



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ESTOMATOLOGIA

ELIANA CRISTINA FOSQUIERA

**AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOIDE DE
Geissospermum vellosii Allemão “PAU PEREIRA” NO
PROCESSO DE REPARO DE ÚLCERA BUCAL EM
RATOS**

Curitiba

2018

ELIANA CRISTINA FOSQUIERA

**AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOIDE DE
Geissospermum vellosii Allemão “PAU PEREIRA” NO
PROCESSO DE REPARO DE ÚLCERA BUCAL EM
RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann

Co-orientadora: Dr^a Ana Maria Trindade Gregio Hardy

Curitiba

2018

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

F749a
2018 Fosquiera, Eliana Cristina
Avaliação da fração alcaloide de *Geissospermum vellosii* Alemão "Pau pereira" no processo de reparo de úlcera bucal em ratos / Eliana Cristina Fosquiera; orientadora: Aline Cristina Batista Rodrigues Johann; co-orientadora: Ana Maria Trindade Gregio Hardy – 2018.
101 f.: il.; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba
2018
Inclui bibliografias

1. Estomatologia. 2. Úlceras orais – Tratamento. 3. Plantas medicinais.
4. Cicatrização de feridas. I. Johann, Aline Cristina Batista Rodrigues.
II. Hardy, Ana Maria Trindade Gregio. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDD 20. ed. – 617.63


TERMO DE APROVAÇÃO

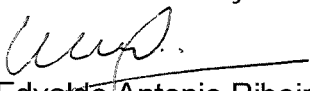
ELIANA CRISTINA FOSQUIERA


**AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOIDE DE *GEISSOSPERMUM VELLOSI* ALLEMÃO
(APOCYNACEAE) NO PROCESSO DE REPARO DE ÚLCERA BUCAL EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Estomatologia**.


Orientador (a):


Prof.ª Dr.ª Aline Cristina Batista Rodrigues Johann
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof.ª Dr.ª Elisa Souza Camargo
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof.ª Dr.ª Ana Maria Trindade Grégio Hardy
Estados Unidos, USA


Prof.ª Dr.ª Rafaela Scariot de Moraes
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UP

Curitiba, 09 de Abril de 2018.

Dedico aos meus pais a quem devo a minha formação e educação.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pois compreendo a existência de uma força maior, que me guiou em mais esta etapa de minha vida. Tenho a certeza que terei essa Tua força que me fará seguir em frente por qualquer caminho.

Ao meu pai **Hitalo** (*in memoriam*) que desde minha infância me proporcionou o melhor em meus estudos, sinto sua falta! A minha mãe **Cleonice** que sempre me incentivou a buscar os meus ideais. Nada do que eu possa dizer traduzirá a importância de vocês para me tornar a pessoa que sou hoje.

Ao meu filho **Davi** e meu esposo **Carlos** que compreenderam a minha ausência. Aos meus irmãos Giovana, Fabiana, Juliano e Júnior que me auxiliaram de uma forma ou outra nestes anos de doutorado.

A **Mari Paese**, que me acolheu como irmã em sua casa em todos esses anos do doutorado. Importantes foram as suas palavras de estímulo, frente ao meu cansaço das viagens semanais! A sua grandiosa força perante o enfrentamento da sua doença me levou a repensar o que realmente importa na vida de cada um nós. A Você pertence boa parte desta vitória.

À **Emanuela Carla dos Santos** pela disposição em ajudar na realização deste trabalho, obrigada pelo companheirismo e amizade, convivência e apoio em todos os momentos.

A minha orientadora **Professora Dra. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann**, agradeço pela acolhida na orientação da minha tese, pelo modo especial que trata seus alunos, por sua paciência em transmitir seu conhecimento de forma clara e com muita boa vontade em todos os momentos. Obrigada pela sua compreensão!

A minha co-orientadora **Professora Dra. Ana Maria Trindade Grégio Hardy**, agradeço pela orientação e por todo conhecimento transmitido.

À **Profª. Drª. Evelise Machado de Souza**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, por proporcionar oportunidades e condição de trabalho.

A **todos os professores** do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia da PUCPR, pelos conhecimentos transmitidos e pela grande disposição em colaborar.

À **Pontifícia Universidade Católica do Paraná**, pela oportunidade e incentivo ao crescimento profissional e pessoal.

Aos **profissionais do Laboratório de Patologia Experimental** da Escola de Medicina da PUCPR, pela disponibilidade e eficiência para realização das etapas laboratoriais.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES)** do Ministério da Educação e Cultura, pelo apoio financeiro para a realização deste Doutorado.

A **todos os colegas do doutorado**, obrigada pela aprendizagem e troca de experiências. A construção do conhecimento não é um caminho solitário. Ao contrário, é um acúmulo de informações, percepções, acertos, aprendizagens, que estão sempre envolvendo diversos personagens.

À **secretária Neide Reis Borges** do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pelo seu excelente trabalho.

A todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram no alcance deste objetivo. Muito obrigada!

Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, mas capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer é algo que só depende da nossa vontade e perseverança.

Albert Einstein

SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS	11
Página título.....	11
Resumo.....	13
Introdução.....	14
Material e Método.....	16
Resultados	22
Discussão.....	23
Referências	26
Tabelas e Figuras.....	30
ARTIGO EM INGLÊS	37
Title Page.....	37
Abstract.....	39
Introduction.....	40
Material and Method.....	42
Results.....	47
Discussion.....	48
References	52
Tables and Figures.....	56
ANEXOS	63
Parecer do Comitê de Ética	63
Análise Estatística.....	64
Normas para publicação	96

1 **ARTIGO EM PORTUGUÊS**

2 **Página Título**

3 **Título**

4 Avaliação da fração alcaloide de *Geissospermum vellosii* Allemão “Pau Pereira” no processo
5 de reparo de úlcera bucal em ratos

6

7 **Autores**

8 Eliana Cristina Fosquiera, Emanuela Carla dos Santos, Aline Pagani, Cassianne Cordeiro,
9 Josiane de Fátima Gaspari Dias, Obdúlio Gomes Miguel, Camila Klocker Costa, Lúcia Noronha,
10 Patricia Vida Cassi Bettega, Seigo Nagashima, Marina Luise Viola de Azevedo, Sérgio
11 Aparecido Ignácio, Yusuf S. Althobaiti, Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, Ana Maria
12 Trindade Gregio Hardy

13

14 **Afiliações dos Autores**

15 ECF, ECS, AP, CC, SAI and ACRBJ – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Escola de
16 Ciências da Vida, Departamento de Odontologia, Curitiba, PR, Brasil

17 SN, MLVA, LN – Laboratório de Patologia, Escola de Medicina, Pontifícia Universidade
18 Católica do Paraná, Escola de Ciências da Vida, Curitiba, PR, Brasil

19 AMTGH - University of Toledo, College of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,
20 Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Toledo, OH

21 YA - Taif University, College of Pharmacy, Department of Pharmacology and Toxicology, Taif,
22 Saudi Arabia

23 JFGD, OGM, CKC- Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Curitiba, PR,
24 Brasil.

1 *Geissospermum vellosii* Allemão no reparo de úlcera bucal

2

3 *Autora Correspondente:

4 Profa. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann. PhD

5 Coordenadora do Curso de Odontologia

6 Pontifícia Universidade Católica do Paraná

7 Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho 80.215-901 Curitiba, PR, Brasil.

8 Telefone: +55 41 3271-1448 Fax: +55 41 3271-1405

9 E-mail: alinecristinabatista@yahoo.com.br

10

11

12 Número de Páginas: 24

13 Número de tabelas: 2

14 Número de Figuras: 5

15 Número de Referências: 33

16 Palavras Resumo: 250

17 Palavras Introdução: 528

18 Palavras Discussão: 881

19

20

21

22

23 Recomendado para publicação: Drug Discovery and Translational Medicine

24

1 **Resumo**

2 A ação da fração alcaloide de *Geissospermum vellosii* Allemão, “Pau pereira”, no processo de
3 reparo de ulcerações bucais em ratos foi avaliada. Foram induzidas mecanicamente, por meio de
4 um micropunch de 4.0 mm, úlceras em dorso de língua de 48 ratos machos Wistar, tratados com
5 30mg/kg-50µL da solução da fração alcaloide de *G. vellosii* (grupo Pau pereira) ou com
6 dimetilsulfóxido (grupo DMSO), duas vezes/dia, sendo os animais eutanasiados após 2, 7, 14 e
7 21 dias. A língua foi processada e embebida em parafina. Foram obtidas lâminas coradas com
8 hematoxilina-eosina, Picrosirius Red e submetidas à imunohistoquímica para metaloproteinase
9 1 (MMP-1) e 8 (MMP-8), interleucina 6 (IL-6). As imagens foram capturadas e analisadas em
10 programa de morfometria obtendo-se o número de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos; a
11 porcentagem de colágeno I; e a porcentagem da área imunopositiva para MMP-1, MMP-8 e IL-
12 6 (área/tecido conjuntivo). Os testes Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, ANOVA dois critérios e
13 Games-Howell foram utilizados com significância de 5%. As úlceras tratadas pela fração
14 alcaloide de *G. vellosii* em comparação com DMSO apresentaram mais macrófagos e
15 fibroblastos aos 2 dias; maior expressão de MMP-8 e IL-6 aos 7 dias; menos neutrófilos e
16 macrófagos, mais fibroblastos, colágeno tipo I, MMP-1 e IL-6 aos 14 dias; menos neutrófilos e
17 MMP-8, mais macrófagos e fibroblastos aos 21 dias. Estes achados sugerem que a maior
18 expressão de MMP-1, MMP-8 e IL-6 modularam a maior deposição do colágeno I em estágio
19 precoce da cicatrização, conferindo maior resistência à ferida, com o uso da fração alcaloide de
20 *G. vellosii*.

21 Palavras-chave: *Geissospermum vellosii*. Úlcera Bucal. Cicatrização de ferida.

1 **Introdução**

2 As ulcerações bucais afetam aproximadamente 25% da população mundial. São
3 alterações dolorosas e impactam negativamente na qualidade de vida das pessoas (Scully, Porter,
4 2008). Os corticosteroides tópicos são os fármacos tradicionais utilizados para o tratamento das
5 úlceras bucais, porém, tratam apenas os sintomas e não reduzem o tempo de cicatrização (Kumar
6 et al., 2004; Martins et al., 2009).

7 A cicatrização da ferida na mucosa bucal é um processo complexo que envolve a ativação
8 e interação celular e molecular nos estágios coagulatório, inflamatório, proliferação e migração
9 celular, deposição de matriz extracelular, epitelização, contração da ferida e remodelação do
10 tecido (Vyas, Vasconez, 2014; Basso et al., 2016). Durante este processo, o colágeno tipo III
11 (imaturo) é inicialmente sintetizado no local da injúria, sendo substituído no decorrer do tempo
12 da cicatrização, pelo colágeno tipo I (maduro) que proporciona resistência à ferida (Antonio,
13 2005).

14 A concentração de citocinas e metaloproteinases da matriz (MMPs) são fatores locais
15 que podem influenciar os estágios da cicatrização (Joshi et al., 2016). Esta interleucina, um
16 biomarcador inflamatório, é uma citocina multifuncional que participa nas respostas
17 inflamatórias (Sims et al., 2016) e imunes, sendo produzida por monócitos, macrófagos, células
18 endoteliais, fibroblastos, células T e B ativadas (Sun et al., 2002; Gill et al., 2008). É liberada
19 primeiramente pelos macrófagos e linfócitos em resposta à injúria e tem papel importante na
20 cicatrização de ferida, demonstrando também indução e proliferação de fibroblastos (Xue et al.,
21 2000).

22 As principais MMPs envolvidas na reparação de feridas são as collagenases MMP-1,
23 MMP-8 e MMP-13, que degradam a matriz extracelular, atuam na proliferação dos vasos
24 sanguíneos, na remodelação do tecido conjuntivo e na regulação da atividade dos fatores de

1 crescimento. Essas MMPs são secretadas principalmente, por neutrófilos, queratinócitos,
2 macrófagos e fibroblastos (Gajendrareddy et al., 2013).

3 Assim como na mucosa gástrica (Falcão et al., 2008; Li et al., 2016), a incorporação de
4 extratos de plantas medicinais, no desenvolvimento de medicamentos que auxiliem no processo
5 de cicatrização tecidual, pode ser uma alternativa de tratamento às úlceras bucais (Mendes et al.,
6 2008; Bettega et al., 2011; Silva et al., 2017).

7 A espécie *Geissospermum vellosii* Allemão, árvore comumente conhecida como Pau
8 pereira e amplamente encontrada em toda a floresta amazônica. É fonte de alcaloides indólicos
9 monoterpênicos, responsáveis por atividades terapêuticas antinociceptiva, antimicrobiana,
10 antimalária, anticancerígena e anti-inflamatória (Mbeunkui et al., 2012; Camargo et al., 2013;
11 Ramos et al., 2017).

12 Apesar dos alcaloides presentes nas cascas do Pau pereira apresentarem inúmeras
13 atividades biológicas, dentre elas anti-inflamatória (Lima et al., 2016), ao nosso conhecimento,
14 não existem estudos que avaliem a fração alcaloide do Pau pereira na cicatrização de úlceras na
15 mucosa bucal. Considerando que estas ulcerações são comuns, causam muita dor e desconforto
16 ao indivíduo (Compilato, 2009; Sukhitashvili et al., 2012), aliado à ausência de estudos da
17 verificação das atividades biológicas dos alcaloides de *G. vellosii* Allemão em lesões da mucosa
18 bucal, avaliou-se, o efeito cicatrizante da fração alcaloide dessa planta medicinal em úlceras no
19 dorso da língua em ratos. Para tanto, foram analisadas quantitativamente as células envolvidas
20 na inflamação e no processo de reparo tecidual, os neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, bem
21 como a expressão de colágeno tipo I e a imunoexpressão de MMP-1, MMP-8 e IL-6,
22 biomarcadores envolvidos no reparo.

23

24

25

1 **Material e Método**

2 **Vegetal**

3 As cascas da espécie vegetal *Geissospermum vellosii* Allemão (Apocynaceae) foram
4 adquiridas da empresa Quimer Ervas e Especiarias Comercial Ltda (SP – Brasil). A identificação
5 ocorreu por meio de comparação com espécies registradas no Museu Botânico de Curitiba, sob
6 número 36060 (Curitiba, Brasil).

7 **Obtenção da fração alcaloide de *G. vellosii* Allemão**

8 O processo de extração do extrato etanólico bruto (EB) das cascas da planta, suas frações
9 diclorometano (FDCM), acetato de etila (FAE), butanol (FB) e hidroalcoólica remanescente
10 (FHA), bem como o isolamento e a identificação de substâncias alcaloides na fração
11 diclorometano, foram realizados conforme Dias, 2012. A figura 1, apresenta o desenho
12 experimental do estudo de Dias, 2012 para obtenção do EB, das frações FDCM, FAE, FB e
13 FHA, isolamento e identificação das substâncias na FDCM. A figura 2 apresenta as estruturas
14 moleculares das substâncias (1) Lupeol, (2) Sesamina e (3) Aspidospermina isoladas da fração
15 diclorometano de *G. vellosii*, compondo assim, a fração alcaloide que foi utilizada no
16 experimento com os animais desta pesquisa.

17 **Animais**

18 A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA -
19 01043/2016- PUCPR), seguindo, durante todo o experimento, as normas estabelecidas pelo
20 Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, bem como a
21 normatização da PUCPR. Foram utilizados 48 ratos Wistar machos, com idade entre 45 e 50
22 dias e massa corporal de aproximadamente 200 gramas, do Biotério Central da Pontifícia
23 Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil. Os animais foram alimentados com
24 Nuvilab® CR-1 (Nuvital Nutrientes S A – Quimtia, Colombo, PR, Brasil) e água *ad libitum*,
25 com ciclo de luz escura de 12 horas à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

1 **Indução de úlceras**

2 A úlcera na cavidade bucal foi induzida mecanicamente na região central do dorso da
3 língua, sendo os animais previamente anestesiados com Thiopentax® (Tiopental Sódico
4 30mg/kg, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil), via
5 intraperitoneal. Utilizando um instrumental de corte cilíndrico - *punch* de 4,0 mm de diâmetro,
6 Richter® R-806-9-4, (Richter Instrumentos Cirúrgicos Ltda, SP, Brasil) a úlcera foi induzida
7 realizando-se movimentos de rotação e pressão com o instrumento, aprofundando-o até perceber
8 resistência (Alonso et al., 2008) e atingir a marcação feita no instrumento para padronizar a
9 profundidade de 2mm. Os animais receberam dipirona sódica via intramuscular 20 mg /kg
10 (Boehringer Ingelheim® do Brasil Química e Farmacêutica Ltda, Itapeverica da Serra, SP,
11 Brasil), durante os primeiros quatro dias, duas vezes ao dia, após a indução da úlcera.

12 **Tratamento Experimental**

13 Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupo Pau pereira (experimental),
14 tratado com a solução alcaloide das cascas de *G. vellosii* (0,0003% de Lupeol, 0,0001% de
15 Sesamina e 0,0075% de Aspidospermina) e grupo controle, que recebeu a solução de
16 dimetilsulfóxido - DMSO (Galena®, Campinas, SP, Brasil) sendo ainda subdivididos em cada
17 grupo, conforme o tempo de tratamento, 2, 7, 14 e 21 dias (Figura 3). Estes, foram tratados com
18 duas doses diárias (30 mg / kg) de 50 microlitros de solução tópica alcaloide de *G. vellosii*. As
19 aplicações foram realizadas com aplicador microbrush descartável (Microbrush® International,
20 Grafton, WI, USA). Os animais foram eutanasiados por overdose de Thiopentax® (Tiopental
21 sódico 100mg/kg, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil), via
22 intraperitoneal, aos 2, 7, 14 e 21 dias.

23 **Coloração dos cortes histológicos**

24 As línguas foram removidas com lâmina de bisturi número 15 e os espécimes
25 fixados em formalina a 10% durante 24 horas. Após este tempo, os espécimes foram seccionados

1 na linha média do dorso, no sentido longitudinal, processados e emblocados em parafina. Os
2 cortes foram diafanizados e corados com hematoxilina - eosina (HE) e Picrosirius Red (SR). A
3 delimitação da área da úlcera (lesão em toda sua extensão), foi realizada com caneta para
4 retroprojeto azul 1.0 mm (Pilot do Brasil®, São Paulo, SP, Brasil) e as amostras foram extraídas
5 usando uma broca trefina (Neodent®, Curitiba, PR, Brasil), com 3 mm de diâmetro, acoplada
6 em um motor de suspensão de 130 watts de Bethil (Prometal® Ind. Met. LTDA, Marília, SP,
7 Brasil) sendo então posicionadas de acordo com o mapa cartesiano, previamente elaborado, com
8 a localização de cada amostra para TMA (tissue microarray).

9 **Análise Quantitativa das Células**

10 Na coloração HE, as imagens de toda área ulcerada foram capturadas em uma
11 magnificação de 200x, por um observador, usando a microcâmera Dinolite® acoplada ao
12 microscópio binocular OLYMPUS BX-50. Os neutrófilos, macrófagos e fibroblastos foram
13 calculados usando o recurso "Criar ponto" do software UTHSCSA Image Tool versão 3.0 para
14 Microsoft Windows (Oliveira, Vasconcelos, 2012) e o número foi dividido pelo número de
15 imagens. Os neutrófilos foram identificados pelo seu padrão de núcleo polimórfico; macrófagos
16 pela superfície irregular, oval ou núcleo em forma de rim e excêntricos; fibroblastos pela forma
17 alongada, com algumas expansões citoplasmáticas que se estendem para fora da célula e com
18 citoplasma basófilo (Garros et al., 2006).

19 **Análise do Colágeno**

20 Nos cortes corados com SR, quatro imagens aleatórias foram capturadas em um
21 microscópio Olympus BX-50 equipado com lente polarizada Olympus® U-Pot e microcamera
22 Dinolite® com ampliação de 200x, por um único observador. Os parâmetros de aquisição de
23 imagem foram padronizados durante o processo de captura de imagem. As fibras colágenas do
24 tipo I e III apresentam diferenças na coloração sob polarização. Contra um fundo preto, o
25 colágeno tipo I (maduro) apresenta fibras espessas com cor vermelho-laranja, enquanto o tipo

1 III (imaturo) tem fibras finas verde-amareladas (Garros et al., 2006; Lima et al., 2009). As
2 imagens foram analisadas com o auxílio do programa Image ProPlus™ 4.5 (Media Cybernetics,
3 Silver Spring, MD), no qual após a segmentação da imagem foi realizada a mensuração
4 automática da porcentagem de colágeno tipo I. Os valores finais foram determinados a partir da
5 média de quatro campos.

6 **Reação Imunohistoquímica para MMP-1, MMP-8 e IL-6**

7 Os cortes histológicos foram desparafinados (xileno, Biotec, Curitiba, PR, Brasil),
8 hidratados (álcool na diminuição soluções, Biotec®, Curitiba, PR, Brasil) e incubados em
9 solução de peróxido de hidrogênio (Biotec®, Curitiba, PR, Brasil) e metanol 5% (Biotec®,
10 Curitiba, PR, Brasil). Este material foi submetido para a recuperação de antígeno com Immuno
11 Retrifer (Dako® Carpinteria, CA, USA), seguido por incubação com anti-MMP-8 (clone:
12 EP1252Y Abcam, Cambridge, UK); com anti-MMP-1 (clone: EP1247Y Abcam, Cambridge,
13 UK) e com anti-IL6 (clone: ab9324 Abcam, Cambridge, UK) a 4 ° C durante a noite. A diluição
14 do anticorpo em diluente de anticorpo es (Dako® Carpinteria, CA, USA código S302283) foi de
15 1: 200 para a MMP-8, MMP-1 e IL-6. A detecção foi realizada com Advance Link (Dako®
16 Carpinteria, CA, USA código K406889), seguido pela enzima Dako Advance (Dako®
17 Carpinteria, CA, USA código K406889), e por cromogênio 3,3'-tetraidrocloro de
18 diaminobenzidina (DAB - Sigma Chemical®, St. Louis, MO código D7679). As lâminas foram
19 contra-coradas por hematoxilina de Harris (Biotec®, Curitiba, PR, Brasil), desidratadas (etanol)
20 e diafanizadas (xileno). Para controle negativo omitiu-se o anticorpo primário e como controle
21 positivo a placenta humana foi utilizada para MMP-1 e MMP-8 e pele humana inflamada para
22 IL-6.

23 **Análise da Imunoexpressão**

24 Utilizando o escaner de lâminas Zeiss Axio Scan.Z1 (Zeiss®, Oberkochen, Alemanha)
25 as lâminas foram escaneadas e analisadas por um observador. Foram capturadas imagens de cada

1 corte abrangendo toda a extensão da úlcera por meio do programa ZEN 2 (Blue Edition® Carls
2 Zeiss Microscopia GmbH, 2011), na magnificação de 200X. O tecido epitelial, as fibras
3 musculares, o tecido adiposo e os artefatos presentes em cada imagem, foram removidos com
4 Adobe Photoshop® CS6 extended version 13.0 (Jive an Aurea Company®, Foster City, CA,
5 USA). Considerou-se como imunopositivas, as estruturas ou células coradas em marrom. Para a
6 análise das imagens, utilizou-se o software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics®, Silver
7 Spring, MD, USA) e as medidas foram obtidas por segmentação da área de MMP-1, MMP-8 e
8 IL-6 em micrometros quadrados e da área total de tecido conjuntivo. A fórmula (1) abaixo, foi
9 utilizada para calcular a percentagem de área imunopositiva:

$$10 \quad \frac{\text{Área imunopositiva} * 100}{\text{Área Total} (\mu\text{m}^2)} (1)$$

11 Para a obtenção da percentagem de área imunopositiva final, foi calculada a média de
12 todos os valores encontrados das imagens em cada animal.

13 **Análise estatística**

14 Na análise estatística foi utilizado o programa IBM SPSS Statistics 23.0 (SPSS Inc,
15 Chicago, IL, USA).

16 O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi realizado, no qual observou-se que
17 as variáveis neutrófilos, fibroblastos e colágeno I apresentavam distribuição normal e
18 macrófagos, não normais. Para todas as variáveis, com exceção dos macrófagos, para comparar
19 os valores médios da variável nos grupos que apresentaram diferença estatisticamente
20 significante, o teste ANOVA foi aplicado a dois critérios: modelo fatorial completo. O teste de
21 homogeneidade de variância de Levene revelou que a variável apresentava variância
22 heterogênea. Portanto, as comparações entre os grupos foram feitas usando o teste de
23 comparação paramétrica múltipla da Games-Howell. Para a variável macrófagos, para comparar
24 os valores médios da variável nos grupos que apresentaram diferença estatisticamente

1 significante, foi usado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e as comparações entre os
2 grupos foram realizados com Mann-Whitney.

3 Foi realizado o Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk, no qual se observou que as
4 variáveis MMP-1, MMP-8 e IL-6, apresentaram distribuição normal. Por isto, visando comparar
5 os valores médios da variável nos grupos que apresentaram diferença estatisticamente
6 significante realizou-se o teste ANOVA a dois critérios modelo fatorial completo. O teste de
7 homogeneidade de variâncias de Levene revelou que a variável apresentou variância
8 heterogênea. Portanto, as comparações entre os grupos foram feitas utilizando-se o teste de
9 comparações múltiplas paramétricas de Games-Howell. O nível de significância adotado em
10 todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$).

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 **Resultados**

2 **Análise Quantitativa das Células e Colágeno**

3 O grupo Pau pereira em comparação com o grupo DMSO mostrou mais macrófagos e
4 fibroblastos aos 2 dias ($p < 0,05$). Aos 7 dias, não houve diferença estatística entre o grupo Pau
5 pereira e DMSO, tanto para o colágeno tipo I, quanto para as células ($p > 0,05$). Observou-se
6 menos neutrófilos, menos macrófagos, mais fibroblastos aos 14 dias ($p < 0,05$). Menos
7 neutrófilos, menos macrófagos e mais fibroblastos foram detectados aos 21 dias ($p < 0,05$). A
8 avaliação de colágeno revelou que houve maior expressão porcentual de colágeno tipo I no grupo
9 que recebeu a fração de Pau pereira, quando comparado ao grupo DMSO aos 14 dias ($p < 0,05$)
10 (tabela 1). Destaca-se que houve maior número de fibroblastos aos 2, 14 e 21 dias no grupo Pau
11 pereira comparado com o DMSO ($p < 0,05$).

12 **Análise da Imunoexpressão de MMP-1, MMP-8 e IL-6**

13 A expressão de MMP-8 foi maior no grupo Pau pereira quando comparado ao grupo
14 DMSO aos 7 dias ($p < 0,05$). O inverso ocorreu aos 21 dias, sendo a percentagem de expressão
15 de MMP-8 significativamente menor no grupo Pau pereira quando comparado ao grupo DMSO
16 ($p < 0,05$). A expressão de MMP-1 foi menor no grupo DMSO, quando comparado ao grupo Pau
17 pereira aos 14 dias ($p < 0,05$). A IL-6 apresentou maior expressão aos 7 e 14 dias no grupo Pau
18 pereira quando comparado ao grupo DMSO ($p < 0,05$). O mesmo foi observado aos 14 dias no
19 grupo Pau Pereira quando comparado ao grupo DMSO ($p < 0,05$) (tabela 2).

20

21

22

23

24

25

1 **Discussão**

2 Este estudo revelou pela primeira vez na literatura que úlceras tratadas pela fração
3 alcaloide de *Geissospermum vellosii* Allemão em comparação com DMSO apresentaram mais
4 macrófagos e fibroblastos aos 2 dias; maior expressão de MMP-8 e IL-6 aos 7 dias; menos
5 neutrófilos e macrófagos, mais fibroblastos, colágeno tipo I, MMP-1 e IL-6 aos 14 dias; menos
6 neutrófilos e MMP-8, mais macrófagos e fibroblastos aos 21 dias. Estes achados sugerem que a
7 maior expressão de MMP-1, MMP-8 e IL-6 modulam a deposição do colágeno I em estágio
8 precoce da cicatrização, conferindo maior resistência à ferida.

9 Verificamos que após 2 dias, houve maior quimiotaxia de macrófagos no grupo tratado
10 com Pau pereira, e após esse período, o número foi reduzido consecutivamente até o final do
11 experimento aos 21 dias. Os macrófagos são células preponderantes na fagocitose na ferida. O
12 fato deles estarem em maior quantidade logo no início do período de observação, sugere que
13 alcaloides da planta podem interferir na quimiotaxia de macrófagos, ocasionando maior
14 infiltração dos mesmos em um período mais precoce (Corrêa et al., 2017).

