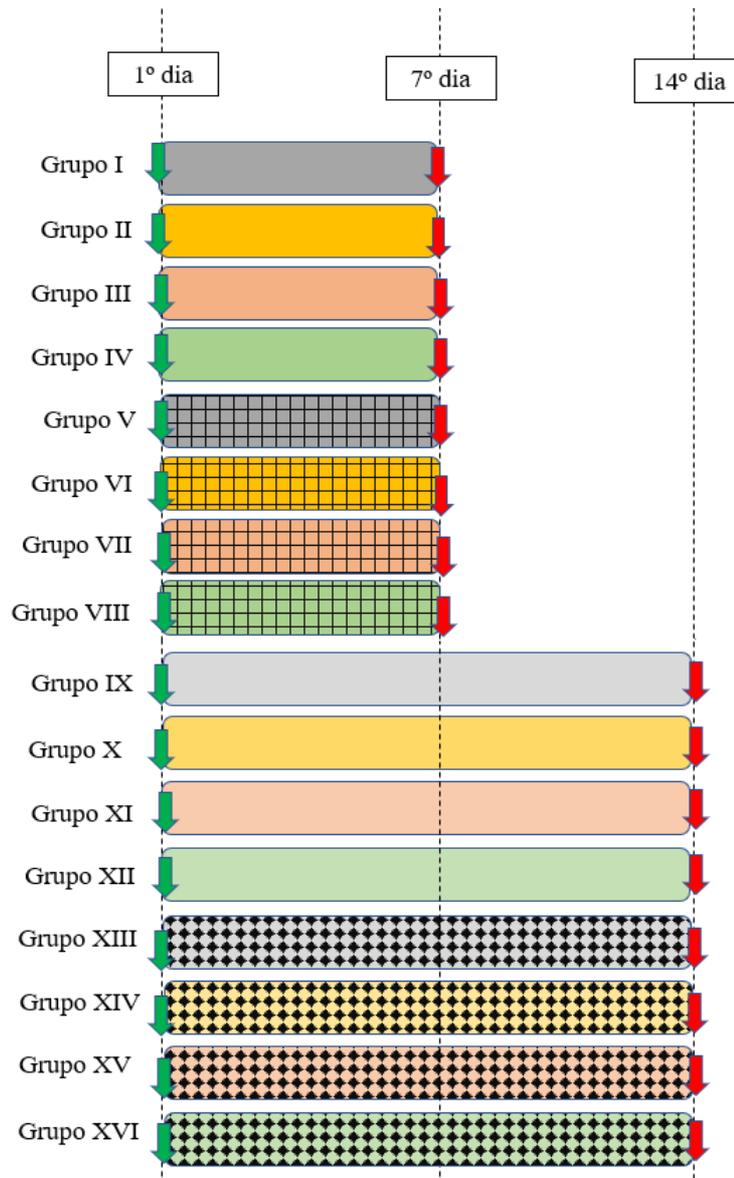
Administrado por gavagem na dose 10 mg/100 g peso de peso/dia (BEZERRA *et al.*, 2017), diluído em água destilada, de forma cautelosa, considerando sua volatilidade por ser

um terpeno (Fornecedor: Laboratório QUINARI localizado na cidade de Ponta Grossa Paraná com a análise química e a análise de pureza realizadas pelo laboratório de química orgânica da Professora Telma Leda (UFC) (Anexo 1).

3.3 Delineamento experimental

As 96 ratas, com peso médio de 100 g, foram distribuídas em 16 grupos contendo 06 animais cada, como demonstrado a seguir (Figura 5). Os grupos controles (I, II, III, IV, IX, X, XI e XII) receberam, após anestesia, assepsia, anti sepsia e tricotomia, o inóculo de 0,2 mL de água destilada estéril no subcutâneo na região do dorso ao nível do encontro da linha média transversal perpendicular com a linha média longitudinal do dorso do animal. Os grupos experimentais (V, VI, VII, VIII e XIII, XIV, XV e XVI), após anestesia intraperitoneal (ketamina e xilazina na dose de 100 mg/kg/peso e 8 mg/kg/peso respectivamente) e tricotomia de dorso, foram submetidos à inoculação de 0,2 mL de solução de sílica 50 mg/mL subcutânea na região do dorso ao nível do encontro da linha média transversal perpendicular com a linha média longitudinal do dorso do animal.

Figura 5 – Desenho experimental.



Legenda:		
	Água destilada (7 dias)	
	Goma Arábica + eugenol (7 dias)	
	Goma Arábica (7 dias)	
	Eugenol (7 dias)	
	Água destilada (14 dias)	
	Goma Arábica + eugenol (14 dias)	
	Goma Arábica (14 dias)	
	Eugenol (14 dias)	
		Início do experimento
		Eutanásia

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O grupo I (n=6) recebeu água destilada (AD) estéril na dose de 5mL/kg, via gavagem, durante 7 dias.

O grupo II (n=6) recebeu goma arábica PA a 500 mg/100 g de peso, diluída em água destilada estéril, na dose de 5 mL/Kg peso e, em seguida, recebeu eugenol, diluído em água destilada estéril, na dose de 10 mg/100g peso, ambos via gavagem, durante 7 dias.

O grupo III (n=6) recebeu goma arábica PA 500 mg/100g de peso, diluída em água destilada estéril, na dose de 5 mL/Kg peso, via gavagem, durante 7 dias.

O grupo IV (n=6), recebeu eugenol, diluído em água destilada estéril, na dose de 10mg/100 g peso, via gavagem, durante 7 dias.

O grupo VI (n=6) recebeu água destilada estéril na dose de 5mL/kg, via gavagem, durante 7 dias.

O grupo VI (n=6) recebeu goma arábica PA a 500 mg/100g de peso, diluída em água destilada estéril, na dose de 5mL/Kg peso e, em seguida, recebeu eugenol, diluído em água destilada estéril, na dose de 10mg/100g peso, ambos via gavagem, durante 7 dias.

O grupo VII (n=6) recebeu goma arábica PA 500 mg/100g de peso, diluída em água destilada estéril, na dose de 5mL/Kg peso, via gavagem, durante 7 dias.

O grupo VIII (n=6) recebeu eugenol, diluído em água destilada estéril, na dose de 10mg/100g peso, via gavagem, durante 7 dias.

O grupo IX (n=6) recebeu água destilada estéril na dose de 5mL/kg, via gavagem, durante 14 dias.

O grupo X (n=6) recebeu goma arábica PA 500 mg/100 g de peso, diluída em água destilada estéril, na dose de 5mL/Kg peso e, em seguida, recebeu eugenol, diluído em água destilada estéril, na dose de 10mg/100g peso, ambos via gavagem, durante 14 dias

O grupo XI (n=6) recebeu goma arábica PA 500 mg/100 g de peso, diluída em água destilada estéril, na dose de 5mL/Kg peso, via gavagem, durante 14 dias.

O grupo XII (n=6) recebeu eugenol, diluída em água destilada estéril, na dose de 10 mg/100 g peso, via gavagem, durante 14 dias.

O grupo XIII (n=6) recebeu água destilada estéril na dose de 5mL/kg, via gavagem, durante 14 dias.

O grupo XIV (n=6) recebeu goma arábica PA 500 mg/100g de peso diluída em água destilada estéril, na dose de 5mL/Kg peso e, posteriormente, eugenol, diluído em água destilada estéril, na dose de 10mg/100g peso, ambos via gavagem, durante 14 dias.

O grupo XV (n=6) recebeu goma arábica PA 500 mg/100 g, diluída em água destilada estéril, na dose de 5 mL/Kg peso, via gavagem, durante 14 dias.

O grupo XVI (n=6) recebeu eugenol diluído em água destilada estéril, na dose de 10mg/100g peso, via gavagem, durante 14 dias.

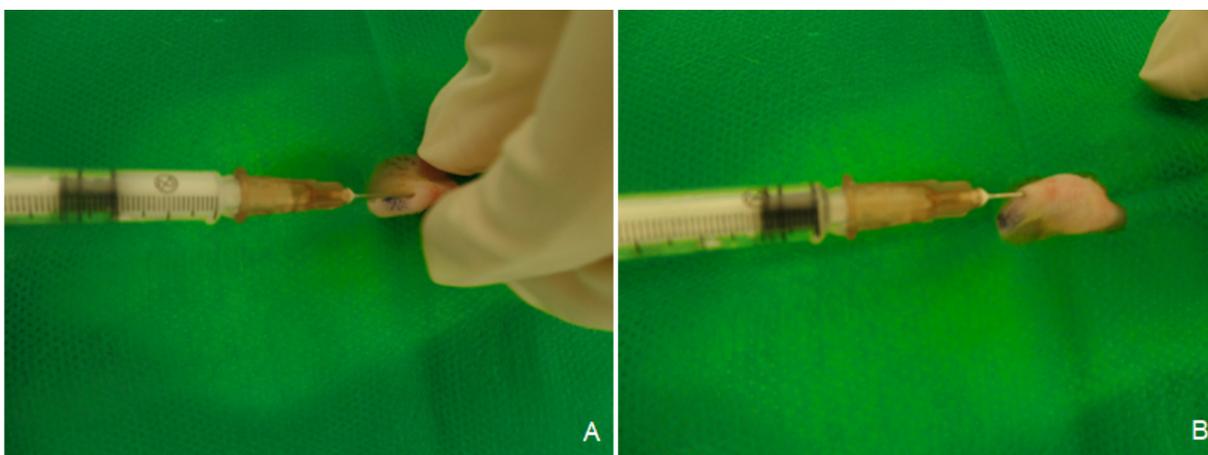
3.4 Inóculo de sílica subcutânea

Partículas de sílica cristalina dióxido de silício (malha 400) (di Luca Distribuidora-Comércio de Minérios) foram suspensas em solução de água destilada na concentração de 50 mg/mL após a esterilização (121,3°C, 103,4 kPa por 90 min).

Os animais foram anestesiados e submetidos a tricotomia do dorso. Após estes procedimentos, o local eleito para a realização do inóculo foi marcado. Posteriormente, realizou-se a assepsia e a antissepsia do local.

Após formada, a suspensão de sílica (50 mg/mL) foi inoculada na dose de 0,2 mL (Figuras 6 A e B) na região do dorso ao nível do encontro da linha média transversal perpendicular com a linha média longitudinal do dorso do animal. Local este previamente marcado no animal.

Figura 6 – A. Inoculação de 0,2 mL de sílica (50 mg/mL) no dorso do animal. B. Pequena bolha formada após o inóculo de sílica



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.5 Eutanásia

Realizada a eutanásia por aprofundamento da dose anestésica após retirada do local do dorso onde foi realizado o implante de sílica.

3.6 Hematoxilina Eosina

Os dorsos dos animais foram fixados em formol tamponado por 48 h e foram clivados e colocados em cassetes (um corte para cada animal) e introduzidos em cestos de processador automático histotécnico, seguindo as seguintes etapas: desidratação com álcool graduados a 70%, 95% (2 vezes), 100% (3 vezes), tempo mínimo de uma hora cada; diafanizados com xilol (3 vezes), mínimo de 2 h cada e impregnação em parafina fundida a 60°C (3 vezes), duas horas cada. Uma vez impregnado, o tecido foi colocado em recipientes contendo parafina fundida. Em temperatura ambiente, a parafina solidificou-se formando blocos com tecido. Os blocos foram fixados em micrótomo rotativo convencional para a realização de cortes na espessura de 5µm. Esses cortes foram colocados em superfície de banho-maria (3 a 8°C) e foram delicadamente distendidos e colocados em lâmina, sendo encaminhados para a estufa a 60°C. Após o período de 1 h, os cortes foram então levados para desparafinar e hidratar na seguinte sequência: xilol 1, 2 e 3 (por 5, 2 e 1 min respectivamente), seguido de álcool a 100%, 95% e 70% (1 min em cada) e por uma última lavagem em água corrente por 2 min. O tecido, uma vez parafinado e hidratado, foi corado pela hematoxilina de carazzi por 1 min, lavado em água e seguido de eosina. A seguir, montou-se a lamínula com uma gota de bálsamo do Canadá sobre o tecido.

3.7 Imuno-histoquímica

As lâminas silanizadas foram desparafinizadas em estufa por uma hora a 65°C, imersas em xilol, hidratadas em solução decrescente de álcool, lavadas em água corrente e submetidas à recuperação antigênica com solução de Tris-EDTA pH 9,0 em banho maria a 85°C por 30 min. Após resfriamento à temperatura ambiente os cortes foram lavados em solução tampão de fosfato 0,1 M pH7,3 (PBS) em dois banhos de cinco minutos cada e realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução 3% de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) diluída em PBS por 30 min (HSU et al., 1981).

Após duas lavagens de cinco minutos em PBS as lâminas foram incubadas em overnight com o seguinte anticorpo: Abcam CD-31 (1:100).

No dia seguinte após resfriamento em temperatura ambiente os cortes foram lavados com dois banhos de cinco minutos de PBS, incubados com polímero anti-coelho/anti-rato Dako Envision Dual Link System HRP (Dako®) por 30 min. Após nova lavagem com dois banhos de cinco minutos de PBS, as lâminas foram incubadas com 3,3-diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos. A reação foi parada com água destilada.

As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris 7% por 10 segundos, lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com Enthellam®

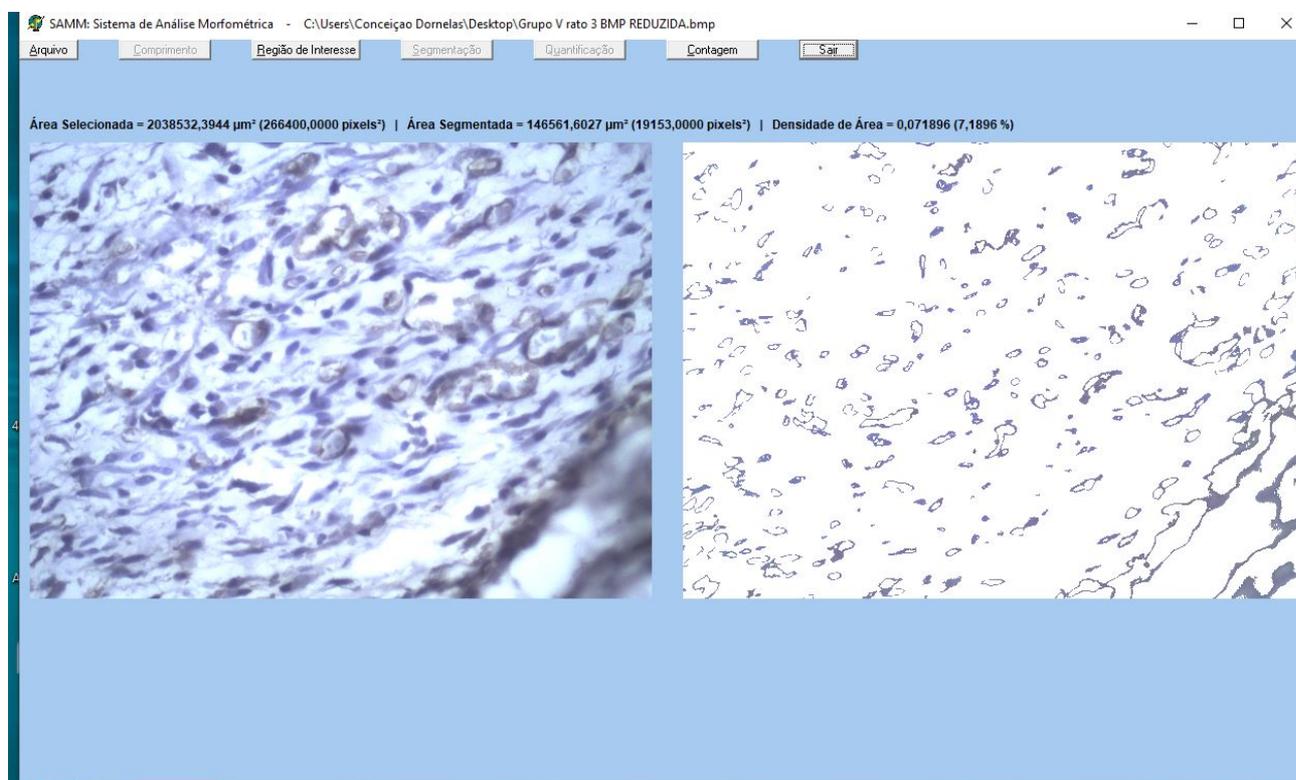
(ANDRADE *et al.*, 2007). Tecido de rim de rato foi usado como controle positivo e como controle negativo foi realizada a supressão do anticorpo primário, com incubação do diluente do anticorpo.

3.8 Quantificação da angiogênese

As imagens capturadas por microscópio estereoscópico foram avaliadas pelo sistema de quantificação da angiogênese (SQAN-versão 1.00-2005), desenvolvido especificamente com a finalidade de quantificar a angiogênese (FECHINE -JAMACARU, 2006).

O programa oferece o reconhecimento e a segmentação automática dos vasos, separando-os dos demais componentes da imagem e, também, uma segmentação manual caso o usuário julgue inadequado o resultado do procedimento automático. Após esse processo, o sistema disponibiliza a densidade de novos vasos formados em relação à área segmentada (Figura 7).

Figura 7. Ambiente do Sistema de Quantificação da Angiogênese –SQAN (FECHINE -JAMACARU, 2006).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

3.9 Avaliação histológica microscópica

Na avaliação microscópica foram identificados: granuloma de corpo estranho, infiltrado linfocitário, macrófago, células gigantes, plasmócitos e proliferação de tecido fibrinóide. Essas variáveis foram classificadas como ausentes ou presentes, sendo colocadas em uma escala 0 / + / ++ de acordo com a intensidade dos achados (LOCKWOOD, 2008). Foram determinados escores (análise qualitativa), que correlacionam-se com a ausência e com a presença desses. As lâminas foram avaliadas com magnificação de 400x em um total de 5 campos.