15 Os macrófagos são células que regulam a fase inflamatória do reparo, liberando fatores
16 de crescimento e citocinas, como PDGF (fator de crescimento derivado de plaqueta), TGF- β
17 (fator de crescimento tumoral beta), β -FGF (fator de crescimento fibroblatos-beta, TNF- α (fator
18 de necrose tumoral alfa), IL-1 (interleucina-1) e IL-6 (interleucina-6), que ajudam na fase
19 proliferativa da cicatrização, por induzirem a proliferação de fibroblastos (Patel et al., 2016).
20 Assim, quanto mais macrófagos, maior a liberação de fatores de crescimento e citocinas, que
21 atuam sobre a migração e proliferação de fibroblastos. O número de fibroblastos teve maior
22 aumento no grupo que recebeu os alcaloides. Após 14 dias de observação, o número observado
23 de fibroblastos foi duas vezes maior no grupo Pau pereira em comparação com o grupo DMSO.
24 Esse aumento no número de fibroblastos sugere efeito cicatrizante do Pau pereira, pois estas
25 células sintetizam a matriz de colágeno. Portanto, o aumento dos fibroblastos,

1 consequentemente, levará ao aumento da produção de colágeno (Martins et al., 2009; Werner et
2 al., 2009). Aos 14 dias no grupo Pau pereira, houve maior área de colágeno tipo I, que é um
3 colágeno maduro, que confere maior resistência à ferida no estágio inicial do processo de
4 cicatrização, reforçando os achados da ação reparadora dessa fração em nosso modelo
5 experimental.

6 A maior expressão de IL-6 aos 7 e 14 dias verificado no grupo Pau pereira, corrobora
7 com o maior número de fibroblastos aos 14 e 21 dias e maior deposição de fibras colágenas I no
8 grupo Pau pereira aos 14 dias, pois uma das várias funções da IL-6, inclui a de promover a
9 migração e proliferação de fibroblastos (Patel et al., 2016). Assim, IL-6 influenciou na migração
10 e proliferação de fibroblastos, que depositaram colágeno tipo I precocemente no processo de
11 reparo.

12 A MMP-1 é a collagenase responsável pela degradação do colágeno tipo III. Durante o
13 processo de uma injúria, normalmente ela é produzida e secretada em estágios mais tardios, na
14 fase de remodelação da cicatrização (Armstrong, Jude, 2002). Porém, neste estudo, verificou-se
15 a maior expressão de MMP-1 aos 14 dias no grupo Pau pereira. Este fato sugere um efeito
16 cicatrizante da fração de Pau Pereira que acelerou a degradação do colágeno tipo III em fase
17 precoce do processo de cicatrização, por meio da MMP-1. Esta metaloproteinase, tem maior
18 predileção por degradar o colágeno imaturo (Armstrong, Jude, 2002), o que permitiu a
19 substituição do mesmo por colágeno tipo I, conferindo maior resistência à ferida aos 14 dias.
20 Este resultado está associado ao aumento da expressão de MMP-8 aos 7 dias, no grupo Pau
21 pereira, que se equivaliu aos 14 dias e reduziu aos 21 dias quando comparado ao grupo DMSO.

22 Pesquisas sobre o papel das metaloproteinases na cicatrização, apontam que
23 concentrações mais altas de MMP-8, como visto no grupo Pau pereira aos 7 dias, são necessárias
24 na ferida nesta etapa para atuar na remodelação da matriz extracelular (Nwomeh et al., 1999).
25 Este quadro sugestivo da aceleração da remodelação pela MMP-8 aos 7 dias associada com

1 maior expressão da MMP-1 aos 14 dias permitiu maior expressão de colágeno tipo I (colágeno
2 mais resistente) aos 14 dias no grupo Pau pereira, quando comparado ao grupo DMSO. Desta
3 forma, a fração alcaloide de *Geissospermum vellosii* Allemão, Pau pereira, acelerou o processo
4 de remodelação proporcionando maior deposição de colágeno tipo I, conferindo resistência à
5 ferida em estágio precoce. Aos 21 dias a queda da MMP-8 também indica a aceleração o
6 processo de remodelação, pois neste período não há mais necessidade de maior síntese de MMP-
7 8.

8 Estudos precisam ser realizados com a finalidade de elucidar o mecanismo de ação da
9 fração alcaloide do Pau pereira, para verificar como ocorre a interação com a MMP-1, MMP-8
10 e IL-6 na cicatrização de feridas bucais frente ao tratamento com os alcaloides em estudos
11 clínicos, já que o presente estudo foi realizado em animais.

12 Os resultados evidenciaram que a fração alcaloide de *Geissospermum vellosii* Allemão
13 Pau pereira, é um agente promissor para o tratamento de lesões ulceradas em mucosa bucal, pois
14 facilita o processo de cicatrização de úlceras em línguas de ratos. Isto se deve, pelo menos em
15 parte à maior expressão de MMP-8, MMP-1 e IL-6 que modulou a maior proliferação de
16 fibroblastos, com deposição do colágeno tipo I em um estágio precoce, conferindo maior
17 resistência à ferida.

18

19 **Agradecimentos**

20 Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
21 (CAPES) pela bolsa de doutorado.

22

23 **Conflito de interesse**

24 Os autores declaram não haver conflito de interesse.

25

1 **Referências**

- 2 Alonso FC, Jornet, PL, Torres MJJ, and Domingo AO (2008) Analysis of the histopathological
3 artifacts in punch biopsies of the normal oral mucosa. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **13**:
4 636-639.
- 5 Antonio FI. Aspectos macroscópicos e microscópicos da reparação de feridas cutâneas de
6 camundongos (swiss-vallée) tratadas com o creme de *Hyptis suaveolens* e *Croton urucurana*
7 Baill [theses]. Uberlândia: Faculdade de Medicina Veterinária – UFU; 2005.
- 8 Armstrong DG and Jude EB (2002) The role of matrix metalloproteinases in wound healing *J*
9 *Am Podiatr Med Assoc* **92**: 12-18.
- 10 Basso FG, Pansani TN, Turrioni APS, Soares DG, Souza Costa CA, and Hebling J (2016) Tumor
11 Necrosis Factor-Alpha and Interleukins Il-1 β , Il-6, and Il-8 Impair *in Vitro* Migration and
12 Induce Apoptosis of Gingival Fibroblasts and Epithelial Cells, Delaying Wound Healing. *J*
13 *Periodontol* **87**: 990-996.
- 14 Bettega PVC, Czlusniak GR, Piva R, Namba EL, Ribas CR, Grégio AMT, and Rosa EAR (2011)
15 Phytotherapy: from greenhouses to drugstore’s bench. *Arch Oral Res* **7**: 89-97.
- 16 Camargo MRM, Amorim RCN, Rocha e Silva LF, Carneiro ALB, Vital MJS, and Pohlit AM
17 (2013) Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum*
18 *Allemão* species (Apocynaceae Juss). *Fitos* **8**: 137-146.
- 19 Compilato D, Cirillo N, Termine N, Kerr AR, Paderni C, Ciavarella D, and Campisi G (2008)
20 Long-standing oral ulcers: proposal for a new ‘S-C-D classification system’ *J Oral Pathol*
21 *Med* **38**: 241–253.
- 22 Corrêa FRS, Schanuel FS, Moura-Nunes N, Monte-Alto-Costa A, and Daleprane JB (2017)
23 Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-
24 associated transcription factor NFkB. *Biomed Pharmacother* **86**:162–171.

1 Dias JFG. Fitoquímica e ensaios biológicos do extrato bruto etanólico, frações e substâncias
2 isoladas provenientes das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão (APOCYNACEAE)
3 [diploma theses]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2012

4 Falcão HS, Leite JA, Barbosa-Filho JM, Athayde-Filho PF, Chaves MCO, Moura MD, Ferreira
5 AL, Almeida ABA, Souza-Brito ARM, and Diniz MFFM, et al. (2008) Duodenal Antiulcer
6 Activity of Alkaloids: A Review. *Molecules* **13**: 3198-3223.

7 Gajendrareddy PK, Engeland CG, Junges R, Horan MP, Rojas IG, and Marucha PT (2013)
8 MMP-8 overexpression and persistence of neutrophils relate to stress-impaired healing and
9 poor collagen architecture in mice. *Brain Behav Immun* **28**: 44–48.

10 Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA, Araújo ACF,
11 Sains-Isolan PMB, Oliveira EM, Arruda ECM (2006) Extrato de *Passiflora edulis* na
12 cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cir
13 Bras* **21**: 55-65.

14 Gill SE and Parks WC (2008) Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound
15 healing. *Int J Biochem Cell Biol* **40**: 1334-47.

16 Joshi A, Joshi V, Pandey D, and Hemalatha S (2016) Systematic investigation of ethanolic
17 extract from *Leea macrophylla*: Implications in wound healing *J Ethnopharmacol* **191**:95–
18 106.

19 Kumar S, Singh RJ, and Reed AM (2004) Cushing’s syndrome after intra-articular and
20 intradermal administration of triam-cinolone acetonide in three pediatric patients.
21 *Pediatrics* **13**: 1820–1824.

22 Li W, Wang X, Zhang H, Zehong H, Zhi W, Liu F, Wang Y, and Niu X (2016) Anti-ulcerogenic
23 effect of cavidine against ethanol-induced acute gastric ulcer in mice and possible underlying
24 mechanism. *Int Immunopharmacol*: **38** 450–459.

1 Lima JA, Costa TW, Silva LL, Miranda AL, and Pinto AC (2016) Antinociceptive and anti-
2 inflammatory effects of a *Geissospermum vellosii* stem bark fraction. *An Acad Bras Cienc*.**88**:
3 237-48.

4 Lima CC, Pereira APC, Silva JRF, Oliveira LS, and Resck MCC et al. (2009) Ascorbic acid for
5 the healing of skin wounds in rats. *Braz J Biol* **69**: 1195-1201.

6 Martins MD, Marques MM, Bussadori SK, Martins MA, and Pavesi VC et al. (2009)
7 Comparative analysis between Chamomilla recutita and corticosteroids on wound healing.
8 An in vitro and in vivo study. *Phytother Res* **23**: 274-278.

9 Mbeunkui F, Grace MH, and Lila MA (2012) Isolation and structural elucidation of indole
10 alkaloids from *Geissospermum vellosii* by mass spectrometry. *J Chromatogr* **885– 886**: 83–
11 89.

12 Mendes AM, Vilela DCH, Jung MT, Okuyama SSK, Machado MAN, Soares de Lima AA,
13 Azevedo LR, and Grégio AMT (2008) Therapeutic effect of arnica ointment on cicatrization
14 process of aphthas and lesions in human oral mucosa. *Pharmacol* **3**: 273-280.

15 Nwomeh BC, Liang HX, Cohen K, and Yager DR (1999) MMP-8 Is the Predominant
16 Collagenase in Healing Wounds and Nonhealing Ulcers. *J Surg Res* **81**:189-195.

17 Oliveira de Sousa AT, Vasconcelos JMB, and Soares MJGO (2012) Software Image Tool 3.0 as
18 an instrument for measuring wounds. *J Nurs*. **6**:2569-2573.

19 Patel S, Maheshwari A, and Chandra A (2016) Biomarkers for wound healing and their
20 evaluation. *J Wound Care*. **25**: 46-55.

21 Ramos AEF, Alcover C, Evanno L, Maciuk A, Litaudon M, Duplais C, Bernadat G, Gallard JF,
22 Jullian JC, and Mouray E, et al. Revisiting Previously Investigated Plants: A Molecular
23 Networking-Based Study of *Geissospermum laeve* *J. Nat. Prod* doi:
24 10.1021/acs.jnatprod.6b01013.

- 1 Scully C and Porter S (2008) Oral mucosal disease: recurrent aphthous stomatitis. *Br J Oral*
2 *Maxillofac Surg* **46**: 198-206.
- 3 Silva KT, Biff LL, Souza FM, Gazim ZC, Fosquiera EC, and Boleta-Ceranto DCF (2017)
4 Evaluation of the ointment effect based on the *Copaifera* L. for the treatment of recurrent
5 mouth ulcerations. *IOSR-JDMS* **16**: 146-148.
- 6 Sims CR, Nguyen TC, and Mayeux PR (2016) Could Biomarkers Direct Therapy for the Septic
7 Patient? *J Pharmacol Exp Ther* **357**:228–239.
- 8 Sukhitashvili N, Imnadze I, Tabaghua G, Gogilashvili Q, and Amiranashvili I (2012)
9 Characterization of oral ulcer and pathological scar in nude mice model. *GeoRGIan Medical*
10 *News* **4**: 82-87.
- 11 Sun A, Chia JS, Chang YF, and Chiang CP (2002) Serum interleukin-6 level is a useful marker
12 in evaluating therapeutic effects of levamisole and Chinese medicinal herbs on patients with
13 oral lichen planus. *Oral Pathol Med* **31**: 196–203.
- 14 Vyas KS and Vasconez HC (2014) Wound Healing: Biologics, Skin Substitutes, Biomembranes
15 and Scaffolds *Healthcare* **2**: 356-400.
- 16 Werner JAT, Oliveira SM, Martins DF, and Mazzardo L (2009) Evidence for a Role of 5-Ht 1a
17 Receptor on Antinociceptive Action from *Geissospermum Vellosii*. *J Ethnopharmacol.*
18 **125**:163-169.
- 19 Xue H, McCauley RL, and Zhang W (2000) Elevated Interleukin-6 Expression in Keloid
20 Fibroblasts. *J Surg Res* **89**: 74-77.

21
22
23
24

1 **Tabela 1** Percentagem de expressão de colágeno do tipo I e o número de fibroblastos, neutrófilos
 2 e macrófagos nos grupos Pau pereira (experimental) e DMSO (controle) aos 2, 7, 14 e 21 dias
 3 (média ± desvio padrão)

Variável	Grupo	Tempo			
		2 dias (M±DP)	7 dias (M±DP)	14 dias (M±DP)	21 dias (M±DP)
Colágeno I	Pau pereira (%)	29,96 ± 11,54	31,58 ± 8,18	28,01±2,09	35,97±5,60
	DMSO (%)	35,44 ± 11,68	32,36± 3,25	26,06±0,37	33,11±7,97
	p* valor	0,94	1,00	0,03	0,98
Fibroblastos	Pau pereira	3,06±0,95	4,71±1,33	15,12±3,46	13,5±2,72
	DMSO	0,81±0,37	3,37±0,95	7,87±2,30	8,56±1,87
	p* valor	0,002	0,3524	0,057	0,0176
Neutrófilos	Pau pereira	27,53±3,98	21,28±7,63	1,53±0,99	0,44±0,50
	DMSO	49,97±19,94	14,33±6,34	2,97±1,49	2,28±0,83
	p * valor	0,1645	0,5261	0,000	0,0032
Macrófagos	Pau pereira	12,25±1,79	4,84±1,72	0,69±0,50	0,0±0,0
	DMSO	7,69±2,24	5,42±1,44	2,83±0,32	1,41±0,61
	p * valor	0,000	0,99	0,000	0,000

4 ANOVA 2 fatores p<0,05; *Games-Howell, em negrito valor de p<0,05; M= média; DP = desvio
 5 padrão; DMSO (dimetilsulfóxido). Mann-Whitney e Kruskal-Wallis p<0,05 para a variável
 6 macrófago.

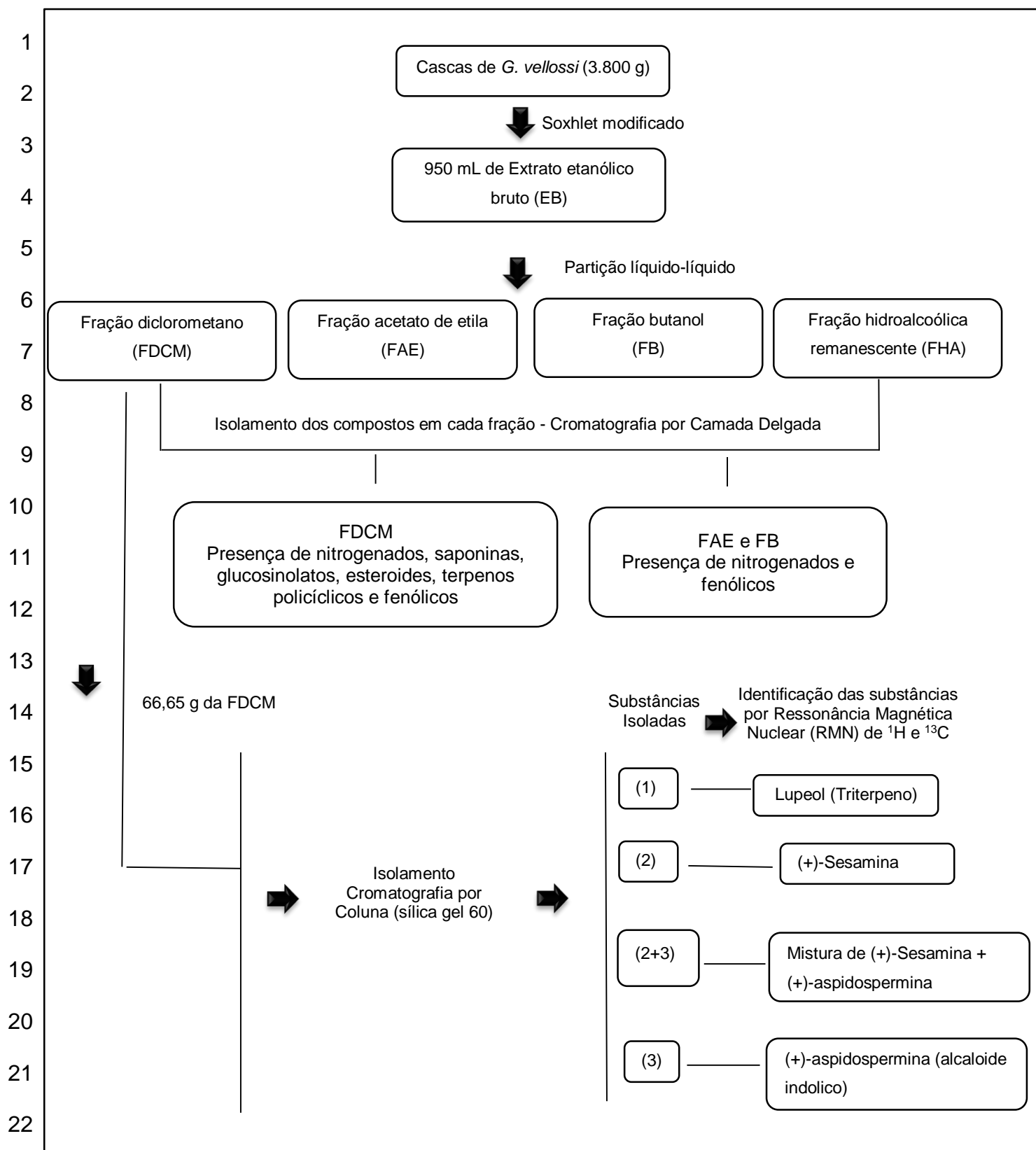
7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14

1 **Tabela 2** Percentagem da expressão de MMP-1, MMP-8 e IL-6 nos grupos Pau pereira
 2 (experimental) e DMSO (controle), aos 2, 7, 14 e 21 dias (média ± desvio padrão)

Variável	Grupo	Tempo			
		2 dias (M±DP)	7 dias (M±DP)	14 dias (M±DP)	21 dias (M±DP)
MMP-1	Pau pereira (%)	3,05±1,15	5,63 ±2,96	5,01±2,73	3,95±1,72
	DMSO (%)	2,52 ±1,48	5,44 ± 2,41	2,62 ± 1,58	3,18±0,66
	p* valor	0,96	1,0	0,02	0,84
MMP-8	Pau pereira (%)	13,44± 3,59	7,24±1,79	5,70±1,40	1,95± 0,10
	DMSO (%)	27,76±15,78	2,78±0,54	4,31±0,84	4,43± 0,64
	p* valor	0,29	0,0019	0,32	0,0019
IL-6	Pau pereira (%)	2,78±0,70	9,32±1,93	10,93±1,63	6,90±0,89
	DMSO (%)	2,68±1,16	4,96±2,80	6,16±3,35	4,28± 2,67
	p* valor	1,00	0,0485	0,00	0,4208

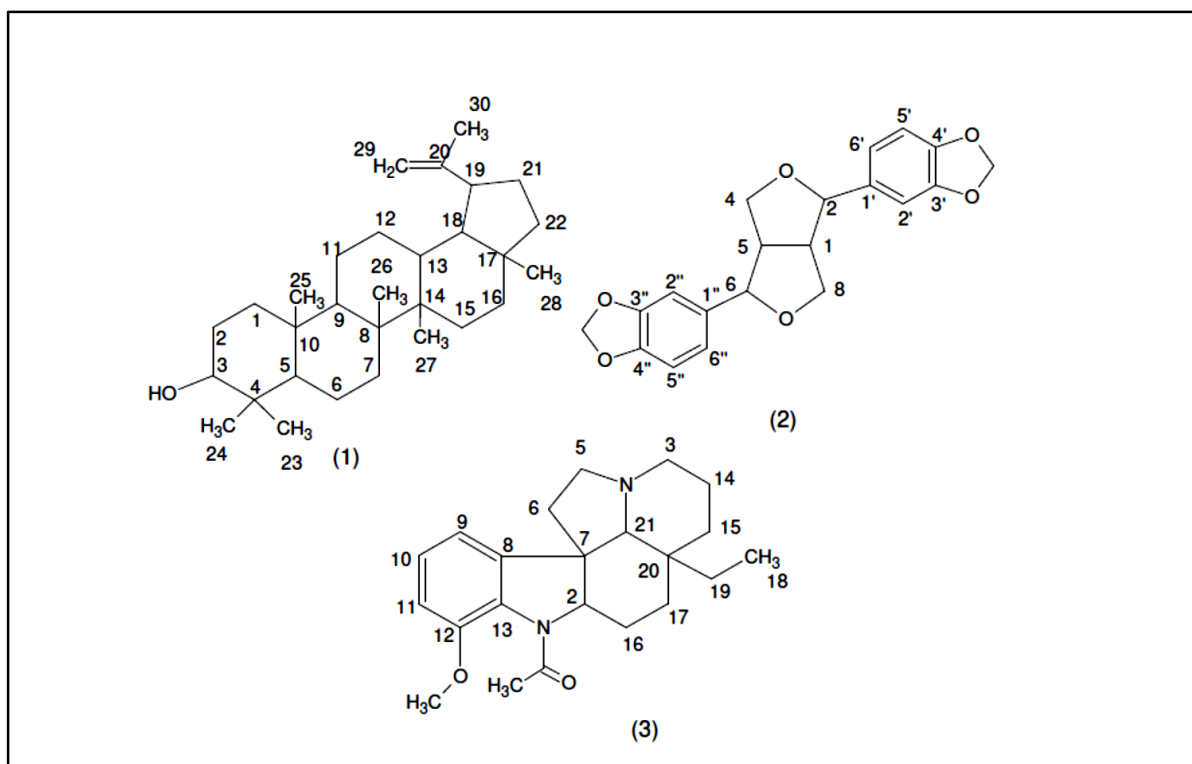
3 ANOVA 2 fatores: MMP-1 p=0,003; MMP-8 p<0,00 e IL-6 p=0,01. *Games-Howell, em negrito valor
 4 de p<0,05; M= média; DP= desvio padrão; DMSO (dimetilsulfóxido).

5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16



23 **Figura 1** Esquema adaptado do desenho experimental para a obtenção da fração alcaloide de
 24 *Geissospermum vellosii* Allemão (Dias, 2012).

25



1 **Figura 2** Estruturas moleculares das substâncias (1) lupeol ($C_{30}H_{50}O$), (2) (+)- sesamina
 2 ($C_{20}H_{18}O_6$) e (3) (+)-aspidospermina ($C_{22}H_{30}N_2O_2$) isoladas da fração diclorometano de
 3 *Geissospermum vellosii* Allemão (Dias, 2012).

4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

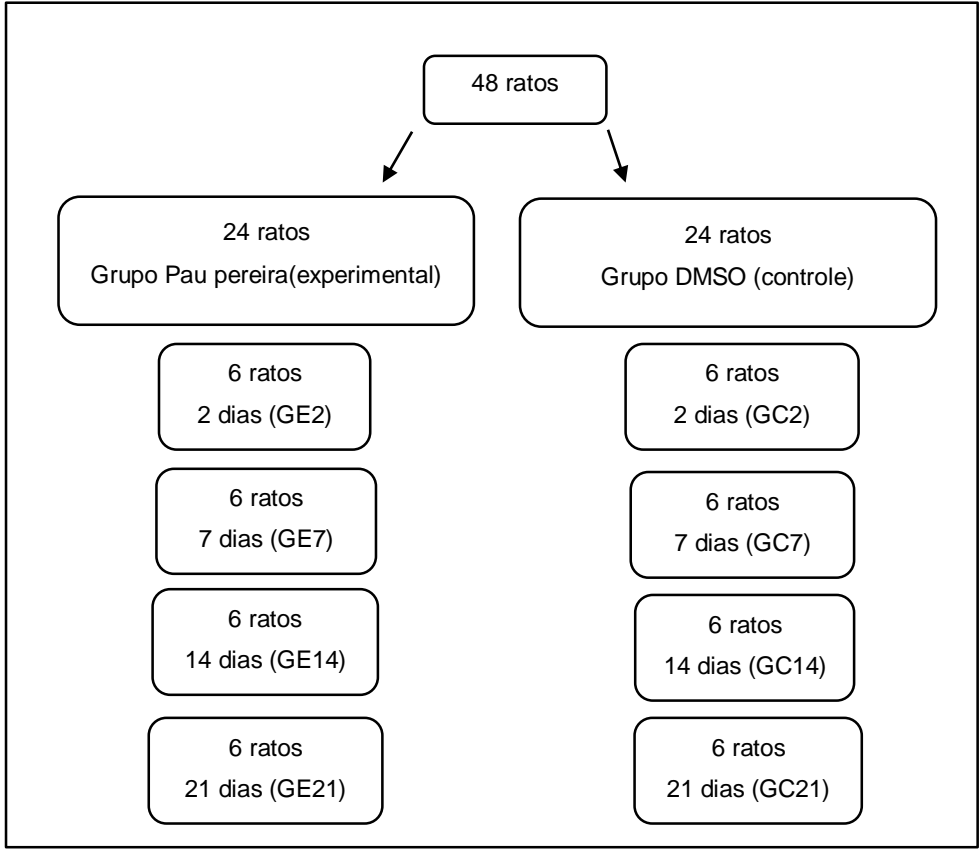
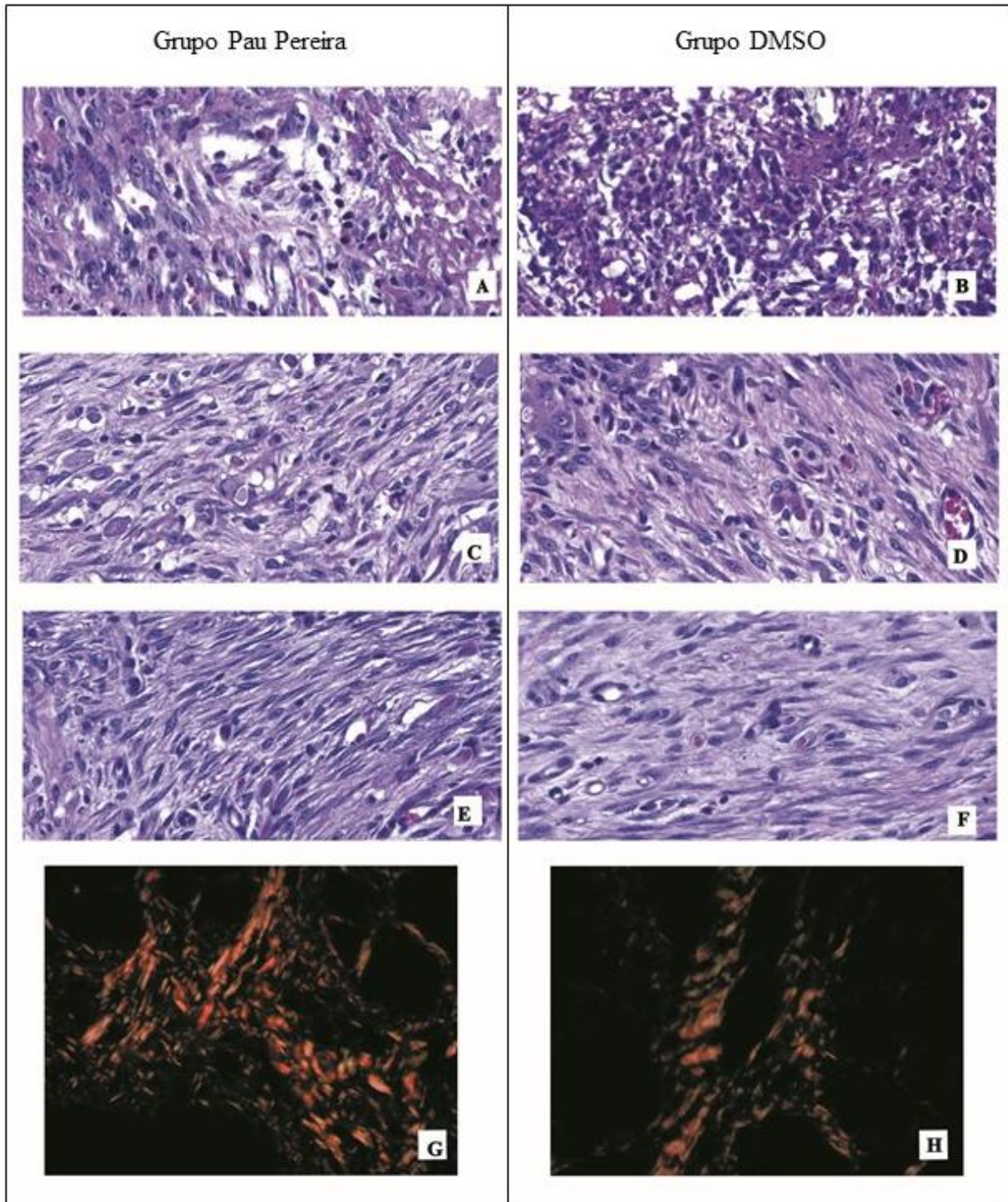
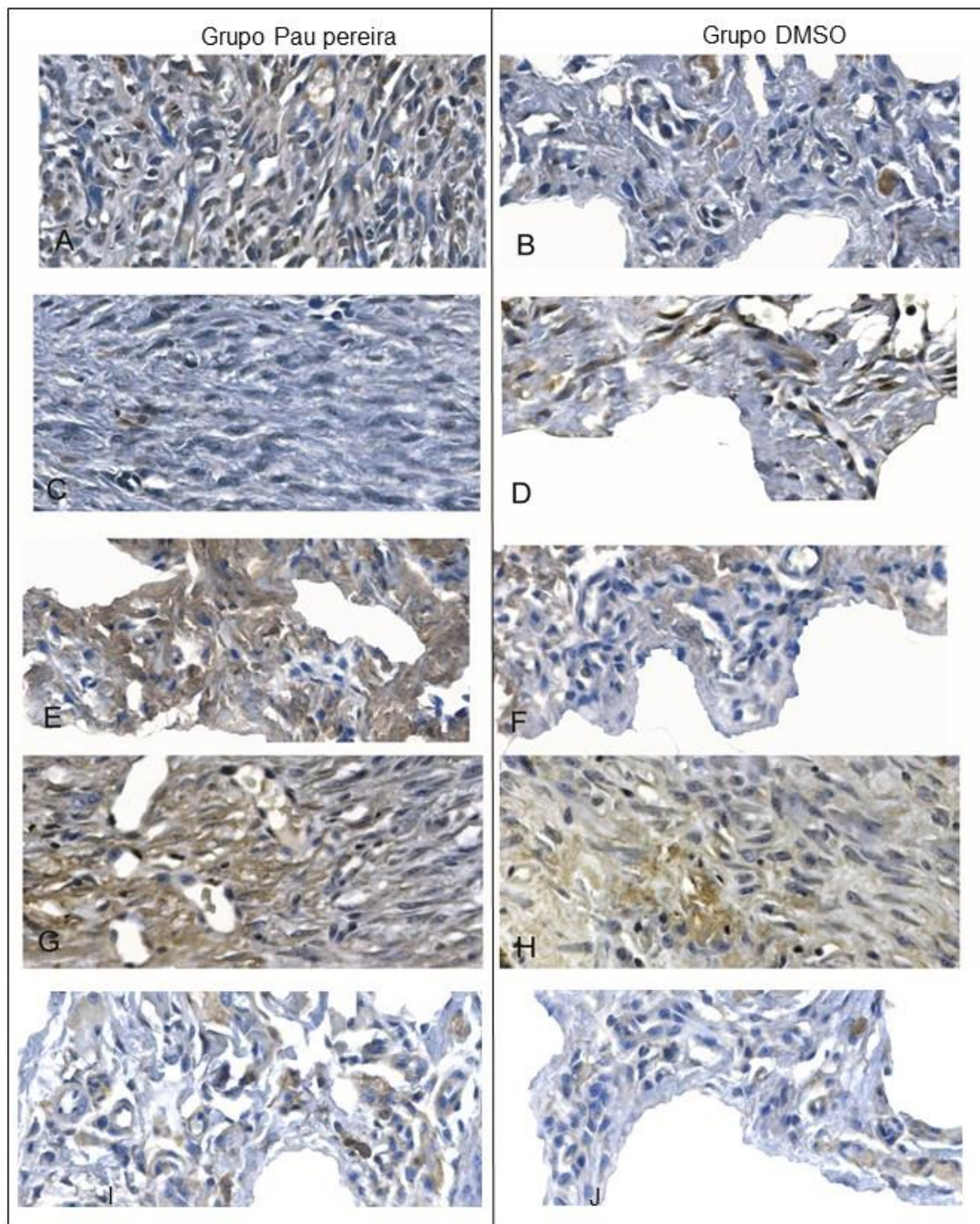


Figura 3 Distribuição do número de animais nos grupos Pau pereira e DMSO (dimetilsulfóxido) nos dias 2, 7, 14 e 21.



1
2 **Figura 4** Fotomicrografias do tecido de reparação do grupo Pau pereira em comparação ao grupo
3 DMSO. Macrófagos e fibroblastos aos 2 dias (A e B, HE, 200x); neutrófilos, macrófagos e
4 fibroblastos (C e D, HE, 200x), colágeno tipo I (G e H, SR, 200x) aos 14 dias; neutrófilos,
5 macrófafos e fibroblastos (E e F, HE, 200x) aos 21 dias.



1
2 **Figura 5** Fotomicrografias do tecido de reparação. (A) imunoposição MMP-8 (marrom) aos
3 7 dias no grupo Pau Pereira e (B) no grupo DMSO; (C) expressão de MMP-8 no grupo Pau
4 pereira e (D) grupo DMSO; expressão IL-6 (marrom) aos 7 dias no grupo Pau Pereira (E) e (F)
5 grupo DMSO, e aos 14 dias (G) grupo Pau Pereira e (H) grupo DMSO; e Imunoposição MMP-
6 1 (marrom) aos 14 dias, nos grupos Pau Pereira (I) e (J) DMSO (Imunohistoquímica, 200x).

7

1 **ARTIGO EM INGLÊS**

2

3 **Title Page**

4 **Title:** Evaluation of alkaloid fraction of *Geissospermum vellosii* Allemão “Pau Pereira” on the
5 repair process of oral ulcer of rats

6

7 **Authors**

8 Eliana Cristina Fosquiera, Emanuela Carla dos Santos, Aline Pagani, Cassianne Cordeiro,
9 Josiane de Fátima Gaspari Dias, Obdúlio Gomes Miguel, Camila Klocker Costa, Lúcia
10 Noronha, Patricia Vida Cassi Bettega, Seigo Nagashima, Marina Luise Viola de Azevedo,
11 Sérgio Aparecido Ignácio, Yusuf S. Althobaiti, Aline Cristina Batista Rodrigues Johann,
12 Ana Maria Trindade Gregio Hardy

13

14 **Author Affiliations**

15 ECF, ECS, AP, CC, SAI and *ACRBJ - Pontifical Catholic University of Paraná, School of Life
16 Sciences, College of Dentistry, Curitiba, PR, Brazil

17 SN, MLVA, LN - Laboratory of Pathology, School of Medicine, Pontifical Catholic University
18 of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

19 AMTGH - University of Toledo, College of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,
20 Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Toledo, OH

21 YA - Taif University, College of Pharmacy, Department of Pharmacology and Toxicology, Taif,
22 Saudi Arabia

23 JFGD, OGM, CKC- Universidade Federal do Paraná, College of Pharmacy, Curitiba, PR, Brazil.

24

25 **Running title:** *Geissospermum vellosii* Allemão on the repair process of oral ulcer

26

27

28

29

1 *Corresponding Author:
2 Prof. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann. PhD
3 Coordinator of the Dentistry School
4 Pontifical Catholic University of Paraná
5 Imaculada Conceição Street, 1155, Prado Velho 80.215-901 Curitiba, PR, Brazil.
6 Phone: +55 41 3271-1448 Fax: +55 41 3271-1405
7 E-mail: alinecristinabatista@yahoo.com.br

8
9 Number of text pages: 24

10 Number of Tables: 2

11 Number of Figures: 5

12 Number of References: 33

13 Word count of Abstract: 244

14 Word count of Introduction: 558

15 Word count of Discussion: 914

16

17

18

19

20 Recommended section assignment: Drug Discovery and Translational Medicine

21

1 **Abstract**

2 The action of alkaloid fraction extracted from barks of *Geissospermum vellosii* Allemão, “Pau
3 pereira”, in the repair process of oral ulcers in rats was evaluated. By using a micro punch of 4.0
4 mm, ulcers on 48 male Wistar rats’ tongue surface were induced mechanically and then treated
5 with 30mg/kg-50 µL of alkaloide fraction of *G. vellosii* (Pau pereira group) or dimethylsulfoxide
6 (DMSO group), twice a day. The animals were killed after 2, 7, 14 and 21 days. The tongue were
7 processed and embedded in paraffin. From the blocks, slides were obtained stained by
8 hematoxylin eosin, Picrosirius Red and submitted to immunohistochemistry for
9 metalloproteinase 1 (MMP-1) and 8 (MMP-8), interleukin 6 (IL-6). The images were captured
10 and analyzed on morphometric computer program obtaining the number of neutrophils,
11 macrophages and fibroblasts; percentage of collagen type I; and the percentage of
12 immunopositive area for MMP-, MMP-8 and IL-6 (area/ conjunctive tissue). Kruskal-Wallis,
13 Mann-Whitney, ANOVA two-way and Games-Howell were used with 5% significance. Ulcers
14 treated by *G. vellosii* alkaloid fraction in comparision with DMSO group showed more
15 macrophages and fibroblasts in two days; higher expression of MMP-8 and IL-6 in seven days;
16 less neutrophils and macrophages, more fibroblasts, collagen type 1, MMP-1 e IL-6 in fourteen
17 days; less neutrophils and MMP-8, more macrophages and fibroblasts in twenty-one days. These
18 findings suggest that the major expression of MMP-1, MMP-8 and IL-6 modulated the major
19 deposition of collagen I in early stage of healing process, making the wound more resistant.

Key-words: *Geissospermum vellosii*. Oral Ulcer. Wound healing.

20

21

22

23

24

1 **Introduction**

2 Oral ulcers affect approximately 25% of world's population; they are painful and impact
3 negatively on people's quality life (Scully and Porter, 2008). Topical corticosteroids are
4 traditional drugs used to treat oral ulcers, however this treatment reduces only symptoms and
5 don't reduce healing time (Kumar et al., 2004; Martins et al., 2009).

6 The healing on oral mucosa is a complex process that involves the cellular and molecular
7 activation and interaction on different stages, as coagulation, inflammation, proliferation and
8 cellular migration, extracellular matrix deposition, epithelization and tissue remodeling (Vyas,
9 Vasconez, 2014; Basso et al., 2016). During this process, collagen type III (immature) is
10 deposited in the injury site, being replaced along healing, by collagen type I (mature), that
11 provides resistance to the wound (Antonio, 2005).

12 The concentration of cytokines and matrix metalloproteinase (MMPs) are local factors
13 that may influence the healing stages. Some groups of cytokines are related to repair process,
14 mainly promoting cell migration and proliferation (Joshi et al., 2016), being the interleukin-6
15 (IL-6), a biomarker, a multifunctional cytokine that participates in inflammatory responses (Sims
16 et al., 2016) and it is produced by monocytes, macrophages, endothelial cells, fibroblasts, T and
17 B activated cells (Sun et al.,2002; Gill et al., 2008). It is first released by macrophages and
18 lymphocytes in response to an injury and plays an important role in wound healing, also
19 demonstrating induction and proliferation of fibroblasts (Xue et al., 2000).

20 The main MMPs involved in wound repair are collagenase MMP-1, MMP-8, MMP-13,
21 which degrade the extracellular matrix, act on the proliferation of blood vessels, remodeling of
22 connective tissue and regulating the activity of inflammatory factors growth. These MMPs are
23 secreted mainly by neutrophils, keratinocytes, macrophages and fibroblasts (Gajendrareddy et
24 al., 2013).

25

1 The alkaloids have been used in the healing process of gastric ulcers induced in animals'
2 models experiment (Falcão et al., 2008; Li et al., 2016). As in the gastric mucosa, the
3 incorporation of medicinal plants extracts in the development of medicines the help in tissue
4 healing can be an alternative treatment for oral ulcers (Mendes et al., 2008; Bettega et al., 2011;
5 Silva et al., 2017).

6 *Geissospermum vellosii* Allemão specie, belonging to Apocynaceae family, is a tree
7 found on Amazon forest, popularly known as “Pau pereira”, its barks if source of monoterpenoid
8 indole alkaloids, responsible for therapeutic activities as antinociceptive, antimicrobial,
9 antimalarial, anticancer, anti-inflammatory, and it has been studied for the treatment of HIV
10 infection (Mbeunkui et al., 2012; Camargo et al., 2013; Ramos et al., 2017).

11 Despite the alkaloids, present in the barks of Pau pereira, present numerous biological
12 activities, among them anti-inflammatory (Lima et al., 2016), to our knowledge, there are no
13 studies that evaluate the alkaloid fraction of Pau pereira in the healing process of oral ulcers.
14 Considering that ulcerations in the oral mucosa are common, cause a lot of pain and discomfort
15 to the individual (Compilato, 2009; Sukhitashvili et al., 2012) and the lack of studies to verify
16 the biological activities of the alkaloids of *Geissospermum vellosii* Allemão in mucosal lesions,
17 the healing effect of the alkaloid fraction of this medicinal plant on mouth mucosa ulcers in rats
18 was evaluated. For this, the cells involved in inflammation and the tissue repair process, such as
19 neutrophils, macrophages, fibroblasts, as well as the expression of type I collagen and the
20 immunoexpression of IL-6, MMP-1 and MMP-8, biomarkers involved in the repair process,
21 were quantitatively analyzed.

22

23

24

25

1 **Material and Methods**

2 **Plant**

3 The bark of *Geissospermum vellosii* Allemão (Apocynaceae) was purchased from
4 Quimer Herbs and Spices Comercial Ltda (SP - Brazil). The identification was made by
5 comparison with species registered at the Botanical Museum of Curitiba, under number 36060
6 (Brazil).

7 **Obtaining the alkaloids fraction of *Geissospermum vellosii* Allemão**

8 The extraction process of the crude ethanol extract (EE) of the plant bark, its
9 dichloromethane (DCMF), ethyl acetate (FEA), butanol (BF) and hydroalcoholic fractions
10 (HAF), as well as the isolation and identification of substances alkaloids in the dichloromethane
11 fraction. Figure1 shows the experimental design to obtain EE, DCMF, FEA, BF and HAF
12 fractions, isolation and identification of the substances in the FDCM. Figure 2 shows the
13 molecular structures of substances (1) Lupeol, (2) Sesamin and (3) Aspidospermin isolated from
14 the dichloromethane fraction of *Geissospermum vellosii* Allemão thus composing the alkaloid
15 fraction that was used in the experiment with the animals of this research (Dias, 2012).

16 **Animals**

17 The research was approved by the Committee on Ethics in Animal Use (CEUA -
18 01043/2016 - PUCPR), following, throughout the experiment, the standards established by the
19 National Council for Control of Animal Experimentation - CONCEA, as well as the
20 standardization of PUCPR. A total of 48 male Wistar rats, aged between 45 and 50 days and
21 body mass of approximately 200 grams, were used in the Biotério Central of the Pontifical
22 Catholic University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil. The animals were fed with Nuvilab® CR-1
23 (Nuvital Nutrientes S A-Quimtia, Colombo, PR, Brazil) and water *ad libitum*, with a dark light
24 cycle of 12 hours at room temperature (25 ± 1 °C).

25

1 **Induction of ulcers**

2 The lesions in the oral cavity were mechanically induced in the central region of the
3 tongue surface, and the animals were previously anesthetized with Thiopentax® (Tiopental
4 Sódico 30mg/kg, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brazil) by
5 intraperitoneal. Using a 4.0 mm diameter punch-cutting instrument - Richter® R-806-9-4
6 (Richter Instrumentos Cirúrgicos Ltda, SP, Brazil) – performing pressure and rotation
7 movements with the instrument (Alonso et al., 2008) and, to standardize the depth, a mark 2 mm
8 was made in the instrument. The animals received sodium dipyron intramuscularly 20 mg / kg
9 (Boehringer Ingelheim® do Brasil Química e Farmacêutica Ltda, Itapeccerica da Serra, SP,
10 Brazil), during the first four days after induction of ulcers.

11 **Experimental Treatment**

12 The animals were randomly assigned to the Pau pereira group (experimental), treated
13 with the alkaloid solution of *Geissospermum vellosii* Allemão, and the control group, which
14 received the dimethylsulfoxide - DMSO solution (Galena ®, Campinas, SP, Brazil), and
15 subdivided according to the treatment time, 2, 7, 14 and 21 days (Figure 3). These were treated
16 with two daily doses (30 mg / kg) of 50 microliters of topical alkaloid solution of *Geissospermum*
17 *vellosii* Allemão - Pau pereira. The applications were performed with a disposable microbrush
18 applicator (Microbrush® International, Grafton, WI, USA). The animals were killed by
19 intraperitoneal overdose of Thiopentax® (Thiopental sodium 100mg / kg, Cristália Produtos
20 Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brazil) at 2, 7, 14 and 21 days.

21 **Histological slides staining**

22 After the animals died, the tongues were removed with a 15-knife scalpel and the
23 specimens fixed in 10% formalin for 24 hours. After this time, the specimens were sectioned in
24 the midline of the dorsum, longitudinally, processed and embedded in paraffin. The sections
25 were diaphanized and stained with hematoxylin - eosin (HE) and Picrosirius Red (SR). The

1 delimitation of the ulcer area (lesion in all its extension) was performed with 1.0 mm blue
2 overhead pen (Pilot do Brasil®, São Paulo, SP, Brazil) and the samples were extracted using a
3 trephine drill (Neodent®, Curitiba, PR, Brazil), with 3 mm diameter, coupled to a 130watt
4 suspension motor from Bethil (Prometal® Ind. Met. LTDA, Marília, SP, Brazil) and then
5 positioned according to the cartesian map, with the location of each sample for TMA (tissue
6 microarray).

7 **Quantitative Analysis of Cells**

8 In HE staining, images of the entire ulcerated area were captured at a magnification of
9 200x using the Dinolite® microchamber coupled to the OLYMPUS BX-50 binocular
10 microscope. The neutrophils, macrophages, fibroblasts were counted using the "Create point"
11 feature of the UTHSCSA Image Tool version 3.0 software for Microsoft Windows (Oliveira,
12 Vasconcelos 2012) and the number was divided by the number of images. Neutrophils were
13 identified by their polymorphic nucleus pattern; macrophages by an irregular, oval or nucleus-
14 shaped surface of the kidney and eccentrics (Garros et al., 2006).

15 **Collagen Analysis**

16 In SR-stained sections, four random images were captured on an Olympus BX-50
17 microscope equipped with an Olympus® U-Pot polarized lens and a 200x magnification
18 Dinolite® microcamera by a single observer. The image acquisition parameters were
19 standardized during the image capture process. Collagen fibers type I and III exhibit differences
20 in staining under polarization. In contrast to a black background, type I collagen (mature) has
21 thick red-orange fibers, while type III (immature) has fine yellow-green fibers (Garros et al.,
22 2006; Lima et al., 2009). The images were analyzed with Image ProPlus™ 4.5 program (Media
23 Cybernetics, Silver Spring, MD). After the image segmentation the automatic measurement of
24 the percentage of type I collagen was performed. The final values were determined from average
25 of four fields.

1 **Immunohistochemical Reaction for MMP-1, MMP-8 and IL-6**

2 The histological sections were dewaxed, (xylene, Biotec, Curitiba, PR, Brazil), and
3 incubated in hydrogen peroxide solution (Biotec®, Curitiba, PR, Brazil) Brazil) and 5%
4 methanol (Biotec®, Curitiba, PR, Brazil). This material was subjected to antigen retrieval with
5 Immuno Retrifer (Dako® Carpinteria, CA, USA), followed by incubation with anti-MMP-8
6 (clone: EP1252Y Abcam, Cambridge, UK); with anti-MMP-1 (clone: EP1247Y Abcam,
7 Cambridge, UK) and with anti-IL6 (clone: ab9324 Abcam, Cambridge, UK) at 4 ° C overnight.
8 Dilution of the antibody in antibody diluent (Dako® Carpinteria, CA, USA code S302283) was
9 1: 200 for MMP-8, MMP-1 and IL-6. The detection was performed with Advance Link (Dako®
10 Carpinteria, CA, USA code K406889), followed by the enzyme Dako Advance (Dako®
11 Carpinteria, CA, USA code K406889), and by chromogen 3,3'-diaminobenzidine
12 tetrahydrochloride (DAB- Sigma Chemical®, St. Louis, MO code D7679). The slides were
13 counterstained by Harris hematoxylin (Biotec®, Curitiba, PR, Brazil), dehydrated (ethanol) and
14 diaphanized (xylene). For negative control the primary antibody was omitted and as a positive
15 control the human placenta was used for MMP-1 and MMP-8 and human skin inflamed for IL-
16 6.

17 **ImmunoExpression Analysis**

18 Using the Zeiss Axio Scan.Z1 slide scanner (Zeiss®, Oberkochen, Germany) the slides
19 were scanned and analyzed by a single observer. Images of each cut covering the entire extent
20 of the ulcer were captured through the ZEN 2 program (Blue Edition® Carls Zeiss Microscopy
21 GmbH, 2011), at magnification of 200X. The epithelial tissue, muscle fibers, adipose tissue and
22 artifacts present in each image were removed with Adobe Photoshop® CS6 extended version
23 13.0 (Jive an Aurea Company®, Foster City, CA, USA). The cells or stained cells in brown were
24 considered as immunopositive. Image-Pro Plus 4.5 software (Media Cybernetics®, Silver
25 Spring, MD, USA) was used for image analysis and measurements were obtained by segmenting

1 the MMP-1, MMP-8 and IL-6 square micrometers and the total area of connective tissue. The
2 formula (1) below was used to calculate the percentage of immunopositive area:

$$3 \quad \frac{\text{Immunopositive area} \times 100}{\text{Total Area } (\mu\text{m}^2)} (1)$$

4 To obtain the percentage of final immunopositive area, the average of all values of the
5 images in each animal was calculated.

6 **Statistical analysis**

7 In the statistical analysis we used the program IBM SPSS Statistics 23.0 (SPSS Inc,
8 Chicago, IL, USA).

9 The Kolmogorov-Smirnov normality test was performed and variables neutrophils,
10 fibroblasts and collagen type I showed normal distribution and macrophages non-normal. For
11 all variables, with the exception of macrophages, to compare the mean values of the variable in
12 the groups that presented a statistically significant difference, the ANOVA test was applied to
13 two criteria: a complete factorial model. The homogeneity test of Levene's variance revealed
14 that the variable presented heterogeneous variance. Therefore, comparisons between groups
15 were made using Games-Howell's multiple parametric comparison test. For the variable
16 macrophages, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare the mean values of
17 the variable in the groups that presented a statistically significant difference and the comparisons
18 between the groups were performed with Mann-Whitney.

19 The Shapiro-Wilk Normality Test was performed, in which the variables IL-6, MMP-8
20 and MMP-1 were found to be normal. Therefore, in order to compare the mean values of the
21 variable in the groups that presented a statistically significant difference, the ANOVA test was
22 applied to two criteria: a full factorial model. The Levene variance homogeneity test revealed
23 that the variable presented heterogeneous variance. Therefore, comparisons between the groups
24 were made using Games-Howell's multiple parametric comparison test. The level of significance
25 adopted in all tests was 5% ($p < 0.05$).

1 **Results**

2 **Quantitative Analysis of Cells and Collagen**

3 The Pau pereira group compared to the DMSO group showed more macrophages and
4 fibroblasts at 2 days; at 7 days, there was no statistical difference between the Pau pereira
5 group and DMSO, both for type I collagen and for the cells; fewer neutrophils, fewer
6 macrophages, and more fibroblasts were observed at 14 days; less neutrophils, fewer
7 macrophages and more fibroblasts at 21 days. The collagen evaluation showed that there was
8 a greater expression of the percentage of type I collagen in the group that received Pau pereira
9 fraction when compared to DMSO group at 14 days (table 1). It is noteworthy that there was
10 greater number of fibroblasts at 2, 14 and 21 days in the Pau pereira group compared to
11 DMSO.

12 **Analysis of Immunoexpression of MMP-1, MMP-8 and IL-6**

13 The expression of MMP-8 was higher in the Pau pereira group when compared to the
14 DMSO group at 7 days. The reverse occurred at 21 days and the percentage of MMP-8
15 expression was significantly lower in the Pau pereira group when compared to the DMSO
16 group. The expression of MMP-1 was lower in the DMSO group when compared to the Pau
17 Pereira group at the 14 days. The IL-6 demonstrated higher expression at the 7 and 14 days
18 to the Pau Pereira group when compared to the DMSO group. The same was verified at the
19 14 days to the Pau Pereira group when compared to the DMSO group (table 2).

20

21

22

23

24

25

1 **Discussion**

2 This study revealed for the first time in the literature that the ulcers treated by the alkaloid
3 fraction of *Geissospermum vellosii* Allemão in comparison with DMSO presented more
4 macrophages and fibroblasts at 2 days; higher expression of MMP-8 and IL-6 at 7 days; less
5 neutrophils and macrophages, plus fibroblasts, type I collagen, MMP-1 and IL-6 at 14 days; less
6 neutrophils and MMP-8, plus macrophages and fibroblasts at 21 days. These findings suggest
7 that increased expression of MMP-1, MMP-8 and IL-6 modulated the increased deposition of
8 collagen I in the early stage of healing, conferring greater wound resistance.

9 It was verified that after 2 days, there was a greater chemotaxis of macrophages in the
10 group treated with Pau pereira, after which the number was consecutively reduced until the end
11 of the experiment (21 days). Macrophages are preponderant cells in wound phagocytosis. The
12 fact that they are in greater quantity at the beginning of the observation period suggests that the
13 alkaloid solution of the plant may be interfering with the chemotaxis of macrophages, causing a
14 greater infiltration of the same in an earlier period (Corrêa et al., 2017).

15 Macrophages are cells that regulate the inflammatory phase of the repair, releasing
16 growth factors and cytokines such as PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- β (tumor
17 growth factor beta), β -FGF (fibroblast- (TNF-alpha), IL-1 (interleukin-1), and IL-6 (interleukin-
18 6), which help in the proliferative phase of healing by inducing fibroblast proliferation (Patel et
19 al. 2016). Thus, the more macrophages, the greater the release of growth factors and cytokines,
20 which act on the migration and proliferation of fibroblasts. The number of fibroblasts had a
21 higher increase in the group that received the alkaloid. After 14 days of observation, the observed
22 number of fibroblasts was twice as high in the Pau pereira group compared to the DMSO group.
23 This increase in the number of fibroblasts suggests a healing effect of Pau pereira, because these
24 cells synthesize the collagen matrix. Therefore, the increase of fibroblasts, consequently, will
25 lead to an increase in the production of collagen (Martins et al., 2009; Werner et al., 2009). There

1 was a greater area of type I collagen at 14 days in the Pau pereira group, which is a mature
2 collagen, conferring greater resistance to the wound in the initial stage of the healing process,
3 reinforcing the findings of the repairing action of this fraction in our experimental model.