3.10 Análise estatística

Os dados foram tabulados no software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 20.0 para Windows no qual foram calculadas média e desvio-padrão, submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e associados com tempos e substâncias por meio dos testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis/Dunn (dados não paramétricos).

Além disso, foi considerado o efeito dos dois fatores que influenciam os desfechos (tratamentos e tempo): ANOVA para dois fatores de classificação. Os procedimentos estatísticos foram realizados usando o software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software, SanDiego, California, USA).

4 RESULTADOS

Esse estudo se desenvolveu em três fases.

A primeira fase constituiu-se em desenvolver um modelo animal experimental para estudo da angiogênese inflamatória, por meio de implante subcutâneo de sílica no dorso de ratas Wistar durante um período de sete dias (grupo de inflamação aguda) e quatorze dias (grupo de inflamação crônica).

A segunda fase da pesquisa destinou-se a coloração pela imuno-histoquímica com quantificação da densidade microvascular realizada por um software elaborado especialmente para esse fim.

A terceira fase da pesquisa destinou-se a avaliação dos processos histopatológicos da inflamação, por meio de cortes histológicos do dorso dos animais, corados em hematoxilina eosina, analisados de forma qualitativa.

4.1 Modelo experimental, evolução clínica e mortalidade

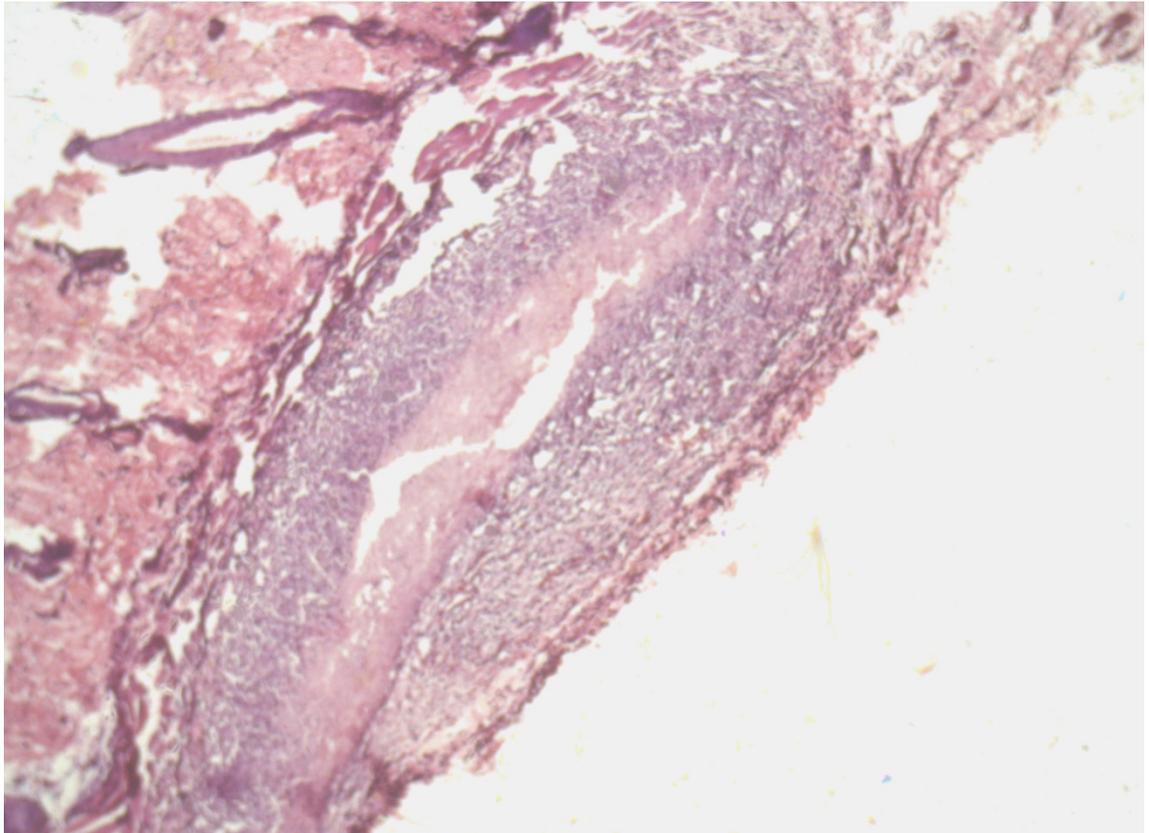
O modelo experimental foi criado com sucesso. Pode-se observar a formação de nódulos subcutâneos e palpáveis no final do experimento.

Apenas dois animais apresentaram rebaixamento profundo do sensório e evoluíram ao óbito após indução anestésica (grupo V e grupo XIII). Os demais animais do experimento seguiram durante os 14 dias sem intercorrências.

4.2 Análise da resposta inflamatória por meio da hematoxilina-eosina

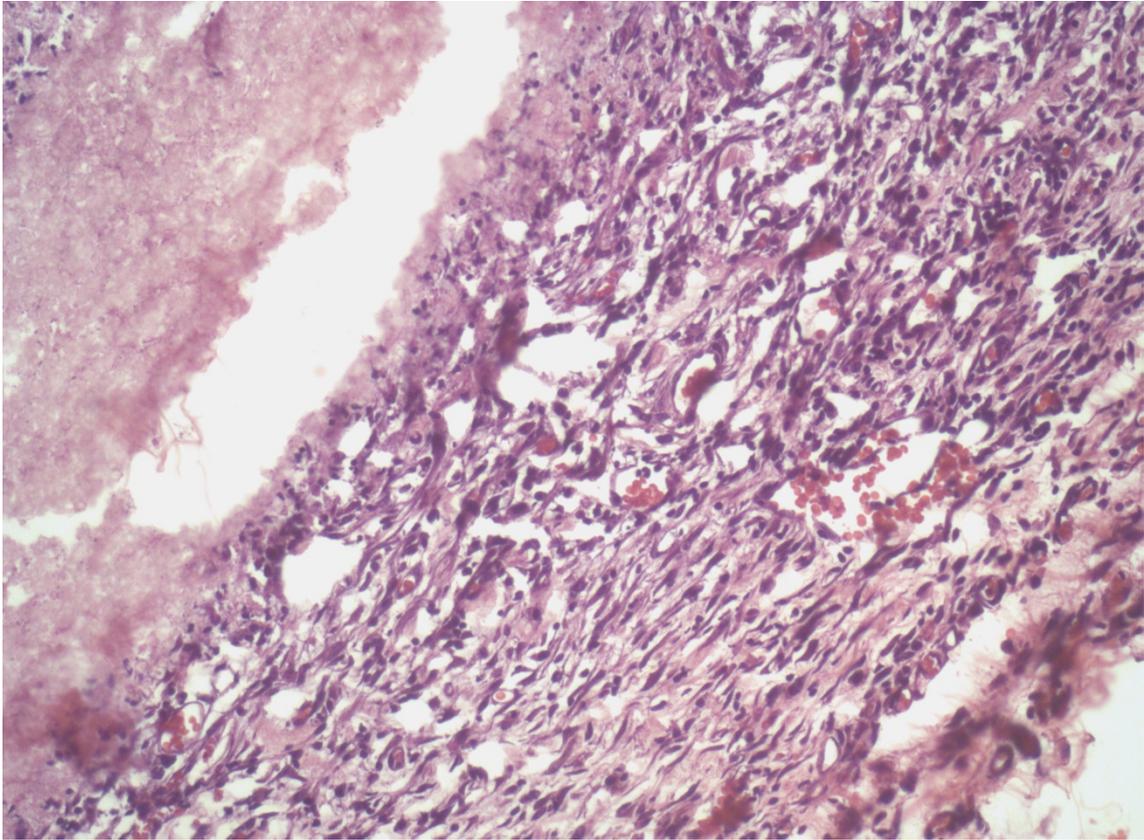
Em todos os grupos as quatro variáveis foram encontradas (figuras 8, 9 e 10). Mesmo com quantidades de dias de tratamento diferentes, não houve diferença entre os achados histológicos entre os grupos. Em todos os grupos, apenas o infiltrado linfocitário apresentou-se como presença acentuada. Um infiltrado inflamatório foi considerado quando se detectaram 50 leucócitos ou mais em cada área (MICHAILOWSKY et al., 2001). Todas as demais características, apresentaram-se com presença leve, independentemente do tipo de tratamento (apêndice 2).

Figura 8. Corte histológico de pele e subcutâneo de rata corado pela hematoxilina-eosina, evidenciando, em subcutâneos, partículas de sílica envolvidas por numerosos vasos e por infiltrado inflamatório constituído por linfócitos. Em região central do granuloma, observa-se material fibrinóide. (Aumento 100x)



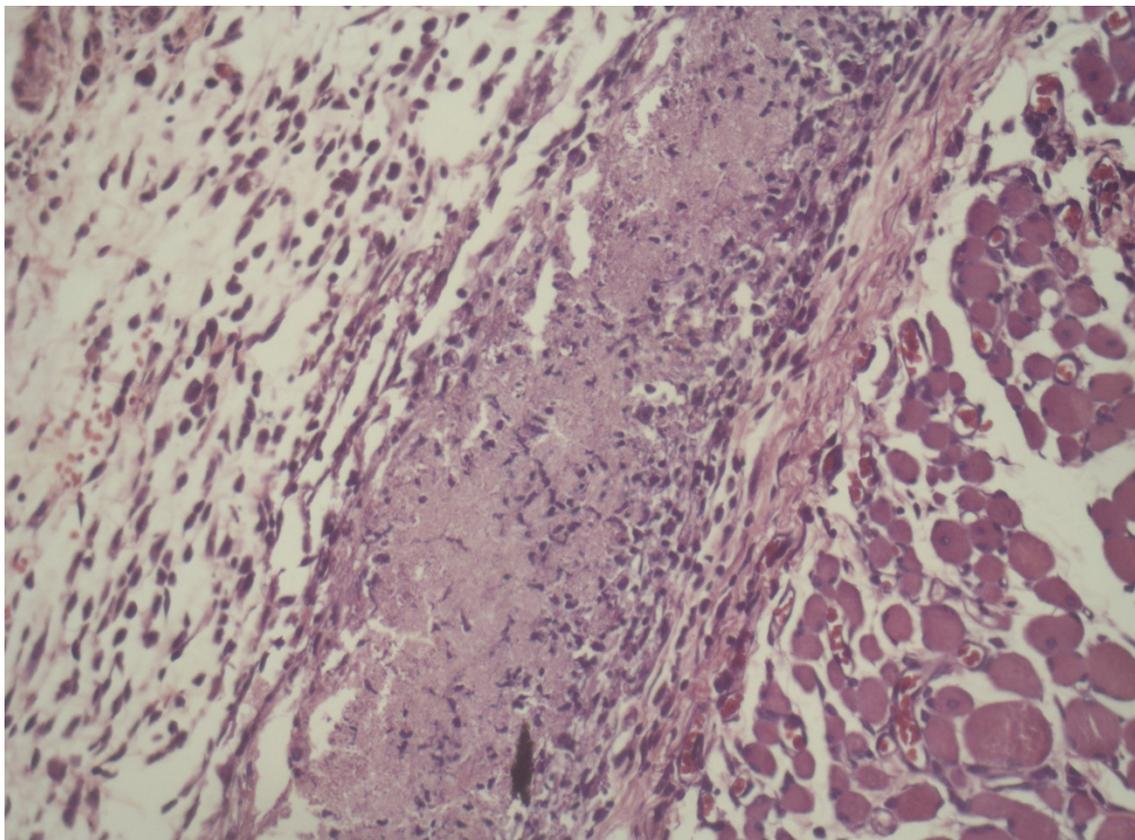
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Figura 9. Corte histológico de pele e subcutâneo de rata corado pela hematoxilina-eosina, evidenciando, em subcutâneo, partículas de sílica envolvidas por numerosos vasos e por infiltrado inflamatório constituído por linfócitos. (Aumento 200x).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Figura 10. Corte histológico de pele e de subcutâneo de rata corado pela hematoxilina-eosina, evidenciando, em subcutâneo, partículas de sílica envolvidas por vasos e por infiltrado inflamatório constituído por linfócitos. Em meio a este granuloma, observa-se material eosinofílico fibrinóide. (Aumento 400x).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

4.3 Análise da densidade microvascular pela imuno-histoquímica

Os grupos que receberam goma arábica apresentaram diminuição da densidade vascular tanto os tratados por 7 dias quanto os tratados por 14 dias, porém não ocorreu de forma estatisticamente significante. (Tabela 1)

Nos animais que receberam apenas eugenol por 7 dias, ocorreu uma redução da densidade vascular (inibição da angiogênese), entretanto, estatisticamente não significante. Nos grupos tratados por 14 dias, a densidade microvascular aumentou (estímulo à angiogênese) de forma estatisticamente significante.

Nos grupos tratados por 7 dias com goma arábica + eugenol (GA + E), houve um aumento da densidade microvascular (estímulo à angiogênese); nos grupos tratados por 14 dias, houve uma diminuição da densidade microvascular (inibição da angiogênese). Ambos de forma estatisticamente não significante.

Tabela 1 – Quantificação da angiogênese por meio da densidade vascular

	Substância				p-Valor ^a
	Água destilada	Goma arábica + Eugenol	Goma arábica	Eugenol	
Tempo					
7d	0.11±0.04	0.13±0.04	0.09±0.02	0.08±0.03	0,271
14d	0.10±0.01	0.09±0.03	0.08±0.03	0.14±0.02*	0,015
p-Valor^b	0,486	0,190	0,413	0,004	

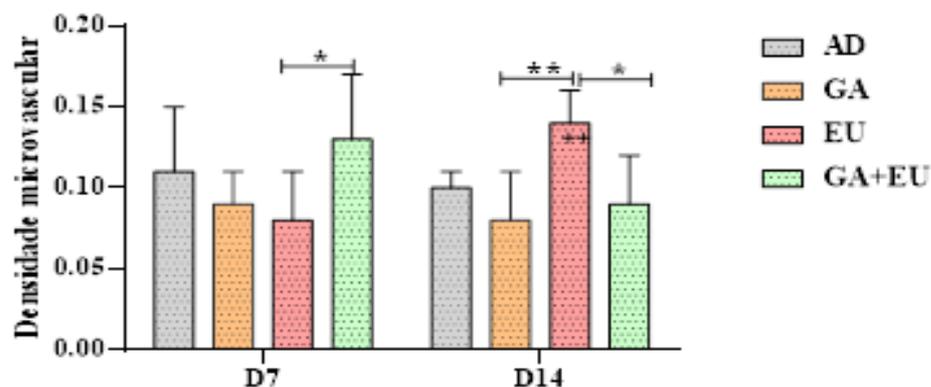
*p<0,05 versus demais grupos; aTeste Kruskal-Wallis/Dunn; bTeste Mann-Whitney; média ± DP

A análise de variância para dois fatores de classificação também foi usada para avaliar os efeitos dos tratamentos (fator 1: AD, GA, EU e GA+EU) e do tempo (fator 2: dia 7 e dia 14) na densidade microvascular, sendo complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, para verificar diferenças entre os grupos de tratamento em cada tempo, bem como entre os dois tempos dentro de cada grupo. Os dados correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas em 6 animais de cada grupo.

Considerando a análise de dois fatores, os animais que receberam apenas eugenol por 7 dias apresentaram uma redução da densidade microvascular. Se esta densidade for comparada com a densidade microvascular final do grupo tratado com eugenol + goma arábica por 7 dias, esta redução ocorreu de forma estatisticamente significativa (Figura 10).

Os animais tratados por 14 dias apenas com eugenol tiveram um aumento da densidade microvascular (estímulo a angiogênese), e este aumento ocorreu com significância estatística com relação ao grupo tratado por 7 dias. Se comparados aos animais tratados com eugenol, os animais tratados apenas com GA e os tratados com GA + E por 14 dias apresentara uma redução da densidade microvascular de forma estatisticamente significativa. Porém essa significância estatística não ocorreu se compararmos a densidade microvascular dos animais tratados por 7 dias com GA +E e os tratados por 7 dias apenas com GA, com os densidade microvascular dos animais tratados por 14 dias com estas respectivas substâncias (Figura 10).

Figura 10. Densidade microvascular mensurada nos grupos tratados água destilada (AD), goma arábica (GA), eugenol (EU) e a associação das duas substâncias (GA+EU) nos dias 7 (D7) e 14 (D14).



Os símbolos *($P < 0,05$), **($P < 0,01$) denotam diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos assinalados no mesmo dia, enquanto o símbolo ++($P < 0,01$) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao dia 7 no mesmo grupo (teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

5 DISCUSSÃO

Nosso estudo desenvolveu um modelo para estudo da angiogênese. Foi realizado um inóculo de sílica no subcutâneo de ratas Wistar, para testar os efeitos do eugenol, da goma arábica e da água destilada na reação inflamatória. Esse efeito foi quantificado pela análise de célula inflamatórias em cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina e pela densidade microvascular através de imagens de tecidos cujos vasos foram corados pela imunohistoquímica pelo CD 31.

O estudo da angiogênese inflamatória induzida por um inóculo de sílica no subcutâneo de ratas é um modelo novo e reprodutível para avaliação da angiogênese e da inflamação. A abordagem experimental utilizada no presente trabalho criou um modelo simulando uma condição clínica de reação inflamatória granulomatosa decorrente da presença de um corpo estranho (sílica).

Como já mencionado, a persistência do agente nocivo que induziu a inflamação leva à regulação positiva da resposta inflamatória. Uma melhor compreensão das vias moleculares e celulares que ligam a angiogênese e a inflamação seria útil no desenvolvimento do tratamento de condições em que ambos os processos estão envolvidos, já que a cronificação desses processos podem acarretar prejuízos.