4 The higher expression of IL-6 at 7 and 14 days in the Pau pereira group compared to the
5 DMSO group corroborates the highest number of fibroblasts at 14 and 21 days and the highest
6 deposition of collagen fibers I in the Pau pereira group at 14 days, because among the various
7 functions of IL-6, is to promote fibroblast migration and proliferation (Patel et al., 2016). Thus,
8 IL-6 influenced the migration and proliferation of fibroblasts, which deposited type I collagen
9 early in the repair process.

10 MMP-1 is the collagenase responsible for the degradation of type III collagen. During
11 the process of injury it is usually produced and secreted in later stages in the remodeling phase
12 of healing (Armstrong, Jude, 2002). However, in this study, the highest expression of MMP-1
13 at 14 days in the Pau pereira group was verified. This fact suggests a healing effect of the Pau
14 Pereira fraction that accelerated the degradation of type III collagen in the early stage of the
15 healing process, through MMP-1. This metalloproteinase has a greater predilection for degrading
16 immature collagen (Armstrong, Jude, 2002), which allowed the replacement of the same by type
17 I collagen, conferring greater resistance to the wound at 14 days. This result is associated to the
18 increase in MMP-8 expression at 7 days, the Pau pereira group, which was equivalent to 14 days
19 and reduced to 21 days when compared to the DMSO group. Researches about the role of
20 metalloproteinase in wound healing head to the fact that higher concentrations of MMP-8, as
21 seen in Pau Pereira group in seven days, are needed in this stage to act on remodelation of
22 extracellular matrix (Nwomeh et al., 1999). It suggests that the acceleration of remodeling by
23 MMP-8 at 7 days associated with greater expression of MMP-1 at 14 days allowed a greater
24 expression of type I collagen (resistant collagen) at 14 days in the Pau pereira group when
25 compared to DMSO group. In this way, the alkaloid fraction of *Geissospermum vellosii*

1 Allemão, Pau pereira, accelerated the remodeling process, providing a greater deposition of type
2 I collagen, conferring resistance to the wound in an early stage. At 21 days, the decrease in
3 MMP-8 also indicates the acceleration of the remodeling process, since there is no need for
4 further synthesis of MMP-8 in this period.

5 However, another studies have to be carried out to elucidate the mechanism of action of
6 the Pau pereira alkaloid fraction, to verify the interaction with MMP-1, MMP-8 and IL-6 in the
7 healing of oral wounds compared to treatment with the alkaloids in clinical studies with humans,
8 since the present study was conducted in animals.

9 The results evidenced the alkaloid fraction of *Geissospermum vellosii* Allemão "Pau
10 pereira" as a new agent for the treatment of ulcerated lesions in the oral mucosa, as it is a
11 facilitator of the healing process of ulcers in rat tongue, showing a great potential in the treatment
12 of mouth ulcerations. This is due, at least in part, to the greater expression of MMP-1, MMP-8
13 and IL-6 that modulated the increased proliferation of fibroblasts, with early type I collagen
14 deposition, conferring greater resistance to the wound.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

1 **Acknowledgments**

2 We thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)
3 for the PhD scholarship.

4

5 **Funding and Disclosure**

6 The authors declare that there is no conflict of interest.

7

8 **Authorship Contributions**

9 ACBRJ and AMTGH participated in research design, experiments, data analysis, writing the
10 manuscript, and approving the final version of the manuscript. ECF, ECS, MLVA, and SN
11 participated in the experiments, data analysis, and writing the manuscript. SAI conducted the
12 statistical analysis; YA participated in writing and editing the manuscript.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

1 **References**

- 2 Alonso FC, Jornet, PL, Torres MJJ, and Domingo AO (2008) Analysis of the histopathological
3 artifacts in punch biopsies of the normal oral mucosa. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **13**:
4 636-639.
- 5 Antonio FI. Aspectos macroscópicos e microscópicos da reparação de feridas cutâneas de
6 camundongos (swiss-vallée) tratadas com o creme de *Hyptis suaveolens* e *Croton urucurana*
7 Baill [theses]. Uberlândia: Faculdade de Medicina Veterinária – UFU; 2005.
- 8 Armstrong DG and Jude EB (2002) The role of matrix metalloproteinases in wound healing *J*
9 *Am Podiatr Med Assoc* **92**: 12-18.
- 10 Basso FG, Pansani TN, Turrioni APS, Soares DG, Souza Costa CA, and Hebling J (2016) Tumor
11 Necrosis Factor-Alpha and Interleukins Il-1 β , Il-6, and Il-8 Impair *in Vitro* Migration and
12 Induce Apoptosis of Gingival Fibroblasts and Epithelial Cells, Delaying Wound Healing. *J*
13 *Periodontol* **87**: 990-996.
- 14 Bettega PVC, Czlusniak GR, Piva R, Namba EL, Ribas CR, Grégio AMT, and Rosa EAR (2011)
15 Phytotherapy: from greenhouses to drugstore's bench. *Arch Oral Res* **7**: 89-97.
- 16 Camargo MRM, Amorim RCN, Rocha e Silva LF, Carneiro ALB, Vital MJS, and Pohlit AM
17 (2013) Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum*
18 *Allemão* species (Apocynaceae Juss). *Fitos* **8**: 137-146.
- 19 Compilato D, Cirillo N, Termine N, Kerr AR, Paderni C, Ciavarella D, and Campisi G (2008)
20 Long-standing oral ulcers: proposal for a new 'S-C-D classification system' *J Oral Pathol*
21 *Med* **38**: 241–253.
- 22 Corrêa FRS, Schanuel FS, Moura-Nunes N, Monte-Alto-Costa A, and Daleprane JB (2017)
23 Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-
24 associated transcription factor NFkB. *Biomed Pharmacother* **86**:162–171.

- 1 Dias JFG. Fitoquímica e ensaios biológicos do extrato bruto etanólico, frações e substâncias
2 isoladas provenientes das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão (APOCYNACEAE)
3 [diploma theses]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2012
- 4 Falcão HS, Leite JA, Barbosa-Filho JM, Athayde-Filho PF, Chaves MCO, Moura MD, Ferreira
5 AL, Almeida ABA, Souza-Brito ARM, and Diniz MFFM, et al. (2008) Duodenal Antiulcer
6 Activity of Alkaloids: A Review. *Molecules* **13**: 3198-3223.
- 7 Gajendrareddy PK, Engeland CG, Junges R, Horan MP, Rojas IG, and Marucha PT (2013)
8 MMP-8 overexpression and persistence of neutrophils relate to stress-impaired healing and
9 poor collagen architecture in mice. *Brain Behav Immun* **28**: 44–48.
- 10 Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA, Araújo ACF,
11 Sains-Isolan PMB, Oliveira EM, Arruda ECM (2006) Extrato de *Passiflora edulis* na
12 cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cir
13 Bras* **21**: 55-65.
- 14 Gill SE and Parks WC (2008) Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound
15 healing. *Int J Biochem Cell Biol* **40**: 1334-47.
- 16 Joshi A, Joshi V, Pandey D, and Hemalatha S (2016) Systematic investigation of ethanolic
17 extract from *Leea macrophylla*: Implications in wound healing *J Ethnopharmacol* **191**:95–
18 106.
- 19 Kumar S, Singh RJ, and Reed AM (2004) Cushing’s syndrome after intra-articular and
20 intradermal administration of triam-cinolone acetonide in three pediatric patients.
21 *Pediatrics* **13**: 1820–1824.
- 22 Li W, Wang X, Zhang H, Zehong H, Zhi W, Liu F, Wang Y, and Niu X (2016) Anti-ulcerogenic
23 effect of cavidine against ethanol-induced acute gastric ulcer in mice and possible underlying
24 mechanism. *Int Immunopharmacol*: **38** 450–459.

- 1 Lima JA, Costa TW, Silva LL, Miranda AL, and Pinto AC (2016) Antinociceptive and anti-
2 inflammatory effects of a *Geissospermum vellosii* stem bark fraction. *An Acad Bras Cienc*.**88**:
3 237-48.
- 4 Lima CC, Pereira APC, Silva JRF, Oliveira LS, and Resck MCC et al. (2009) Ascorbic acid for
5 the healing of skin wounds in rats. *Braz J Biol* **69**: 1195-1201.
- 6 Martins MD, Marques MM, Bussadori SK, Martins MA, and Pavesi VC et al. (2009)
7 Comparative analysis between Chamomilla recutita and corticosteroids on wound healing.
8 An in vitro and in vivo study. *Phytother Res* **23**: 274-278.
- 9 Mbeunkui F, Grace MH, and Lila MA (2012) Isolation and structural elucidation of indole
10 alkaloids from *Geissospermum vellosii* by mass spectrometry. *J Chromatogr* **885– 886**: 83–
11 89.
- 12 Mendes AM, Vilela DCH, Jung MT, Okuyama SSK, Machado MAN, Soares de Lima AA,
13 Azevedo LR, and Grégio AMT (2008) Therapeutic effect of arnica ointment on cicatrization
14 process of aphthas and lesions in human oral mucosa. *Pharmacol* **3**: 273-280.
- 15 Nwomeh BC, Liang HX, Cohen K, and Yager DR (1999) MMP-8 Is the Predominant
16 Collagenase in Healing Wounds and Nonhealing Ulcers. *J Surg Res* **81**:189-195.
- 17 Oliveira de Sousa AT, Vasconcelos JMB, and Soares MJGO (2012) Software Image Tool 3.0 as
18 an instrument for measuring wounds. *J Nurs*. **6**:2569-2573.
- 19 Patel S, Maheshwari A, and Chandra A (2016) Biomarkers for wound healing and their
20 evaluation. *J Wound Care*. **25**: 46-55.
- 21 Ramos AEF, Alcover C, Evanno L, Maciuk A, Litaudon M, Duplais C, Bernadat G, Gallard JF,
22 Jullian JC, and Mouray E, et al. Revisiting Previously Investigated Plants: A Molecular
23 Networking-Based Study of *Geissospermum laeve* *J. Nat. Prod* doi:
24 10.1021/acs.jnatprod.6b01013.

- 1 Scully C and Porter S (2008) Oral mucosal disease: recurrent aphthous stomatitis. *Br J Oral*
2 *Maxillofac Surg* **46**: 198-206.
- 3 Silva KT, Biff LL, Souza FM, Gazim ZC, Fosquiera EC, and Boleta-Ceranto DCF (2017)
4 Evaluation of the ointment effect based on the *Copaifera* L. for the treatment of recurrent
5 mouth ulcerations. *IOSR-JDMS* **16**: 146-148.
- 6 Sims CR, Nguyen TC, and Mayeux PR (2016) Could Biomarkers Direct Therapy for the Septic
7 Patient? *J Pharmacol Exp Ther* **357**:228–239.
- 8 Sukhitashvili N, Imnadze I, Tabaghua G, Gogilashvili Q, and Amiranashvili I (2012)
9 Characterization of oral ulcer and pathological scar in nude mice model. *GeoRGIan Medical*
10 *News* **4**: 82-87.
- 11 Sun A, Chia JS, Chang YF, and Chiang CP (2002) Serum interleukin-6 level is a useful marker
12 in evaluating therapeutic effects of levamisole and Chinese medicinal herbs on patients with
13 oral lichen planus. *Oral Pathol Med* **31**: 196–203.
- 14 Vyas KS and Vasconez HC (2014) Wound Healing: Biologics, Skin Substitutes, Biomembranes
15 and Scaffolds *Healthcare* **2**: 356-400.
- 16 Werner JAT, Oliveira SM, Martins DF, and Mazzardo L (2009) Evidence for a Role of 5-Ht 1a
17 Receptor on Antinociceptive Action from *Geissospermum Vellosii*. *J Ethnopharmacol.*
18 **125**:163-169.
- 19 Xue H, McCauley RL, and Zhang W (2000) Elevated Interleukin-6 Expression in Keloid
20 Fibroblasts. *J Surg Res* **89**: 74-77.

21

22

23

24

25

1 **Table 1** Percentage of collagen type I expression and number of fibroblasts, neutrophils and
 2 macrophages in the Pau pereira (experimental) and DMSO (control) groups at 2, 7, 14 and 21
 3 days (mean \pm standard deviation)

Variable	Group	Time			
		2 days (M \pm SD)	7 days (M \pm SD)	14 days (M \pm SD)	21 days (M \pm SD)
Collagen I	Pau pereira (%)	29,96 \pm 11,54	31,58 \pm 8,18	28,01 \pm 2,09	35,97 \pm 5,60
	DMSO (%)	35,44 \pm 11,68	32,36 \pm 3,25	26,06 \pm 0,37	33,11 \pm 7,97
	p* value	0,94	1,00	0,03	0,98
Fibroblasts	Pau pereira (%)	3,06 \pm 0,95	4,71 \pm 1,33	15,12 \pm 3,46	13,5 \pm 2,72
	DMSO (%)	0,81 \pm 0,37	3,37 \pm 0,95	7,87 \pm 2,30	8,56 \pm 1,87
	p* value	0,002	0,3524	0,057	0,0176
Neutrophils	Pau pereira (%)	27,53 \pm 3,98	21,28 \pm 7,63	1,53 \pm 0,99	0,44 \pm 0,50
	DMSO (%)	49,97 \pm 19,94	14,33 \pm 6,34	2,97 \pm 1,49	2,28 \pm 0,83
	p * value	0,1645	0,5261	0,000	0,0032
Macrophages	Pau pereira (%)	12,25 \pm 1,79	4,84 \pm 1,72	0,69 \pm 0,50	0,0 \pm 0,0
	DMSO (%)	7,69 \pm 2,24	5,42 \pm 1,44	2,83 \pm 0,32	1,41 \pm 0,61
	p * value	0,000	0,99	0,000	0,000

4 ANOVA two criteria p <0.05; * Games-Howell, bold value of p <0.05. Kruskal-Wallis and
 5 Mann-Whitney for the variable macrophages, bold value of p <0.05. M = average; SD = standard
 6 deviation; DMSO (dimethylsulfoxide).

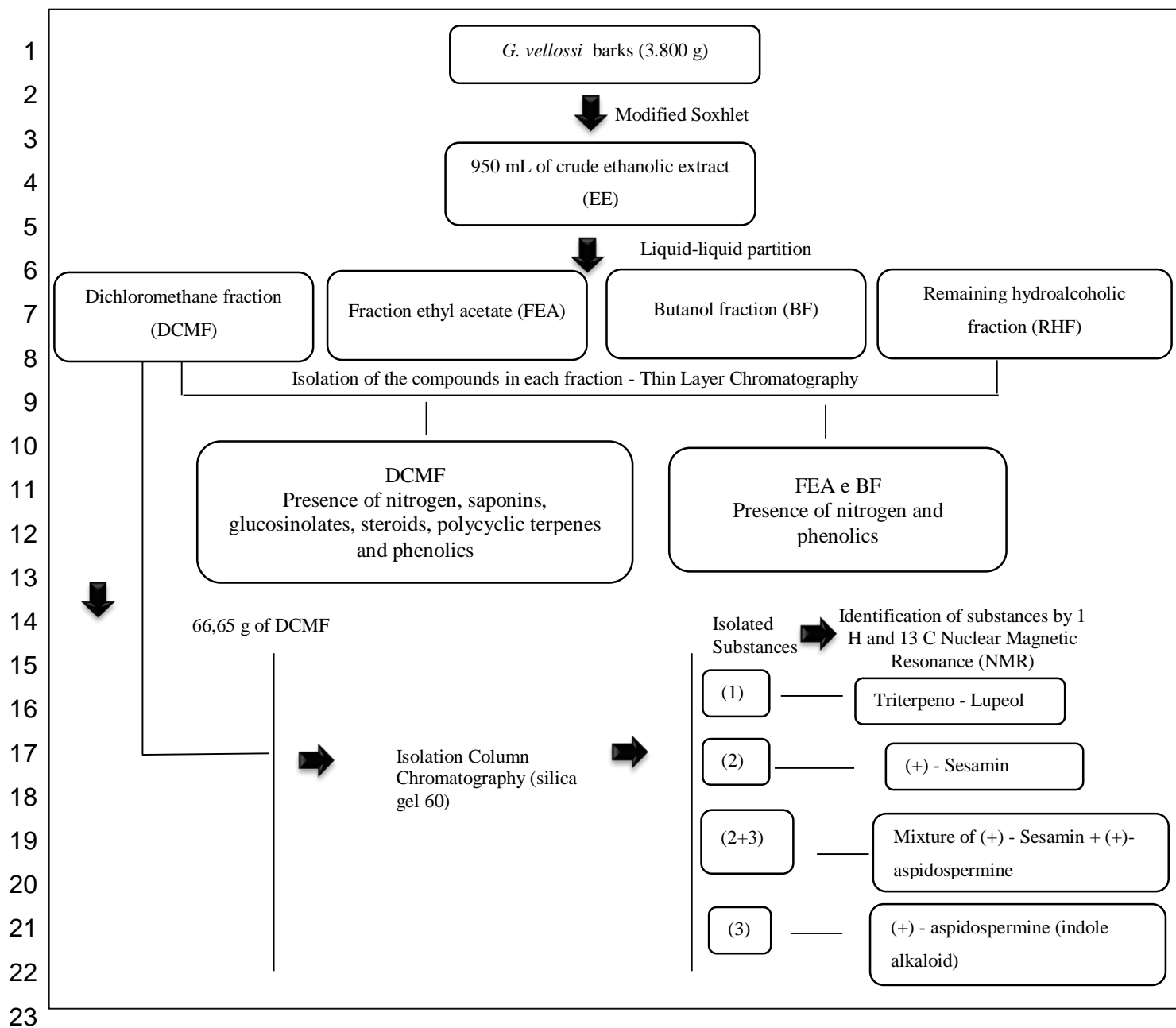
7
 8
 9
 10
 11
 12

1 **Table 2** Percentage of expression of MMP-8, IL-6 and MMP-1 in the Pau pereira (experimental)
 2 and DMSO (control) groups at 2, 7, 14 and 21 days (mean \pm standard deviation)

Variable	Group	Time			
		2 dias (M \pm SD)	7 dias (M \pm SD)	14 dias (M \pm SD)	21 dias (M \pm SD)
MMP-1	Pau pereira (%)	3,05 \pm 1,15	5,63 \pm 2,96	5,01 \pm 2,73	3,95 \pm 1,72
	DMSO (%)	2,52 \pm 1,48	5,44 \pm 2,41	2,62 \pm 1,58	3,18 \pm 0,66
	p* valor	0,96	1,0	0,02	0,84
MMP-8	Pau pereira (%)	13,44 \pm 3,59	7,24 \pm 1,79	5,70 \pm 1,40	1,95 \pm 0,10
	DMSO (%)	27,76 \pm 15,78	2,78 \pm 0,54	4,31 \pm 0,84	4,43 \pm 0,64
	p* valor	0,29	0,0019	0,32	0,0019
IL-6	Pau pereira (%)	2,78 \pm 0,70	9,32 \pm 1,93	10,93 \pm 1,63	6,90 \pm 0,89
	DMSO (%)	2,68 \pm 1,16	4,96 \pm 2,80	6,16 \pm 3,35	4,28 \pm 2,67
	p* valor	1,00	0,0485	0,00	0,4208

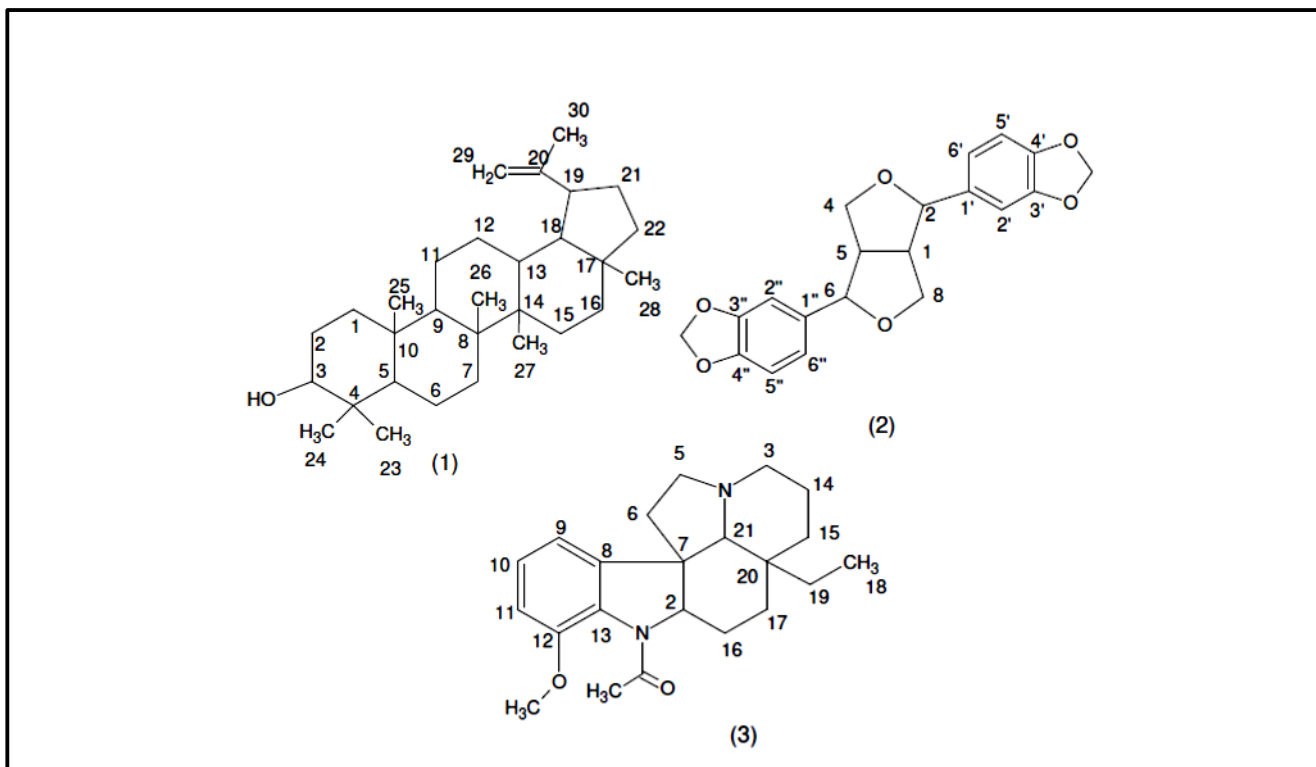
3 ANOVA two criteria: MMP-1 p = 0.003, MMP-8 p <0.00, and IL-6 p = 0.01. * Games-Howell,
 4 bold value of p <0.05; M = average; SD = standard deviation; DMSO (dimethylsulfoxide).

5
6
7
8
9
10
11
12
13
14



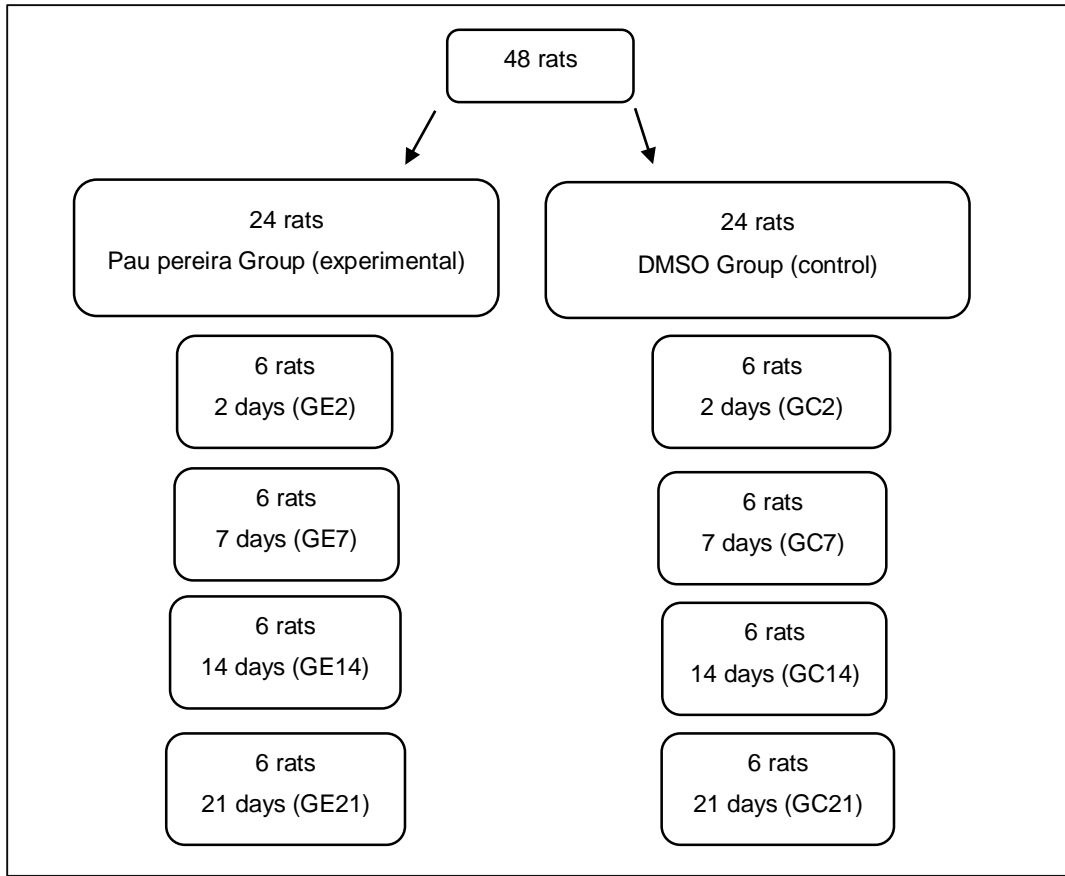
24 **Figure 1** Adapted scheme of the experimental design (Dias, 2012) to obtain the alkaloid fraction
 25 of *Geissospermum vellosii* Allemão.

26
 27
 28
 29
 30
 31



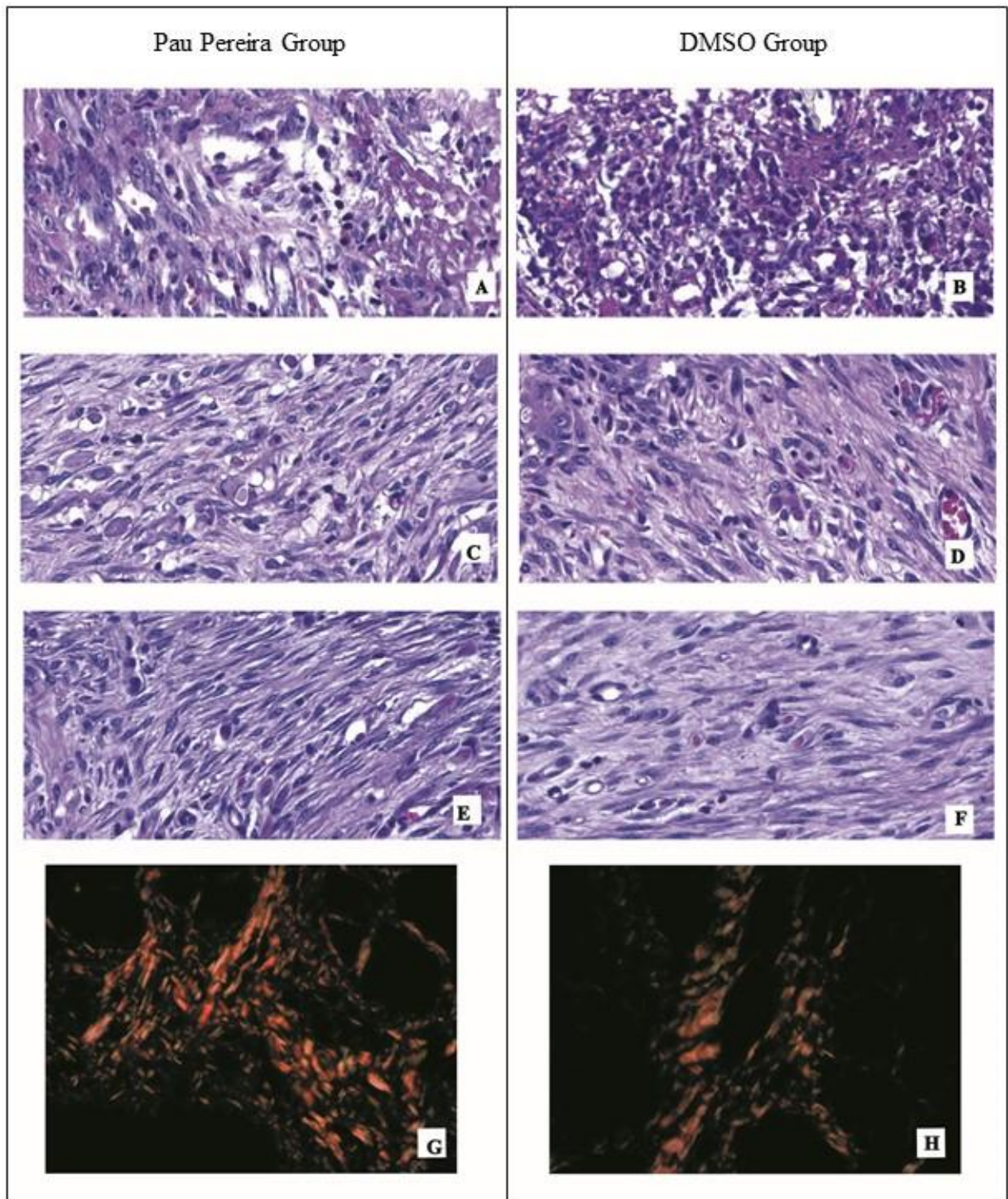
1
 2 **Figure 2** Molecular structures of the substances (1) Lupeol ($C_{30}H_{50}O$), (2) (+)- Sesamin
 3 ($C_{20}H_{18}O_6$) and (3) (+)- aspidospermin ($C_{22}H_{30}N_2O_2$) isolated from the dichloromethane fraction
 4 of *Geissospermum vellosii* Allemão (Dias, 2012).

5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16

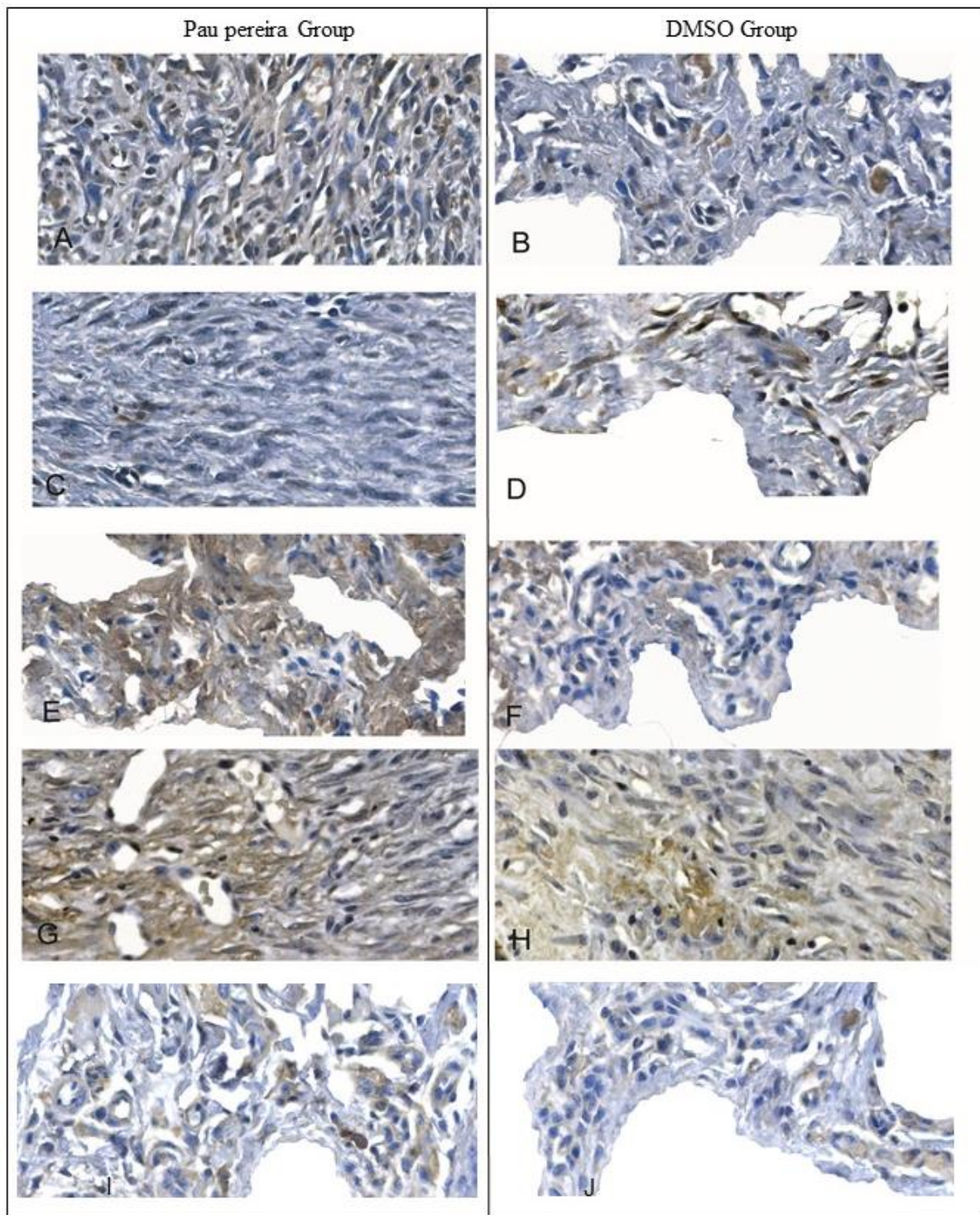


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

Figure 3 Distribution of the number of animals used in the experimental and control groups on days 2, 7, 14 and 21.



1 **Figure 4** Photomicrographs of the repair tissue of the Pau pereira group compared to the
 2 DMSO group. Macrophages and fibroblasts at 2 days (A and B, HE, 200x); neutrophils,
 3 macrophages and fibroblasts (C and D, HE, 200x), Type I collagen (G and H, SR, 200x) at
 4 14 days; neutrophils, macrophages and fibroblasts (E and F, HE, 200x) at 21 days.



1 **Figure 5** Photomicrographs of repair tissue. (A) MMP-8 immunohistochemistry (brown) at 7
2 days in the Pau Pereira group and (B) in the DMSO group; (C) MMP-8 expression in the
3 Pau pereira group and (D) DMSO group; IL-6 expression (brown) at 7 days in the Pau Pereira
4 group (E) and (F) DMSO group, and at the 14 days (G) Pau Pereira group and (H) DMSO
5 group; and MMP-1 immunohistochemistry (brown) at 14 days in the Pau Pereira (I) and (J)
6 DMSO groups (Immunohistochemistry, 200x).

1 ANEXOS

2 Parecer do comitê de ética



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 11 de Agosto de 2016.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01043/2016 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Análise do processo de reparo de lesão bucal de ratos tratados com extrato de pau pereira – Análise Histopatológica.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ana Maia Trindade Grégio

EQUIPE DE PESQUISA: Emanuela Carla dos Santos, Eliana Cristina Fosquiera, Thayse da Silva Arcenio, Luana Pereira dos Santos

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Ciências da Vida / Odontologia

VIGÊNCIA DO PROJETO	2016 a 2017	QUANTIDADE DE ANIMAIS	DADOS JÁ COLETADOS
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Ratos norvegicus</i> (Ratos)	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	DADOS JÁ COLETADOS	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	DADOS JÁ COLETADOS	ESPECIÊ – GRUPO TAXONÔMICOS (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	Pesquisas anteriores	LOCAL (S) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado do CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de **11.08.2016**. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório à CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo. **Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a esta CEUA.**

Atenciosamente,

Profa. Dra. Marta Luciane Fischer

Coordenadora

Comissão de Ética no Uso de Animais

Rua Imaculada Conceição, 11.551 Prédio do CEUA, 81.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3339-2292 e-mail: ceua@pucpr.br



1 Análise estatística

Tests of Normality^c

Grupo x Tempo		Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Statistic	df	Valor p
Número de Neutrófilos	Pau-pereira/2 dias	,251	8	,146
	Pau-pereira/7 dias	,140	8	,200*
	Pau-pereira/14 dias	,192	8	,200*
	Pau-pereira/21 dias	,272	8	,082
	DMSO/2 dias	,150	8	,200*
	DMSO/7 dias	,148	8	,200*
	DMSO/14 dias	,195	8	,200*
	DMSO/21 dias	,239	8	,199
Número de Macrófagos	Pau-pereira/2 dias	,140	8	,200*
	Pau-pereira/7 dias	,201	8	,200*
	Pau-pereira/14 dias	,311	8	,022
	DMSO/2 dias	,224	8	,200*
	DMSO/7 dias	,250	8	,150
	DMSO/14 dias	,250	8	,150
	DMSO/21 dias	,162	8	,200*
	Número de Fibroblastos	Pau-pereira/2 dias	,178	8
Pau-pereira/7 dias		,166	8	,200*
Pau-pereira/14 dias		,279	8	,066
Pau-pereira/21 dias		,240	8	,197
DMSO/2 dias		,192	8	,200*
DMSO/7 dias		,250	8	,150
DMSO/14 dias		,143	8	,200*
DMSO/21 dias		,143	8	,200*

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

c. Número de Macrófagos is constant when Grupo x Tempo = Pau-pereira/21 dias. It has been omitted.

Valor p > 0,05 indica distribuição normal

Test of Homogeneity of Variance^a

		Levene Statistic	df1	df2	Valor p
Número de Neutrófilos	Based on Mean	12,056	7	56	,000
Número de Macrófagos	Based on Mean	4,440	6	49	,001
Número de Fibroblastos	Based on Mean	4,233	7	56	,001

a. Número de Macrófagos é constante quando Grupo x Tempo = Pau-pereira/21 dias.

Valor p < 0,05 indica que a variável apresenta heterogeneidade de variâncias segundo Grupo x Tempo

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Número de Neutrófilos	Pau-pereira	32	12,70	12,80	2,26	8,08	17,31	0,00	34,00
	DMSO	32	17,26	21,91	3,87	9,36	25,16	0,00	76,00
	Total	64	14,98	17,95	2,24	10,50	19,46	0,00	76,00
Número de Macrófagos	Pau-pereira	32	4,45	5,09	0,90	2,61	6,28	0,00	15,25
	DMSO	32	4,34	2,78	0,49	3,33	5,34	0,50	10,00
	Total	64	4,39	4,07	0,51	3,37	5,41	0,00	15,25
Número de Fibroblastos	Pau-pereira	32	9,10	5,81	1,03	7,01	11,19	2,00	22,50
	DMSO	32	5,16	3,58	0,63	3,87	6,45	0,25	11,25
	Total	64	7,13	5,18	0,65	5,83	8,42	0,25	22,50

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Número de Neutrófilos	2 dias	16	38,50	17,92	4,48	28,95	48,05	21,25	76,00
	7 dias	16	17,81	7,67	1,92	13,72	21,89	3,75	34,00
	14 dias	16	2,25	1,43	0,36	1,49	3,01	0,00	4,33
	21 dias	16	1,36	1,16	0,29	0,74	1,98	0,00	3,75
	Total	64	14,98	17,95	2,24	10,50	19,46	0,00	76,00
Número de Macrófagos	2 dias	16	9,97	3,06	0,77	8,34	11,60	3,50	15,25
	7 dias	16	5,13	1,56	0,39	4,30	5,96	2,50	7,50
	14 dias	16	1,76	1,18	0,29	1,13	2,39	0,25	3,50
	21 dias	16	0,70	0,84	0,21	0,26	1,15	0,00	2,50
	Total	64	4,39	4,07	0,51	3,37	5,41	0,00	15,25
Número de Fibroblastos	2 dias	16	1,94	1,36	0,34	1,22	2,66	0,25	4,50
	7 dias	16	4,05	1,32	0,33	3,35	4,75	2,00	6,50
	14 dias	16	11,50	4,70	1,17	9,00	14,00	3,75	22,50
	21 dias	16	11,03	3,41	0,85	9,22	12,85	5,25	16,50
	Total	64	7,13	5,18	0,65	5,83	8,42	0,25	22,50

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Número de Neutrófilos	Pau-pereira/2 dias	8	27,53	3,98	1,41	24,21	30,86	23,75	33,75
	Pau-pereira/7 dias	8	21,28	7,63	2,70	14,90	27,66	10,75	34,00
	Pau-pereira/14 dias	8	1,53	0,99	0,35	0,71	2,36	0,50	3,50
	Pau-pereira/21 dias	8	0,44	0,50	0,18	0,02	0,85	0,00	1,50
	DMSO/2 dias	8	49,47	19,94	7,05	32,80	66,14	21,25	76,00
	DMSO/7 dias	8	14,33	6,34	2,24	9,03	19,64	3,75	24,75
	DMSO/14 dias	8	2,97	1,49	0,53	1,72	4,21	0,00	4,33

Número de Macrófagos	DMSO/21 dias	8	2,28	0,83	0,29	1,59	2,97	1,25	3,75
	Total	64	14,98	17,95	2,24	10,50	19,46	0,00	76,00
	Pau-pereira/2 dias	8	12,25	1,79	0,63	10,76	13,74	9,50	15,25
	Pau-pereira/7 dias	8	4,84	1,72	0,61	3,40	6,28	2,50	7,50
	Pau-pereira/14 dias	8	0,69	0,50	0,18	0,27	1,10	0,25	1,25
	Pau-pereira/21 dias	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	DMSO/2 dias	8	7,69	2,24	0,79	5,81	9,56	3,50	10,00
	DMSO/7 dias	8	5,42	1,44	0,51	4,21	6,62	2,50	7,00
	DMSO/14 dias	8	2,83	0,32	0,11	2,57	3,10	2,50	3,50
	DMSO/21 dias	8	1,41	0,61	0,22	0,90	1,92	0,50	2,50
Número de Fibroblastos	Total	64	4,39	4,07	0,51	3,37	5,41	0,00	15,25
	Pau-pereira/2 dias	8	3,06	0,95	0,34	2,27	3,86	2,00	4,50
	Pau-pereira/7 dias	8	4,72	1,33	0,47	3,60	5,83	2,75	6,50
	Pau-pereira/14 dias	8	15,13	3,46	1,22	12,23	18,02	12,25	22,50
	Pau-pereira/21 dias	8	13,50	2,73	0,96	11,22	15,78	9,50	16,50
	DMSO/2 dias	8	0,81	0,37	0,13	0,50	1,12	0,25	1,50
	DMSO/7 dias	8	3,38	0,95	0,34	2,58	4,17	2,00	4,75
	DMSO/14 dias	8	7,88	2,30	0,81	5,95	9,80	3,75	11,00
	DMSO/21 dias	8	8,56	1,87	0,66	7,00	10,13	5,25	11,25
	Total	64	7,13	5,18	0,65	5,83	8,42	0,25	22,50

1

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Número de Neutrófilos

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Valor p	Observed Power ^b
Grupo	66,885	1	66,885	1,037	0,3129	0,1707
Tempo	14540,218	3	4846,739	75,142	0,0000	1,0000
Grupo * Tempo	1806,160	3	602,053	9,334	0,0000	0,9950
Error	3612,079	56	64,501			
Corrected Total	20025,343	63				

b. Computed using alpha = ,05

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Número de Macrófagos

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Valor p	Observed Power ^b
Grupo	,191	1	,191	,109	0,7420	0,0622
Tempo	834,850	3	278,283	159,078	0,0000	1,0000
Grupo * Tempo	110,716	3	36,905	21,097	0,0000	1,0000
Error	97,964	56	1,749			
Corrected Total	1043,720	63				

Uma vez que Número de Macrófagos é constante quando Grupo x Tempo = Pau-pereira/21 dias e que Grupo x Tempo = Pau-pereira/14 dias não apresenta distribuição normal, utilizou-se a seguir visando comparar o número médio de macrófagos segundo Grupo o teste não paramétrico U de Mann-Whitney e para comparar Grupo x Tempo e teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

1 Mann-Whitney Test

		Ranks		
Grupo		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Número de Macrófagos	Pau-pereira	32	29,61	947,50
	DMSO	32	35,39	1132,50
	Total	64		

Test Statistics ^a	
	Número de Macrófagos
Mann-Whitney U	419,500
Z	-1,244
Valor p	0,2135

a. Grouping Variable: Grupo

O resultado coincide com o obtido utilizando ANOVA

Kruskal-Wallis Test

		Ranks	
Tempo		N	Mean Rank
Número de Macrófagos	2 dias	16	55,03
	7 dias	16	40,91
	14 dias	16	22,16
	21 dias	16	11,91
	Total	64	

Test Statistics ^{a,b}	
	Número de Macrófagos
Chi-Square	51,369
Df	3
Valor p	0,0000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Tempo

O resultado coincide com o obtido utilizando ANOVA

1 Kruskal-Wallis Test

Ranks

Grupo x Tempo	N	Mean Rank	
Número de Macrófagos	Pau-pereira/2 dias	8	60,25
	Pau-pereira/7 dias	8	39,75
	Pau-pereira/14 dias	8	13,94
	Pau-pereira/21 dias	8	4,50
	DMSO/2 dias	8	49,81
	DMSO/7 dias	8	42,06
	DMSO/14 dias	8	30,38
	DMSO/21 dias	8	19,31
	Total	64	

2

Test Statistics^{a,b}

	Número de Macrófagos
Chi-Square	58,359
Df	7
Valor p	0,0000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Grupo x Tempo

O resultado coincide com o obtido utilizando ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Número de Fibroblastos

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Valor p	Observed Power ^b
Grupo	249,048	1	249,048	62,360	0,0000	1,0000
Tempo	1132,550	3	377,517	94,528	0,0000	1,0000
Grupo * Tempo	86,190	3	28,730	7,194	0,0004	0,9758
Error	223,648	56	3,994			
Corrected Total	1691,437	63				

b. Computed using alpha = ,05

3

4

5

6

7

8

9

Multiple Comparisons

Games-Howell

Dependent Variable			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Número de Neutrófilos	2 dias	7 dias	20,69271 [*]	4,87398	0,0020	7,0692	34,3162
		14 dias	36,25021 [*]	4,49517	0,0000	23,3136	49,1868
		21 dias	37,14063 [*]	4,49032	0,0000	24,2115	50,0698
	7 dias	2 dias	-20,69271 [*]	4,87398	0,0020	-34,3162	-7,0692
		14 dias	15,55750 [*]	1,95035	0,0000	9,9790	21,1360
		21 dias	16,44792 [*]	1,93916	0,0000	10,8876	22,0082
	14 dias	2 dias	-36,25021 [*]	4,49517	0,0000	-49,1868	-23,3136
		7 dias	-15,55750 [*]	1,95035	0,0000	-21,1360	-9,9790
		21 dias	,89042	,45958	0,2352	-,3623	2,1431
	21 dias	2 dias	-37,14063 [*]	4,49032	0,0000	-50,0698	-24,2115
		7 dias	-16,44792 [*]	1,93916	0,0000	-22,0082	-10,8876
		14 dias	-,89042	,45958	0,2352	-2,1431	,3623
Número de Macrófagos	2 dias	7 dias	4,83854 [*]	,85999	0,0001	2,4531	7,2240
		14 dias	8,20833 [*]	,82084	0,0000	5,9041	10,5126
		21 dias	9,26563 [*]	,79422	0,0000	7,0111	11,5201
	7 dias	2 dias	-4,83854 [*]	,85999	0,0001	-7,2240	-2,4531
		14 dias	3,36979 [*]	,48940	0,0000	2,0333	4,7063
		21 dias	4,42708 [*]	,44331	0,0000	3,2002	5,6540
	14 dias	2 dias	-8,20833 [*]	,82084	0,0000	-10,5126	-5,9041
		7 dias	-3,36979 [*]	,48940	0,0000	-4,7063	-2,0333
		21 dias	1,05729 [*]	,36155	0,0329	,0680	2,0465
	21 dias	2 dias	-9,26563 [*]	,79422	0,0000	-11,5201	-7,0111
		7 dias	-4,42708 [*]	,44331	0,0000	-5,6540	-3,2002
		14 dias	-1,05729 [*]	,36155	0,0329	-2,0465	-,0680
Número de Fibroblastos	2 dias	7 dias	-2,10938 [*]	,47240	0,0006	-3,3939	-,8248
		14 dias	-9,56250 [*]	1,22267	0,0000	-13,0282	-6,0968
		21 dias	-9,09375 [*]	,91668	0,0000	-11,6637	-6,5238
	7 dias	2 dias	2,10938 [*]	,47240	0,0006	,8248	3,3939
		14 dias	-7,45313 [*]	1,22000	0,0001	-10,9140	-3,9922
		21 dias	-6,98438 [*]	,91311	0,0000	-9,5473	-4,4215
	14 dias	2 dias	9,56250 [*]	1,22267	0,0000	6,0968	13,0282
		7 dias	7,45313 [*]	1,22000	0,0001	3,9922	10,9140
		21 dias	,46875	1,45105	0,9881	-3,4988	4,4363
	21 dias	2 dias	9,09375 [*]	,91668	0,0000	6,5238	11,6637
		7 dias	6,98438 [*]	,91311	0,0000	4,4215	9,5473
		14 dias	-,46875	1,45105	0,9881	-4,4363	3,4988

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

1

- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8

Multiple Comparisons

Games-Howell

Dependent Variable		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Número de Neutrófilos	Pau-pereira/2 dias	Pau-pereira/7 dias	6,25000	3,04244	0,4936	-5,0359	17,5359
		Pau-pereira/14 dias	26,00000*	1,44920	0,0000	20,2372	31,7628
		Pau-pereira/21 dias	27,09375*	1,41751	0,0000	21,3186	32,8689
		DMSO/2 dias	-21,93750	7,18876	0,1645	-50,8362	6,9612
		DMSO/7 dias	13,19792*	2,64748	0,0057	3,5820	22,8139
		DMSO/14 dias	24,56292*	1,50184	0,0000	18,7823	30,3435
	Pau-pereira/7 dias	DMSO/21 dias	25,25000*	1,43682	0,0000	19,4847	31,0153
		Pau-pereira/2 dias	-6,25000	3,04244	0,4936	-17,5359	5,0359
		Pau-pereira/14 dias	19,75000*	2,72016	0,0019	8,6752	30,8248
		Pau-pereira/21 dias	20,84375*	2,70342	0,0015	9,7558	31,9317
		DMSO/2 dias	-28,18750	7,54834	0,0579	-57,1749	,7999
		DMSO/7 dias	6,94792	3,50831	0,5261	-5,4948	19,3906
	Pau-pereira/14 dias	DMSO/14 dias	18,31292*	2,74857	0,0029	7,2534	29,3724
		DMSO/21 dias	19,00000*	2,71359	0,0025	7,9204	30,0796
		Pau-pereira/2 dias	-26,00000*	1,44920	0,0000	-31,7628	-20,2372
		Pau-pereira/7 dias	-19,75000*	2,72016	0,0019	-30,8248	-8,6752
		Pau-pereira/21 dias	1,09375	,39013	0,1934	-,3597	2,5472
		DMSO/2 dias	-47,93750*	7,05841	0,0033	-76,9186	-18,9564
	Pau-pereira/21 dias	DMSO/7 dias	-12,80208*	2,26981	0,0086	-22,0043	-3,5998
		DMSO/14 dias	-1,43708	,63116	0,3751	-3,7165	,8423
		DMSO/21 dias	-,75000	,45531	0,7174	-2,3639	,8639
		Pau-pereira/2 dias	-27,09375*	1,41751	0,0000	-32,8689	-21,3186
		Pau-pereira/7 dias	-20,84375*	2,70342	0,0015	-31,9317	-9,7558
		Pau-pereira/14 dias	-1,09375	,39013	0,1934	-2,5472	,3597
	DMSO/2 dias	DMSO/2 dias	-49,03125*	7,05197	0,0029	-78,0183	-20,0442
		DMSO/7 dias	-13,89583*	2,24971	0,0056	-23,1125	-4,6792
		DMSO/14 dias	-2,53083*	,55457	0,0208	-4,6888	-,3728
		DMSO/21 dias	-1,84375*	,34131	0,0032	-3,0899	-,5976
		Pau-pereira/2 dias	21,93750	7,18876	0,1645	-6,9612	50,8362
		Pau-pereira/7 dias	28,18750	7,54834	0,0579	-,7999	57,1749
	DMSO/7 dias	Pau-pereira/14 dias	47,93750*	7,05841	0,0033	18,9564	76,9186
		Pau-pereira/21 dias	49,03125*	7,05197	0,0029	20,0442	78,0183
		DMSO/7 dias	35,13542*	7,39798	0,0169	6,2349	64,0360
		DMSO/14 dias	46,50042*	7,06941	0,0039	17,5291	75,4717
		DMSO/21 dias	47,18750*	7,05588	0,0036	18,2041	76,1709
		Pau-pereira/2 dias	-13,19792*	2,64748	0,0057	-22,8139	-3,5820
	DMSO/14 dias	Pau-pereira/7 dias	-6,94792	3,50831	0,5261	-19,3906	5,4948
		Pau-pereira/14 dias	12,80208*	2,26981	0,0086	3,5998	22,0043
		Pau-pereira/21 dias	13,89583*	2,24971	0,0056	4,6792	23,1125
		DMSO/2 dias	-35,13542*	7,39798	0,0169	-64,0360	-6,2349
		DMSO/14 dias	11,36500*	2,30377	0,0161	2,1754	20,5546
		DMSO/21 dias	12,05208*	2,26192	0,0123	2,8448	21,2593
	DMSO/21 dias	Pau-pereira/2 dias	-24,56292*	1,50184	0,0000	-30,3435	-18,7823
		Pau-pereira/7 dias	-18,31292*	2,74857	0,0029	-29,3724	-7,2534
		Pau-pereira/14 dias	1,43708	,63116	0,3751	-,8423	3,7165
		Pau-pereira/21 dias	2,53083*	,55457	0,0208	,3728	4,6888
		DMSO/2 dias	-46,50042*	7,06941	0,0039	-75,4717	-17,5291
		DMSO/7 dias	-11,36500*	2,30377	0,0161	-20,5546	-2,1754
	DMSO/21 dias	DMSO/21 dias	,68708	,60221	0,9333	-1,5298	2,9039
		Pau-pereira/2 dias	-25,25000*	1,43682	0,0000	-31,0153	-19,4847
Pau-pereira/7 dias		-19,00000*	2,71359	0,0025	-30,0796	-7,9204	
Pau-pereira/14 dias		,75000	,45531	0,7174	-,8639	2,3639	
Pau-pereira/21 dias		1,84375*	,34131	0,0032	,5976	3,0899	
DMSO/2 dias		-47,18750*	7,05588	0,0036	-76,1709	-18,2041	
DMSO/14 dias	DMSO/7 dias	-12,05208*	2,26192	0,0123	-21,2593	-2,8148	
	DMSO/14 dias	-,68708	,60221	0,9333	-2,9039	1,5298	