A justificativa para a construção e para o estudo de um modelo de granuloma induzido por sílica foi baseada em estudos epidemiológicos que relacionam a incidência de granulomas relacionados com exposições ocupacionais a partículas inorgânicas (NEWMAN, 2004 e ONESTI, 2014)

A onipresença da sílica (dióxido de silício), devido à sua presença em, dentre outros, areia comum, vidro, granito, mica, cascalho, cimento, tijolo e amianto, torna-a muito comum contaminante a feridas (KAYA, 2003). Relatos de granuloma de sílica já foram descritos na biópsia feita do cotovelo, confirmado por luz polarizada e microanálise de raios-X, de paciente vítima de acidente de trânsito (PIMENTEL, 2002), na área da cicatriz de paciente vítima de trauma craniano devido a um acidente de carro (ocorrido 30 anos antes) sendo a lesão causada pela quebra do para-brisa (ONESTI, 2014) e em crianças com lesões placóides assintomáticas no rosto (KAYA, 2003).

Recentemente, foram descritos casos de granuloma subcutâneo de sílica no antebraço (semelhante aos descritos na sarcoidose), possivelmente, induzido pelo contato com diatomáceas (MORALES-NEIRA, 2021). As diatomáceas são algas fotossintéticas com um exoesqueleto silicioso que são utilizadas por uma ampla gama de indústrias para aplicações como filtração e controle de pragas. Existem dados sobre granulomas iniciados pela sílica o que pode alertar os médicos sobre a existência de granulomas de diatomáceas e orientá-los a investigar questões sobre a possível exposição ao avaliar os pacientes que apresentam este tipo de lesão (BRODY et. al, 2021). Além disso, corroboram para investigação de substâncias que possam amenizar o processo inflamatório gerado por esses granulomas.

Outros modelos, objetivando criar um granuloma de sílica, já foram testados como um modelo de uma doença granulomatosa induzida por nanotubo de carbono inalado para simular semelhanças com a fisiopatologia da sarcoidose (BARNA, 2021). Nesse modelo, nanotubos de carbono de múltiplas paredes são administrados via instilação orofaríngea em camundongos do tipo selvagem (C57 / Bl6). A dosagem inicial variou de 25 a 100 µg com 100 µg, proporcionando formação consistente de granuloma, mantida até 90 dias após a instilação (BARNA, 2021). Um modelo com eficácia clínica, mas de difícil execução.

O inóculo de sílica subcutâneo é um modelo com poucos custos e totalmente reprodutível. A rapidez da execução do procedimento diminui as chances de complicações como infecções no sítio cirúrgico. Além disso, a facilidade do procedimento garante uma uniformidade da execução do mesmo.

A utilização da goma arábica (NASIR, 2010) e do eugenol (CARRERAS, 2012) neste estudo foi motivada pelos relatos das propriedades antiinflamatórias já conhecidas de ambos. A utilização da goma arábica na dose de 500 mg/100g de peso diluída em água destilada 5 mL/kg de peso, aquecida a 60°C e centrifugada, administrada uma vez ao dia por gavagem foi relatada por NASIF et al., (2011); já o eugenol, semelhante ao estudo de (BEZERRA et al., 2017), foi administrado uma vez ao dia, por gavagem, na dose 10 mg/100 g peso/dia, diluído em água destilada, de forma cautelosa, considerando sua volatilidade por ser um óleo essencial

Sobre a quantificação da angiogênese, observada através de fotografias (pelo SQAN), analisando a densidade microvascular da área do granuloma, a goma arábica inibiu a angiogênese, comparada com os controles, mas não apresentou diferença estatisticamente significante. Nossos dados foram ao encontro aos relatados na literatura, apesar de não ter sido de forma tão eficiente, incluindo Nasir (2010) que encontrou inibição dos níveis de fatores de transcrição angiogênicos (angiogenina 1, angiogenina 3 e angiogenina 4) dentro de 4 dias com o uso da goma arábica o que poderia favorecer a diminuição da proliferação vascular (angiogênese).

Em relação ao eugenol, encontramos, através de fotografias (pelo SQAN), redução da densidade microvascular na área do granuloma nos grupos tratados durante 7 dias (inibição da angiogênese), porém sem significância estatística. Entretanto, nos grupos tratados por 14 dias, houve aumento da densidade vascular (estímulo à angiogênese) de forma estatisticamente significante. Estes achados, a princípio, parecem conflitantes, entretanto na esteira da literatura, Carreras, em 2012, relatou que o eugenol e seus compostos podem atuar como eliminadores (substância antioxidante) ou geradores (substância pró-oxidante) de radicais livres (estresse oxidativo), podendo influenciar na viabilidade celular e na atividade anti-inflamatória em vários graus. Além disso, é importante lembrar que a patogênese de muitas doenças graves (por exemplo, câncer, doença cardíaca isquêmica) inclui estresse oxidativo o qual pode perturbar a angiogênese, ou seja, o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes. Os antioxidantes, por meio da redução do estresse oxidativo e por meio da influência na neovascularização, podem modular o progresso e os resultados da terapia de doenças nas quais tais processos desempenham um papel importante (RADOMSKA-LEŚNIEWSKA 2017). Desta forma, o presente estudo demonstra que o eugenol com sua atividade aparentemente antagônica com relação a eliminação a produção de radicais livres pode ter sido determinante para a inibição e para o estímulo da angiogênese

neste contexto, considerando sua capacidade antioxidante e pró-oxidante em relação ao tempo de administração.

A maioria dos antioxidantes sintéticos exerce um efeito inibitório na neovascularização. Um efeito semelhante também foi exibido por vários antioxidantes de origem natural o que sugere que sua aplicação na terapia pode normalizar a angiogênese excessiva. (RADOMSKA-LEŚNIEWSKA, 2017)

Nossos resultados corroboram com esses achados uma vez que, se compararmos os animais que receberam eugenol por 7 dias com o seu respectivo controle, notamos uma inibição da densidade microvascular (efeito antiinflamatório/anti-angiogênico), apesar de estatisticamente não significante. De forma diversa, nos granulomas de animais que receberam eugenol por 14 dias observou-se um estímulo da densidade microvascular (estímulo inflamatório/angiogênico). Estes resultados embora antagônicos, como exposto anteriormente, já foram descritos (o eugenol e seus compostos podem atuar como eliminadores (substância antioxidante) ou geradores (substância pro oxidante) de radicais livres (estresse oxidativo), possivelmente, perdeu-se o ponto de corte do dia ideal da inibição da angiogênese. Entretanto, o tempo de estímulo angiogênico encontra-se, certamente, dentro dos 14 dias como demonstrado estaticamente.

A ingestão oral de eugenol, por ratas Wistar, em diferentes doses durante um período de 15 dias pode causar algumas alterações na química do sangue (LI, 1980). Além disso, causa um aumento nos níveis de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e bilirrubina total, mas parece que tais efeitos não são dependentes da dose (MOHAMMADI, 2017). Assim, existe um limite não apenas de dose, mas de tempo para a obtenção de efeito terapêutico ou tóxico de qualquer fármaco.

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o metabolismo é um processo normal, geralmente compensado pelo sistema de defesa antioxidante de um organismo. No entanto, as EROs podem causar dano oxidativo e tem sido proposto como sendo a principal causa de complicações clínicas relacionadas à idade e a doenças como câncer (BEZERRA et al., 2017).

O eugenol possui atividades benéficas para as células, entretanto, pode apresentar toxicidade dependendo do tipo de célula ao qual está exposto e da concentração utilizada. Assim, a toxicidade do eugenol foi observada em fibroblastos de polpa dentária humana, com danos no DNA. Eugenol também foi capaz de induzir genotoxicidade de macrófagos peritoneais de camundongos. No entanto, tem demonstrado potencial antígeno tóxico dependendo do protocolo de tratamento, que pode estar interligado com seu efeito no

metabolismo da droga. Portanto, o eugenol pode modular processos inflamatórios e oxidantes. Porém, seu uso deve ser feito de acordo com a segurança terapêutica evidenciada na toxicidade (BARBOSA et al., 2018).

Apesar de os efeitos tóxico terem sido estudado in vivo, pouca ou nenhuma informação está disponível em humanos. O efeito pró-oxidante do eugenol leva à sua toxicidade atribuída à inativação de proteínas devido à ligação do eugenol nos resíduos de lisina. A sua citotoxicidade provavelmente se deve às suas reações metabólicas ativas que reagem com o DNA, formando adutos que podem destruir o material genético nuclear. Entretanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o eugenol como uma molécula não mutante e geralmente reconhecida como segura (NISAR et al., 2021)

Embora haja um grande número de artigos sobre as propriedades citotóxicas do eugenol, resultados controversos dificultam a interpretação sobre a eficácia e sobre a segurança, bem como a elaboração de ensaios clínicos. Contudo, a capacidade do eugenol de induzir estresse oxidativo (inflamação), conforme observado, parece estar relacionada ao seu efeito citotóxico e antitumoral. (BEZERRA, 2017). O macrófago produz citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico, que são importantes para eventos celulares e vasculares durante a instalação e progressão de doenças inflamatórias. Estudos demonstraram que o eugenol pode modular as funções dos macrófagos e regular negativamente a inflamação (BARBOZA, et al., 2018).

Da mesma forma, considerando as neoplasias, essa capacidade de inibir o estresse oxidativo tem sido descrita como um efeito protetor contra a formação de câncer (carcinogênese); por outro lado, uma vez que o câncer já se formou, o efeito antioxidante pode contribuir para a involução do câncer, enquanto o efeito pró-oxidante pode induzir a morte das células cancerígenas (GORRINI, 2013). Curiosamente, o eugenol tem sido descrito como um agente de duplo efeito, antioxidante e pró-oxidante, apresentando efeitos benéficos na prevenção e no tratamento do câncer. Isso acontece porque alguns marcadores de inflamação, incluindo a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) e os níveis de IL 6, TNF- α e prostaglandina E2 (PGE2), foram reduzidos em animais expostos a carcinógenos após o tratamento com eugenol. Além disso, descobriu-se que o eugenol suprime a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) na pele de camundongo com inflamação induzida por carcinógenos (CARRERAS, 2012).

Em macrófagos, citocinas e lipopolissacarídeos induzem a níttrico sintase (iNOS) e a COX-2. Ambas iNOS e COX-2 são responsáveis pela produção de grandes mediadores pró-inflamatórios, como óxido nítrico e prostaglandinas no local inflamatório. O eugenol mostrou

efeito antiinflamatório semelhante aos efeitos do antagonista COX (indometacina) e do antagonista seletivo de COX-2 (celecoxib) (DANIEL et al., 2009).

Além disso, Fonseca et al. realizaram a administração de orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg), morfina (6 mg/kg) e dexametasona (2 mg/kg) antes da realização de testes farmacológicos. O pré-tratamento com orto-eugenol reduziu o número de contorções e tempos de lambidas no teste de contorções e no teste do glutamato, respectivamente. O tempo de reação ao estímulo térmico aumentou significativamente no teste da placa quente após a administração do orto-eugenol. O tratamento com ioimbina reverteu o efeito antinociceptivo do orto-eugenol, sugerindo envolvimento do sistema adrenérgico. Em testes antiinflamatórios, o orto-eugenol inibiu a permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético e a migração de leucócitos, reduzindo TNF- α e IL-1 β em virtude de sua supressão das formas fosforiladas de NF- κ B e p38 no teste de peritonite. A partir desses resultados, os efeitos antinociceptivos do orto-eugenol mediados pelo sistema adrenérgico e da atividade antiinflamatória por meio da regulação de citocinas pró-inflamatórias e fosforilação de NF- κ B e p38 tornam-se evidentes (FONSECA et al., 2016).

Outros autores também realizaram o teste da placa quente, e a administração do eugenol (100 mg/kg) mostrou atividade significativa de desconforto-tempo dependente, avaliada como a latência da resposta, inibida pela meperidina. Eugenol, nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg, também apresentou efeito antinociceptivo significativo no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em comparação com o grupo controle, indicando que o eugenol apresenta atividade antiinflamatória e antinociceptiva periférica (DANIEL, et al., 2009).

Problemas relacionados ao grau de pureza do composto, sua evaporação durante os experimentos, os métodos usados para quantificar esses dados (uma vez que diferentes modelos e animais podem apresentar resultados e interpretações divergentes) podem contribuir para explicar esses resultados controversos. O eugenol utilizado neste trabalho foi submetido ao controle de qualidade/avaliação de pureza, não sendo esta uma limitação neste estudo (anexo A).

Não existe relatos na literatura da associação de goma arábica com eugenol. Realizamos essa associação, mas, nos grupos tratados por 7 dias com goma arábica e eugenol, houve um aumento da densidade microvascular; nos grupos tratados por 14 dias, houve uma diminuição da densidade microvascular. Ambos sem significância estatística

6 CONCLUSÃO

O modelo experimental de inóculo de sílica no subcutâneo de ratas Wistar foi criado com sucesso e constitui um modelo válido para o estudo de angiogênese inflamatória.

O eugenol inibiu a angiogênese nos grupos tratados durante 7 dias embora estatisticamente não significativa e estimulou a angiogênese nos grupos tratados durante 14 dias.

A goma arábica não inibiu a angiogênese.

Independente da substância ou do tempo de tratamento, não foram observadas diferenças de infiltrados inflamatórios no inóculo de sílica.

REFERÊNCIAS

AGUILAR-CAZARES, Dolores, *et al.* Contribution of angiogenesis to inflammation and cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1399, dez. 2019.

ANDRADE, V. P. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 1, p. 55-60, fev. 2007.

ASAI, J. What is new in the histogenesis of granulomatous skin diseases?. **The Journal of Dermatology**, v. 44 n. 3: p. 297-303, mar. 2017.

AVELINO, A. L. N., *et al.* Antioxidant and Antigenotoxic Actions of Gum Arabic on the Intestinal Mucosa, Liver and Bone Marrow of Swiss Mice Submitted to Colorectal Carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, v. 4, p. 1-9, jun. 2021.

BACH, E., *et al.* Direct effects of TNF- α on local fuel metabolism and cytokine levels in the placebo-controlled, bilaterally infused human leg: increased insulin sensitivity, increased net protein breakdown, and increased IL-6 release. **Diabetes**, v. 62, n. 12, p. 4023-4029, jul. 2013.

BARBOZA J. N. *et al.* An Overview on the Anti-inflammatory Potential and Antioxidant Profile of Eugenol. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 22, out. 2018.

BARNA B. P.; Malur A.; Thomassen M. J. Studies in a Murine Granuloma Model of Instilled Carbon Nanotubes: Relevance to Sarcoidosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3705, abr. 2021.

BAYIR, H.; KAGAN, V. E. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis—there is nothing more practical than a good theory. **Critical Care**, v. 12, n. 1, p. 1-11, fev. 2008.

BELKAID, Y., *et al.* A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 2, p. 969-977, jul. 2000.

BEZERRA, D. P., *et al.* The Dual Antioxidant/Prooxidant Effect of Eugenol and Its Action in Cancer Development and Treatment. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1367, dez, 2017.

BLANCO, R.; GERHARDT, H. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 3, e006569, jan. 2013. DOI: 10.1101/cshperspect.a006569. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3530037/>. Acesso em: 23 mai. 2021.

BRODY, G., *et al.* A case of oral foreign-body granuloma due to diatoms. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 48, n. 3, p. 429-433, fev. 2021.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 932-936, dez. 2005.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature Medicine**, v. 6, n.4, p. 389-395, abr. 2000.

CARRERAS, A, *et al.* Punicalagin and catechins contain polyphenolic substructures that influence cell viability and can be monitored by radical chemosensors sensitive to electron transfer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n.7, p. 1659-1665, fev. 2012.

CASTRANOVA, V., “Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: Role of reactive oxygen/nitrogen species”, **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37 n. 7, p. 916-925, out. 2004.

CONWAY, E. M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovascular Research**, v. 49, n. 3, p. 507-521, fev. 2001.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; DE SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 2: p. 90-96, fev. 2014.

DALDON, P. E. C.; ARRUDA, L. H. F. Granulomas não-infecciosos: sarcoidose. **An. Bras. Dermatol.**, v. 82, n. 6, p. 559-571, dez. 2007.

DANIEL, A. N., *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities A of eugenol essential oil in experimental animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 212-217, fev. 2009.

DVORAK, A. M., *et al.* The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 1, p. 100-115, jan. 1996.

EICHHORN, M. E., *et al.* Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 392, n. 3, p. 371-379, mai. 2007.

ELTZSCHIG, H. K.; CARMELIET, P. Hypoxia and inflammation. **New England Journal of Medicine**, v.364, n. 7, p. 656-665, fev. 2011.

FECHINE JAMACARU, F V. In vivo quantification of corneal angiogenesis using digital image processing [tese]. Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceará: Fortaleza; 2006. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/7700>

FERRARA, N.; GERBER, H.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 669-676, jun. 2003.

FERNANDEZ-FLORES, A.; MONTERO, M. G. Does cutaneous silica granuloma develop mainly in predisposed patients?. **European Journal of Dermatology**, v. 16, n. 3, p. 321-322, mai-jun. 2006.

FONSECA D. V. *et al.* Ortho-eugenol exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory activities. **Int Immunopharmacol.**, v. 38, p. 402-8, set. 2016.

FRAISL, P., *et al.* Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. **Developmental Cell**, v. 16, n. 2, p. 167-179, fev. 2009.

GANDO, S. Microvascular thrombosis and multiple organ dysfunction syndrome. **Critical Care Medicine**, v. 38, p. 35-42, fev. 2010.

GERHARDT, H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. In: VEGF in Development. Springer, p. 68-78, out. 2008.

GERMOLEC, D. R., *et al.* Markers of Inflammation. **Methods Mol Biol.**, n. 1803, p. 57-79, 2018.

GHOSH, R., *et al.* Combination of 2-methoxyestradiol (2-ME2) and eugenol for apoptosis induction synergistically in androgen independent prostate cancer cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 113, n. 1-2, p. 25-35, jan. 2009.

GHOSH, R., *et al.* Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 7, p. 5812-5819, fev. 2005.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 12, p. 931–947, dez. 2013.