Número de Macrófagos	Pau-pereira/2 dias	Pau-pereira/7 dias	7,40625 ⁺	,87747	0,0000	4,3093	10,5032
		Pau-pereira/14 dias	11,56250 ⁺	,65593	0,0000	8,9729	14,1521
		Pau-pereira/21 dias	12,25000 ⁺	,63210	0,0000	9,6508	14,8492
		DMSO/2 dias	4,56250 ⁺	1,01413	0,0096	,9568	8,1682
		DMSO/7 dias	6,83333 ⁺	,81239	0,0000	3,9472	9,7194
		DMSO/14 dias	9,41667 ⁺	,64203	0,0000	6,8245	12,0089
		DMSO/21 dias	10,84375 ⁺	,66805	0,0000	8,2504	13,4371
	Pau-pereira/7 dias	Pau-pereira/2 dias	-7,40625 ⁺	,87747	0,0000	-10,5032	-4,3093
		Pau-pereira/14 dias	4,15625 ⁺	,63332	0,0023	1,6627	6,6498
		Pau-pereira/21 dias	4,84375 ⁺	,60860	0,0013	2,3412	7,3463
		DMSO/2 dias	-2,84375	,99965	0,1640	-6,4073	,7198
		DMSO/7 dias	-,57292	,79424	0,9947	-3,3885	2,2427
		DMSO/14 dias	2,01042	,61891	0,1302	-,4851	4,5059
		DMSO/21 dias	3,43750 ⁺	,64586	0,0076	,9391	5,9359
	Pau-pereira/14 dias	Pau-pereira/2 dias	-11,56250 ⁺	,65593	0,0000	-14,1521	-8,9729
		Pau-pereira/7 dias	-4,15625 ⁺	,63332	0,0023	-6,6498	-1,6627
		Pau-pereira/21 dias	,68750	,17519	0,0620	-,0329	1,4079
		DMSO/2 dias	-7,00000 ⁺	,81216	0,0005	-10,2498	-3,7502
		DMSO/7 dias	-4,72917 ⁺	,53954	0,0002	-6,8230	-2,6354
		DMSO/14 dias	-2,14583 ⁺	,20818	0,0000	-2,9001	-1,3916
		DMSO/21 dias	-,71875	,27826	0,2420	-1,7071	,2696
	Pau-pereira/21 dias	Pau-pereira/2 dias	-12,25000 ⁺	,63210	0,0000	-14,8492	-9,6508
		Pau-pereira/7 dias	-4,84375 ⁺	,60860	0,0013	-7,3463	-2,3412
		Pau-pereira/14 dias	-,68750	,17519	0,0620	-1,4079	,0329
		DMSO/2 dias	-7,68750 ⁺	,79304	0,0004	-10,9485	-4,4265
		DMSO/7 dias	-5,41667 ⁺	,51031	0,0002	-7,5151	-3,3182
		DMSO/14 dias	-2,83333 ⁺	,11247	0,0000	-3,2958	-2,3709
		DMSO/21 dias	-1,40625 ⁺	,21618	0,0043	-2,2952	-,5173
	DMSO/2 dias	Pau-pereira/2 dias	-4,56250 ⁺	1,01413	0,0096	-8,1682	-,9568
		Pau-pereira/7 dias	2,84375	,99965	0,1640	-,7198	6,4073
		Pau-pereira/14 dias	7,00000 ⁺	,81216	0,0005	3,7502	10,2498
		Pau-pereira/21 dias	7,68750 ⁺	,79304	0,0004	4,4265	10,9485
		DMSO/7 dias	2,27083	,94304	0,3176	-1,1451	5,6867
		DMSO/14 dias	4,85417 ⁺	,80097	0,0057	1,5995	8,1089
		DMSO/21 dias	6,28125 ⁺	,82197	0,0009	3,0324	9,5301
	DMSO/7 dias	Pau-pereira/2 dias	-6,83333 ⁺	,81239	0,0000	-9,7194	-3,9472
		Pau-pereira/7 dias	,57292	,79424	0,9947	-2,2427	3,3885
		Pau-pereira/14 dias	4,72917 ⁺	,53954	0,0002	2,6354	6,8230
		Pau-pereira/21 dias	5,41667 ⁺	,51031	0,0002	3,3182	7,5151
		DMSO/2 dias	-2,27083	,94304	0,3176	-5,6867	1,1451
		DMSO/14 dias	2,58333 ⁺	,52256	0,0163	,4921	4,6745
		DMSO/21 dias	4,01042 ⁺	,55421	0,0006	1,9049	6,1159
	DMSO/14 dias	Pau-pereira/2 dias	-9,41667 ⁺	,64203	0,0000	-12,0089	-6,8245
		Pau-pereira/7 dias	-2,01042	,61891	0,1302	-4,5059	,4851
		Pau-pereira/14 dias	2,14583 ⁺	,20818	0,0000	1,3916	2,9001
		Pau-pereira/21 dias	2,83333 ⁺	,11247	0,0000	2,3709	3,2958
		DMSO/2 dias	-4,85417 ⁺	,80097	0,0057	-8,1089	-1,5995
		DMSO/7 dias	-2,58333 ⁺	,52256	0,0163	-4,6745	-,4921
		DMSO/21 dias	1,42708 ⁺	,24369	0,0022	,5229	2,3313
	DMSO/21 dias	Pau-pereira/2 dias	-10,84375 ⁺	,66805	0,0000	-13,4371	-8,2504
		Pau-pereira/7 dias	-3,43750 ⁺	,64586	0,0076	-5,9359	-,9391
		Pau-pereira/14 dias	,71875	,27826	0,2420	-,2696	1,7071
		Pau-pereira/21 dias	1,40625 ⁺	,21618	0,0043	,5173	2,2952
		DMSO/2 dias	-6,28125 ⁺	,82197	0,0009	-9,5301	-3,0324
		DMSO/7 dias	-4,01042 ⁺	,55421	0,0006	-6,1159	-1,9049
		DMSO/14 dias	-1,42708 ⁺	,24369	0,0022	-2,3313	-,5229

1

2

Número de Fibroblastos	Pau-pereira/2 dias	Pau-pereira/7 dias	-1,65625	,57900	0,1626	-3,7323	,4198
		Pau-pereira/14 dias	-12,06250	1,26927	0,0002	-17,0763	-7,0487
		Pau-pereira/21 dias	-10,43750	1,02071	0,0001	-14,3922	-6,4828
		DMSO/2 dias	2,25000	,36136	0,0023	,8653	3,6347
		DMSO/7 dias	-,31250	,47599	0,9970	-1,9921	1,3671
		DMSO/14 dias	-4,81250	,88072	0,0053	-8,1673	-1,4577
		DMSO/21 dias	-5,50000	,74327	0,0003	-8,2657	-2,7343
	Pau-pereira/7 dias	Pau-pereira/2 dias	1,65625	,57900	0,1626	-,4198	3,7323
		Pau-pereira/14 dias	-10,40625	1,31138	0,0004	-15,4392	-5,3733
		Pau-pereira/21 dias	-8,78125	1,07263	0,0002	-12,7903	-4,7722
		DMSO/2 dias	3,90625	,48914	0,0006	1,9761	5,8364
		DMSO/7 dias	1,34375	,57900	0,3524	-,7323	3,4198
		DMSO/14 dias	-3,15625	,94040	0,0810	-6,6025	,2900
		DMSO/21 dias	-3,84375	,81310	0,0073	-6,7605	-,9270
	Pau-pereira/14 dias	Pau-pereira/2 dias	12,06250	1,26927	0,0002	7,0487	17,0763
		Pau-pereira/7 dias	10,40625	1,31138	0,0004	5,3733	15,4392
		Pau-pereira/21 dias	1,62500	1,55767	0,9584	-3,9178	7,1678
		DMSO/2 dias	14,31250	1,23088	0,0001	9,2861	19,3389
		DMSO/7 dias	11,75000	1,26927	0,0002	6,7362	16,7638
		DMSO/14 dias	7,25000	1,46975	0,0057	1,9442	12,5558
		DMSO/21 dias	6,56250	1,39174	0,0105	1,4227	11,7023
	Pau-pereira/21 dias	Pau-pereira/2 dias	10,43750	1,02071	0,0001	6,4828	14,3922
		Pau-pereira/7 dias	8,78125	1,07263	0,0002	4,7722	12,7903
		Pau-pereira/14 dias	-1,62500	1,55767	0,9584	-7,1678	3,9178
		DMSO/2 dias	12,68750	,97256	0,0000	8,7322	16,6428
		DMSO/7 dias	10,12500	1,02071	0,0001	6,1703	14,0797
		DMSO/14 dias	5,62500	1,26133	0,0099	1,1552	10,0948
		DMSO/21 dias	4,93750	1,16951	0,0176	,7294	9,1456
	DMSO/2 dias	Pau-pereira/2 dias	-2,25000	,36136	0,0023	-3,6347	-,8653
		Pau-pereira/7 dias	-3,90625	,48914	0,0006	-5,8364	-1,9761
		Pau-pereira/14 dias	-14,31250	1,23088	0,0001	-19,3389	-9,2861
		Pau-pereira/21 dias	-12,68750	,97256	0,0000	-16,6428	-8,7322
		DMSO/7 dias	-2,56250	,36136	0,0009	-3,9472	-1,1778
		DMSO/14 dias	-7,06250	,82443	0,0006	-10,4013	-3,7237
		DMSO/21 dias	-7,75000	,67563	0,0001	-10,4666	-5,0334
	DMSO/7 dias	Pau-pereira/2 dias	,31250	,47599	0,9970	-1,3671	1,9921
		Pau-pereira/7 dias	-1,34375	,57900	0,3524	-3,4198	,7323
		Pau-pereira/14 dias	-11,75000	1,26927	0,0002	-16,7638	-6,7362
		Pau-pereira/21 dias	-10,12500	1,02071	0,0001	-14,0797	-6,1703
		DMSO/2 dias	2,56250	,36136	0,0009	1,1778	3,9472
		DMSO/14 dias	-4,50000	,88072	0,0084	-7,8548	-1,1452
		DMSO/21 dias	-5,18750	,74327	0,0005	-7,9532	-2,4218
	DMSO/14 dias	Pau-pereira/2 dias	4,81250	,88072	0,0053	1,4577	8,1673
		Pau-pereira/7 dias	3,15625	,94040	0,0810	-,2900	6,6025
		Pau-pereira/14 dias	-7,25000	1,46975	0,0057	-12,5558	-1,9442
		Pau-pereira/21 dias	-5,62500	1,26133	0,0099	-10,0948	-1,1552
		DMSO/2 dias	7,06250	,82443	0,0006	3,7237	10,4013
		DMSO/7 dias	4,50000	,88072	0,0084	1,1452	7,8548
		DMSO/21 dias	-,68750	1,04955	0,9970	-4,4143	3,0393
	DMSO/21 dias	Pau-pereira/2 dias	5,50000	,74327	0,0003	2,7343	8,2657
		Pau-pereira/7 dias	3,84375	,81310	0,0073	,9270	6,7605
		Pau-pereira/14 dias	-6,56250	1,39174	0,0105	-11,7023	-1,4227
		Pau-pereira/21 dias	-4,93750	1,16951	0,0176	-9,1456	-,7294
		DMSO/2 dias	7,75000	,67563	0,0001	5,0334	10,4666
		DMSO/7 dias	5,18750	,74327	0,0005	2,4218	7,9532
		DMSO/14 dias	,68750	1,04955	0,9970	-3,0393	4,4143

1
2
3

Tests of Normality

Grupo x Tempo		Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Statistic	df	Valor p
% colágeno I	Pau-pereira/2 dias	,189	16	0,1298
	Pau-pereira/7 dias	,097	15	0,2000
	Pau-pereira/14 dias	,144	16	0,2000
	Pau-pereira/21 dias	,162	14	0,2000
	DMSO/2 dias	,203	8	0,2000
	DMSO/7 dias	,223	6	0,2000
	DMSO/14 dias	,191	6	0,2000
	DMSO/21 dias	,223	6	0,2000
% colágeno III	Pau-pereira/2 dias	,189	16	0,1298
	Pau-pereira/7 dias	,097	15	0,2000
	Pau-pereira/14 dias	,144	16	0,2000
	Pau-pereira/21 dias	,162	14	0,2000
	DMSO/2 dias	,203	8	0,2000
	DMSO/7 dias	,223	6	0,2000
	DMSO/14 dias	,191	6	0,2000
	DMSO/21 dias	,223	6	0,2000

a. Lilliefors Significance Correction

Valor p > 0,05 indica distribuição normal

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
% colágeno I	Pau-pereira	61	31,2307	8,08081	1,03464	29,1611	33,3003	10,10	60,10
	DMSO	26	32,0322	8,10351	1,58923	28,7591	35,3053	18,49	55,73
	Total	87	31,4702	8,04880	,86292	29,7548	33,1856	10,10	60,10
% colágeno III	Pau-pereira	61	68,7693	8,08081	1,03464	66,6997	70,8389	39,90	89,90
	DMSO	26	67,9678	8,10351	1,58923	64,6947	71,2409	44,27	81,51
	Total	87	68,5298	8,04880	,86292	66,8144	70,2452	39,90	89,90

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
% colágeno I	2 dias	24	31,7938	11,63469	2,37492	26,8809	36,7066	10,10	60,10
	7 dias	21	31,8058	7,04641	1,53765	28,5983	35,0133	17,90	50,47
	14 dias	22	27,4825	1,99038	,42435	26,6000	28,3649	23,08	30,34
	21 dias	20	35,1161	6,32923	1,41526	32,1540	38,0783	25,63	48,65
	Total	87	31,4702	8,04880	,86292	29,7548	33,1856	10,10	60,10
% colágeno III	2 dias	24	68,2063	11,63469	2,37492	63,2934	73,1191	39,90	89,90
	7 dias	21	68,1942	7,04641	1,53765	64,9867	71,4017	49,53	82,10
	14 dias	22	72,5175	1,99038	,42435	71,6351	73,4000	69,66	76,92
	21 dias	20	64,8839	6,32923	1,41526	61,9217	67,8460	51,35	74,37
	Total	87	68,5298	8,04880	,86292	66,8144	70,2452	39,90	89,90

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
% colágeno I	Pau-pereira/2 dias	16	29,9681	11,54212	2,88553	23,8178	36,1185	10,10	60,10
	Pau-pereira/7 dias	15	31,5812	8,18232	2,11267	27,0500	36,1124	17,90	50,47
	Pau-pereira/14 dias	16	28,0138	2,09640	,52410	26,8967	29,1308	23,08	30,34
	Pau-pereira/21 dias	14	35,9745	5,60531	1,49808	32,7381	39,2109	28,51	48,65
	DMSO/2 dias	8	35,4450	11,68105	4,12988	25,6794	45,2106	18,49	55,73
	DMSO/7 dias	6	32,3672	3,25835	1,33021	28,9478	35,7866	28,66	38,14
	DMSO/14 dias	6	26,0657	,37713	,15396	25,6699	26,4615	25,59	26,47
	DMSO/21 dias	6	33,1133	7,97859	3,25725	24,7403	41,4864	25,63	45,59
	Total	87	31,4702	8,04880	,86292	29,7548	33,1856	10,10	60,10
% colágeno III	Pau-pereira/2 dias	16	70,0319	11,54212	2,88553	63,8815	76,1822	39,90	89,90
	Pau-pereira/7 dias	15	68,4188	8,18232	2,11267	63,8876	72,9500	49,53	82,10
	Pau-pereira/14 dias	16	71,9863	2,09640	,52410	70,8692	73,1033	69,66	76,92
	Pau-pereira/21 dias	14	64,0255	5,60531	1,49808	60,7891	67,2619	51,35	71,49
	DMSO/2 dias	8	64,5550	11,68105	4,12988	54,7894	74,3206	44,27	81,51
	DMSO/7 dias	6	67,6328	3,25835	1,33021	64,2134	71,0522	61,86	71,34
	DMSO/14 dias	6	73,9343	,37713	,15396	73,5385	74,3301	73,53	74,41
	DMSO/21 dias	6	66,8867	7,97859	3,25725	58,5136	75,2597	54,41	74,37
	Total	87	68,5298	8,04880	,86292	66,8144	70,2452	39,90	89,90

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: % colágeno III

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Valor p	Observed Power ^b
Grupo	2,379	1	2,379	,040	0,8426	0,0544
Tempo	537,108	3	179,036	2,986	0,0361	0,6850
Grupo * Tempo	205,568	3	68,523	1,143	0,3371	0,2968
Error	4737,204	79	59,965			
Corrected Total	5571,351	86				

b. Computed using alpha = ,05

Valor p < 0,05 para grupo ou Tempo indica diferença estatisticamente significante

Valor p < 0,05 para grupo*Tempo indica interação estatisticamente significante

1

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Valor p
% colágeno I	4,070	7	79	0,0007
% colágeno III	4,070	7	79	0,0007
Área do colágeno I (mm ²)	14,133	7	79	0,0000
Área do colágeno III (mm ²)	9,977	7	79	0,0000
Área do colágeno total (mm ²)	10,938	7	79	0,0000

Valor p < 0,05 indica variâncias heterogêneas segundo Grupo x Tempo.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: % colágeno I

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Valor p	Observed Power ^b
Grupo	2,379	1	2,379	,040	0,8426	,054
Tempo	537,108	3	179,036	2,986	0,0361	,685
Grupo * Tempo	205,568	3	68,523	1,143	0,3371	,297
Error	4737,204	79	59,965			
Corrected Total	5571,351	86				

b. Computed using alpha = ,05

Multiple comparisons

Games-Howell

Dependent Variable			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Valor p	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
% colágeno I	2 dias	7 dias	-,01204	2,82924	1,0000	-7,6080	7,5839
		14 dias	4,31129	2,41253	0,3034	-2,3348	10,9574
		21 dias	-3,32238	2,76464	0,6297	-10,7619	4,1172
	7 dias	2 dias	,01204	2,82924	1,0000	-7,5839	7,6080
		14 dias	4,32333	1,59513	0,0563	-,0904	8,7370
		21 dias	-3,31033	2,08982	0,3993	-8,9189	2,2982
	14 dias	2 dias	-4,31129	2,41253	0,3034	-10,9574	2,3348
		7 dias	-4,32333	1,59513	0,0563	-8,7370	,0904
		21 dias	-7,63366*	1,47751	0,0002	-11,7306	-3,5367
	21 dias	2 dias	3,32238	2,76464	0,6297	-4,1172	10,7619
		7 dias	3,31033	2,08982	0,3993	-2,2982	8,9189
		14 dias	7,63366*	1,47751	0,0002	3,5367	11,7306
% colágeno III	2 dias	7 dias	,01204	2,82924	1,0000	-7,5839	7,6080
		14 dias	-4,31129	2,41253	0,3034	-10,9574	2,3348
		21 dias	3,32237	2,76464	0,6297	-4,1172	10,7619
	7 dias	2 dias	-,01204	2,82924	1,0000	-7,6080	7,5839
		14 dias	-4,32333	1,59513	0,0563	-8,7370	,0904
		21 dias	3,31033	2,08982	0,3993	-2,2982	8,9189
	14 dias	2 dias	4,31129	2,41253	0,3034	-2,3348	10,9574
		7 dias	4,32333	1,59513	0,0563	-,0904	8,7370
		21 dias	7,63366*	1,47751	0,0002	3,5367	11,7306
	21 dias	2 dias	-3,32237	2,76464	0,6297	-10,7619	4,1172
		7 dias	-3,31033	2,08982	0,3993	-8,9189	2,2982
		14 dias	-7,63366*	1,47751	0,0002	-11,7306	-3,5367

* The mean difference is significant at the 0.05 level.

Valor p < 0,05 indica diferença estatisticamente significante entre os dois Tempos comparados

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

1
2

Multiple Comparisons

Games-Howell

Dependent Variable			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Valor p	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
% colágeno I	Pau-pereira/2 dias	Pau-pereira/7 dias	-1,61310	3,57626	0,9998	-13,3392	10,1130	
		Pau-pereira/14 dias	1,95438	2,93274	0,9969	-8,2002	12,1089	
		Pau-pereira/21 dias	-6,00634	3,25124	0,5971	-16,8469	4,8342	
		DMSO/2 dias	-5,47687	5,03807	0,9494	-23,2640	12,3103	
		DMSO/7 dias	-2,39910	3,17738	0,9937	-13,1447	8,3465	
		DMSO/1 4 dias	3,90243	2,88963	0,8654	-6,1831	13,9879	
	Pau-pereira/7 dias	DMSO/2 1 dias	DMSO/2 1 dias	-3,14521	4,35155	0,9945	-18,6401	12,3496
			Pau-pereira/2 dias	1,61310	3,57626	0,9998	-10,1130	13,3392
		Pau-pereira/14 dias	3,56747	2,17670	0,7224	-3,9865	11,1214	
		Pau-pereira/21 dias	-4,39324	2,58991	0,6895	-12,9447	4,1583	
		DMSO/2 dias	-3,86378	4,63888	0,9867	-20,9974	13,2699	
		DMSO/7 dias	-,78600	2,49656	1,0000	-9,2518	7,6798	
		DMSO/1 4 dias	5,51553	2,11827	0,2313	-1,9472	12,9783	
		DMSO/2 1 dias	-1,53211	3,88240	0,9999	-16,2615	13,1972	

3
4
5
6
7
8
9
10
11

	DMSO/2 1 dias	-1,53211	3,88240	0,9999	-16,2615	13,1972
Pau-pereira/14 dias	Pau- pereira/2 dias	-1,95438	2,93274	0,9969	-12,1089	8,2002
	Pau- pereira/7 dias	-3,56747	2,17670	0,7224	-11,1214	3,9865
	Pau- pereira/21 dias	-7,96071*	1,58711	0,0024	-13,4480	-2,4734
	DMSO/2 dias	-7,43125	4,16300	0,6459	-24,3855	9,5230
	DMSO/7 dias	-4,35347	1,42974	0,1799	-10,3376	1,6307
	DMSO/1 4 dias	1,94806*	,54625	0,0381	,0759	3,8202
	DMSO/2 1 dias	-5,09958	3,29914	0,7648	-20,1264	9,9273
Pau-pereira/21 dias	Pau- pereira/2 dias	6,00634	3,25124	0,5971	-4,8342	16,8469
	Pau- pereira/7 dias	4,39324	2,58991	0,6895	-4,1583	12,9447
	Pau- pereira/14 dias	7,96071*	1,58711	0,0024	2,4734	13,4480
	DMSO/2 dias	,52946	4,39319	1,0000	-16,3987	17,4576
	DMSO/7 dias	3,60724	2,00343	0,6285	-3,3351	10,5496
	DMSO/1 4 dias	9,90877*	1,50597	0,0003	4,5501	15,2674
	DMSO/2 1 dias	2,86113	3,58524	0,9878	-11,7471	17,4693
DMSO/2 dias	Pau- pereira/2 dias	5,47687	5,03807	0,9494	-12,3103	23,2640
	Pau- pereira/7 dias	3,86378	4,63888	0,9867	-13,2699	20,9974
	Pau- pereira/14 dias	7,43125	4,16300	0,6459	-9,5230	24,3855

		Pau-pereira/21 dias	-,52946	4,39319	1,0000	-17,4576	16,3987
		DMSO/7 dias	3,07778	4,33882	0,9941	-13,8728	20,0283
		DMSO/14 dias	9,37931	4,13274	0,4132	-7,6002	26,3589
		DMSO/21 dias	2,33167	5,25980	0,9997	-16,7212	21,3845
	DMSO/7 dias	Pau-pereira/2 dias	2,39910	3,17738	0,9937	-8,3465	13,1447
		Pau-pereira/7 dias	,78600	2,49656	1,0000	-7,6798	9,2518
		Pau-pereira/14 dias	4,35347	1,42974	0,1799	-1,6307	10,3376
		Pau-pereira/21 dias	-3,60724	2,00343	0,6285	-10,5496	3,3351
		DMSO/2 dias	-3,07778	4,33882	0,9941	-20,0283	13,8728
		DMSO/4 dias	6,30153 [*]	1,33909	0,0457	,1394	12,4637
		DMSO/21 dias	-,74611	3,51840	1,0000	-15,4701	13,9779
	DMSO/14 dias	Pau-pereira/2 dias	-3,90243	2,88963	0,8654	-13,9879	6,1831
		Pau-pereira/7 dias	-5,51553	2,11827	0,2313	-12,9783	1,9472
		Pau-pereira/14 dias	-1,94806 [*]	,54625	0,0381	-3,8202	-,0759
		Pau-pereira/21 dias	-9,90877 [*]	1,50597	0,0003	-15,2674	-4,5501
		DMSO/2 dias	-9,37931	4,13274	0,4132	-26,3589	7,6002
		DMSO/7 dias	-6,30153 [*]	1,33909	0,0457	-12,4637	-,1394
		DMSO/21 dias	-7,04764	3,26088	0,4829	-22,1956	8,1003
	DMSO/21 dias	Pau-pereira/2 dias	3,14521	4,35155	0,9945	-12,3496	18,6401
		Pau-pereira/7 dias	1,53211	3,88240	0,9999	-13,1972	16,2615
		Pau-pereira/14 dias	5,09958	3,29914	0,7648	-9,9273	20,1264
		Pau-pereira/21 dias	-2,86113	3,58524	0,9878	-17,4693	11,7471

% colágeno III	Pau-pereira/2 dias	DMSO/2 dias	-2,33167	5,25980	0,9997	-21,3845	16,7212
		DMSO/7 dias	,74611	3,51840	1,0000	-13,9779	15,4701
		DMSO/14 dias	7,04764	3,26088	0,4829	-8,1003	22,1956
		Pau-pereira/7 dias	1,61310	3,57626	0,9998	-10,1130	13,3392
	Pau-pereira/7 dias	Pau-pereira/14 dias	-1,95438	2,93274	0,9969	-12,1089	8,2002
		Pau-pereira/21 dias	6,00634	3,25124	0,5971	-4,8342	16,8469
		DMSO/2 dias	5,47687	5,03807	0,9494	-12,3103	23,2640
		DMSO/7 dias	2,39910	3,17738	0,9937	-8,3465	13,1447
		DMSO/14 dias	-3,90243	2,88963	0,8654	-13,9879	6,1831
		DMSO/21 dias	3,14521	4,35155	0,9945	-12,3496	18,6401
		Pau-pereira/2 dias	-1,61310	3,57626	0,9998	-13,3392	10,1130
		Pau-pereira/14 dias	-3,56747	2,17670	0,7224	-11,1214	3,9865
		Pau-pereira/21 dias	4,39324	2,58991	0,6895	-4,1583	12,9447
		DMSO/2 dias	3,86378	4,63888	0,9867	-13,2699	20,9974
		DMSO/7 dias	,78600	2,49656	1,0000	-7,6798	9,2518
		DMSO/14 dias	-5,51553	2,11827	0,2313	-12,9783	1,9472
DMSO/21 dias	1,53211	3,88240	0,9999	-13,1972	16,2615		

1
2
3
4
5
6
7
8
9

Pau-pereira/14 dias	Pau-pereira/2 dias	1,95438	2,93274	0,9969	-8,2002	12,1089
	Pau-pereira/7 dias	3,56747	2,17670	0,7224	-3,9865	11,1214
	Pau-pereira/21 dias	7,96071*	1,58711	0,0024	2,4734	13,4480
	DMSO/2 dias	7,43125	4,16300	0,6459	-9,5230	24,3855
	DMSO/7 dias	4,35347	1,42974	0,1799	-1,6307	10,3376
	DMSO/14 dias	-1,94806*	,54625	0,0381	-3,8202	-,0759
	DMSO/21 dias	5,09958	3,29914	0,7648	-9,9273	20,1264
Pau-pereira/21 dias	Pau-pereira/2 dias	-6,00634	3,25124	0,5971	-16,8469	4,8342
	Pau-pereira/7 dias	-4,39324	2,58991	0,6895	-12,9447	4,1583
	Pau-pereira/14 dias	-7,96071*	1,58711	0,0024	-13,4480	-2,4734
	DMSO/2 dias	-,52946	4,39319	1,0000	-17,4576	16,3987
	DMSO/7 dias	-3,60724	2,00343	0,6285	-10,5496	3,3351
	DMSO/14 dias	-9,90877*	1,50597	0,0003	-15,2674	-4,5501
	DMSO/21 dias	-2,86113	3,58524	0,9878	-17,4693	11,7471

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

DMSO/2 dias	Pau- pereira/2 dias	-5,47687	5,03807	0,9494	-23,2640	12,3103
	Pau- pereira/7 dias	-3,86378	4,63888	0,9867	-20,9974	13,2699
	Pau- pereira/14 dias	-7,43125	4,16300	0,6459	-24,3855	9,5230
	Pau- pereira/21 dias	,52946	4,39319	1,0000	-16,3987	17,4576
	DMSO/7 dias	-3,07778	4,33882	0,9941	-20,0283	13,8728
	DMSO/1 4 dias	-9,37931	4,13274	0,4132	-26,3589	7,6002
	DMSO/2 1 dias	-2,33167	5,25980	0,9997	-21,3845	16,7212
DMSO/7 dias	Pau- pereira/2 dias	-2,39910	3,17738	0,9937	-13,1447	8,3465
	Pau- pereira/7 dias	-,78600	2,49656	1,0000	-9,2518	7,6798
	Pau- pereira/14 dias	-4,35347	1,42974	0,1799	-10,3376	1,6307
	Pau- pereira/21 dias	3,60724	2,00343	0,6285	-3,3351	10,5496
	DMSO/2 dias	3,07778	4,33882	0,9941	-13,8728	20,0283
	DMSO/1 4 dias	-6,30153*	1,33909	0,0457	-12,4637	-,1394
	DMSO/2 1 dias	,74611	3,51840	1,0000	-13,9779	15,4701

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

DMSO/14 dias	Pau- pereira/2 dias	3,90243	2,88963	0,8654	-6,1831	13,9879
	Pau- pereira/7 dias	5,51553	2,11827	0,2313	-1,9472	12,9783
DMSO/21 dias	Pau- pereira/14 dias	1,94806*	,54625	0,0381	,0759	3,8202
	Pau- pereira/21 dias	9,90877*	1,50597	0,0003	4,5501	15,2674
DMSO/14 dias	DMSO/2 dias	9,37931	4,13274	0,4132	-7,6002	26,3589
	DMSO/7 dias	6,30153*	1,33909	0,0457	,1394	12,4637
DMSO/21 dias	DMSO/2 1 dias	7,04764	3,26088	0,4829	-8,1003	22,1956
	Pau- pereira/2 dias	-3,14521	4,35155	0,9945	-18,6401	12,3496
DMSO/14 dias	Pau- pereira/7 dias	-1,53211	3,88240	0,9999	-16,2615	13,1972
	Pau- pereira/14 dias	-5,09958	3,29914	0,7648	-20,1264	9,9273
DMSO/21 dias	Pau- pereira/21 dias	2,86113	3,58524	0,9878	-11,7471	17,4693
	DMSO/2 dias	2,33167	5,25980	0,9997	-16,7212	21,3845
DMSO/14 dias	DMSO/7 dias	-,74611	3,51840	1,0000	-15,4701	13,9779
	DMSO/1 4 dias	-7,04764	3,26088	0,4829	-22,1956	8,1003

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Valor p < 0,05 indica diferença estatisticamente significante entre os dois Tratamentos (Grupo x Tempo) comparados

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9

1

Testes de Normalidade

Grupo x Tempo		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estatística	gl	Valor p	Estatística	gl	Valor p
Porcentagem da imunopressão da MMP-1	Controle / 2 dias	,170	12	,200	,918	12	,273
	Controle / 7 dias	,289	7	,080	,877	7	,213
	Controle / 14 dias	,179	16	,182	,913	16	,132
	Controle / 21 dias	,273	5	,200	,857	5	,218
	Experimental / 2 dias	,210	13	,120	,944	13	,507
	Experimental / 7 dias	,198	8	,200	,931	8	,525
	Experimental / 14 dias	,108	25	,200	,960	25	,415
	Experimental / 21 dias	,122	14	,200	,971	14	,889

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Descritivas

Porcentagem da imunopressão da MMP-1

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Controle	40	3,158432	1,9271167	,3047039	2,542110	3,774754	,6674	9,9313
Experimental	60	4,428457	2,4146758	,3117333	3,804680	5,052234	,5901	10,8289
Total	100	3,920447	2,3084329	,2308433	3,462404	4,378490	,5901	10,8289

Teste de Homogeneidade de Variâncias

Porcentagem da imunopressão da MMP-1

Estatística de Levene	gl1	gl2	Valor p
2,474	1	98	0,1190

2

Descritivas

Porcentagem da imunopressão da MMP-1

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
2 dias	25	2,801716	1,3251991	,2650398	2,254700	3,348731	,6674	5,4971
7 dias	15	5,547063	2,6283912	,6786477	4,091508	7,002617	1,8124	9,9802
14 dias	41	4,084325	2,6142352	,4082749	3,259170	4,909479	,5901	10,8289
21 dias	19	3,754660	1,5405990	,3534377	3,012115	4,497205	1,1076	6,8475
Total	100	3,920447	2,3084329	,2308433	3,462404	4,378490	,5901	10,8289

Porcentagem da imunopressão da MMP-1

Estatística de Levene	gl1	gl2	Valor p
5,422	3	96	0,0017

Descritivas

Porcentagem da imunopressão da MMP-1

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Controle / 2 dias	12	2,523110	1,4891350	,4298763	1,576959	3,469261	,6674	5,4971
Controle / 7 dias	7	5,445972	2,4154275	,9129458	3,212074	7,679870	2,8068	9,9313
Controle / 14 dias	16	2,624700	1,5841983	,3960496	1,780541	3,468860	,7575	5,5534
Controle / 21 dias	5	3,188589	,6628864	,2964518	2,365507	4,011671	2,0785	3,7633
Experimental / 2 dias	13	3,058890	1,1533882	,3198923	2,361904	3,755876	1,3772	5,0383
Experimental / 7 dias	8	5,635517	2,9659567	1,0486241	3,155915	8,115119	1,8124	9,9802
Experimental / 14 dias	25	5,018484	2,7372383	,5474477	3,888608	6,148361	,5901	10,8289
Experimental / 21 dias	14	3,956828	1,7273803	,4616618	2,959469	4,954188	1,1076	6,8475
Total	100	3,920447	2,3084329	,2308433	3,462404	4,378490	,5901	10,8289

Teste de Homogeneidade de Variâncias

Porcentagem da imunopressão da MMP-1

Estatística de Levene	gl1	gl2	Valor p
2,759	7	92	0,0120

Comparações múltiplas

Porcentagem da imunopressão da

Variável dependente: MMP-1

Games-Howell

(I) Tempo	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Valor p	Intervalo de Confiança 95%	
				Limite inferior	Limite superior
2 dias	7 dias	-2,7453473	,7285663	0,0068	-4,800693 - ,690002
	14 dias	-1,2826091	,4867592	0,0506	-2,567500 ,002282
	21 dias	-,9529444	,4417740	0,1551	-2,143520 ,237631
7 dias	2 dias	2,7453473	,7285663	0,0068	,690002 4,800693
	14 dias	1,4627382	,7919919	0,2762	-,716788 3,642264
	21 dias	1,7924029	,7651672	0,1196	-,337064 3,921869

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

14 dias	2 dias	1,2826091	,4867592	0,0506	-,002282	2,567500
	7 dias	-1,4627382	,7919919	0,2762	-3,642264	,716788
	21 dias	,3296647	,5400061	0,9283	-1,101446	1,760776
21 dias	2 dias	,9529444	,4417740	0,1551	-,237631	2,143520
	7 dias	-1,7924029	,7651672	0,1196	-3,921869	,337064
	14 dias	-,3296647	,5400061	0,9283	-1,760776	1,101446

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Comparações múltiplas

Variável dependente: Percentagem da imunexpressão da MMP-1

Games-Howell

(I) Grupo x Tempo	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Valor p	Intervalo de Confiança 95%		
				Limite inferior	Limite superior	
Controle / 2 dias	Controle / 7 dias	-2,9228620	1,0090905	0,1846	-6,828291	,982567
	Controle / 14 dias	-,1015904	,5845074	1,0000	-2,033238	1,830057
	Controle / 21 dias	-,6654791	,5221851	0,8947	-2,493594	1,162636
	Experimental / 2 dias	-,5357799	,5358402	0,9693	-2,335449	1,263889
	Experimental / 7 dias	-3,1124072	1,1333164	0,2175	-7,423459	1,198644
	Experimental / 14 dias	-2,4953742*	,6960550	0,0206	-4,740141	-,250608
	Experimental / 21 dias	-1,4337181	,6308131	0,3474	-3,522944	,655507
Controle / 7 dias	Controle / 2 dias	2,9228620	1,0090905	0,1846	-,982567	6,828291
	Controle / 14 dias	2,8212717	,9951509	0,2040	-1,072295	6,714838
	Controle / 21 dias	2,2573830	,9598717	0,3771	-1,654158	6,168924
	Experimental / 2 dias	2,3870822	,9673681	0,3290	-1,508990	6,283154
	Experimental / 7 dias	-,1895452	1,3903533	1,0000	-5,156498	4,777408
	Experimental / 14 dias	,4274879	1,0645041	0,9999	-3,506468	4,361444
	Experimental / 21 dias	1,4891439	1,0230355	0,8126	-2,421612	5,399900
Controle / 14 dias	Controle / 2 dias	,1015904	,5845074	1,0000	-1,830057	2,033238
	Controle / 7 dias	-2,8212717	,9951509	0,2040	-6,714838	1,072295
	Controle / 21 dias	-,5638887	,4947110	0,9381	-2,266179	1,138401
	Experimental / 2 dias	-,4341895	,5091035	0,9879	-2,105077	1,236698
	Experimental / 7 dias	-3,0108169	1,1209227	0,2385	-7,310170	1,288536
	Experimental / 14 dias	-2,3937838*	,6756879	0,0212	-4,557410	-,230158
	Experimental / 21 dias	-1,3321277	,6082655	0,3885	-3,328897	,664642

Controle / 21 dias	Controle / 2 dias	,6654791	,5221851	0,8947	-1,162636	2,493594
	Controle / 7 dias	-2,2573830	,9598717	0,3771	-6,168924	1,654158
	Controle / 14 dias	,5638887	,4947110	0,9381	-1,138401	2,266179
	Experimental / 2 dias	,1296992	,4361362	1,0000	-1,429288	1,688687
	Experimental / 7 dias	-2,4469282	1,0897229	0,4141	-6,748560	1,854704
	Experimental / 14 dias	-1,8298951	,6225613	0,1043	-3,874721	,214931
	Experimental / 21 dias	-,7682390	,5486486	0,8450	-2,657142	1,120664
Experimental / 2 dias	Controle / 2 dias	,5357799	,5358402	0,9693	-1,263889	2,335449
	Controle / 7 dias	-2,3870822	,9673681	0,3290	-6,283154	1,508990
	Controle / 14 dias	,4341895	,5091035	0,9879	-1,236698	2,105077
	Controle / 21 dias	-,1296992	,4361362	1,0000	-1,688687	1,429288
	Experimental / 7 dias	-2,5766273	1,0963318	0,3668	-6,870186	1,716931
	Experimental / 14 dias	-1,9595943	,6084819	0,0069	-3,366700	-,552488
	Experimental / 21 dias	-,8979382	,5616607	0,7463	-2,766897	,971021
Experimental / 7 dias	Controle / 2 dias	3,1124072	1,1333164	0,2175	-1,198644	7,423459
	Controle / 7 dias	,1895452	1,3903533	1,0000	-4,777408	5,156498
	Controle / 14 dias	3,0108169	1,1209227	0,2385	-1,288536	7,310170
	Controle / 21 dias	2,4469282	1,0897229	0,4141	-1,854704	6,748560
	Experimental / 2 dias	2,5766273	1,0963318	0,3668	-1,716931	6,870186
	Experimental / 14 dias	,6170331	1,1829249	0,9992	-3,727073	4,961139
	Experimental / 21 dias	1,6786891	1,1457504	0,8089	-2,639491	5,996869
Experimental / 14 dias	Controle / 2 dias	2,4953742	,6960550	0,0206	,250608	4,740141
	Controle / 7 dias	-,4274879	1,0645041	0,9999	-4,361444	3,506468
	Controle / 14 dias	2,3937838	,6756879	0,0212	,230158	4,557410
	Controle / 21 dias	1,8298951	,6225613	0,1043	-,214931	3,874721
	Experimental / 2 dias	1,9595943	,6084819	0,0069	,552488	3,366700
	Experimental / 7 dias	-,6170331	1,1829249	0,9992	-4,961139	3,727073
	Experimental / 21 dias	1,0616561	,7161219	0,8115	-1,239720	3,363032
Experimental / 21 dias	Controle / 2 dias	1,4337181	,6308131	0,3474	-,655507	3,522944
	Controle / 7 dias	-1,4891439	1,0230355	0,8126	-5,399900	2,421612
	Controle / 14 dias	1,3321277	,6082655	0,3885	-,664642	3,328897
	Controle / 21 dias	,7682390	,5486486	0,8450	-1,120664	2,657142
	Experimental / 2 dias	-,8979382	,5616607		-,971021	2,766897

Experimental / 7 dias	-1,6786891	1,1457504	0,7463	-5,996869	2,639491
Experimental / 14 dias	-1,0616561	,7161219	0,8115	-3,363032	1,239720

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

1
2
3

Testes de Normalidade

Variável	GrupoxTempo	Shapiro-Wilk		
		Estatística	gl	Valor p
IL-6(%)	DMSO / 2 dias	0,9176	8	0,4111
	DMSO / 7 dias	0,9475	8	0,6862
	DMSO / 14 dias	0,9258	8	0,4786
	DMSO / 21 dias	0,9059	6	0,4099
	Pau Pereira / 2 dias	0,9513	8	0,7245
	Pau Pereira / 7 dias	0,8885	8	0,2266
	Pau Pereira / 14 dias	0,8899	8	0,2336
	Pau Pereira / 21 dias	0,9034	6	0,3946
MMP-8 (%)	DMSO / 2 dias	0,9650	8	0,8565
	DMSO / 7 dias	0,8814	8	0,1942
	DMSO / 14 dias	0,8989	8	0,2823
	DMSO / 21 dias	0,8073	6	0,0683
	Pau Pereira / 2 dias	0,8251	8	0,0528
	Pau Pereira / 7 dias	0,8892	8	0,2302
	Pau Pereira / 14 dias	0,9407	8	0,6183
	Pau Pereira / 21 dias	0,8589	6	0,1853

4

Descritivas									
Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
						Limite inferior	Limite superior		
IL-6(%)	DMSO	30	4,5414	2,8155	0,5140	3,4901	5,5927	0,5192	10,4561
	Pau Pereira	30	7,5254	3,4884	0,6369	6,2229	8,8280	1,9032	12,6961
	Total	60	6,0334	3,4845	0,4498	5,1333	6,9336	0,5192	12,6961
MMP-8 (%)	DMSO	30	10,1833	13,3123	2,4305	5,2124	15,1542	2,0631	49,4754
	Pau Pereira	30	7,3214	4,4817	0,8182	5,6479	8,9949	1,7563	18,3984
	Total	60	8,7524	9,9530	1,2849	6,1812	11,3235	1,7563	49,4754

5

Teste de Homogeneidade de Variâncias				
Variável	Estatística de Levene	gl1	gl2	Valor p
IL-6(%)	1,988	1	58	0,1639
MMP-8 (%)	13,981	1	58	0,0004

6

7

Descritivas									
Variável	Tempo	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
						Limite inferior	Limite superior		
IL-6(%)	2 dias	16	2,7339	0,9301	0,2325	2,2384	3,2295	1,2752	4,7621
	7 dias	16	7,1431	3,2384	0,8096	5,4174	8,8687	1,3857	12,6961
	14 dias	16	8,5498	3,5415	0,8854	6,6627	10,4369	1,2386	12,6912
	21 dias	12	5,5981	2,3444	0,6768	4,1085	7,0877	0,5192	8,8136
	Total	60	6,0334	3,4845	0,4498	5,1333	6,9336	0,5192	12,6961
MMP-8 (%)	2 dias	16	20,4056	13,4208	3,3552	13,2541	27,5570	3,9156	49,4754
	7 dias	16	5,0135	2,6321	0,6580	3,6110	6,4161	2,0631	9,6052
	14 dias	16	5,0081	1,3332	0,3333	4,2977	5,7185	3,3782	7,7237
	21 dias	12	3,1922	1,3671	0,3946	2,3236	4,0608	1,7563	4,9524
	Total	60	8,7524	9,9530	1,2849	6,1812	11,3235	1,7563	49,4754
Teste de Homogeneidade de Variâncias									
	Estadística de Levene	gl1	gl2	Valor p					
IL-6(%)	5,943	3	56	0,0014					
MMP-8 (%)	22,615	3	56	0,0000					

1

Descritivas									
Variável	Grupo x Tempo	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
						Limite inferior	Limite superior		
IL-6(%)	DMSO / 2 dias	8	2,6820	1,1646	0,4117	1,7084	3,6556	1,2752	4,7621
	DMSO / 7 dias	8	4,9644	2,8065	0,9923	2,6181	7,3107	1,3857	9,2530
	DMSO / 14 dias	8	6,1688	3,3551	1,1862	3,3639	8,9737	1,2386	10,4561
	DMSO / 21 dias	6	4,2869	2,6754	1,0922	1,4792	7,0945	0,5192	8,8136
	Pau Pereira / 2 dias	8	2,7859	0,7008	0,2478	2,2000	3,3718	1,9032	3,9454
	Pau Pereira / 7 dias	8	9,3217	1,9355	0,6843	7,7036	10,9399	6,9695	12,6961
	Pau Pereira / 14 dias	8	10,9308	1,6314	0,5768	9,5670	12,2947	8,5919	12,6912
	Pau Pereira / 21 dias	6	6,9093	0,8988	0,3669	5,9661	7,8526	5,9402	8,1212
	Total	60	6,0334	3,4845	0,4498	5,1333	6,9336	0,5192	12,6961
MMP-8 (%)	DMSO / 2 dias	8	27,7670	15,7864	5,5813	14,5692	40,9647	3,9156	49,4754
	DMSO / 7 dias	8	2,7867	0,5487	0,1940	2,3280	3,2455	2,0631	3,3956
	DMSO / 14 dias	8	4,3100	0,8486	0,3000	3,6005	5,0195	3,3782	5,5394
	DMSO / 21 dias	6	4,4317	0,6427	0,2624	3,7572	5,1062	3,3429	4,9524
	Pau Pereira / 2 dias	8	13,0442	3,5911	1,2696	10,0420	16,0464	9,8286	18,3984
	Pau Pereira / 7 dias	8	7,2404	1,7918	0,6335	5,7424	8,7384	5,2329	9,6052
	Pau Pereira / 14 dias	8	5,7061	1,4052	0,4968	4,5314	6,8809	3,7264	7,7237
	Pau Pereira / 21 dias	6	1,9527	0,1060	0,0433	1,8415	2,0640	1,7563	2,0655
	Total	60	8,7524	9,9530	1,2849	6,1812	11,3235	1,7563	49,4754
Teste de Homogeneidade de Variâncias									
	Estadística de Levene	gl1	gl2	Valor p					
IL-6(%)	3,191	7	52	0,0069					
MMP-8 (%)	20,353	7	52	0,0000					

2

3

4

5

ANOVA A DOIS CRITÉRIOS

		Rótulo de valor	N
Grupo	1	DMSO	30
	2	Pau Pereira	30
Tempo	1	2 dias	16
	2	7 dias	16
	3	14 dias	16
	4	21 dias	12

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: IL-6(%)						
Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Poder observado ^b
Grupo	129,527	1	129,527	29,089	0,000002	0,9995683
Tempo	297,474	3	99,158	22,269	0,000000	0,9999999
Grupo * Tempo	53,763	3	17,921	4,025	0,011949	0,8115388
Erro	231,543	52	4,453			
Total corrigido	716,347	59				

b. Calculado usando alfa = ,05

Comparações múltiplas

Variável dependente: IL-6(%)

Games-Howell

(I) Tempo		Diferença média (I-J)	Erro Erro	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
2 dias	7 dias	-4,409109*	,8423223	0,0003	-6,796978	-2,021239
	14 dias	-5,815859*	,9153926	0,0000	-8,416982	-3,214736
	21 dias	-2,864159*	,7156026	0,0066	-4,951662	-,776655
7 dias	2 dias	4,409109*	,8423223	0,0003	2,021239	6,796978
	14 dias	-1,406751	1,1997191	0,6484	-4,670413	1,856911
	21 dias	1,544950	1,0552106	0,4727	-1,349939	4,439839
14 dias	2 dias	5,815859*	,9153926	0,0000	3,214736	8,416982
	7 dias	1,406751	1,1997191	0,6484	-1,856911	4,670413
	21 dias	2,951701	1,1144085	0,0615	-,107937	6,011338
21 dias	2 dias	2,864159*	,7156026	0,0066	,776655	4,951662
	7 dias	-1,544950	1,0552106	0,4727	-4,439839	1,349939
	14 dias	-2,951701	1,1144085	0,0615	-6,011338	-,107937

*. A diferença média é significativa no nível ,05.

- 1
- 2
- 3

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: IL-6(%)						
Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Poder observado ^b
GrupoxTempo	484,804	7	69,258	15,554	0,0000000	0,999999999947
Total corrigido	716,347	59				

b. Calculado usando alfa = ,05

Comparações múltiplas

Variável dependente: IL-6(%)
Games-Howell

(I) Grupo x Tempo		Diferença média (I-J)	Erro Erro	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
DMSO / 2 dias	DMSO / 7 dias	-2,282342	1,0742871	0,4628	-6,372910	1,808226
	DMSO / 14 dias	-3,486782	1,2556219	0,2161	-8,354497	1,380932
	DMSO / 21 dias	-1,604846	1,1672399	0,8427	-6,537701	3,328009
	Pau Pereira / 2 dias	-,103855	,4805467	1,0000	-1,857172	1,649462
	Pau Pereira / 7 dias	-6,639730*	,7986301	0,0001	-9,553665	-3,725795
	Pau Pereira / 14 dias	-8,248791*	,7086578	0,0000	-10,789939	-5,707643
	Pau Pereira / 21 dias	-4,227327*	,5515217	0,0001	-6,224513	-2,230140
DMSO / 7 dias	DMSO / 2 dias	2,282342	1,0742871	0,4628	-1,808226	6,372910
	DMSO / 14 dias	-1,204440	1,5464871	0,9916	-6,687483	4,278602
	DMSO / 21 dias	,677496	1,4756304	0,9997	-4,731169	6,086161
	Pau Pereira / 2 dias	2,178487	1,0227225	0,4689	-1,886563	6,243536
	Pau Pereira / 7 dias	-4,357388*	1,2053407	0,0485	-8,693265	-,021511
	Pau Pereira / 14 dias	-5,966449*	1,1477072	0,0046	-10,170387	-1,762512
	Pau Pereira / 21 dias	-1,944985	1,0579283	0,6145	-6,028819	2,138849
DMSO / 14 dias	DMSO / 2 dias	3,486782	1,2556219	0,2161	-1,380932	8,354497
	DMSO / 7 dias	1,204440	1,5464871	0,9916	-4,278602	6,687483
	DMSO / 21 dias	1,881937	1,6124449	0,9270	-3,961803	7,725676
	Pau Pereira / 2 dias	3,382927	1,2117981	0,2246	-1,478786	8,244640
	Pau Pereira / 7 dias	-3,152948	1,3694304	0,3679	-8,173373	1,867478
	Pau Pereira / 14 dias	-4,762009*	1,0550767	0,0000	-6,879175	-2,644842
	Pau Pereira / 21 dias	-,740544	1,2416545	0,9979	-5,606855	4,125767
DMSO / 21 dias	DMSO / 2 dias	1,604846	1,1672399	0,8427	-3,328009	6,537701
	DMSO / 7 dias	-,677496	1,4756304	0,9997	-6,086161	4,731169
	DMSO / 14 dias	-1,881937	1,6124449	0,9270	-7,725676	3,961803
	Pau Pereira / 2 dias	1,500991	1,1199631	0,8540	-3,503116	6,505097
	Pau Pereira / 7 dias	-5,034884*	1,2888764	0,0475	-10,021343	-,048425
	Pau Pereira / 14 dias	-6,643945*	1,2351470	0,0098	-11,574562	-1,713329
	Pau Pereira / 21 dias	-2,622481	1,1522016	0,4208	-7,576828	2,331865

- 1
- 2
- 3

Pau Pereira / 2 dias	DMSO / 2 dias	,103855	,4805467	1,0000	-1,649462	1,857172
	DMSO / 7 dias	-2,178487	1,0227225	0,4689	-6,243536	1,886563
	DMSO / 14 dias	-3,382927	1,2117981	0,2246	-8,244640	1,478786
	DMSO / 21 dias	-1,500991	1,1199631	0,8540	-6,505097	3,503116
	Pau Pereira / 7 dias	-6,535875*	,7277902	0,0002	-9,346096	-3,725654
	Pau Pereira / 14 dias	-8,144936*	,6277454	0,0000	-10,526137	-5,763735
	Pau Pereira / 21 dias	-4,123472*	,4427693	0,0001	-5,814120	-2,432823
Pau Pereira / 7 dias	DMSO / 2 dias	6,639730*	,7986301	0,0001	3,725795	9,553665
	DMSO / 7 dias	4,357388*	1,2053407	0,0485	,021511	8,693265
	DMSO / 14 dias	3,152948	1,3694304	0,3679	-1,867478	8,173373
	DMSO / 21 dias	5,034884*	1,2888764	0,0475	,048425	10,021343
	Pau Pereira / 2 dias	6,535875*	,7277902	0,0002	3,725654	9,346096
	Pau Pereira / 14 dias	-1,609061	,8949576	0,6314	-4,780891	1,562768
	Pau Pereira / 21 dias	2,412403	,7764854	0,1248	-,476051	5,300858
Pau Pereira / 14 dias	DMSO / 2 dias	8,248791*	,7086578	0,0000	5,707643	10,789939
	DMSO / 7 dias	5,966449*	1,1477072	0,0046	1,762512	10,170387
	DMSO / 14 dias	4,762009*	1,0550767	0,0000	2,644842	6,879175
	DMSO / 21 dias	6,643945*	1,2351470	0,0098	1,713329	11,574562
	Pau Pereira / 2 dias	8,144936*	,6277454	0,0000	5,763735	10,526137
	Pau Pereira / 7 dias	1,609061	,8949576	0,6314	-1,562768	4,780891
	Pau Pereira / 21 dias	4,021464*	,6836046	0,0017	1,517089	6,525840
Pau Pereira / 21 dias	DMSO / 2 dias	4,227327*	,5515217	0,0001	2,230140	6,224513
	DMSO / 7 dias	1,944985	1,0579283	0,6145	-2,138849	6,028819
	DMSO / 14 dias	,740544	1,2416545	0,9979	-4,125767	5,606855
	DMSO / 21 dias	2,622481	1,1522016	0,4208	-2,331865	7,576828
	Pau Pereira / 2 dias	4,123472*	,4427693	0,0001	2,432823	5,814120
	Pau Pereira / 7 dias	-2,412403	,7764854	0,1248	-5,300858	,476051
	Pau Pereira / 14 dias	-4,021464*	,6836046	0,0017	-6,525840	-1,517089

*. A diferença média é significativa no nível ,05.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9

ANOVA A DOIS CRITÉRIOS

		Rótulo de valor	N
Grupo	1	DMSO	30
	2	Pau Pereira	30
Tempo	1	2 dias	16
	2	7 dias	16
	3	14 dias	16
	4	21 dias	12

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: MMP-8 (%)

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Poder observado ^b
Grupo	118,953	1	118,953	3,290	0,07549	0,428771096276
Tempo	2991,717	3	997,239	27,579	0,00000	0,999999999592
Grupo * Tempo	849,752	3	283,251	7,833	0,00021	0,984171721613
Erro	1880,310	52	36,160			
Total corrigido	5844,637	59				

b. Calculado usando alfa = ,05

Comparações múltiplas

Variável dependente: MMP-8 (%)

Games-Howell

(I) Tempo		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
2 dias	7 dias	15,3920403 [*]	3,4191269	0,0018	5,620003	25,164078
	14 dias	15,3975016 [*]	3,3717206	0,0018	5,701838	25,093165
	21 dias	17,2133599 [*]	3,3783360	0,0006	7,507250	26,919470
7 dias	2 dias	-15,3920403 [*]	3,4191269	0,0018	-25,164078	-5,620003
	14 dias	,0054613	,7376253	1,0000	-2,041193	2,052116
	21 dias	1,8213196	,7672976	0,1101	-,298136	3,940776
14 dias	2 dias	-15,3975016 [*]	3,3717206	0,0018	-25,093165	-5,701838
	7 dias	-,0054613	,7376253	1,0000	-2,052116	2,041193
	21 dias	1,8158583 [*]	,5165430	0,0091	,388790	3,242926
21 dias	2 dias	-17,2133599 [*]	3,3783360	0,0006	-26,919470	-7,507250
	7 dias	-1,8213196	,7672976	0,1101	-3,940776	,298136
	14 dias	-1,8158583 [*]	,5165430	0,0091	-3,242926	-,388790

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Testes de efeitos entre sujeitos

Variável dependente: MMP-8 (%)

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.	Poder observado ^b
Grupo x Tempo	3964,327	7	566,332	15,662	0,000000	0,999999999957
Erro	1880,310	52	36,160			
Total corrigido	5844,637	59				

b. Calculado usando alfa = ,05

Comparações múltiplas

Variável dependente: MMP-8 (%)