GRIFFITHS, H. R.; GAO, D.; PARARASA, C. Redox regulation in metabolic programming and inflammation. **Redox biology**, v. 12, p. 50-57, e. 28212523, fev. 2017. DOI: 10.1016/j.redox.2017.01.023.

GRUNEWALD, M., *et al.* VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. **Cell**, v. 124, n. 1, p. 175-189, ago. 2006.

HSU, S.; RAINE, L.; FANGER, H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotinperoxidase complex in immunoperoxidase technics. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 75, n. 6, p. 816-821, jun. 1981.

- INOUE, K., *et al.* Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 5: p. 2104-2119, mai. 2000.
- JAKOBSSON, L., *et al.* Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 10, p. 943-953, set. 2010.
- JOHNSON, L. V., *et al.* Activation and inflammatory processes in Drusen formation and age-related macular degeneration. **Exp Eye Res.**, v. 73, n. 6, p. 887- 96, dez. 2001.
- KAYA, T. I., *et al.*, Cutaneous silica granuloma in a child. **Pediatric dermatology**, v. 20, n. 1, p. 40-43, jan-fev. 2003.
- KOH, T. *et. al.* Changes of metabolic profiles in an oral squamous cell carcinoma cell line induced by eugenol. **In vivo**, v. 27, n. 2, p. 233-243, mar-abr. 2013.
- KOH, T., *e.t al.* Re-evaluation of anti-inflammatory potential of eugenol in IL-1 β stimulated gingival fibroblast and pulp cells. **In vivo**, v. 27, n. 2, p. 269-273, mar-abr. 2013.
- LINDNER, D. J. Interferons as antiangiogenic agents. **Current oncology reports**, v. 4, n. 6, p. 510-514, nov. 2002.
- LI, J., *et. al.* A 15- day oral dose toxicity study of aspirin eugenol ester in Wistar rats. **Food Chem Toxicol.** v. 50, p. 1980-1985, 1980.
- LOCKWOOD, D. N. J., *et. al.* The histological diagnosis of leprosy type 1 reactions: identification of key variables and an analysis of the process of histological diagnosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 5, p. 595-600, mai. 2008.
- MARQUES, M.R.; XAVIER-FILHO, J. Enzymatic and inhibitory activities of cashew tree gum exudate. **Phytochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1431-33, 1991.

MANIKANDAN, P., *et al.* Eugenol inhibits cell proliferation via NF- κ B suppression in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. **Investigational New Drugs**, v. 29, n. 1: p. 110-117, fev. 2011.

MANIKANDAN, P., *et al.* Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. **Life Sci.** v. 19, n. 86, p. 936-41, jun. 2010.

MARIK, P. E.; BELLOMO, R.; DEMLA, V. Lactate clearance as a target of therapy in sepsis: a flawed paradigm. **OA Critical Care**, v. 1. n. 1, p. 3, mar. 2013.

MAURER, M., *et al.* Skin mast cells control T cell-dependent host defense in Leishmania major infections. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 14, p. 2460-2467, dez. 2006.

MAUVAIS-JARVIS, F.; ARNOLD, A. P.; REUE, K. A guide for the design of pre-clinical studies on sex differences in metabolism. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 6, p. 1216-1230, jun. 2017.

MCKEE, P. H.; CALONJE, E.; GRANTER, S. R. Pathology of the skin with clinical correlations. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005.

MEDZHITOV R. Origin and physiological roles of inflammation. New Haven, **Nature**. v. 24, n. 454, p. 428-35, jul. 2008.

MELO, N. O. R., *et al.* Effect of red propolis on hamster cheek pouch angiogenesis in a new sponge implant model. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 420-430, mai. 2018.

MICHAILOWSKY, V., *et al.* Pivotal role of interleukin-12 and interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during Trypanosoma cruzi infection. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 5: p. 1723-1733, nov. 2001.

MITTAL, M., *et al.* Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126-1167, mar. 2014.

MOHAMMADI, N. S.; ÖZGÜNEŞ, H.; BAŞARAN, N. Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. **Turk J Pharm Sci.**, v. 14 n. 2, p. 201-206, ago. 2017.

MONGIAT, M., *et al.* Extracellular matrix, a hard player in angiogenesis. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 11, p. 1822, nov. 2016.

MOWRY, R. G.; SAMS, W. M; CAULFIELD, J. B; Cutaneous sílica granuloma. *Arch Dermatol*, n. 127, p. 692–694, mai. 1991.

NASIF, W. A.; LOTFY M.; MAHMOUD, M. R. Protective effect of gum acacia against the aspirin induced intestinal and pancreatic alterations. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**, v. 15, n. 3, p. 285-92, mar. 2011.

NASIR, O., *et al.* Downregulation of angiogenin transcript levels and inhibition of colonic carcinoma by Gum Arabic (Acacia senegal). **Nutrition and cancer**, v. 62, n. 6, p. 802-810, 2010.

NEWMAN, L. S., *et al.* A case control etiologic study of sarcoidosis: environmental and occupational risk factors. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 170, n. 12, p. 1324-30, dez. 2004.

NISAR M.F., *et al.* Pharmacological Properties and Health Benefits of Eugenol: A Comprehensive Review **Oxid Med Cell Longev.** Aug 3;2021.

ONESTI, M. G., *et al.* A clinical case of cutaneous silica granuloma. **G Ital Dermatol Venereol.**, v. 149, n. 3, p. 376-8, jun. 2014.

OUTTZ, H. H., *et al.* Notch1 controls macrophage recruitment and Notch signaling is activated at sites of endothelial cell anastomosis during retinal angiogenesis in mice. **Blood**, v. 118, n. 12, p. 3436-3439, set. 2011.

PARDUE, M., *et al.* Exploring the biological contributions to human health: does sex matter?. Washington (DC): National Academies Press (US). 2001.

PIMENTEL, L., *et al.* Simultaneous presentation of silicone and silica granuloma. **Dermatology**, v. 205, n. 2, p. 162-165, 2002.

PISANO, M., *et al.* Antiproliferative and pro-apoptotic activity of eugenol-related biphenyls on malignant melanoma cells. **Molecular cancer**, v. 6, n. 1, p. 1-12, jan. 2007.

PRAKASH, P. A. G. N.; GUPTA, N. Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. **Indian journal of physiology and pharmacology**, v. 49, n. 2, p. 125, abr. 2005.

RADOMSKA-LEŚNIEWSKA, D. M.; BAŁAN, B. J.; SKOPIŃSKI, P. Angiogenesis modulation by exogenous antioxidants. **Cent Eur J Immunol.** v. 42, n. 4, p. 370-376, dez, 2017.

RIEDER, F.; FIOCCHI, C.. Intestinal fibrosis in IBD—a dynamic, multifactorial process. **Nature reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 6, n. 4, p. 228, abr. 2009.

SAJIB, S., *et al.* Mechanisms of angiogenesis in microbe-regulated inflammatory and neoplastic conditions. **Angiogenesis**, v. 21, n. 1, p. 1-14, fev. 2018.

SERHAN, C. N.; WARD, P. A.; GILROY, D. W. **Fundamentals of Inflammation.** Cambridge University Press, 2010.

SHAH, K.; PRITT, B.; ALEXANDER, M. Histopathologic review of granulomatous inflammation. **Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases**, v. 10, n. 7, p. 1–12, fev. 2017.

SHATTOCK S. G. Pseudo tuberculoma silicotumof the lip. **Proc R Soc Med**, n. 10, p. 19–21, 1916.

SLAMENŇOVÁ, D., *et al.* Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 677, n. 1-2, p. 46-52, jun. 2009.

TAFANI, M., et al. The interplay of reactive oxygen species, hypoxia, inflammation, and sirtuins in cancer initiation and progression. **Oxidative Medicine and Cellular longevity**, e. 3907147, dez. 2016. DOI: 10.1155/2016/3907147

TISONCIK, J. R., *et al.* Into the eye of the cytokine storm. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n.1, p. 16-32, mar. 2012.

VARELA, M. L., *et al.* Acute inflammation and metabolism. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1115-1127, aug. 2018.

VON STEBUT, E. Was ist ein Granulom?. **Der Hautarzt**, v. 68, n. 7, p. 520-525, jul. 2017.

VON STEBUT, E., *et al.* Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1 α/β released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNF α . *Blood*, **The Journal of the American Society of Hematology**, v. 101, n. 1, p. 210-215, jan. 2003

XIE, Q, *et. al.* IL-8 up-regulates proliferative angiogenesis in ischemic myocardium in rabbits through phosphorylation of Akt/GSK-3 β ser9 dependent pathways. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n.8: p. 12498-508, ago. 2015.

YOO, C, *et. al.* Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 225, n.1, p. 41-52, jul. 2005.

ZHANG L., *et. al.* Polymer-Brush-Grafted Mesoporous Silica Nanoparticles for Triggered Drug Delivery. **Chemphyschem**, v. 19, n. 16, p. 1956-1964, ago. 2018.

APÊNDICE A – TABELA DE PESOS DOS ANIMAIS

GRUPO I		
	DIA 1	DIA 7
Rato 1	115g	130g
Rato 2	99g	124g
Rato 3	109g	130g
Rato 4	113g	138g
Rato 5	115g	134g
Rato 6	100g	124g

GRUPO II		
	DIA 1	DIA 7
Rato 1	131g	142g
Rato 2	132g	140g
Rato 3	116g	128g
Rato 4	115g	128g
Rato 5	106g	124g
Rato 6	133g	148g

GRUPO III		
	DIA 1	DIA 7
Rato 1	132g	148g
Rato 2	117g	130g
Rato 3	127g	140g
Rato 4	133g	146g
Rato 5	117g	128g
Rato 6	112g	136g

GRUPO IV		
	DIA 1	DIA 7
Rato 1	109g	124g
Rato 2	117g	138g
Rato 3	110g	128g
Rato 4	130g	148g
Rato 5	124g	148g
Rato 6	135g	152g

GRUPO V		
	DIA 1	DIA 7
Rato 1	123g	124g
Rato 2	131g	-
Rato 3	123g	147g
Rato 4	143g	160g
Rato 5	129g	146g
Rato 6	133g	143g

GRUPO VI		
	DIA 1	DIA 7
Rato 1	120g	136g
Rato 2	134g	135g
Rato 3	149g	158g
Rato 4	135g	151g
Rato 5	147g	163g
Rato 6	136g	147g

GRUPO VII		
	DIA 1	DIA 7
Rato 1	138g	140g
Rato 2	142g	150g

Rato 3	145g	152g
Rato 4	144g	154g
Rato 5	158g	158g
Rato 6	129g	144g
GRUPO VIII		
	DIA 1	DIA 7
Rato 1	123g	138g
Rato 2	136g	142g
Rato 3	135g	143g
Rato 4	127g	141g
Rato 5	130g	139g
Rato 6	152g	169g

GRUPO IX			
	DIA 1	DIA 7	DIA 14
Rato 1	102g	122g	138g
Rato 2	117g	136g	154g
Rato 3	112g	132g	152g
Rato 4	120g	140g	152g
Rato 5	117g	138g	160g
Rato 6	141g	158g	170g

GRUPO X			
	DIA 1	DIA 7	DIA 14
Rato 1	129g	144g	156g
Rato 2	116g	132g	154g
Rato 3	101g	128	138g
Rato 4	117g	134g	152g
Rato 5	128g	150g	158g
Rato 6	128g	146g	170g

GRUPO XI			
	DIA 1	DIA 7	DIA 14
Rato 1	127g	150g	172g
Rato 2	119g	144g	166g
Rato 3	140g	158g	170g
Rato 4	129g	150g	170g
Rato 5	122g	136g	166g
Rato 6	127g	146g	160g

GRUPO XII			
	DIA 1	DIA 7	DIA 14
Rato 1	105g	126g	144g
Rato 2	123g	144g	164g
Rato 3	106g	140g	158g
Rato 4	114g	128g	154g
Rato 5	122g	130g	158g
Rato 6	127g	142g	148g

GRUPO XIII			
	DIA 1	DIA 7	DIA 14
Rato 1	135g	150g	164g
Rato 2	128g	140g	150g
Rato 3	115g	129g	140g
Rato 4	134g	154g	169g
Rato 5	111g	125g	139g
Rato 6	125g	-	-

GRUPO XIV			
	DIA 1	DIA 7	DIA 14
Rato 1	100g	108g	117g
Rato 2	113g	123g	124g

Rato 3	125g	140g	150g
Rato 4	125g	135g	145g
Rato 5	132g	146g	158g
Rato 6	130g	143g	156g

GRUPO XV			
	DIA 1	DIA 7	DIA 14
Rato 1	134g	146g	157g
Rato 2	139g	149g	160g
Rato 3	118g	130g	140g
Rato 4	129g	150g	160g
Rato 5	128g	138g	148g
Rato 6	134g	148g	158g

GRUPO XVI			
	DIA 1	DIA 7	DIA 14
Rato 1	138g	152g	166g
Rato 2	119g	130g	140g
Rato 3	128g	137g	147g
Rato 4	124g	141g	156g
Rato 5	133g	148g	158g
Rato 6	124g	134g	145g

APÊNDICE B – TABELAS COM ACHADOS HEMATOXICILINA-EOSINA

GRUPO V						
	RATO 1	RATO 2	RATO 3	RATO 4	RATO 5	RATO 6
Granuloma	+		+	+	+	+
Infiltrado linfocitário	++		++	++	++	++
Macrófago	+		+	+	+	+
Células gigantes	+		+	+	+	+
Plasmócitos	+		+	+	+	+

GRUPO VI						
	RATO 1	RATO 2	RATO 3	RATO 4	RATO 5	RATO 6
Granuloma	+	+	+	+	+	+
Infiltrado linfocitário	++	++	++	++	++	++
Macrófago	+	+	+	+	+	+
Células gigantes	+	+	+	+	+	+
Plasmócitos	+	+	+	+	+	+

GRUPO VII						
	RATO 1	RATO 2	RATO 3	RATO 4	RATO 5	RATO 6
Granuloma	+	+	+	+	+	+

Infiltrado linfocitário	++	++	++	++	++	++
Macrófago	+	+	+	+	+	+
Células gigantes	+	+	+	+	+	+
Plasmócitos	+	+	+	+	+	+

GRUPO VIII						
	RATO 1	RATO 2	RATO 3	RATO 4	RATO 5	RATO 6
Granuloma	+	+	+	+	+	+
Infiltrado linfocitário	++	++	++	++	++	++
Macrófago	+	+	+	+	+	+
Células gigantes	+	+	+	+	+	+
Plasmócitos	+	+	+	+	+	+

GRUPO XIII						
	RATO 1	RATO 2	RATO 3	RATO 4	RATO 5	RATO 6
Granuloma	+	+	+	+	+	
Infiltrado linfocitário	++	++	++	++	++	
Macrófago	+	+	+	+	+	
Células gigantes	+	+	+	+	+	
Plasmócitos	+	+	+	+	+	

GRUPO XIV						
	RATO 1	RATO 2	RATO 3	RATO 4	RATO 5	RATO 6
Granuloma	+	+	+	+	+	+
Infiltrado linfocitário	++	++	++	++	++	++
Macrófago	+	+	+	+	+	+
Células gigantes	+	+	+	+	+	+
Plasmócitos	+	+	+	+	+	+

GRUPO XV						
	RATO 1	RATO 2	RATO 3	RATO 4	RATO 5	RATO 6
Granuloma	+	+	+	+	+	+
Infiltrado linfocitário	++	++	++	++	++	++
Macrófago	+	+	+	+	+	+
Células gigantes	+	+	+	+	+	+
Plasmócitos	+	+	+	+	+	+

GRUPO XVI						
	RATO 1	RATO 2	RATO 3	RATO 4	RATO 5	RATO 6
Granuloma	+	+	+	+	+	+
Infiltrado linfocitário	++	++	++	++	++	++
Macrófago	+	+	+	+	+	+
Células gigantes	+	+	+	+	+	+
Plasmócitos	+	+	+	+	+	+

APÊNDICE C – ARTIGO ENVIADO PARA REVISTA

Title: Gum arabic and eugenol in a silica-induced inflammatory angiogenesis model in Wistar rat

AUTHORS: Barbara de Araujo Lima Dutra^{1,2}, Carolina Lyra Barreira Carneiro¹, Nayanna de Oliveira Ramos Melo¹, Gilson Brito de Oliveira¹, Francisco Vagnaldo Fechine Jamacaru¹, Joao Crispim Ribeiro^{2,3}, Conceição Aparecida Dornelas¹

1. Universidade Federal do Ceará
2. Instituto Cearense de Oftalmologia
3. Centro Universitário Christus

Corresponding author:

Barbara Dutra, Universidade Federal do Ceará

Rua Alexandre Baraúna, 949 – Rodolfo Teófilo, Fortaleza – CE, CEP: 60430-160

Email: barbaradutra_@hotmail.com

Author contributions: All authors contributed to the experiment and the writing of the manuscript.

Conflict of interests: No author has a proprietary interest in any material or method mentioned.

Acknowledgments: Research was supported by an institutional grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) / Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), notice 04/2017, No 88887.165958/2018-00, Brazil.

Research performed at Postgraduate Program in Patology, Laboratory of Experimental Surgery and Nucleus of Research and Development of Medicines, Laboratory of Pharmacology and Preclinical Research, Medical School, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE, Brazil. Part of Master degree thesis. Tutor: Profa. Conceição Aparecida

Dornelas.