Games-Howell

(I) Grupo x Tempo		Diferença média (I-J)	Erro Erro	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
DMSO / 2 dias	DMSO / 7 dias	24,980240*	5,5847062	0,0331	2,032694	47,927786
	DMSO / 14 dias	23,456946*	5,5893943	0,0450	,513704	46,400188
	DMSO / 21 dias	23,335259*	5,5874993	0,0462	,390279	46,280240
	Pau Pereira / 2 dias	14,722749	5,7239208	0,2896	-8,146976	37,592475
	Pau Pereira / 7 dias	20,526590*	3,0066510	0,0000	14,493304	26,559877
	Pau Pereira / 14 dias	22,060806*	5,6034019	0,0000	16,027520	28,094093
	Pau Pereira / 21 dias	25,814210*	5,5815031	0,0281	2,863651	48,764769
DMSO / 7 dias	DMSO / 2 dias	-24,980240*	5,5847062	0,0331	-47,927786	-2,032694
	DMSO / 14 dias	-1,523294*	,3573007	0,0174	-2,816859	-,229728
	DMSO / 21 dias	-1,644981*	,3263178	0,0081	-2,872687	-,417274
	Pau Pereira / 2 dias	-10,257490*	1,2843689	0,0010	-15,466925	-5,048056
	Pau Pereira / 7 dias	-4,453649*	,6625497	0,0019	-7,049993	-1,857306
	Pau Pereira / 14 dias	-2,919433*	,5333357	0,0057	-4,963310	-,875556
	Pau Pereira / 21 dias	,833970*	,1987755	0,0394	,038754	1,629187
DMSO / 14 dias	DMSO / 2 dias	-23,456946*	5,5893943	0,0450	-46,400188	-,513704
	DMSO / 7 dias	1,523294*	,3573007	0,0174	,229728	2,816859
	DMSO / 21 dias	-,121687	,3985836	1,0000	-1,564629	1,321255
	Pau Pereira / 2 dias	-8,734197*	1,3046030	0,0025	-13,936089	-3,532304
	Pau Pereira / 7 dias	-2,930356*	,7009690	0,0266	-5,560020	-,300692
	Pau Pereira / 14 dias	-1,396140	,5803728	0,3211	-3,512839	,720560
	Pau Pereira / 21 dias	2,357264*	,3031456	0,0012	1,125868	3,588660
DMSO / 21 dias	DMSO / 2 dias	-23,335259*	5,5874993	0,0462	-46,280240	-,390279
	DMSO / 7 dias	1,644981*	,3263178	0,0081	,417274	2,872687
	DMSO / 14 dias	,121687	,3985836	1,0000	-1,321255	1,564629
	Pau Pereira / 2 dias	-8,612510*	1,2964600	0,0028	-13,817454	-3,407566
	Pau Pereira / 7 dias	-2,808669*	,6856947	0,0340	-5,426984	-,190354
	Pau Pereira / 14 dias	-1,274453	,5618293	0,3883	-3,367544	,818638
	Pau Pereira / 21 dias	2,478951*	,2659264	0,0019	1,268737	3,689165

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9

Pau Pereira / 2 dias	DMSO / 2 dias	-14,722749	5,7239208	0,2896	-37,592475	8,146976
	DMSO / 7 dias	10,257490*	1,2843689	0,0010	5,048056	15,466925
	DMSO / 14 dias	8,734197*	1,3046030	0,0025	3,532304	13,936089
	DMSO / 21 dias	8,612510*	1,2964600	0,0028	3,407566	13,817454
	Pau Pereira / 7 dias	5,803841*	1,4189071	0,0291	,513140	11,094542
	Pau Pereira / 14 dias	7,338057*	1,3633680	0,0063	2,114360	12,561754
	Pau Pereira / 21 dias	11,091461*	1,2703688	0,0007	5,871368	16,311554
Pau Pereira / 7 dias	DMSO / 2 dias	-20,526590*	3,0066510	0,0000	-26,559877	-14,493304
	DMSO / 7 dias	4,453649*	,6625497	0,0019	1,857306	7,049993
	DMSO / 14 dias	2,930356*	,7009690	0,0266	,300692	5,560020
	DMSO / 21 dias	2,808669*	,6856947	0,0340	,190354	5,426984
	Pau Pereira / 2 dias	-5,803841*	1,4189071	0,0291	-11,094542	-,513140
	Pau Pereira / 14 dias	1,534216	,8050720	0,5694	-1,331321	4,399753
	Pau Pereira / 21 dias	5,287620*	,6349847	0,0009	2,683945	7,891295
Pau Pereira / 14 dias	DMSO / 2 dias	-22,060806*	5,6034019	0,0000	-28,094093	-16,027520
	DMSO / 7 dias	2,919433*	,5333357	0,0057	,875556	4,963310
	DMSO / 14 dias	1,396140	,5803728	0,3211	-,720560	3,512839
	DMSO / 21 dias	1,274453	,5618293	0,3883	-,818638	3,367544
	Pau Pereira / 2 dias	-7,338057*	1,3633680	0,0063	-12,561754	-2,114360
	Pau Pereira / 7 dias	-1,534216	,8050720	0,5694	-4,399753	1,331321
	Pau Pereira / 21 dias	3,753404*	,4986788	0,0017	1,712209	5,794598
Pau Pereira / 21 dias	DMSO / 2 dias	-25,814210*	5,5815031	0,0281	-48,764769	-2,863651
	DMSO / 7 dias	-,833970*	,1987755	0,0394	-1,629187	-,038754
	DMSO / 14 dias	-2,357264*	,3031456	0,0012	-3,588660	-1,125868
	DMSO / 21 dias	-2,478951*	,2659264	0,0019	-3,689165	-1,268737
	Pau Pereira / 2 dias	-11,091461*	1,2703688	0,0007	-16,311554	-5,871368
	Pau Pereira / 7 dias	-5,287620*	,6349847	0,0009	-7,891295	-2,683945
	Pau Pereira / 14 dias	-3,753404*	,4986788	0,0017	-5,794598	-1,712209

*. A diferença média é significativa no nível ,05.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

1 Normas para publicação

2 3 The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics - Instructions to Authors

4 5 Scope of Submitted Manuscripts

6 The *Journal* invites for review original papers dealing with interactions of chemicals with biological
7 systems. All aspects of pharmacology and therapeutics are within the scope of the *Journal*. Research
8 papers should provide rigorous quantitative analyses and/or new insights on pharmacological
9 mechanisms.

10 All manuscripts are initially screened by the Editorial Board to ensure that each manuscript meets the
11 above criteria before peerreview. Manuscripts that provide descriptive case reports, lack complete dose-
12 response determinations, or do not communicate novel findings are not acceptable and will be rejected
13 without

14 peer review. Manuscripts dealing primarily with new methods will be reviewed only if data are presented
15 showing that new or more reliable pharmacological information has been obtained with their use. The
16 *Journal* will also consider for publication manuscripts that refutes previous findings published in the
17 journal. Such manuscripts should provide a rigorous and thorough investigation of the topic at hand, and
18 should independently advance our understanding of the field.

19 The Journal also invites authors to submit minireviews (4,000 – 6,000 words) that provide concise
20 perspectives, overviews, or commentaries of contemporary or emerging topics in pharmacology.
21 Submission procedures and organization of
22 minireviews are described in further detail below.

23 24 Submission of Manuscripts

25 All manuscripts submissions must be made through the journal's online manuscript system at
26 <http://submit.pet.aspetjournals.org>. Submissions mailed to the editorial office will not be processed. If
27 you are using the system for the first time, you must create an account before you can submit a paper.
28 To do so, please click "Create a new account". Complete instructions for using the
29 online manuscript system are provided in the Author Area; click on "Help with Online Submission". After
30 submission of your research manuscript, please mail or
31 fax (credit cards only) the items detailed below in a) and b) to *JPET*, ASPET Journals Department, 9650
32 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3995; telephone: 301-634-7063; fax: 301- 634-7158.

33 a) The manuscript handling fee is waived for manuscripts where any author is an ASPET member in
34 good standing. A check for \$75 for the manuscript handling fee (checks must be in U.S. dollars, drawn
35 on a U.S. bank, MICR encoded at the bottom of the check, and payable to ASPET). VISA, MasterCard,
36 Discover, and American Express credit cards are also accepted. When paying by credit card, provide the
37 cardholder's name, complete card number, expiration date, and include the three digits located on the
38 back of a Visa, MasterCard, or Discover card in the signature box or the four digits on the front of the
39 American Express card above the raised numbers. Please state whether the card is Visa, MasterCard,
40 Discover or American Express (no other cards are acceptable), and include the cardholder's signature.
41 Wire transfers are not permitted.

42 b) A completed copy of the Authorship Responsibility, Financial Disclosure, and Chemical Structure
43 Statement Form and Copyright Transfer Form at <http://bit.ly/2gbAhAO> signed by all authors.
44 (Alternatively, see the Open Access Option below.) Submission of a manuscript amounts to assurance
45 that it has
46 received proper clearance from the author's company or institution, that it has not been copyrighted,
47 published, or accepted for publication elsewhere, that it is not currently being considered for publication
48 elsewhere, and that it will not be submitted elsewhere while under consideration by the *Journal of*
49 *Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Indicate all potential conflicts of interest.

50 The corresponding author is responsible for obtaining permission from the copyright owner to reproduce
51 or modify figures and tables and to reproduce text (in whole or in part) from previous publications;
52 permissions must allow electronic
53 reproduction as well as print. A permission request form is available from the online *Instructions to*
54 *Authors*. Signed permissions forms must be submitted with the manuscript and be identified as to the
55 relevant item in the manuscript (e.g.,
56 "permissions for Fig. 1"). In addition, a statement indicating that the material is being reprinted with
57 permission must be included in the relevant figure legend or table footnote of the manuscript. Reprinted
58 text must be enclosed in quotation marks, and the permission statement must be included as running
59 text or

1 indicated parenthetically. Manuscripts must be in English, typewritten using **Arial** or **Times New Roman**
2 fonts only, and double-spaced throughout, including references, tables, and figure legends, with at least
3 1 inch (25 mm) margins. Authors for whom English is not their native language are encouraged to have
4 their manuscripts reviewed for grammar, vocabulary, syntax, and punctuation.

5 Many English-language editing services can be found through an online search and are available for a
6 fee. ASPET does not endorse or recommend any particular service.

7 **PDF-Only Submission**

8 Once manuscript preparation is complete, convert the text and figure files (but not supplemental data)
9 into a single PDF with a file size of less than **250 MB**. PDF preparation can be done by using Adobe
10 Acrobat, which is available for purchase

11 <http://adobe.com/products/main.html>. Microsoft Word also has a "Save As" feature that will allow you to
12 save a file in PDF format. (PC versions 2007 and higher, Macintosh 2004 and higher.) Figure resolution
13 may be reduced if this option is used. Authors are responsible for ensuring the accuracy and quality of
14 the PDF. **ALL SUBMISSIONS, INCLUDING REVISIONS MUST BE IN PDF FORMAT**. This file, along
15 with any supplementary files, must be uploaded into the journal's online
16 manuscript system at <http://submit-jpet.aspetjournals.org/>. Source files (manuscript, figure files) will be
17 requested only at time of acceptance.

18 *Requirements*

19 File size must be less than **250 MB**. Text and figures must be in one file with figures at the end of the
20 file. File must not contain supplemental data or supplemental legends. These must be uploaded
21 separately.

22 File name should be one word with no spaces and a .PDF file extension (e.g., MolPharm.pdf).
23 Remove password protections from the file. Do not place restrictions on the extraction of content or
24 modification of the PDF (this will disable reference extraction).

25 **Similarity Check (formerly known as CrossCheck)**

26 Similarity Check is a multi-publisher initiative to screen published and submitted content for originality.
27 ASPET uses iThenticate software to detect instances of overlapping and similar text in submitted
28 manuscripts. All manuscripts considered
29 for publication are screened using Similarity Check and iThenticate prior to acceptance. Visit
30 <http://www.crossref.org/crosscheck/index.html> for more
31 information about Similarity Check. Plagiarism will be reported to the authors' institution(s) and funder(s).

32 **Preprint Servers**

33 Manuscripts deposited in a preprint server may be submitted to *JPET*. A footnote must be included noting
34 that the manuscript has been deposited in a preprint server.

35 **Open Access Option**

36 Authors have the option to publish their work under a Creative Commons Attribution license (CC-BY) or
37 Creative Commons Attribution Noncommercial license (CC-BY-NC) for an open access fee that is in
38 addition to page charges. An Open Access License Agreement should be submitted in place of a
39 Copyright

40 Transfer Form. The form is available at <http://bit.ly/1RnIVLQ>. Open access articles will not appear online
41 until the open access fee has been paid through the Copyright Clearance Center's Rightslink for Open
42 Access (ROA) system. A link to the ROA is provided from the manuscript submission system. Some
43 funders

44 require authors to utilize an open access option when it is available—**know your funder's requirements**
45 **prior to submission**.

46 ASPET does not offer refunds of open access fees. If an error related to open access is identified in a
47 published article (e.g., missing Creative Commons license, article not freely accessible, or article not
48 deposited with PubMed Central), ASPET will correct the error.

49 **Organization of the Manuscript**

50 Manuscripts must be in English, typewritten using **Arial** or **Times New Roman** fonts only, and double-
51 spaced throughout, including references, tables, and figure legends, with at least 1 inch (25 mm) margins.
52 Manuscripts should contain the following sections **in the order listed**. Each section should be titled and
53 begin on a new page. All pages, excluding figure pages, should be numbered consecutively.

54 **1. Title Page.** This should contain the complete title of the article, the names of all authors, and the
55 primary laboratory of origin. Titles should be concise and accurately reflect the content of the paper.
56 Affiliation should be indicated by author initials only. Financial support for the research should not be on
57 this page but indicated as an unnumbered footnote to the title and included with other footnotes on a
58 separate page following the *References* section.

59 **2. Running Title Page.** The running title page should contain the following:

1 **a)** A running title, which conveys the sense of the full title (not to exceed 60 characters, including spaces
2 and punctuation). Commonly used abbreviations (e.g., “ATP”, “Ach”, etc.) may be used.

3 **b)** The name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the corresponding author.
4 Only one author may be designated as the corresponding author. The e-mail address will also be used
5 as a hypertext link in the paper. It is possible to list two corresponding authors on the published
6 manuscript. In such
7 cases, the relative roles of the two corresponding authors need to be explained in the cover letter that
8 accompanies submission. Nonetheless, a **single** author needs to be designated at the time of submission
9 who will be responsible for all correspondence during review and processing of the manuscript. The
10 additional
11 corresponding author should be listed on the manuscript’s running title page only and not entered into
12 the online manuscript submission system.

13 **c)** The number of text pages, number of tables, figures, and references, and the number of words in the
14 *Abstract, Introduction, and Discussion* (each item should be placed on a separate line).

15 **d)** A list of nonstandard abbreviations used in the paper, with abbreviations listed in alphabetical order.
16 A list of standard abbreviations is available at <http://bit.ly/2gbenCB>. The use of abbreviations should be
17 minimized to enhance readability and comprehension of the text.

18 **e)** A recommended section assignment to guide the listing in the table of contents. Section options are:
19 Behavioral Pharmacology Cardiovascular Cellular and Molecular Chemotherapy, Antibiotics, and Gene
20 Therapy Drug Discovery and Translational Medicine Endocrine and Diabetes Gastrointestinal, Hepatic,
21 Pulmonary, and Renal Inflammation, Immunopharmacology, and Asthma Metabolism, Transport, and
22 Pharmacogenomics Neuropharmacology Toxicology
23 Other

24 **3. Abstract.** The abstract should concisely present the hypothesis being tested, general methods,
25 results, and conclusions. Abstracts of more than 250 words will not be accepted. A word is one or more
26 characters bounded by White space. The abstract must be a single paragraph. IMPORTANT: If your
27 manuscript is accepted, the abstract entered into the online metadata form will appear online EXACTLY
28 the way you enter it during the submission process. Please make sure to code all special characters,
29 including sub- and superscripts, using the
30 codes available from the online submission system. **For revisions, update the abstract, if changed
31 from the original.**

32 **4. Visual Abstract.** In addition to a text abstract, authors may submit a visual or graphic abstract that is
33 intended to catch a reader’s attention and provides a quick visual impression of the gist of the article. The
34 graphic must be 440 pixels wide by 350- 365 pixels tall, saved as RGB. TIFF or PDF file formats are
35 preferred. Visual abstracts submitted in Word or PowerPoint are acceptable but should be avoided if
36 possible. Follow the image preparation guidelines given below for figures. The visual abstract will appear
37 below the text abstract in the abstract and HTML full-text views. A smaller version of the image, converted
38 from the authors’ file by our compositor, will appear on the table of contents.
39 A visual abstract should use color, be simple and clear, be entirely original (reprinted images and figures
40 will not be accepted), and should not include an image of any person, living or dead. Trademarked items
41 (e.g., company logos, images, and products) may not be used. The image should be labeled “Visual
42 Abstract,” similar to labeling a figure for identification by reviewers and for use in the “Fast Forward”
43 version of the paper.

44 **5. Introduction.** This section must contain a clear statement of the aims of the work or of the hypotheses
45 being tested. A brief account of the relevant background that supports the rationale of the study should
46 also be given. The length of the *Introduction* should not exceed 750 words.

47 **6. Materials and Methods.** Authors must affirm that original studies in animals have been carried out in
48 accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by
49 the U.S. National Institutes of Health, and were approved by the Institution’s Animal Care and use
50 Committee or local equivalent. For investigations involving human subjects, authors must affirm that they
51 have been carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional
52 Review Board(s) or equivalent ethics committee. For multisite studies, all IRBs must be in agreement.
53 This section should contain explicit, detailed and concise descriptions of all new methods or procedures
54 employed. Authors should review the NIH Principles and Guidelines for Reporting Preclinical Research
55 ([www.nih.gov/about/reporting-preclinicalresearch](http://www.nih.gov/about/reporting-preclinicalresearch.htm). htm). Whereas modifications of previously published
56 methods must be described, commonly used procedures require only a citation of the original source.
57 Descriptions of methods must not only be sufficient to enable the reader to judge the accuracy,
58 reproducibility, blinding, and reliability of the experiment(s) but also to be able to reproduce the results.
59 The name and location (city and state or country) of commercial suppliers of chemicals, reagents, and
60 equipment must be given. For biological materials, give the source, catalog, and batch numbers (where

1 applicable). For antibodies, also provide references describing their selectivity if this is not assessed in
2 the current paper, and dilutions used. Sources of compounds, reagents, and equipment not available
3 commercially should be identified by name and affiliation here or in the *Acknowledgments* section. The
4 chemical identity or structure of novel drugs or research compounds must be provided. The structures of
5 novel biologic agents must also be provided, at the level of current knowledge. Report the source of cell
6 lines and, if known, their authentication and mycoplasma contamination status. For animal experiments,
7 authors should report the source, species, strain, sex, age, randomization, and husbandry of the animals.
8 Report the strain characteristics of genetically engineered animals including generations of back-
9 crossing, or percentage of contributing strains if genetic analysis was performed. In vivo studies and
10 studies using primary cultures of cells or tissues from animals or humans must state the sex of the
11 experimental subjects or tissue donors in the Materials and Methods section. The designations "mixed"
12 or "unknown" should be used as appropriate when the sex cannot be determined (e.g., embryonic or
13 early postnatal cultures, cell lines immortalized from a mixed culture, previously completed experiments
14 for which sex was not documented). **7. Results.** Contained in this section are the experimental data, with
15 no discussion of their significance. Results are typically presented in figures or tables, with no duplication
16 of information in the text. If a table or figure includes less than four values, the data should be presented
17 in the text rather than as a separate table
18 or figure. Magnitudes of variables reported should be expressed in numerals. Generally, units are
19 abbreviated without punctuation and with no distinction between singular and plural forms (e.g., 1 mg, 25
20 mg). Data should be presented in a quantitative manner where possible, with descriptive statistical
21 measures. Report not only the statistical tests used but also the exact value of *N* for each
22 group. Report how often each experiment was performed. Sufficient information about sample collection
23 must be provided to distinguish between independent biology data points and technical replicates. For
24 animal or human studies, authors are encouraged to use a power analysis to computer an appropriate
25 sample size during study design and should report the results. If any data or subjects were excluded,
26 clearly state the criteria that were used. Statistical probability (*P*) in tables, figures, and figure legends
27 should be expressed as **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001. For second comparisons, one, two, or
28 three daggers may be used. For multiple comparisons within a table, footnotes italicized in lower case,
29 superscript letters are used and defined in the table legend.
30 All data upon which the conclusion of the paper rely must be made available upon request (where
31 ethically appropriate) during consideration of the manuscript and to members of the scientific community
32 thereafter.
33 **8. Discussion.** Conclusions drawn from the results presented are included in this section. Whereas
34 speculative discussion is allowed, it must be identified as such and be based on the data presented. The
35 *Discussion* must be as concise as possible and should not exceed 1,500 words.
36 **9. Acknowledgments.** The *Acknowledgments* section is placed at the end of the text. Personal
37 assistance is noted here. Financial support is acknowledged as an unnumbered footnote to the title. See
38 Section 11, Footnotes.
39 **10. Authorship Contributions.** Each author's contributions to the manuscript as detailed on the
40 Authorship Responsibility, Financial Disclosure, and Chemical Structure Statement Form are to be given
41 in this section. All of the appropriate individuals must be named as authors of the work. Each of the
42 applicable authorship categories from the form is to be listed followed by the last name of each respective
43 author (use first initials when multiple authors share a last name). For example:
44 *Participated in research design:* Sung, Smith, Gupta, and Abel. *Conducted experiments:* Sung, Smith,
45 Gupta, J.D. White, S.T. White, and Abel. *Contributed new reagents or analytic tools:* Sung, J.D. White,
46 and S.T. White.
47 *Performed data analysis:* Sung, Gupta, J.D. White, and Abel.
48 *Wrote or contributed to the writing of the manuscript:* Gupta, J.D. White, S.T. White, and Abel.
49 **11. References.** References are cited in the text by giving the first author's name (or the first and second
50 if they are the only authors) and the year of publication (e.g., Ruth and Gehrig, 1929; McCarthy, 1952; or
51 Kennedy et al., 1960). In the reference list, the references should be arranged alphabetically by author
52 and not
53 numbered. The names of all authors should be given in the reference list. If reference is made to more
54 than one publication by the same author(s) in the same year, suffixes (a, b, c, etc.) should be added to
55 the year in the text citation and in the references list. Journal titles should be abbreviated as given in the
56 National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine catalog at
57 <http://bit.ly/2h3INDC>. References to personal communications, unpublished observations, and papers
58 submitted for publication are given in parentheses at the

1 appropriate location in the text, not in the list of references. Only papers that have been officially accepted
2 for publication may be cited as “in press” in the reference list. The authors are responsible for the
3 accuracy of the references. The format for
4 journal article, chapter, book, and publish-ahead-of-print journal article references is as follows: Fricks IP,
5 Maddileti S, Carter SRL, Lazarowski ER, Nicholas RA, Jacobson KA, and Harden TK (2008) UDP is a
6 competitive antagonist at the human P2Y₁₄ receptor.
7 *J Pharmacol Exp Ther* **325**: 588-594. Kappas A (2002) Development of heme oxygenase inhibitors for
8 the prevention of severe jaundice in infants: studies from laboratory bench to newborn nursery, in *Heme*
9 *Oxygenase in Biology and Medicine* (Abraham NG, Alam J, and Nath KA eds) pp 3-17, Kluwer
10 Academic/Plenum Publishers, New York.
11 Wilson JH and Hunt T (2008) *Molecular Biology of the Cell: A Problems Approach*, 5th ed. Garland
12 Science, New York.
13 Hanada K, Ikemi Y, Kukita K, Mihara K, and Ogata H (2008) Stereoselective first-pass metabolism of
14 verapamil in the small intestine and liver in rats. *Drug Metab Dispos*: 10.1124/dmd.107.020339.

15 **12. Footnotes.** Footnotes should be listed on a separate page and presented in the following order:
16 a) Unnumbered footnote providing the source of financial support. This information must be in the form
17 of a sentence with the name of the funding agency written out in full. Research funded by the NIH, the
18 Wellcome Trust, the Howard Hughes Medical Institute, and the Research Councils UK and its agencies
19 **MUST** include the grant number in square brackets: This work was supported by the National Institutes
20 of Health National Institute of Diabetes and Digestive and
21 Kidney Diseases [Grant XXXX]. Multiple grant numbers should be separated by a comma and a space.
22 Where the research was supported by more than one agency, the different agencies should be separated
23 by a semicolon with “and” before the final funder: This work was supported by the Wellcome Trust [Grants
24 XXX, YYY]; the National Institutes of Health National Cancer Institute [Grants ZZZ, AAA]; and the Howard
25 Hughes Medical Institute [Grant BBB]. Funding from these agencies may not be cited without a grant
26 number. **Articles funded by the NIH, the Wellcome Trust, HHMI, and the Research Councils UK will**
27 **be deposited with PubMed Central ONLY when such funding is cited.** When one or more authors
28 are NIH employees, the following footnote must be included:
29 This research was supported [in part] by the Intramural Research Program of the National Institutes of
30 Health [name of institute]. b) Unnumbered footnote providing thesis information, citation of meeting
31 abstracts where the work was previously presented, c) The name and full address (with street address
32 or P.O. box and postal code) and e-mail address of person to receive reprint requests. d) Numbered
33 footnotes, using superscript numbers, beginning with those (if any) to authors’ names and listed in order
34 of appearance.

35 **13. Figure Legends.** Figures are numbered consecutively with Arabic numerals and listed in order rather
36 than one per page. Legends must provide sufficient explanation for the reader to understand the figure
37 independent of the text. Authors should provide details regarding group sizes, replicates, and the
38 statistical analysis used for all experiments shown in each figure in the legends.

39 **14. Tables.** Each table must be double-spaced and begin on a separate page, each page numbered
40 continuous with the rest of the manuscript. Tables are numbered consecutively with Arabic numerals. A
41 brief descriptive title is provided at the top of each table. General statements about the table follow the
42 title in paragraph form. Footnotes to tables are referenced by italicized, lower case, superscript letters
43 and defined beneath the table. Acceptable formats for tables are Word and WordPerfect.

44 **15. Figures.**
45 *Image Manipulation:* Figures in manuscripts considered for acceptance will be examined for evidence of
46 manipulation. While certain modifications of primary data are often needed for clarity and/or brevity,
47 image manipulation for deceptive purposes, to unfairly enhance or eliminate or otherwise obscure data,
48 are grounds for rejection and may constitute misconduct. Inappropriate image manipulation will result in
49 rejection of the manuscript. Suspected misconduct may be reported to the authors’ institution(s) and
50 funder(s). No specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or
51 introduced. The groupings of images from different parts of the same gel, or from different gels, fields, or
52 exposures must be made explicit by the arrangement of the figure (e.g., using
53 dividing lines or ensuring white space separates lanes from different gels) and in the text of the figure
54 legend. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if they are applied to every
55 pixel in the image and as long as they do not obscure, eliminate, or misrepresent any information present
56 in the original, including the background. Nonlinear adjustments (e.g., changes to gamma settings) must
57 be disclosed in the figure legend. This policy is consistent with many leading peerreviewed journals
58 publishing biological data. For more detailed
59 information, see the “Guidelines for Best Practices in Image Processing” at <http://bit.ly/2gbA5Sf> from the
60 Office of Research Integrity. [*With thanks to Rockefeller Univ. Press.*]

1 *Figure Preparation:* If your manuscript is accepted for publication, you will be required to provide source
2 files prepared according to the following instructions.

3 To publish the figures in your article with the highest quality, it is important to submit digital art that
4 conforms to the appropriate resolution, size, color mode, and file format. Doing so will help to avoid delays
5 in publication and maximize the quality of images. These instructions are available as a PDF file with
6 screen

7 shots and example images at <http://bit.ly/2h3l19s>.

8 *Sizing and Preparation:* Submit figures at their final publication size; do not scale figures (printed 1:1).
9 Most figures should fit within a single column. See the table below for allowable widths. The height of all
10 figures must be ≤ 9.375 inches / 24 cm / 56.5 picas.

11 Columns Inches Centimeters Picas

12 $1 \leq 3.5 \leq 8.9 \leq 21$

13 $2 \leq 7.125 \leq 18.2 \leq 43$

14

15 **Page Charges**

16 Authors are assessed \$90 per typeset page (\$50 when at least one author has been an ASPET member
17 in good standing since the manuscript was submitted) for an accepted research manuscript. *JPET*
18 Editorial Board members will have their page charges waived once in each three-year term on the
19 Editorial Board. Authors will receive with their page proof a request for information concerning such
20 charges. Questions on business matters should be directed to the Journals Director, American Society
21 for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3995;
22 telephone: (301) 634-7060; fax: (301) 634-7158; email:
23 info@aspet.org.

24

25

26

27

28