ABSTRACT

The purpose of this work was to evaluate the effects of gum arabic and eugenol on inflammatory angiogenesis in a subcutaneous silica inoculum model. Ninety-six Wistar rats were distributed over 16 groups. The substances administered by gavage included distilled water, gum arabic (500 mg/100g weight) and eugenol (10mg/100g weight). Control groups received 0.2 mL of sterile distilled water subcutaneously. The experimental groups were subjected to an inoculum of 0.2 mL of silica solution (50 mg/mL) subcutaneously. Groups I and V received distilled water for seven days, and groups IX and XIII received it for 14 days. Groups II and VI received gum arabic and eugenol for 7 days, and groups X and XIV for 14 days. Groups III and VII received gum arabic for 7 days, and groups XI and XV for 14 days. Groups IV and VIII received eugenol for 7 days, and groups VIII and XVI received it for 14 days. There was no difference between the histological analysis of slides stained with hematoxylin-eosin. There was a reduction in vascular density in animals that received only gum arabic for 7 ($0.09 \mu\text{m}^2 \pm 0.02$) or 14 ($0.08 \mu\text{m}^2 \pm 0.03$) days and only eugenol for seven days ($0.08 \mu\text{m}^2 \pm 0.03$), but this was not statistically significant. The microvascular density significantly increased in group treated with eugenol for 14 days ($0.14 \mu\text{m}^2 \pm 0.02$). The experimental model of silica inoculum was successfully created. Eugenol reduced inflammatory angiogenesis when administered for 7 days and stimulated it in when administered for 14 days. Gum arabic had a potential inhibitory effect on this model.

Keywords: Angiogenesis inhibitors, Inflammation, Eugenol, Gum arabic, Granuloma.

INTRODUCTION

The process of angiogenesis is defined as the formation of new blood vessels by a process of germination of endothelial sprouts from pre-existing capillaries. This event is related to several physiological processes such as morphogenesis and wound healing¹. Unregulated angiogenesis can induce or increase several pathological conditions such as chronic arthropathies, diabetic retinopathy, vascular glaucoma, tumor growth, and metastatic dissemination^{1,2}.

Inflammation is defined as the physiological response to infectious or non-infectious agents. The inflammation process is activated to remove cells from the damaged tissue and the source of injury. The general objective of the inflammatory process is the repair of damaged tissue to restore the typical tissue architecture, thus maintaining cell/tissue homeostasis³.

Granulomatous inflammation is a histological pattern of tissue reaction that appears after cell injury⁴. The histogenesis of granulomas depends on several cell types. Chronic inflammatory granulomatous skin diseases are mainly based on the dysfunctional negative modulation of inflammatory processes that lead to granuloma formation and maintain the formation⁵.

Silicon dioxide, also known as silica, is a silicon oxide whose chemical formula is SiO_2 . It can be found in many different forms. Prolonged exposure to the crystalline form of silica induces the production of chemokines, inflammatory cytokines, and growth factors. These mediators have been shown to be important for the initiation and progression of silica-induced lung diseases. In addition to these mediators, crystalline silica may induce toxicity by forming reactive oxygen species⁶.

Cutaneous disease is a rare event characterized by a foreign body granuloma produced by accidental implantation of silica in a wound and the pathogenesis is unclear⁷. Some authors suggest that time is needed for this transformation considering the long characteristic period for the development of silica granuloma (mean interval of approximately 10 years)^{7,8}.

Natural gums are exuded by some plants as protection in response to mechanical injury or microbial invasion. Gum arabic (GA) is a naturally occurring exudate collected from Senegalese acacia⁹. GA ingestion has decreased levels of angiogenic transcription factors (angiogenin 1, angiogenin 3, and angiogenin 4) within four days. Angiogenins are known to be related to vascular proliferation (angiogenesis) and, consequently, to the growth and metastasis of tumors as well as enabling vascularization of ischemic tissues¹⁰.

Eugenol (Eu, 4-allyl-2-methoxyphenol) and its related compounds are effective antioxidants that can prevent free radical-mediated diseases such as cancer, inflammatory conditions (type 2 diabetes and cardiovascular disease), neurodegenerative disorders, and periodontal changes¹¹. They can act as scavengers or free radical generators depending on their nature and concentration. This dual effect can influence cell viability and anti-inflammatory activity to varying degrees¹². The aim of this study is to evaluate the effects of gum arabic and/or eugenol on inflammatory angiogenesis model induced by a subcutaneous silica inoculum.

METHODS

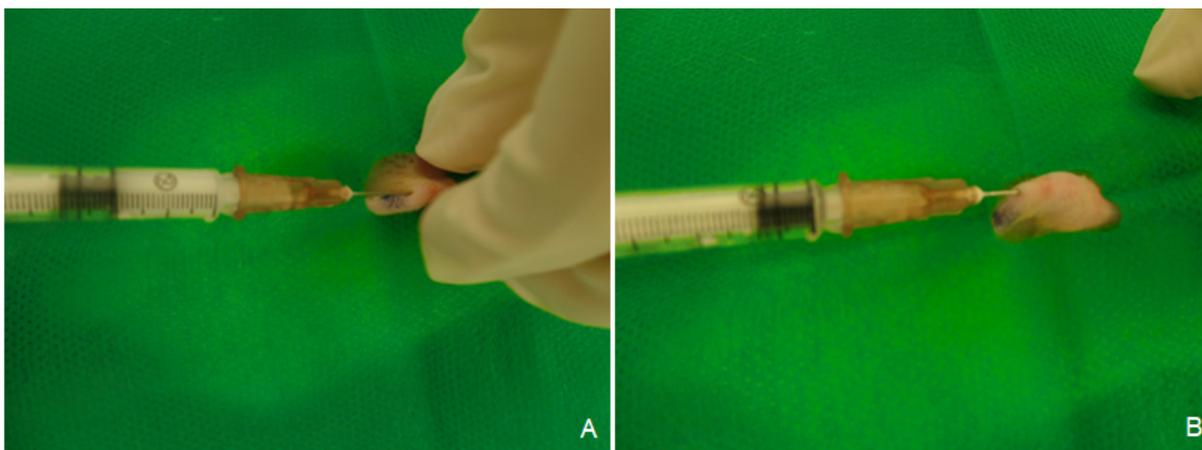
The research project was submitted to the Ethics Committee of the Federal University of Ceará (UFC) and started after approval (CEUA n° 9407070619). 96 Wistar rats were used and distributed into 16 groups containing six animals each. Control groups (I, II, III, IV, IX, X, XI, and XII) received 0.2 mL of sterile distilled water (DW) subcutaneously in the dorsum region. The experimental groups (V, VI, VII, VIII, XIII, XIV, XV, and XVI) were subjected to an inoculation of 0.2 mL of 50 mg/mL silica solution subcutaneously in the dorsum region (Table 1).

Table 1. Experimental study design.

SUBSTANCE	TREATMENT TIME			
	7 DAYS		14 DAYS	
	No inoculum	With inoculum	No inoculum	With inoculum
Distilled water	I	V	IX	XIII
Gum arabic + eugenol	II	VI	X	XIV
Gum arabic	III	VII	XI	XV
Eugenol	IV	VIII	XII	XVI

All animals were previously submitted to intraperitoneal anesthesia, shaving, and asepsis at the inoculum site (Figure 1).

Figure 1 – A. Inoculation of 0.2 mL of silica on the animal's back. B. Small bubble formed after silica inoculation.



Source: Prepared by the authors.

Silica

Particles of crystalline silica silicon dioxide (400 mesh) (di Luca Distribuidora-Comercio de Minérios) were suspended in a solution of distilled water at a concentration of 50 mg/mL after sterilization (121.3 °C, 103.4 kPa for 90 min)¹³.

Gum arabic PA (APA Comércio de produtos médicos hospitalares e laboratoriais LTDA)

The treatment was used at a dose of 500 mg/100g of weight. The sample was diluted in distilled water at 5 mL/kg of weight and heated to 60 degrees and centrifuged. It was then administered by gavage¹⁴.

Eugenol

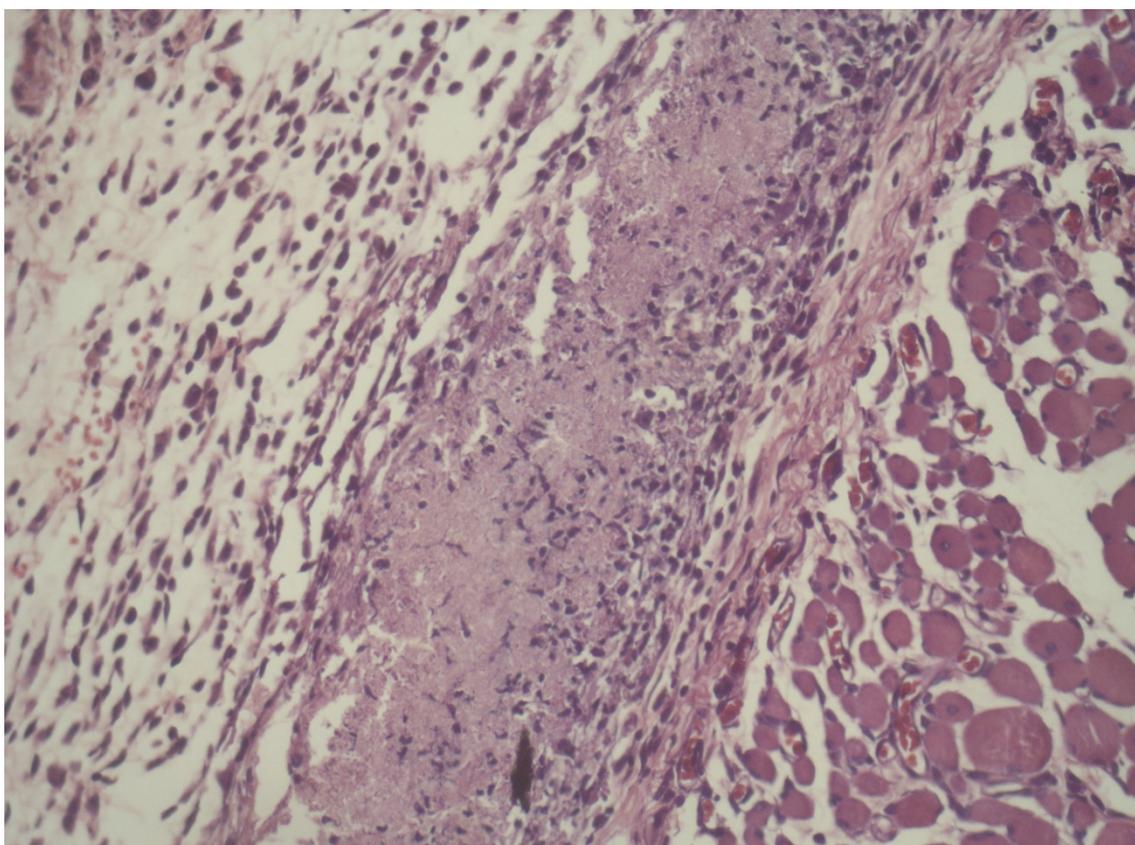
The eugenol was administered by gavage at a dose of 10mg/100g weight per day¹⁵ and carefully diluted in distilled water considering its volatility (it is an essential oil). The supplier was QUINARI Laboratory (city of Ponta Grossa/Paraná). The chemical analysis and purity analysis was performed in the organic chemistry laboratory of Professor Telma Leda (UFC).

Microscopic histological evaluation

Microscopic evaluation identified foreign body granuloma, lymphocytic infiltrate, macrophage, giant cells, plasma cells and proliferation of fibrinoid tissue. Scores were determined (qualitative analysis) and found to correlate with their absence and presence. These variables were placed on a 0 / + / ++ scale according to the intensity of the findings¹⁶.

An inflammatory infiltrate was considered when 50 leukocytes or more were detected in each area¹⁷. Quantitative analysis was performed by counting the findings in 10 fields at 400x magnification (Figure 2).

Figure 2. Histological section of the skin and subcutaneous tissue of a rat stained with hematoxylin-eosin. This shows silica particles surrounded by vessels in the subcutaneous tissue as well as via an inflammatory infiltrate consisting of lymphocytes. There is eosinophilic fibrinoid material within his granuloma (400x magnification).

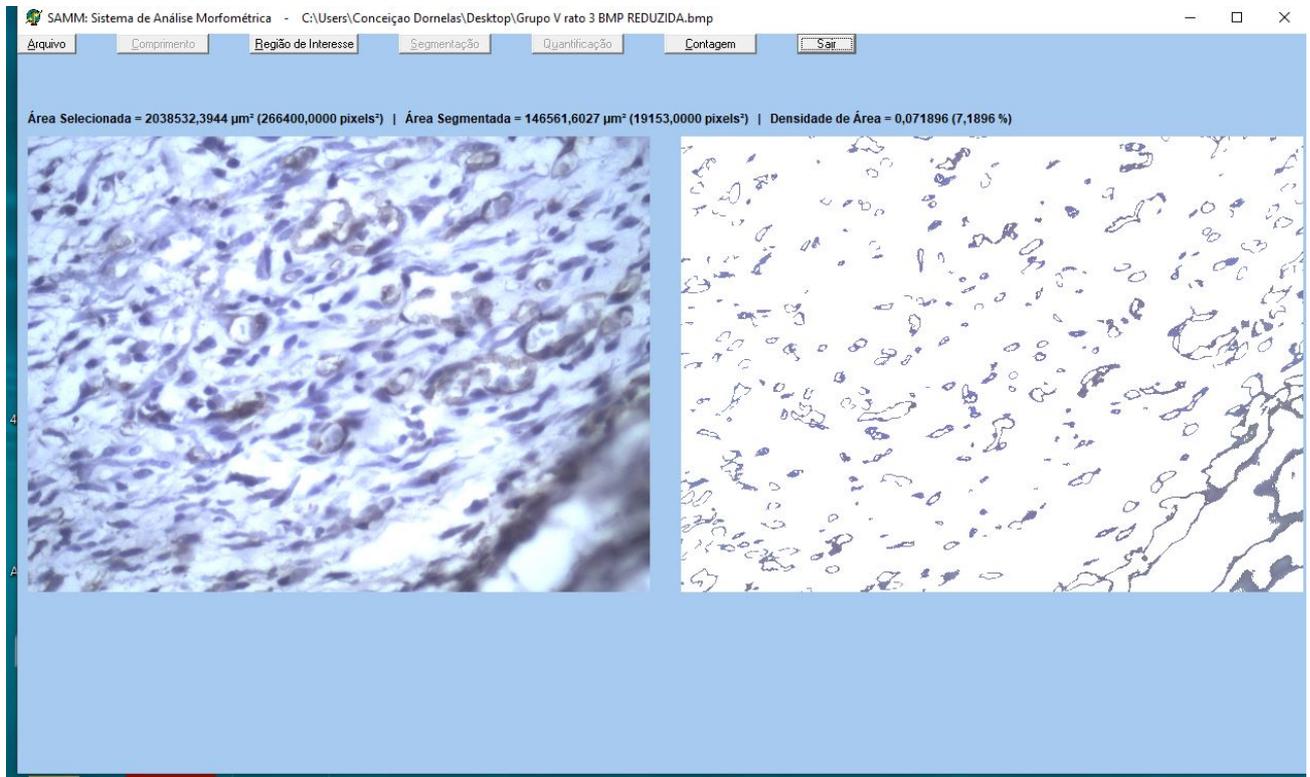


Source: Prepared by the authors.

Quantification of Angiogenesis

Images were captured by stereoscopic microscopy and evaluated by an angiogenesis quantification system (SAMM -version 1.00-2005) to quantify angiogenesis¹⁸. The program offers the recognition and automatic segmentation of vessels, separating them from the other components of the image. There was manual segmentation if the user found the automatic procedure to be inadequate. The system next provides the density of new vessels formed in relation to the segmented area (Figure 3).

Figure 3. Morphometric Analysis System (SAMM).



Source: Prepared by the authors.

Statistical analysis

Data were tabulated in the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software, version 20.0 for Windows, in which mean and standard deviation were calculated, submitted to the Shapiro-Wilk normality test, and associated with times and substances through Mann-Whitney or Kruskal-Wallis/Dunn test (non-parametric data). The level of significance was set at $P < 0.05$.

Analysis of variance for two classification factors was also used to assess the effects of treatments (factor 1: distilled water (DW), gum arabic (GA), eugenol (EU) and GA+EU) and time (factor 2: day 7 and day 14) on microvascular density. This analysis was complemented by Bonferroni's multiple comparisons test to verify differences between treatment groups at each time point as well as between the two times within each group. The data correspond to the mean and standard deviation of measurements made in six animals in each group.

RESULTS

An experimental new model was successfully created. The formation of subcutaneous and palpable nodules can be observed at the end of the experiment.

The slides were evaluated with 400x magnification over five fields. The main histopathological features were formation of foreign body granuloma, lymphocytic infiltrate, macrophage, giant cells, plasma cells, and proliferation of fibrous tissue. Four variables were evaluated in all groups. There was no difference between the histological findings between the groups even at different treatment days. Only the lymphocytic infiltrate had an accentuated presence (in all groups). All other characteristics presented a slight presence regardless of the type of treatment.

In accordance with the angiogenesis process analysis, the groups that received gum arabic had a decrease in microvascular density in relation with the control group (distilled water)—both those treated for seven days and those treated for 14 days, but this did not occur in a statistically significant way. There was a reduction in vascular density in animals that received only eugenol for 7 days, but this was not statistically significant. Microvascular density increased in a statistically significant way in groups treated for 14 days. There was an increase in microvascular density in groups treated for 7 days with gum arabic + eugenol; there was a decrease in microvascular density in groups treated for 14 days. Neither change was statistically significant (Table 2).

Table 2 – Quantification of angiogenesis through vascular density (μm^2).

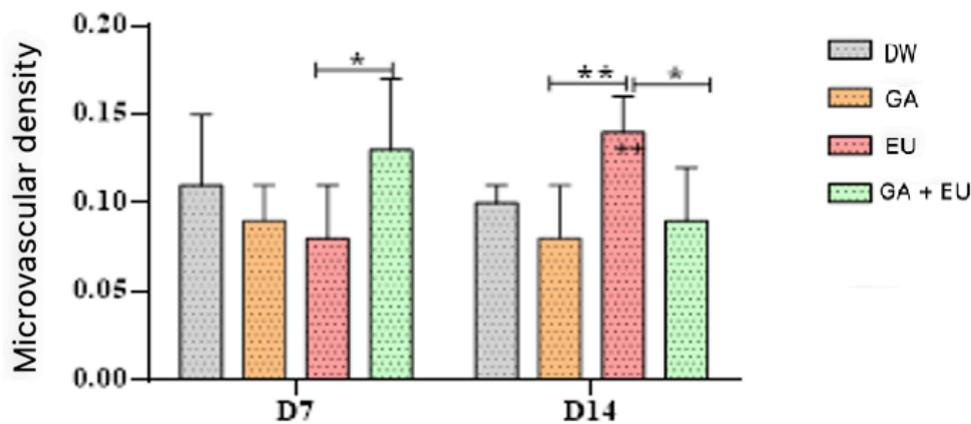
	Substance				p-Value ^a
	Distilled water	Gum arabic	Eugenol	Gum arabic + Eugenol	
Time					
7 days	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.13 ± 0.04	0.271
14 days	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.14 ± 0.02*	0.09 ± 0.03	0.015
p-Value^b	0.486	0.413	0.004	0.190	

*p < 0.05 versus other groups; Kruskal-Wallis/Dunn Test; Mann-Whitney Test; mean ± SD

Considering the analysis of two factors, animals that received only eugenol for seven days showed a reduction in microvascular density. This reduction was statistically significant if this density is compared with the final microvascular density of the group treated with

eugenol + gum arabic for 7 days. Animals treated for 14 days only with eugenol had an increase in microvascular density (stimulation of angiogenesis). This increase occurred with statistical significance in relation to the group treated for seven days. In comparison with animals treated with eugenol, animals treated only with GA and those treated with GA + EU for 14 days showed a statistically significant reduction in microvascular density. However, this statistical significance did not occur when comparing the microvascular density of animals treated for seven days with GA + EU and those treated for seven days only with GA. There was no statistically significant difference when comparing the microvascular density of animals treated for 14 days with those treated with these respective substances (Figure 4).

Figure 4. Microvascular density measured in the treated groups distilled water (DW), gum arabic (GA), eugenol (EU), and the association of the two substances (GA+EU) on days 7 (D7) and 14 (D14).



The symbols *(P<0.05), **(P<0.01) denote statistically significant differences between the two groups marked on the same day while the symbol ++(P<0.01) indicates a statistically significant difference upon comparing day 7 in the same group (Bonferroni multiple comparisons test).

DISCUSSION

Our study developed a model for studying inflammatory angiogenesis. A silica inoculum was performed in the subcutaneous tissue of Wistar rats to test the effects of eugenol, gum arabic, and distilled water in the inflammatory reaction. The study of inflammatory angiogenesis induced by a silica inoculum in the subcutaneous tissue of rats and is a new and reproducible model for evaluating angiogenesis and inflammation. The experimental approach used here created a model simulating a clinical condition of granulomatous inflammatory reaction resulting from the presence of a foreign body (silica).

The persistence of the harmful agent that induced inflammation upregulates the inflammatory response. A better understanding of the molecular and cellular pathways that links angiogenesis and inflammation would be useful in developing treatment conditions in which both processes are involved. The rationale for the construction and study of a silica-induced granuloma model was based on epidemiological studies that relate the incidence of granulomas related to occupational exposures to inorganic particles^{19,20}.

Silica (silicon dioxide) is very common in sand, glass, granite, mica, gravel, cement, bricks, and asbestos. It is a very common contaminant of wounds⁷. Reports on silica granulomas have already been published in the elbow biopsies as confirmed by polarized light and X-ray microanalysis including after traffic accidents²¹, head trauma from a windshield 30 years prior²⁰, and in children with asymptomatic placoid lesions on the face⁷.

Other models aiming to create a silica granuloma have already been tested as a model of an inhaled carbon nanotube-induced granulomatous disease to simulate similarities with the pathophysiology of sarcoidosis²². This model had clinical efficacy but was difficult to implement. The subcutaneous silica inoculum is a low cost and fully reproducible model. The procedure was fast and reproducible and reduces the chances of complications such as surgical site infections.

Angiogenesis was quantified via photographs (by SAMM)¹⁸, and the microvascular density of the granuloma area was measured. Gum arabic reduced angiogenesis versus controls, but did not present a statistically significant difference. Our data agree with those found in the literature²³. There was inhibition of the levels of angiogenic transcription factors (angiogenin 1, angiogenin 3, and angiogenin 4) within four days with the use of gum arabic. This favored the reduction of vascular proliferation (angiogenesis).

We used photographs (using SAMM) to show a reduction in microvascular density in the area of the granuloma in the groups treated with eugenol for 7 days (reduction in angiogenesis), but this was not statistically significant. However, there was a statistically significant stimulation of vascular density in the groups treated for 14 days (stimulation of angiogenesis). This seems contradictory although we know that eugenol and its compounds can act as scavengers (antioxidant substance) or generators (pro-oxidant substance) of free radicals (oxidative stress). This influences cell viability and anti-inflammatory activity to varying degrees¹².

The macrophages contribute to the production of proinflammatory cytokines and nitric oxide, which are important for cellular and vascular events during the onset and progression

of the inflammatory process. Studies have shown that eugenol can modulate macrophage functions and negatively regulate inflammation²⁴.

Yeh et al²⁵. demonstrated that eugenol inhibits the inducible expression of macrophage nitric oxide synthase (iNOS) in response to LPS culminating in the reduction of NO levels. Eugenol also reduced TNF- α and IL-1 β as well as NF- κ B, ERK1/2 and p38 MAPK24 signaling pathways.

In macrophages, cytokines and lipopolysaccharides induce nitric synthase (iNOS) and COX-2. Both iNOS and COX-2 are responsible for producing large pro-inflammatory mediators such as nitric oxide and prostaglandins in the inflammatory site. Eugenol showed an anti-inflammatory effect similar to the effects of the COX antagonist (indomethacin) and the selective COX-2 antagonist (celecoxib)²⁶.

The antinociceptive effects of ortho-eugenol mediated by the adrenergic system as well as the anti-inflammatory activity based on regulation of pro-inflammatory cytokines and phosphorylation of NF- κ B and p38 became obvious upon pre-treatment with ortho-eugenol. There were reduced writhing events and reduced lick times in the writhing and glutamate tests, respectively. The reaction time to thermal stimulus increased significantly in the hot plate test after administration of ortho-eugenol. In anti-inflammatory tests, ortho-eugenol inhibited acetic acid-induced vascular permeability and leukocyte migration, thus reducing TNF- α and IL-1 β due to its suppression of phosphorylated forms of NF- κ B and p38 in the peritonitis test²⁷.

Our results corroborate these findings because we noticed an inhibition of microvascular density (anti-inflammatory/anti-angiogenic effect) when comparing the animals that received eugenol for 7 days with their respective control (not statistically significant). There was higher microvascular density (inflammatory/angiogenic stimulus) versus the granulomas of animals that received eugenol for 14 days. These results, although antagonistic as we have seen previously, have already been described. That is, eugenol and its compounds can act as scavengers (antioxidant substance) or generators (pro-oxidant substance) of free radicals (oxidative stress). We could have used longer experiments, but the time required for angiogenic stimulation is certainly within 14 days as shown via statistical analysis.

Eugenol has beneficial activities for cells, but it can also be toxic depending on the type of cell to which it is exposed and the concentration used. Thus, eugenol toxicity was observed in human dental pulp fibroblasts with DNA damage. Eugenol could induce genotoxicity of mouse peritoneal macrophages, but it also has antigenotoxic potential depending on the treatment protocol. These may be interlinked with its effect on drug

metabolism. Therefore, eugenol can modulate inflammatory and oxidative processes, but of course, it must be used safely²⁴.

Although toxicity has been studied *in vivo*, little or no information is available on human subjects. The pro-oxidant effect of eugenol mediates its toxicity attributed to protein inactivation due to the binding of eugenol to lysine residues. Its cytotoxicity is probably due to its active metabolic reactions that react with DNA, thus forming adducts that can destroy nuclear genetic material. However, the World Health Organization (WHO) declared eugenol as a non-mutant molecule and is generally recognized as safe²⁸.

Oral ingestion of eugenol by Wistar rats in different doses over a 15-day period may cause some changes in blood chemistry. Furthermore, eugenol increases the levels of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and total bilirubin, but these effects are not dose-dependent²⁹. Thus, there is a limit not only on the dose, but also on the time to obtain a therapeutic or toxic effect of any drug.

Although there are many studies articles on the cytotoxic properties of eugenol, the controversial results in the literature make it difficult to interpret efficacy and safety much less extend to clinical trials. However, the ability of eugenol to induce oxidative stress (inflammation), as observed, seems to be related to its cytotoxicity and antitumor effects¹⁵.

Problems related to the degree of purity of the compound, its evaporation during the experiments, and the various methods used to quantify these data (different models and animals can present divergent results and interpretations) can all partially explain these controversial results.

There are no reports in the literature about the association of gum arabic with eugenol. We found an increase in microvascular density in the groups treated for 7 days with gum arabic and eugenol. There was a reduction in microvascular density in the groups treated for 14 days. However, neither of these changes were statistically significant.

New inflammatory model was successfully created. Eugenol reduced angiogenesis in the groups treated for 7 days but not in a statistically significant way. Angiogenesis was stimulated in groups treated for 14 days. Although gum arabic did not inhibit angiogenesis with statistical significance, there was no increase in vascular density in animals treated only with GA. Then, gum arabic had a potential inhibitory effect on this inflammatory angiogenesis model. There was no difference between the findings of inflammatory cells regardless of the substance or time of treatment. Gum arabic had a potential inhibitory effect on this inflammatory angiogenesis model.

REFERENCES

1. Johnson LV. *et al.* Activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 73 (6): 887- 96, 2001.
2. Sajib, S, *et al.* Mechanisms of angiogenesis in microbe-regulated inflammatory and neoplastic conditions. *Angiogenesis*, 21 (1): 1-14, 2018.
3. Aguilar-Cazares, D, *et al.* Contribution of angiogenesis to inflammation and cancer. *Frontiers in oncology*, 9: 1399, 2019.
4. Shah K, Pritt B, Alexander M. Histopathologic review of granulomatous inflammation. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases.* 7: 1–12, 2017.
5. Von Stebut E., *et al.* Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1 α/β released from neutrophils recruited by mast cell–derived TNF α . *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 101 (1): 210-215, 2003.
6. Castranova V, Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: Role of reactive oxygen/nitrogen species, *Free Radical Biology and Medicine*, 37 (7): 916-925, 2004.
7. Kaya, TI, *et al.* Cutaneous silica granuloma in a child. *Pediatric dermatology*, 20 (1): 40-43, 2003.
8. Mowry R. G.; Sams W. M; Caulfield J. B. Cutaneous silica granuloma. *Arch Dermatol*, 127: 692–694, 1991.
9. Kaddam LA, Kaddam AS. Effect of Gum Arabic (*Acacia senegal*) on C-reactive protein level among sickle cell anemia patients. *BMC Res Notes.*, 13 (1): 162, 2020.
10. Nasir, O, *et al.* Downregulation of angiogenin transcript levels and inhibition of colonic carcinoma by Gum Arabic (*Acacia senegal*). *Nutrition and cancer*, 62 (6): 802-810, 2010.

11. Prakash PAGN, Gupta N. Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. *Indian journal of physiology and pharmacology*, 49 (2): 125, 2005.
12. Carreras A, *et al.* Punicalagin and catechins contain polyphenolic substructures that influence cell viability and can be monitored by radical chemosensors sensitive to electron transfer. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (7): 1659-1665, 2012.
13. Zhang L, *et al.* Polymer-Brush-Grafted Mesoporous Silica Nanoparticles for Triggered Drug Delivery. *Chemphyschem*. 19 (16): 1956-1964, 2018
14. Nasif WA, Lotfy M, Mahmoud MR. Protective effect of gum acacia against the aspirin induced intestinal and pancreatic alterations. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 15(3): 285-92, 2011.
15. Bezerra DP, *et al.* The Dual Antioxidant/Prooxidant Effect of Eugenol and Its Action in Cancer Development and Treatment. *Nutrients*. 9 (12): 1367, 2017.
16. Lockwood DNJ, *et al.* The histological diagnosis of leprosy type 1 reactions: identification of key variables and an analysis of the process of histological diagnosis. *Journal of clinical pathology*, 61 (5): 595-600, 2008.
17. Michailowsky V, *et al.* Pivotal role of interleukin-12 and interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *The American journal of pathology*, 159 (5): 1723-1733, 2001.
18. Fechine-Jamacaru FV, Fechine Júnior JU, de Moraes Filho MO. Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho induzida pela cauterização alcalina pontual [Model of inflammatory angiogenesis in rabbit cornea induced by punctual alkaline cauterization]. *Acta Cir Bras*. 20 (1): 64-73, 2005.
19. Lockwood DNJ, *et al.* The histological diagnosis of leprosy type 1 reactions: identification of key variables and an analysis of the process of histological diagnosis. *Journal of clinical pathology*, 61 (5): 595-600, 2008.

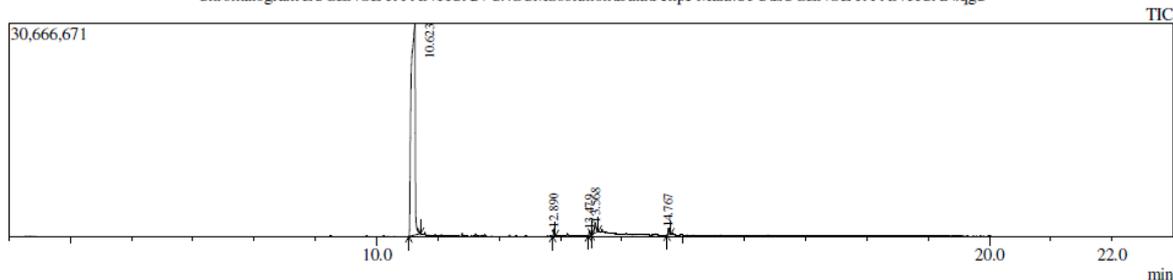
20. Michailowsky V, *et al.* Pivotal role of interleukin-12 and interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *The American journal of pathology*, 159 (5): 1723-1733, 2001.
21. Newman LS, *et al.* Um estudo etiológico caso-controle da sarcoidose: Fatores de risco ocupacionais e ambientais. *Sou. J. Respir. Crit. Care Med*, 170: 1324–1330, 2004.
22. Onesti MG, *et al.* A clinical case of cutaneous silica granuloma. *Giornale italiano di dermatologia e venereologia: organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia*, 149 (3): 376-378, 2014.
23. Pimentel L, *et al.* Simultaneous presentation of silicone and silica granuloma. *Dermatology*, 205 (2): 162-165, 2002.
24. Barna BP, Malur A, Thomassen MJ. Studies in a Murine Granuloma Model of Instilled Carbon Nanotubes: Relevance to Sarcoidosis. *Int J Mol Sci*. 22(7): 3705, 2021.
25. Yeh JL, *et al.* Eugenolol and glyceryl-isoeugenol suppress LPS-induced iNOS expression by down-regulating NF-kappaB AND AP-1 through inhibition of MAPKS and AKT/IkappaBalpha signaling pathways in macrophages. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 24 (2): 345-56, 2011.
26. Nasir O, *et al.* Downregulation of angiogenin transcript levels and inhibition of colonic carcinoma by Gum Arabic (*Acacia senegal*). *Nutrition and cancer*, 62 (6): 802-810, 2010.
27. Barboza JN, da Silva Maia Bezerra Filho C, Silva RO, Medeiros JVR, de Sousa DP. An Overview on the Anti-inflammatory Potential and Antioxidant Profile of Eugenol. *Oxid Med Cell Longev.*, 2018: 3957262. PMID: 30425782
28. Gorrini, C; Harris, IS.; Mak, TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 931–947, 2013.
29. Fonsêca DV *et. al*, Ortho-eugenol exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory activities. *Int Immunopharmacol*. 38: 402-408, 2016

ANEXO A – PUREZA EUGENOL

Sample Information

Analyzed by : Dr. Felipe Maia
 Analyzed : 31/05/2019 19:30:55
 Sample Type : Unknown
 Level # : 1
 Sample Name : EUGENOL-PA-ANTICAN
 Sample ID : EUGENOL-PA-ANTICAN
 IS Amount : [1]=1
 Sample Amount : 1
 Dilution Factor : 1
 Vial # : 1
 Injection Volume : 1.00
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\Felipe Maia\UFC\EUGENOL-PA-ANTICAN.qgd
 Org Data File : C:\GCMSsolution\Data\Felipe Maia\UFC\EUGENOL-PA-ANTICAN.qgd
 Method File : C:\GCMSsolution\Data\Felipe Maia\Acetofenona e derivados.qgm
 Org Method File : C:\GCMSsolution\Data\Felipe Maia\Acetofenona e derivados.qgm
 Report File :
 Tuning File : C:\GCMSsolution\System\Tune1\tuning 25-04-2019.qgt
 Modified by : Admin
 Modified : 31/05/2019 21:01:31

Chromatogram EUGENOL-PA-ANTICAN C:\GCMSsolution\Data\Felipe Maia\UFC\EUGENOL-PA-ANTICAN.qgd



Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	10.623	10.525	10.715	136025311	96.08	30419160	88.45	4.47		3-Allyl-6-methoxyphenol
2	12.890	12.870	12.915	786976	0.56	1026309	2.98	0.77		Hexadecanoic acid, methyl ester
3	13.479	13.455	13.500	741484	0.52	610685	1.78	1.21		6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-
4	13.568	13.500	13.620	2837757	2.00	1444247	4.20	1.96	V	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-
5	14.767	14.740	14.800	1177970	0.83	889695	2.59	1.32		9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 2-hyd
				141569498	100.00	34390096	100.00			

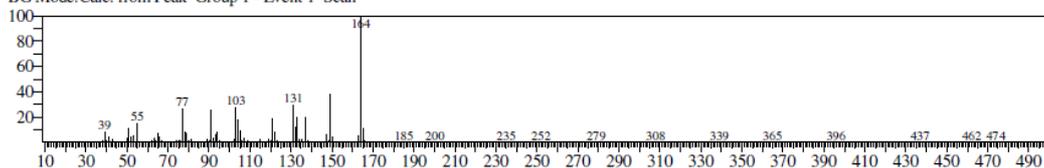
Library

<< Target >>

Line#:1 R.Time:10.620(Scan#:1325) MassPeaks:350

RawMode:Averaged 10.615-10.625(1324-1326) BasePeak:164.05(5636376)

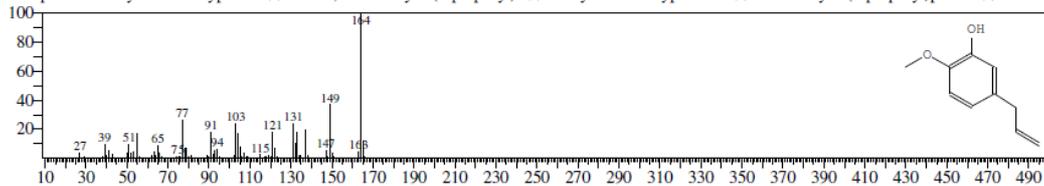
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:23175 Library:NIST14.lib

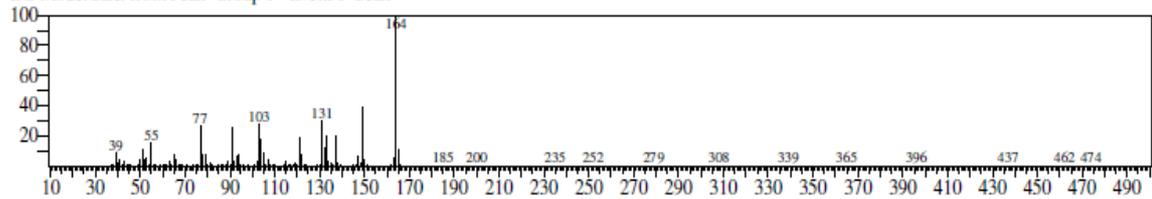
SE:97 Formula:C10H12O2 CAS:501-19-9 MolWeight:164 RetIndex:1392

CompName:3-Allyl-6-methoxyphenol \$\$ Phenol, 2-methoxy-5-(2-propenyl)- \$\$ 5-Allyl-2-methoxyphenol \$\$ 2-Methoxy-5-(2-propenyl)phenol \$\$ Chavicol

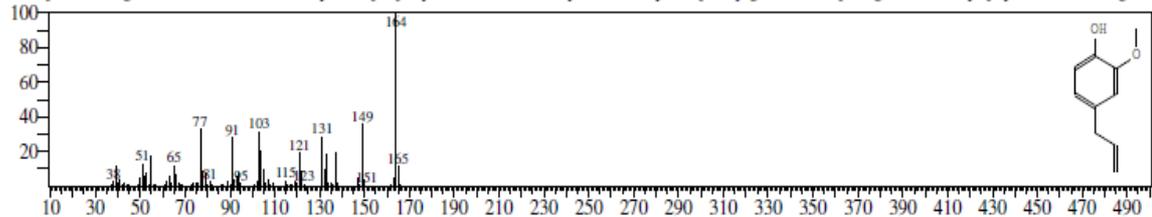


<< Target >>

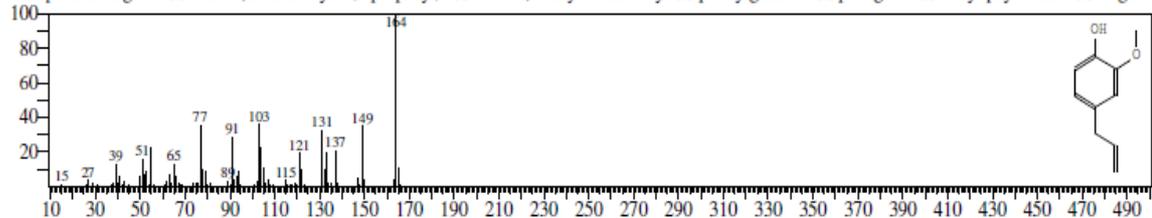
Line#: 1 R.Time: 10.620(Scan#: 1325) MassPeaks: 350
RawMode: Averaged 10.615-10.625(1324-1326) BasePeak: 164.05(5636376)
BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



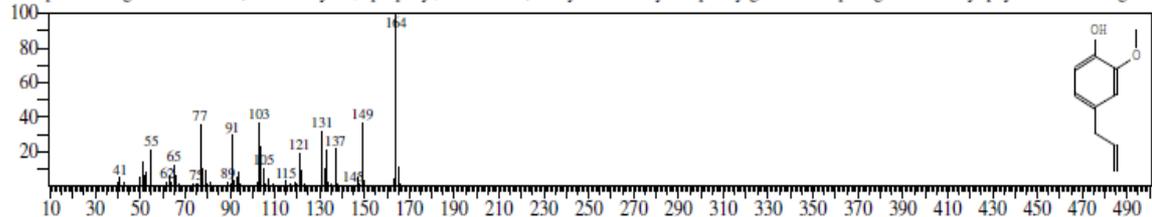
Hit#: 2 Entry: 12142 Library: NIST14s.lib
SI: 96 Formula: C₁₀H₁₂O₂ CAS: 97-53-0 MolWeight: 164 RetIndex: 1392
CompName: Eugenol \$\$ Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)- \$\$ Phenol, 4-allyl-2-methoxy- \$\$ p-Allylguaiacol \$\$ p-Eugenol \$\$ Caryophyllol acid \$\$ Engeno



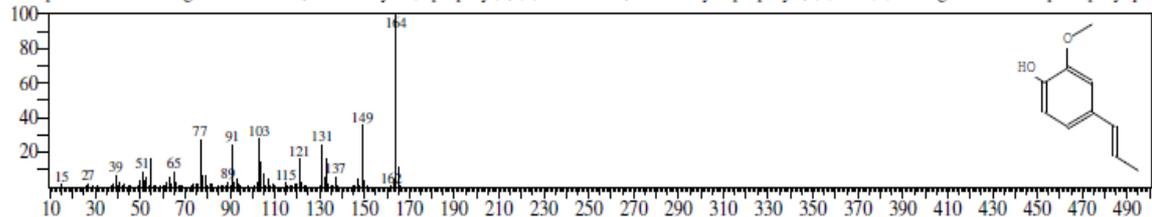
Hit#: 3 Entry: 23166 Library: NIST14.lib
SI: 95 Formula: C₁₀H₁₂O₂ CAS: 97-53-0 MolWeight: 164 RetIndex: 1392
CompName: Eugenol \$\$ Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)- \$\$ Phenol, 4-allyl-2-methoxy- \$\$ p-Allylguaiacol \$\$ p-Eugenol \$\$ Caryophyllol acid \$\$ Engeno



Hit#: 4 Entry: 12144 Library: NIST14s.lib
SI: 94 Formula: C₁₀H₁₂O₂ CAS: 97-53-0 MolWeight: 164 RetIndex: 1392
CompName: Eugenol \$\$ Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)- \$\$ Phenol, 4-allyl-2-methoxy- \$\$ p-Allylguaiacol \$\$ p-Eugenol \$\$ Caryophyllol acid \$\$ Engeno

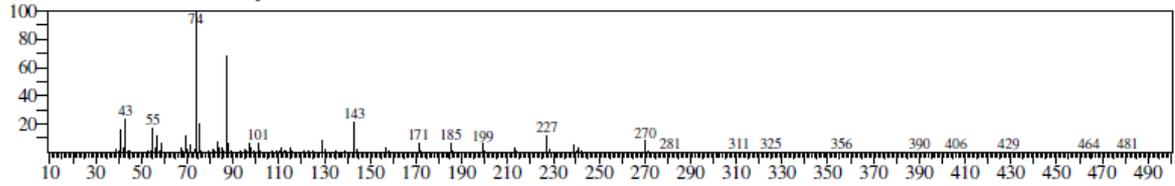


Hit#: 5 Entry: 23177 Library: NIST14.lib
SI: 94 Formula: C₁₀H₁₂O₂ CAS: 5932-68-3 MolWeight: 164 RetIndex: 1410
CompName: trans-Isoeugenol \$\$ Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-, (E)- \$\$ Phenol, 2-methoxy-4-propenyl-, (E)- \$\$ (E)-Isoeugenol \$\$ trans-p-Propenylqua



<< Target >>

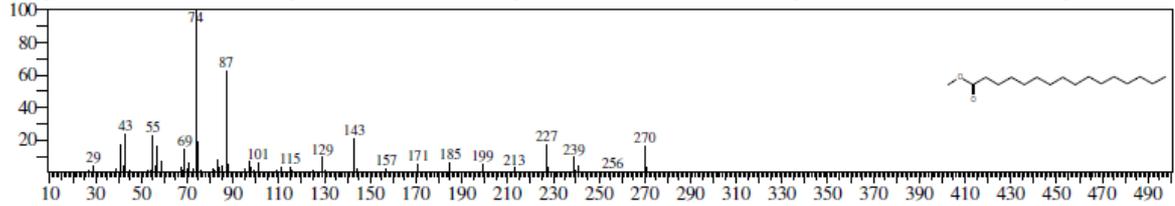
Line#: 2 R.Time: 12.890 (Scan#: 1779) MassPeaks: 307
RawMode: Averaged 12.885-12.895 (1778-1780) BasePeak: 74.00 (159539)
BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#: 1 Entry: 26273 Library: NIST14s.lib

SI: 96 Formula: C17H34O2 CAS: 112-39-0 MolWeight: 270 RetIndex: 1878

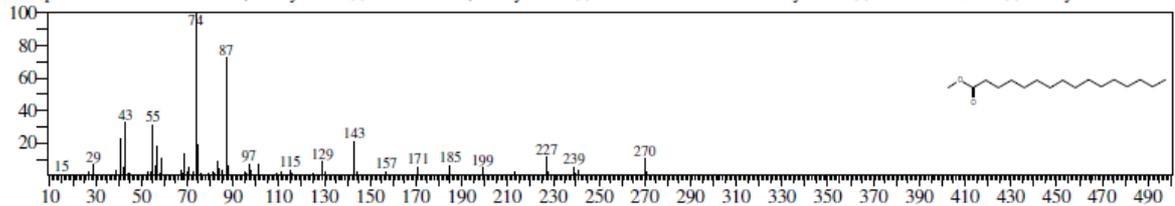
CompName: Hexadecanoic acid, methyl ester \$\$\$\$ Palmitic acid, methyl ester \$\$\$\$ n-Hexadecanoic acid methyl ester \$\$\$\$ Metholene 2216 \$\$\$\$ Methyl hexadecano



Hit#: 2 Entry: 104648 Library: NIST14.lib

SI: 95 Formula: C17H34O2 CAS: 112-39-0 MolWeight: 270 RetIndex: 1878

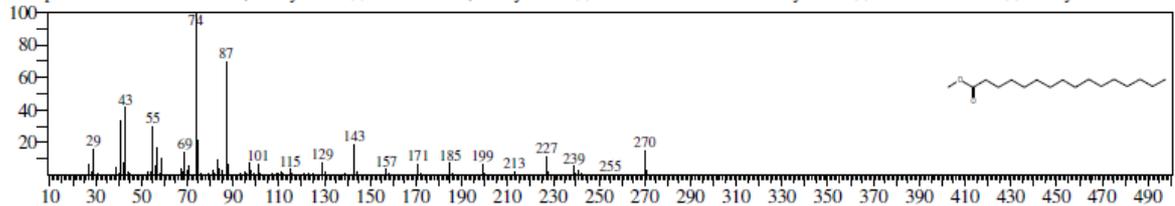
CompName: Hexadecanoic acid, methyl ester \$\$\$\$ Palmitic acid, methyl ester \$\$\$\$ n-Hexadecanoic acid methyl ester \$\$\$\$ Metholene 2216 \$\$\$\$ Methyl hexadecano



Hit#: 3 Entry: 26271 Library: NIST14s.lib

SI: 93 Formula: C17H34O2 CAS: 112-39-0 MolWeight: 270 RetIndex: 1878

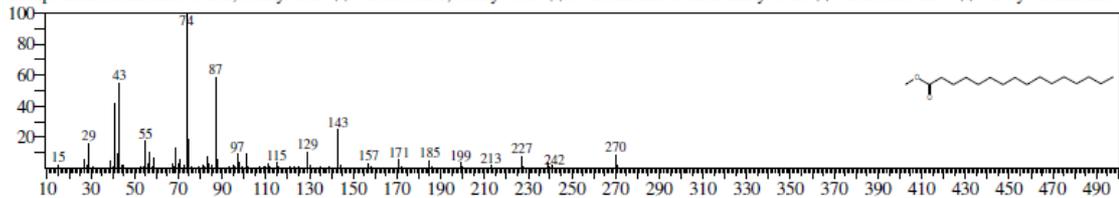
CompName: Hexadecanoic acid, methyl ester \$\$\$\$ Palmitic acid, methyl ester \$\$\$\$ n-Hexadecanoic acid methyl ester \$\$\$\$ Metholene 2216 \$\$\$\$ Methyl hexadecano



Hit#: 4 Entry: 26270 Library: NIST14s.lib

SE93 Formula: C17H34O2 CAS: 112-39-0 MolWeight: 270 RetIndex: 1878

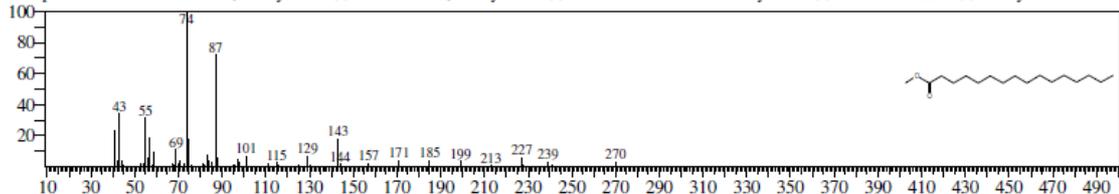
CompName: Hexadecanoic acid, methyl ester \$\$\$\$ Palmitic acid, methyl ester \$\$\$\$ n-Hexadecanoic acid methyl ester \$\$\$\$ Metholene 2216 \$\$\$\$ Methyl hexadecano



Hit#: 5 Entry: 26272 Library: NIST14s.lib

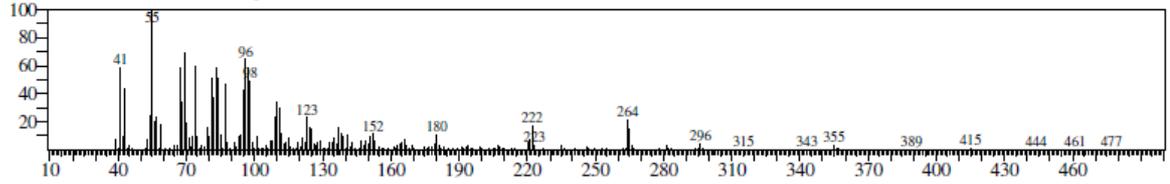
SE93 Formula: C17H34O2 CAS: 112-39-0 MolWeight: 270 RetIndex: 1878

CompName: Hexadecanoic acid, methyl ester \$\$\$\$ Palmitic acid, methyl ester \$\$\$\$ n-Hexadecanoic acid methyl ester \$\$\$\$ Metholene 2216 \$\$\$\$ Methyl hexadecano

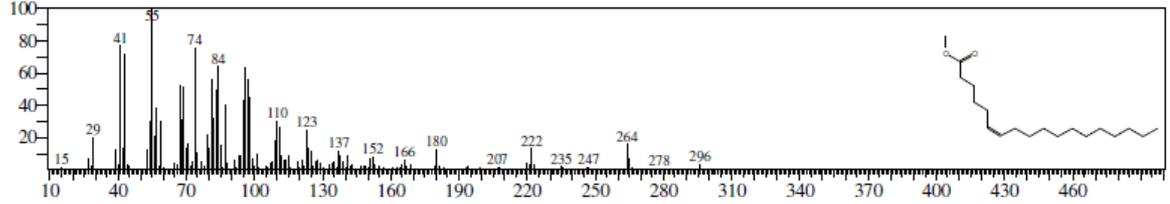


<< Target >>

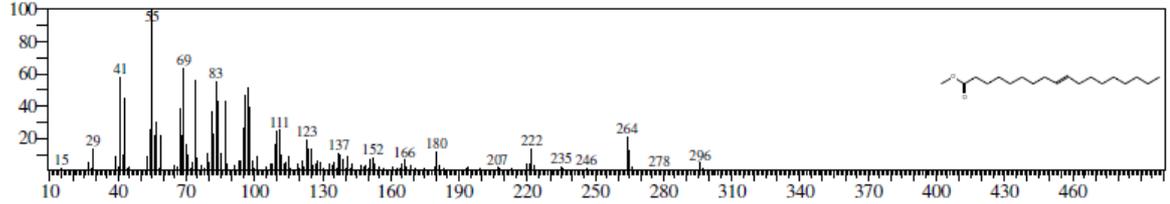
Line#:3 R. Time:13.480(Scan#:1897) MassPeaks:338
RawMode:Averaged 13.475-13.485(1896-1898) BasePeak:55.05(26653)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



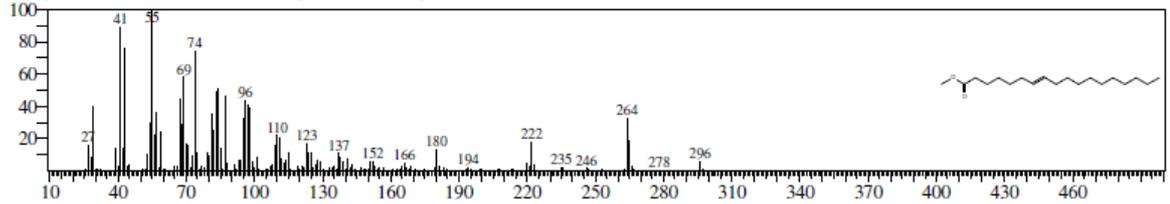
Hit#:1 Entry:127655 Library:NIST14.lib
SI:94 Formula:C19H36O2 CAS:2777-58-4 MolWeight:296 RetIndex:2085
CompName:6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)- \$\$ Methyl cis-6-octadecenoate \$\$ Methyl petroselinate \$\$ Methyl (6Z)-6-octadecenoate # \$\$ cis-6-Octa



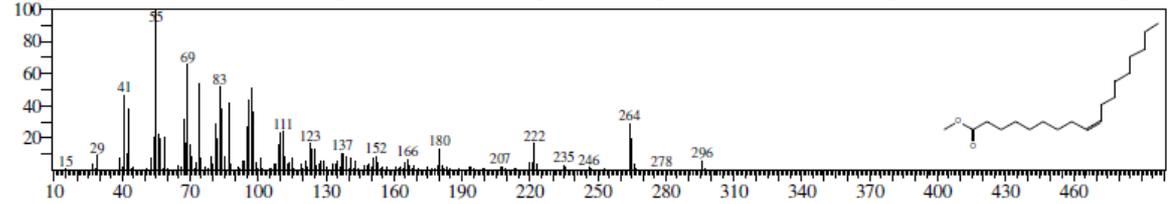
Hit#:2 Entry:28138 Library:NIST14s.lib
SI:93 Formula:C19H36O2 CAS:1937-62-8 MolWeight:296 RetIndex:2085
CompName:9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)- \$\$ Elaidic acid, methyl ester \$\$ Methyl elaidate \$\$ Methyl trans-9-octadecenoate \$\$ (E)-9-Octadecenoic



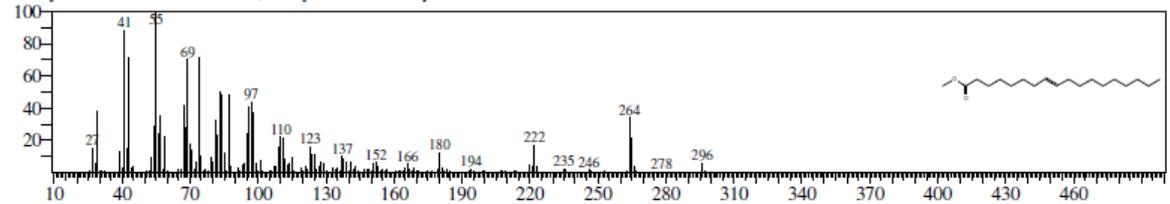
Hit#:3 Entry:127644 Library:NIST14.lib
SI:92 Formula:C19H36O2 CAS:57396-98-2 MolWeight:296 RetIndex:2085
CompName:7-Octadecenoic acid, methyl ester \$\$ Methyl 7-octadecenoate \$\$



Hit#:4 Entry:127664 Library:NIST14.lib
SI:92 Formula:C19H36O2 CAS:112-62-9 MolWeight:296 RetIndex:2085
CompName:9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester \$\$ Oleic acid, methyl ester \$\$ Emery oleic acid ester 2301 \$\$ Methyl cis-9-octadecenoate \$\$ Methyl olei

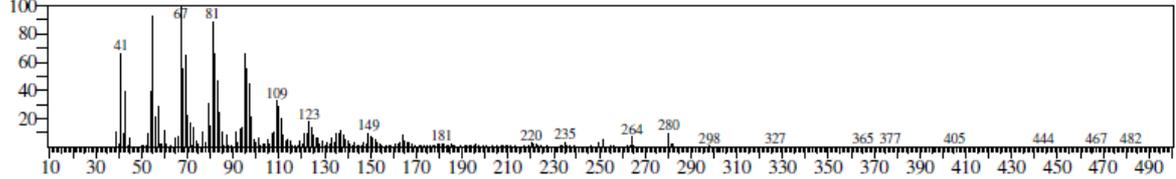


Hit#:5 Entry:127641 Library:NIST14.lib
SI:91 Formula:C19H36O2 CAS:2345-29-1 MolWeight:296 RetIndex:2085
CompName:8-Octadecenoic acid, methyl ester \$\$ Methyl 8-octadecenoate \$\$

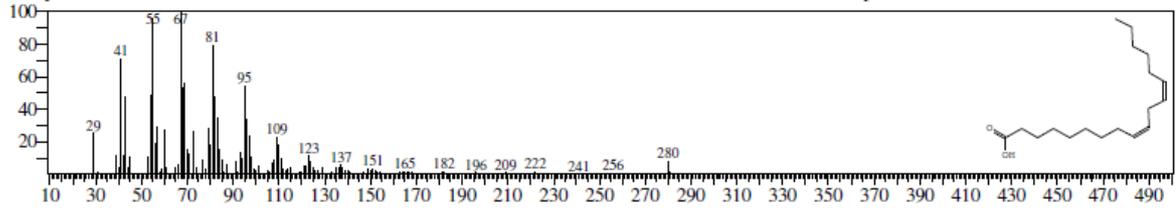


<< Target >>

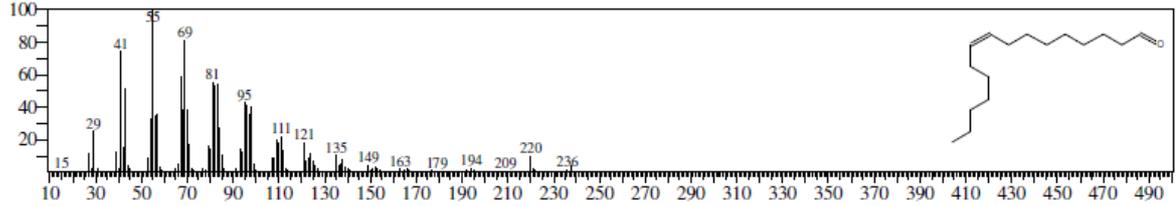
Line#:4 R.Time:13.570(Scan#:1915) MassPeaks:354
RawMode:Averaged 13.565-13.575(1914-1916) BasePeak:67.05(79398)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



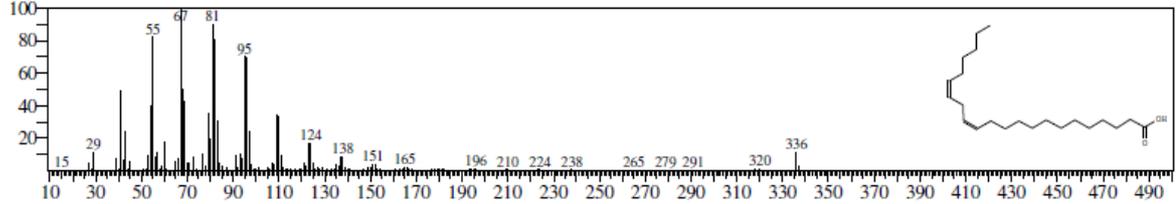
Hit#:1 Entry:26959 Library:NIST14s.lib
SI:91 Formula:C18H32O2 CAS:60-33-3 MolWeight:280 RetIndex:2183
CompName:9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- \$\$ cis-9,cis-12-Octadecadienoic acid \$\$ Grape seed oil \$\$ Linoleic \$\$ Linoleic acid \$\$



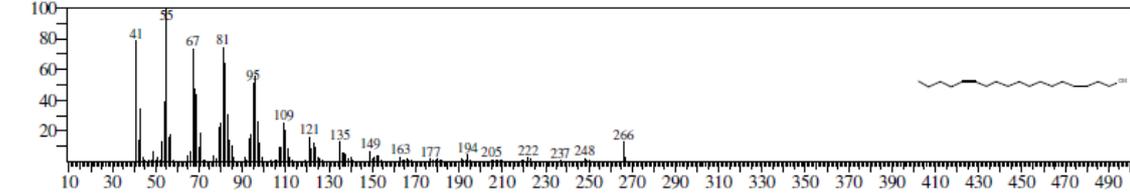
Hit#:2 Entry:77352 Library:NIST14.lib
SI:89 Formula:C16H30O CAS:56219-04-6 MolWeight:238 RetIndex:1808
CompName:cis-9-Hexadecenal \$\$ 9-Hexadecenal, (Z)- \$\$ (Z)-9-Hexadecenal \$\$ Z-9-Hexadecenal \$\$ (9Z)-9-Hexadecenal # \$\$



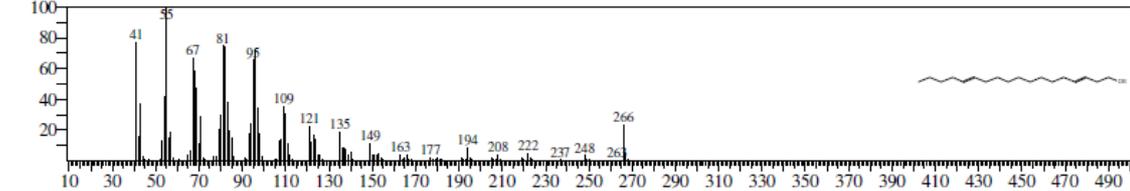
Hit#:3 Entry:163563 Library:NIST14.lib
SI:89 Formula:C22H40O2 CAS:7370-49-2 MolWeight:336 RetIndex:2580
CompName:cis-13,16-Docosadienoic acid



Hit#:4 Entry:101006 Library:NIST14.lib
SI:89 Formula:C18H34O CAS:0-00-0 MolWeight:266 RetIndex:2069
CompName:Z,Z-3,13-Octadecadien-1-ol \$\$ (3Z,13Z)-3,13-Octadecadien-1-ol # \$\$

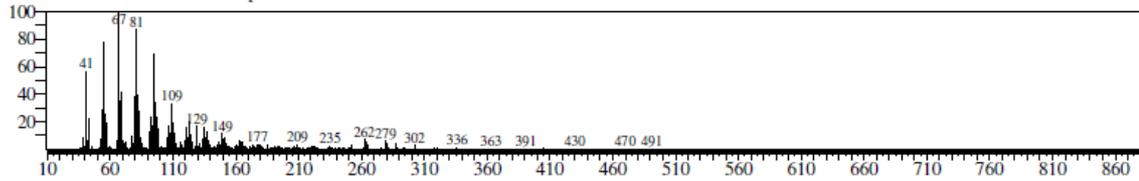


Hit#:5 Entry:101004 Library:NIST14.lib
SI:89 Formula:C18H34O CAS:0-00-0 MolWeight:266 RetIndex:2069
CompName:E,E-3,13-Octadecadien-1-ol \$\$ (3E,13E)-3,13-Octadecadien-1-ol # \$\$

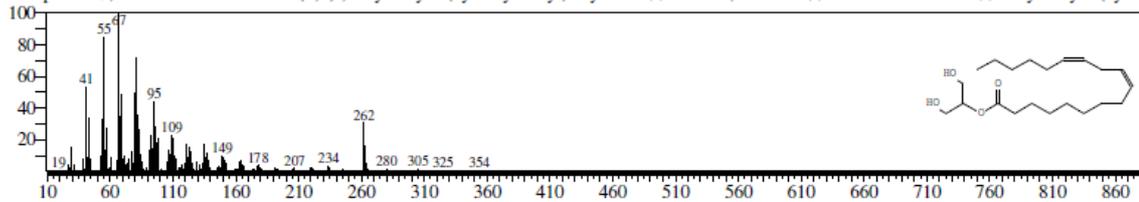


<< Target >>

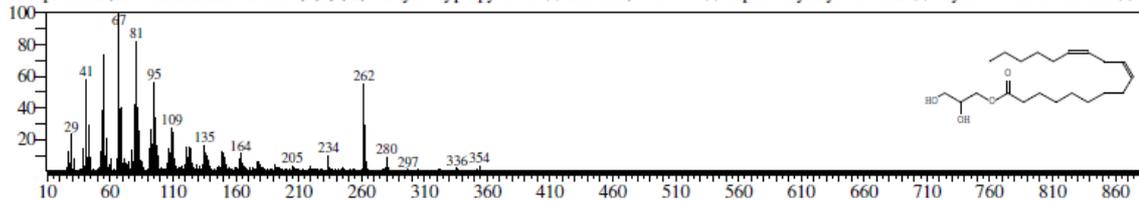
Line#:5 R.Time:14.765(Scan#:2154) MassPeaks:355
RawMode:Averaged 14.760-14.770(2153-2155) BasePeak:67.05(56488)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



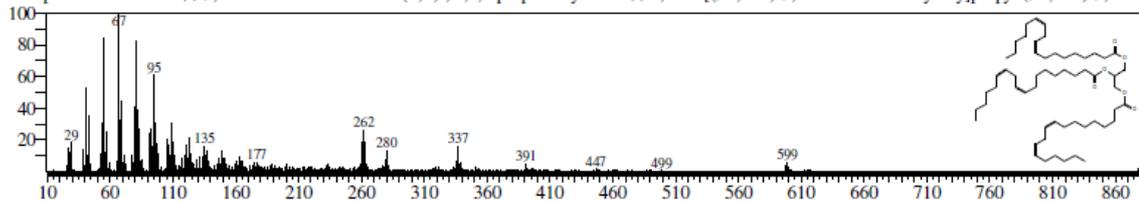
Hit#:1 Entry:31069 Library:NIST14s.lib
SI:91 Formula:C21H38O4 CAS:3443-82-1 MolWeight:354 RetIndex:2713
CompName:9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester \$\$ Linolein, 2-mono- \$\$.beta.-Monolinolein \$\$ 2-Hydroxy-1-(hydr



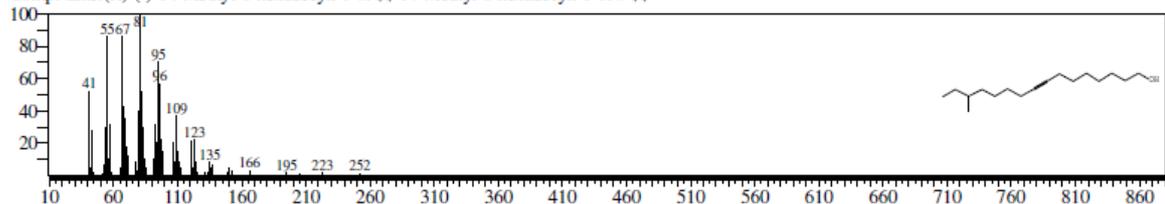
Hit#:2 Entry:177731 Library:NIST14.lib
SI:90 Formula:C21H38O4 CAS:2277-28-3 MolWeight:354 RetIndex:2697
CompName:9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 2,3-dihydroxypropyl ester \$\$ Linolein, 1-mono- \$\$.alpha.-Glyceril linoleate \$\$ Glycerol 1-monolinolate \$\$ I



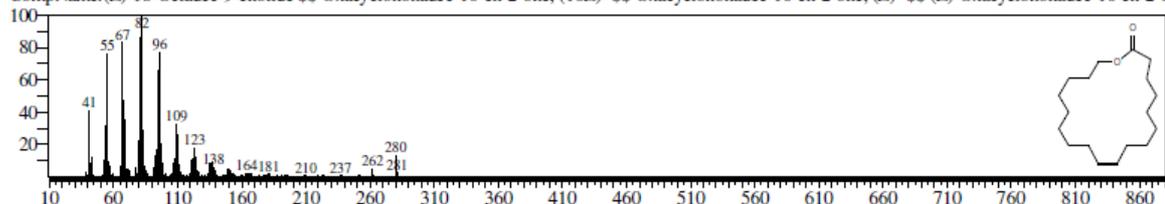
Hit#:3 Entry:242258 Library:NIST14.lib
SI:90 Formula:C57H98O6 CAS:537-40-6 MolWeight:878 RetIndex:6173
CompName:Trilinolein \$\$ 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 1,2,3-propanetriyl ester \$\$ 2,3-Bis[(9Z,12Z)-9,12-octadecadienoyloxy]propyl (9Z,12Z)-9,12-o



Hit#:4 Entry:89026 Library:NIST14.lib
SI:89 Formula:C17H32O CAS:64566-18-3 MolWeight:252 RetIndex:1907
CompName:(R)-(-)-14-Methyl-8-hexadecyn-1-ol \$\$ 14-Methyl-8-hexadecyn-1-ol# \$\$



Hit#:5 Entry:113262 Library:NIST14.lib
SI:89 Formula:C18H32O2 CAS:80060-76-0 MolWeight:280 RetIndex:0
CompName:(Z)-18-Octadec-9-enolide \$\$ Oxacyclonadec-10-en-2-one, (10Z)- \$\$ Oxacyclonadec-10-en-2-one, (Z)- \$\$ (Z)-Oxacyclonadec-10-en-2-o



ANEXO B – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "GOMA ARÁBICA E EUGENOL NA ANGIOGENESE INFLAMATÓRIA EM MODELO DE INÓCULO DE SÍLICA SUBCUTANEO EM RATAS WISTAR", protocolada sob o CEUA nº 9407070619 (00 001158), sob a responsabilidade de **Conceição Aparecida Dornelas e equipe; Bárbara de Araújo Lima Dutra; Conceição Aparecida Dornelas** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 08/08/2019.

We certify that the proposal "ARABIC GUM AND EUGENOL IN ANGIOGENESE INFLAMMATORY IN MODEL OF INACCLE OF SUBCUTANEOUS SILICA ON WISTAR RATS", utilizing 96 Heterogenics rats (96 females), protocol number CEUA 9407070619 (00 001158), under the responsibility of **Conceição Aparecida Dornelas and team; Bárbara de Araújo Lima Dutra; Conceição Aparecida Dornelas** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 08/08/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2019 a 12/2019**

Área: **Departamento de Patologia E Medicina Legal**

Origem: **Biotério Central da UFC**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

Idade: **10 a 18 semanas** N: **96**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **100 a 110 g**

Local do experimento: **Sala de Manuseio de animais do DPML**

Fortaleza, 08 de agosto de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará