



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

TAMIRIS DE FÁTIMA GOEBEL DE SOUZA

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E ACELERAÇÃO DA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS PELAS
PROTEÍNAS ISOLADAS DO LÁTEX DE *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel)**

FORTALEZA

2015

TAMIRIS DE FÁTIMA GOEBEL DE SOUZA

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E ACELERAÇÃO DA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS PELAS
PROTEÍNAS ISOLADAS DO LÁTEX DE *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- S719m Souza, Tamiris de Fátima Goebel de.
Modulação da resposta inflamatória e aceleração da cicatrização de feridas cutâneas experimentais pelas proteínas isoladas do látex de *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel)./ Tamiris de Fátima Goebel de Souza. – 2015.
105f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Farmacologia.
Orientação: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.
1. Cicatrização. 2. Apocynaceae. 3. Ferimentos e Lesões. 4. Látex. I. Título.

CDD 615.1

TAMIRIS DE FÁTIMA GOEBEL DE SOUZA

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E ACELERAÇÃO DA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS PELAS
PROTEÍNAS ISOLADAS DO LÁTEX DE *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

Aprovada em 19/01/2015

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Raquel Sombra Basílio de Oliveira
Centro Universitário Estácio do Ceará - Estácio/FIC

À **Deus** por guiar a minha vida, me dar sabedoria e fé para conquistar meus objetivos e não desistir dos meus sonhos.

À minha avó **Terezinha** que sempre acreditou em mim, teve paciência e me incentivou sempre.

Ao meu esposo, **Marney Diniz** pela imensa paciência comigo e por estar sempre ao meu lado me dando forças conquistar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me beneficiar com o seu amor e sua proteção em todos os momentos da minha vida, me dar sabedoria e paciência nos momentos mais difíceis e não me deixar fraquejar.

Aos meus pais, **Semiramis de França** e **José Roberto Arraes**, pela educação e amor dedicados a mim.

À minha avó, **Terezinha de Jesus de França**, a quem devo tudo o que sou, a quem me ensinou tudo o que sei, a quem me dedicou todo seu amor e sabedoria, moldou o meu caráter, meus princípios e me ensinou sobre o que vale a pena lutar nessa vida, e sempre acreditar em Deus.

Às minhas irmãs, **Ingrid de França Goebel** e **Semiramis Goebel Fernandes**, por todo amor, carinho e cumplicidade que me dedicaram, por me apoiar em todas minhas decisões sempre me mostrando o melhor caminho a seguir e principalmente sendo minha base sólida, a quem eu possa me inspirar e confiar.

Ao meu esposo, **Marney Diniz Pompeu** pela imensa paciência concedida, pelo apoio e amor dedicados em todos os momentos, desde a construção dos nossos sonhos até a dura realização dos mesmos, obrigada por sempre me consolar quando preciso e por me dar forças para continuar, obrigada por me fazer tão feliz.

À minha orientadora **Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar**, sempre compreensiva, amorosa e paciente, e que mesmo em meio à correria do dia-a-dia não deixa de nos orientar. Tenho orgulho de fazer parte da família Bioquímica/Farmacologia.

Ao **Prof. Dr. Márcio Viana Ramos**, pela colaboração e por disponibilizar a fração proteica que foi objeto de estudo neste trabalho. E à Profa. Dra. **Adriana Tomé** pela ajuda na análise histológica e por contribuir cientificamente para este trabalho.

À **Profa. Dra. Ingrid Samantha Tavares Figueiredo**, que me inspirou a estudar o modelo de cicatrização, pela sua disponibilidade e gentileza em me ajudar quando precisei e pela valiosa contribuição na minha banca de qualificação.

À **Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte** pela contribuição ao meu trabalho durante a minha banca de qualificação do mestrado.

Ao **Prof. Said Gonçalves da Cruz Fonseca**, pela imensa colaboração na criação e desenvolvimento da formulação de extrema importância para este trabalho, sempre disponível para me ajudar e contribuir cientificamente. Muito obrigada professor!

À técnica do laboratório **Patrícia Sâmara**, que devo muito por todos os conselhos, por toda a ajuda, paciência e amizade que cresceu mais ainda durante este trabalho. Espero que a nossa convivência continue sendo tão agradável como sempre foi.

À pós doutoranda **Dra. Maria Daniele Azevedo Teixeira Shuh**, obrigada pela companhia, amizade, conselhos e pela imensa contribuição em todas as etapas do meu trabalho, que a nossa amizade e parceria dure por muitos anos.

Aos IC's **Gisele, Yuri, Marília, Lucas e Lara** pela ajuda durante os experimentos, pela excelente convivência e por ter tido a chance de passar um pouco do que aprendi sobre cicatrização para vocês. E à minha parceira de trabalho em cicatrização **Mirele Vasconcelos**, pela ajuda nos experimentos e também pela paciência e excelente convivência que tivemos.

Aos meus amigos que sempre foram tão presentes na minha vida: **Anamaria, Anália, Bruna, Daisy, Juliano, Lívia Galvão, Luana, Camila Marques, Lívia Mendes e Camila Serra** que sempre me deram força e palavras positivas. Muito obrigada por acreditarem em mim e por me incentivarem a conquistar meus objetivos e também pela compreensão nos momentos em que tive que me ausentar para desenvolver esse trabalho.

Agradeço ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ao corpo docente e à Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade, pelos conhecimentos adquiridos ao longo do Mestrado e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

E a todos que trabalharam para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E ACELERAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS PELAS PROTEÍNAS ISOLADAS DO LÁTEX DE *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel)

O tratamento de feridas cutâneas crônicas resulta em altos custos e riscos de complicações que podem atrasar a resolução do processo de cicatrização. Neste estudo, uma formulação farmacêutica (pomada) foi desenvolvida contendo uma fração proteica isolada do látex de *Himatanthus drasticus* (HdLP) com o objetivo de investigar o seu efeito no processo de cicatrização de feridas excisionais em camundongos swiss machos ($25\pm 3,0$ g). Primeiramente, o teste de irritabilidade dermal em camundongos demonstrou que o tratamento tópico com a pomada contendo HdLP não foi capaz de provocar reações de irritação na pele íntegra e na pele escarificada. A análise macroscópica de feridas excisionais constatou que HdLP 0,5%, 1,0 % e 2,0% não interferiu nos sinais flogísticos de edema e hiperemia, mas o tratamento com HdLP 2,0% acelerou a contração das úlceras a partir do 9º dia após a indução cirúrgica da lesão, antecipou o surgimento do tecido cicatricial e favoreceu a reepitelização completa das feridas. Após a análise macroscópica, a concentração de HdLP 2,0% foi escolhida para o estudo histopatológico (infiltrado leucocitário, degranulação de mastócitos, fibroplasia e colagênese) e de mediadores inflamatórios (mieloperoxidase (MPO), níveis de nitrito e citocinas pró- e anti-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10). O tratamento com HdLP 2,0% foi capaz de diminuir o infiltrado polimorfonuclear e aumentar o mononuclear no 2º dia mas não interferiu no processo de degranulação de mastócitos em nenhum período observado 2º, 7º e 9º dias. Na fase inflamatória, HdLP 2,0% diminuiu a atividade de MPO, corroborando com a redução da migração de polimorfonucleares, e estimulou a liberação de IL-1 β e IL-10 no 2º dia, além disso, os níveis de nitrito foram reduzidos no 2º e 4º dias e elevados no 9º dia. Durante a fase proliferativa, HdLP 2,0% estimulou a fibroplasia no 7º e 9º dias após a cirurgia, o que possivelmente contribuiu para uma maior deposição de colágeno observada no 9º e 14º dia. Conforme a análise macroscópica previamente descrita, HdLP 2,0% favoreceu o processo de reepitelização das feridas excisionais mas não interferiu na espessura do novo epitélio formado. Dessa forma, o conjunto dos resultados apresentados demonstram que o tratamento tópico com HdLP 2,0% modula a resposta inflamatória da cicatrização, influenciando nas etapas posteriores e acelerando a reparação tecidual de feridas cutâneas excisionais experimentais.

Palavras-chave: *Himatanthus drasticus*, fração proteica, cicatrização.

ABSTRACT

MODULATION OF INFLAMMATORY RESPONSE AND ACCELERATION HEALING OF EXPERIMENTAL SKIN WOUNDS FOR PROTEINS ISOLATED FROM LATEX OF *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel)

The treatment of chronic skin wounds results in high costs and risks of complications that could delay the resolution of the healing process. In this study, a pharmaceutical formulation (ointment) was developed containing an isolated protein fraction from *Himatanthus drasticus* latex (HdLP) in order to investigate its effect on the excisional wound healing in swiss mice ($25\pm 3,0$ g). Initially, the dermal irritation test in mice demonstrated that topical treatment with the ointment containing HdLP was not able to cause reactions of irritation in intact skin and the damaged skin reactions. The macroscopic analysis showed that HdLP 0,5%, 1,0% and 2,0% did not affect the inflammatory signs of edema and hyperemia in excisional wounds but treatment with 2,0% HdLP accelerated contraction of ulcers from 9th day after surgical induction of injury, anticipated the appearance of scar tissue and favored a complete re-epithelialization of wounds. After macroscopic analysis, the concentration of HdLP 2,0% was chosen for the histopathological study (leukocyte infiltration, mast cell degranulation, fibroplasia and collagenesis) and inflammatory mediators (myeloperoxidase (MPO), levels of nitrite and pro- and anti-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10). The treatment with HdLP 2,0% was able to decrease the polymorphonuclear infiltrate and increase the mononuclear on the 2nd day but had no effect on mast cell degranulation process in any period observed 2, 7 and 9 days. In the inflammatory phase, HdLP 2,0% decreased the MPO activity, confirming the reduction of migration of polymorphonuclear cells, and stimulated release of IL-1 β and IL-10 on day 2, moreover, the nitrite levels were reduced at 2 and 4 days and exalted on the 9th day. During the proliferative phase, HdLP 2,0% stimulated fibroplasia at 7 and 9 days after surgery, which probably contributed to increased collagen deposition observed in the 9th and 14th day. As the macroscopic analysis previously described, HdLP 2,0% favored the re-epithelialization process of excisional wounds but did not affect the thickness of newly formed epithelium. Therefore, all the results presented show that topical treatment with HdLP 2,0% modulates the inflammatory response of wound healing, influencing the subsequent phases and speeding up the tissue repair of experimental wounds excised.

Keywords: *Himatanthus drasticus*, proteic fraction, wound healing.

LISTA DE ABREVIATURAS

μg – Micrograma
A/O – fase aquosa/fase oleosa
ANOVA - Análise de variância
AZ – Azul de toluidina
C3a – Terceiro componente do complemento
C5a – Quinto componente do complemento
E.P.M. - Erro padrão da média
EGF – Fator de crescimento epidérmico
FGF - Fator de crescimento de fibroblastos
GAG – Glicosaminoglicanos
h – Hora
H&E – Hematoxilina-eosina
 H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio
Hdp – fração precipitada do látex de *Himatanthus drasticus*
HdLP – fração protéica do látex de *Himatanthus drasticus*
HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamonio
IL-1 β – Interleucina 1 beta
IL-6 – Interleucina 6
IL-8 – Interleucina 8
IL-10 – Interleucina 10
i.m. - Via intramuscular
KCl – Cloreto de potássio
KGF – Fator de crescimento de queratinócitos
 KH_2PO_4 – Fosfato de potássio
M – Molar
MCP-1 – proteínas quimiotáticas para monócitos 1
min – Minutos
MIP-1 α – proteínas inflamatórias para macrófagos 1- alfa
mg - miligrama

mL - Mililitro

MPO – Mieloperoxidase

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo difosfato

NaNO₂ – nitrito de sódio

NEED – N-(1-naftil)-etilenodiamina

nm – nanômetros

NO – Óxido nítrico

NO²⁻ - Nitrito

NO³⁻ - Nitrato

NOS – Óxido nítrico sintase

NOS_e – NOS endotelial

NOS_i – NOS induzível

NOS_n – NOS neuronal

OMS – Organização Mundial da Saúde

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PBS – Tampão de fosfato de potássio

p – Nível de significância

ROS – Espécies reativas de oxigênio

s.c. – Via subcutânea

TGF-β - Fator transformador de crescimento-beta

TM – Tricrômio de Masson

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura da pele	16
2	Camadas da epiderme	17
3	Evolução temporal dos principais eventos da cicatrização	23
4	Representação das fases do processo cicatricial	30
5	<i>Himatanthus drasticus</i>	38
6	Animal tricotomizado para o teste de irritabilidade dermal	44
7	Representação do tratamento tópico com HdLP em pele íntegra após aplicação única (A) e múltiplas (B) aplicações.	54
8	Representação do tratamento tópico com HdLP em pele escarificada após aplicação única (A) e múltiplas (B) aplicações.	56
9	Representação macroscópica dos sinais flogísticos de edema e hiperemia nos grupos experimentais	58
10	Evolução da área das feridas durante o processo de cicatrização de feridas excisionais	59
11	Efeito de HdLP sobre o surgimento do tecido cicatricial em feridas excisionais	61
12	Efeito de HdLP sobre o início da reepitelização em feridas excisionais	61
13	Representação macroscópica do tecido cicatricial e da reepitelização nos grupos experimentais	62
14	Análise histológica do infiltrado de leucócitos após o tratamento com HdLP 2,0%	64
15	Efeito do tratamento com HdLP 2,0% sobre a degranulação de mastócitos	66
16	Efeito do tratamento tópico com HdLP 2,0% sobre a fibroplasia	68
17	Efeito do tratamento tópico com HdLP 2,0% sobre a deposição de colágeno	70
18	Representação histológica da deposição de colágeno no 9º dia	71
19	Representação histológica da deposição de colágeno no 14º dia	72

20	Influência do tratamento tópico com HdLP 2,0% sobre a reepitelização de feridas excisionais	74
21	Representação histológica do processo de reepitelização no 9º dia	75
22	Representação histológica do processo de reepitelização no 14º dia	76
23	Efeito do tratamento tópico com HdLP 2,0% sobre a atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e os níveis de óxido nítrico (NO)	78
24	Efeito do tratamento tópico com HdLP 2,0% sobre os níveis das citocinas: TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10	80

LISTA DE TABELAS

1	Representação de parâmetros macroscópicos avaliados em pele escarificada	55
2	Avaliação macroscópica dos sinais flogísticos em feridas excisionais	57

SUMÁRIO

1	Introdução	16
1.1	Pele	16
1.2	Feridas cutâneas	20
1.3	Fisiologia da cicatrização de feridas cutâneas	22
1.4	Tratamentos disponíveis para cicatrização de feridas cutâneas	31
1.5	Recursos naturais	32
1.6	Potencial farmacológico de plantas que produzem látex	34
1.7	Proteínas do látex de <i>Himatanthus drasticus</i>	36
2	Justificativa	39
3	Objetivos	40
4	Materiais e métodos	41
4.1	Reagentes	41
4.2	Equipamentos	41
4.3	Processamento do látex de <i>Himatanthus drasticus</i> e obtenção da fração proteica (HdLP)	41
4.4	Produção da pomada contendo a fração proteica HdLP	42
4.5	Animais	43
4.6	Protocolo experimental 1: teste de irritabilidade dermal	43
4.7	Protocolo experimental 2: procedimento cirúrgico de indução de feridas excisionais	45
4.8	Avaliação de parâmetros macroscópicos	46
4.9	Coleta das amostras para estudo	47
4.10	Estudo histopatológico	47
4.11	Estudo de mediadores inflamatórios	50
4.12	Análise estatística	52
5	Resultados	53

5.1	Efeito do tratamento tópico com fração protéica (HdLP2,0%) em teste de irritabilidade dermal em camundongos	53
5.1.1	Tratamento tópico com a fração HdLP não induz irritaçãocutânea em pele íntegra	53
5.1.2	Tratamento tópico com a fração HdLP não induz irritaçãocutânea em pele escarificada	53
5.2	Aspectos macroscópicos de feridas excisionais sob o tratamento contendo a fração protéica (HdLP)	57
5.2.1	O tratamento tópico com HdLP não influenciou os parâmetros de edema e hiperemia tecidual	57
5.2.2	O tratamento tópico com HdLP foi capaz de reduzir a área das feridas excisionais	58
5.2.3	O tratamento tópico com HdLP favorece o aparecimento de tecido cicatricial e a reepitelização em feridas cutâneas	60
5.3	Avaliação histológica do efeito do tratamento tópico com HdLP em feridas excisionais	63
5.3.1	O tratamento tópico com HdLP 2,0% diminui o infiltrado polimorfonuclear e aumenta o mononuclear	63
5.3.2	O tratamento tópico com HdLP 2,0% não interfere na degranulação de mastócitos em feridas excisionais	65
5.3.3	O tratamento tópico com HdLP 2,0% estimula a proliferação de fibroblastos em feridas excisionais	67
5.3.4	O tratamento tópico com HdLP 2,0% intensifica a deposição de colágeno em feridas excisionais	69
5.3.5	O tratamento tópico com HdLP 2,0% estimulou o processo dereepitelização em feridas excisionais	73
5.4	Avaliação do efeito do tratamento com HdLP sobre os mediadores inflamatórios em feridas excisionais	77
5.4.1	O tratamento tópico com HdLP 2,0% reduz a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) durante a fase inflamatória da cicatrização em feridas excisionais	77

5.4.2	O tratamento tópico com HdLP 2,0% reduz os níveis de óxido nítrico (NO) na fase inflamatória mas estimula sua produção durante a fase proliferativa de feridas exisionais	77
5.4.3	O tratamento tópico com HdLP 2,0% modula a liberação de citocinas	79
6	Discussão	81
7	Conclusão	91
	REFERÊNCIAS	92

1 Introdução

1.1 Pele

O maior e mais complexo órgão do corpo humano é a pele, representando 15% do peso total de um corpo adulto. Apresenta importantes funções: composição de uma barreira protetora contra agentes químicos e biológicos, prevenção contra a perda excessiva de água, além de exercer um papel regulatório no controle da temperatura corporal. No entanto, é o órgão que mais sofre injúrias e precisa de reparação para exercer suas funções normalmente (DELAVERY et al, 2011; KOLARSIK *et al.*, 2011).

A pele é um órgão de multi-celular, complexo e dinâmico que compreende em duas camadas: a epiderme e derme (Figura 1). A camada mais externa é responsável pelo isolamento do organismo devido à produção de queratina, uma proteína com papel protetor impermeabilizando a pele; e a derme se divide em papilar e reticular, funciona como uma camada intermediária que fornece sustentação e nutrientes para a epiderme. A espessura dessas camadas varia consideravelmente com a sua localização anatômica do corpo. A pele mais espessa está presente nos pés e mãos e possui mais de 5 mm de espessura, enquanto que a pele delgada recobre todo o resto do corpo medindo de 1 a 2 mm (KOLARSIK *et al.*, 2011; AL-NUAIMIA; SHERRATTA; GRIFFITHS, 2014).

Figura 1 – Estrutura da pele

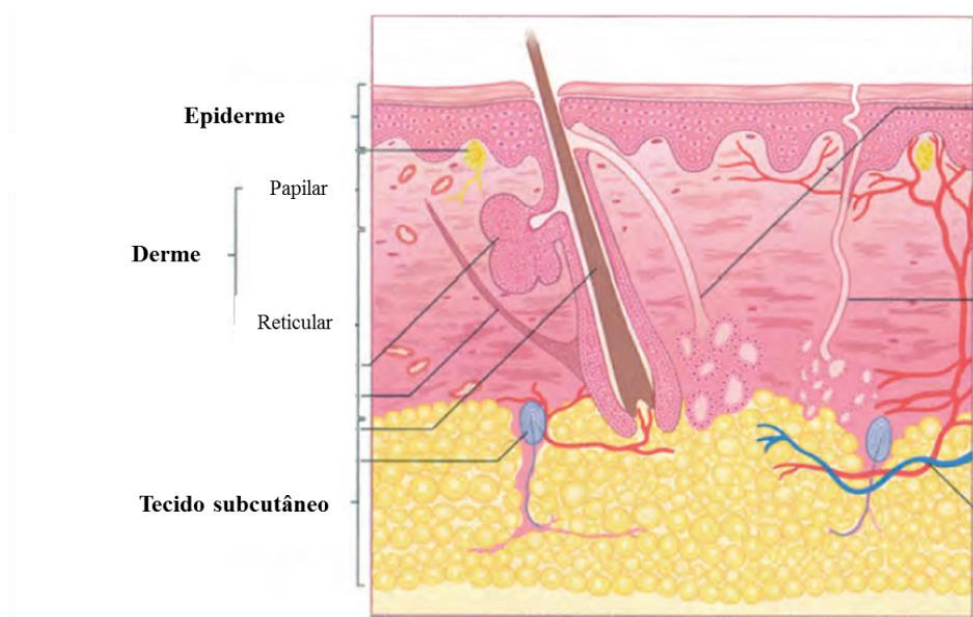


Ilustração de uma secção transversal da pele e suas camadas: epiderme, derme e tecido subcutâneo (Adaptada de KOLARSIK *et al.*, 2011).

1.1.1 Epiderme

A epiderme apresenta um epitélio escamoso estratificado pavimentoso queratinizado e sofre constante rotatividade, se regenerando a cada 48 horas. O estrato basal se comunica com as camadas mais internas enviando projeções que se assemelham aos dedos que alcançam a derme (NYAME *et al.*, 2014). O epitélio da pele delgada se divide em quatro camadas: córnea, granulosa, espinhosa e germinativa, sendo a primeira a mais externa ao organismo. Em relação à pele espessa existe mais uma camada: o estrato lúcido que se dispõe abaixo do estrato córneo (Figura 2). À medida que as células mais superficiais são eliminadas, as células mais profundas sofrem divisão celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As células predominantes na epiderme são os queratinócitos, que estão sempre em constante proliferação na camada mais íntima, movimentando as células mais velhas para a superfície, e assumindo uma forma mais achatada. Após a perda nuclear, os queratinócitos formam o estrato córneo, a parte mais superficial da pele. Esse tipo celular é o principal responsável pela resposta da cicatrização de feridas (NYAME *et al.*, 2014; GANTWERKER; HOM, 2012). Além dos queratinócitos, outros tipos celulares muito importantes são os melanócitos e as células de Langerhans. O primeiro tipo produz a melanina, um pigmento que protege a pele dos raios ultravioletas, e o segundo tipo celular exerce função de defesa imunológica do tecido (SOUTO *et al.*, 2006).

Figura 2 – Camadas da epiderme



Representação da epiderme e suas camadas. A pele normal corada por Hematoxilina e Eosina mostra as células da camada basal (B), estrato espinhoso (S), da camada granular (G) e estrato córneo sobrejacente (SC) (Adaptado de FREINKEL; WOODLEY, 2001).

1.1.2 Derme

A derme funciona como uma matriz de suporte, contendo polissacarídeos e proteínas, formando um sistema de fibras filamentosas e elementos do tecido conjuntivo no qual estão presentes nervos e vasos, além de fibras de colágeno, fibras elásticas, glicoproteínas e proteoglicanos. Interage com a epiderme contribuindo para a regulação térmica e proteção contra lesões mecânicas (KOLARSICK *et al.*, 2011).

O tecido conjuntivo presente na derme é formado por células e pela matriz extracelular (MEC) que circundam as células, que desempenham um papel importante no armazenamento de metabólitos, respostas imunológicas e inflamatórias bem como no reparo tecidual após as lesões. O tecido conjuntivo adulto se classifica em frouxo e denso, onde no primeiro existe uma maior proporção de células que de fibras colágenas, enquanto que no denso essa relação é inversa. Na pele as fibras colágenas estão dispostas de forma aleatória sendo considerado um tecido conjuntivo denso não modelado (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

O colágeno representa 70% do peso seco do corpo e é ele que fornece resistência à derme, permanece em constante equilíbrio sendo degradado por enzimas conhecidas por colagenases e substituído por novas fibras. O colágeno do tipo I constitui 80% do colágeno da pele sendo o responsável pela maior resistência à tração na pele, enquanto que o tipo III, compõe cerca de 15% e é o primeiro tipo a ser sintetizado após durante o reparo de danos teciduais e substituído posteriormente pelo colágeno I. A relação típica entre o colágeno do tipo I e III em pele normal é de 4:1. Os 5% de colágeno restante é representado pelo tipo V e IV. (SIEMIONOW; EISENMANN-KLEIN, 2010).

A derme divide-se em duas camadas, papilar, a mais superficial, e a reticular, a mais profunda, e apresenta um plexo vascular profundo, que é fundamental no suprimento sanguíneo e celular para a epiderme, já que os vasos não conseguem atravessar a camada basal e irrigar a epiderme, além da inervação motora e dos nervos sensoriais que estão ali presentes (FREINKEL; WOODLEY, 2001). Possui alguns tipos celulares, como os fibroblastos, macrófagos, mastócitos e linfócitos, sendo este último tipo essencial durante a organização da resposta imunológica. Os fibroblastos sintetizam e secretam continuamente glicoproteínas, colágeno e proteoglicanos. Já os macrófagos são atraídos por mediadores inflamatórios e principalmente por C5a, participam da renovação de células senescentes e do material da MEC, são células apresentadoras de antígenos para os linfócitos e produzem citocinas que atuam na resposta inflamatória. Os mastócitos são fontes de mediadores

vasoativos contidos em grânulos citoplasmáticos liberados em resposta à alérgenos ou durante a inflamação (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

Logo abaixo da derme encontra-se o tecido subcutâneo essencial para o amortecimento de traumas, isolamento e reserva calórica. Os adipócitos são células especializadas na síntese e armazenamento de gordura ao longo da vida. Estima-se que 80% da gordura do organismo esteja armazenada e distribuída no tecido subcutâneo. Além disso, esse tecido desempenha também uma função endócrina, secretando a leptina e também auxiliando no remodelamento e na fagocitose (CHU, 2008; BURNS *et al.*, 2010). A leptina é um hormônio produzido, principalmente pelos adipócitos, que atua na homeostase energética e funciona como um sinalizador da quantidade de energia e gordura acumulada (LAUA *et al.*, 2014).

1.2 Feridas cutâneas

As feridas ou úlceras cutâneas são formadas por qualquer ruptura na continuidade do tecido cutâneo-mucoso, alterando sua estrutura anatômica e/ou fisiológica. Pode ser ocasionada por alguma exposição a trauma de origem química, mecânica, física ou microbiológica (LIMA, 2010; LEITE, 2014).

São classificadas de acordo com a sua etiologia: agudas e crônicas, e também de acordo com a sua intensidade: superficiais e profundas (CHAYAMITI *et al.*, 2011). As feridas agudas se referem a lesões traumáticas, abrasões, queimaduras ou consequência de procedimentos cirúrgicos, no qual a cicatrização ocorre em tempo hábil para o reparo completo da ferida (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; BOATENG *et al.*, 2008). Já as feridas crônicas são aquelas que demonstram atraso na cicatrização, a resolução não ocorre mesmo após 12 semanas do insulto inicial. Isso acontece devido a uma falha nos estágios iniciais, que prolonga a inflamação e resulta uma incapacidade cicatricial, apresentando recaídas frequentemente (MENKE *et al.*, 2008; YOUNG; MCNAUGHT, 2011).

O tempo de reparação completa de uma ferida pode variar bastante, pode ser rápido enquanto algumas demoram mais tempo que o normal, devido ao fato das etapas envolvidas neste processo não estarem ocorrendo de maneira ordenada e oportuna (VELNAR; BAILEY; SMRKOL, 2009). É necessário o conhecimento sobre a composição e fisiologia da pele bem como os estágios normais de reparo, facilitando assim a compreensão sobre a etiologia das condições patológicas, onde falhas podem ocorrer ao longo do processo (DELAVARY *et al.*, 2011).

Alguns tipos de feridas que não cicatrizam facilmente são as úlceras de pernas (diabéticas, isquêmicas e venosas) e úlceras de pressão, sendo os idosos os mais acometidos, e à medida que estas úlceras cronificam, os pacientes tendem a viver com reincidência destas, sendo capazes até mesmo de acarretar a morte por conta delas (JAUL, 2004).

O tratamento de feridas crônicas resulta em grandes gastos com a saúde, altos índices de morbidades, além do tempo dos profissionais que é empregado, reabilitação dos indivíduos e danos psicossociais, devido à redução da qualidade de vida do paciente. O impacto psíquico, social e econômico da cronificação dessas lesões, representa a segunda causa de afastamento de trabalho no Brasil (LEMOS, 2008). As principais complicações que interferem na cicatrização são a alta incidência de infecção, limitações funcionais e transformação maligna (MENKE *et al.*, 2008; VELNAR; BAILEY; SMRKOL, 2009; SCHMITZ, M., EBERLEIN, T., ANDRIESSEN, 2014).

Diversos fatores e doenças podem influenciar negativamente o processo de cicatrização, como a idade, deficiências nutricionais, oxigenação e perfusão do tecido, diabetes, doenças vasculares, infecções, estado imunológico e alguns medicamentos. A identificação precisa de todos os elementos que podem interferir neste processo deve ser analisada para a escolha da melhor intervenção terapêutica (TAZIMA;VICENTE; MORIYA, 2008; FONDER *et al.*, 2008; CECCHI, 2010).

O estudo sobre as complicações de feridas cutâneas visando o desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos tem crescido bastante, com destaque para: a investigação de mecanismos subjacentes ao processo cicatricial normal; o papel dos fatores de crescimento; cultivo de células *in vitro*; modelos utilizando animais transgênicos e nocautes, que começam a apontar o papel de proteínas específicas que apresentam papel importante no reparo do tecido (FALANGA, 2004).

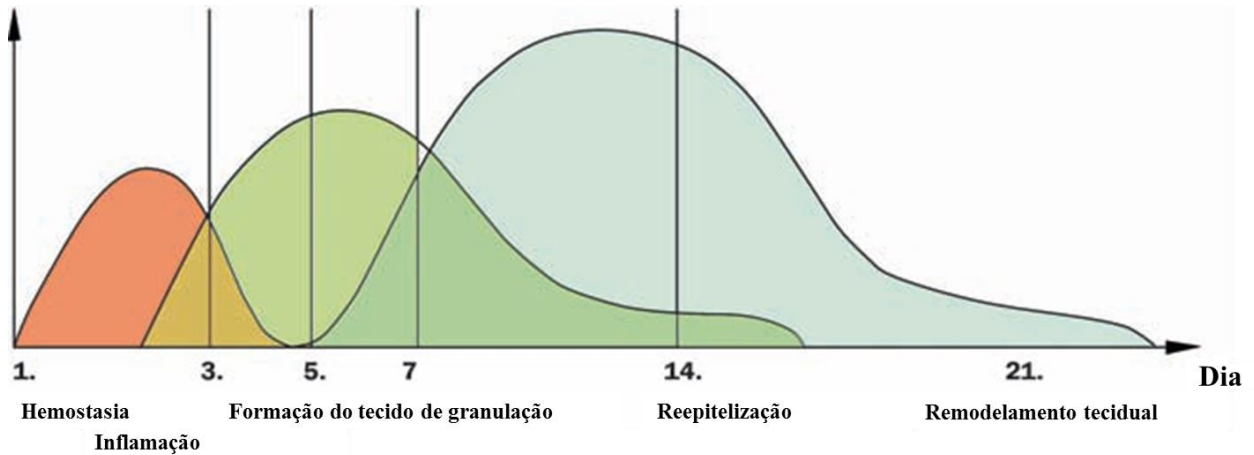
1.3 Fisiologia da cicatrização de feridas cutâneas

A cicatrização da pele é um processo dinâmico e complexo que envolve diversos tipos celulares, além de fatores de crescimento, citocinas e componentes da matriz extracelular, que são ativados imediatamente após a lesão a fim de restaurar a integridade do tecido. A reconstituição do tecido pode ser desenvolvida pelo mecanismo de reparação ou regeneração, sendo o primeiro responsável pela formação de uma cicatriz (YOUNG; MCNAUGHT, 2011; REINKE; SORG, 2012).

A recomposição tecidual divide-se em quatro fases contínuas, sobrepostas e precisamente programadas, embora nenhuma delas ocorra em um período de tempo preciso: hemostasia, inflamação, proliferação celular e remodelação tecidual (Figura 3) (DELAVARY *et al.*, 2011). Todos os eventos biológicos que marcam a cicatrização devem acontecer numa intensidade adequada, na sequencia correta e com duração controlada. Além disso, diversos fatores podem influenciar este processo e interferir em uma ou mais etapas, causando um atraso ou inapropriado reparo tecidual (MONACO; LAWRENCE, 2003; KUMAR *et al.*, 2005).

A taxa de oxigenação e vascularização do tecido, por exemplo, é importante para o metabolismo celular, pois previne infecções, induz a formação de vasos sanguíneos, estimula a reepitelização e aumenta a síntese de colágeno. Além do mais, a presença de infecção bacteriana é capaz de prolongar, especificamente, a fase inflamatória devido ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (GUO; DIPIETRO, 2010). Com os estágios definidos na cicatrização, uma nutrição adequada também é fundamental para uma cicatrização satisfatória, dado que os processos biológicos requerem nutrientes para proliferação e diferenciação celular, síntese de fatores de crescimento e citocinas, e a promoção de um ambiente favorável para a manutenção da funcionalidade do tecido (BROWN; PHILLIPS, 2010).

Figura 3 – Evolução temporal dos principais eventos da cicatrização



Estágios e principais eventos que marcam o processo de cicatrização ao longo do período de reparo (Adaptado de SIEMIONOW; EISENMANN-KLEIN, 2010).

1.3.1 Fase de hemostasia

A hemostasia se inicia logo após a injúria tecidual e perdura de 4 até 6 horas, procedida pela inflamação (NAWAZ; BENTLEY, 2010).

Segundos após a injúria tecidual, a vasoconstrição é estimulada pela norepinefrina, secretada pelos vasos sanguíneos rompidos, e pela serotonina, secretada pelas plaquetas e mastócitos, com a finalidade de estagnar o extravasamento sanguíneo, consequente da ruptura de vasos sanguíneos e linfáticos. As plaquetas entram em contato e se aderem às fibras de colágeno expostas no local da lesão (STRECKER-MCGRAW; JONES; BAER, 2007). O endotélio lesionado expõe fibras de colágeno que permitem a agregação de plaquetas. Estas, por sua vez, liberam o conteúdo de seus grânulos que ativam a cascata intrínseca e extrínseca da coagulação (GANTWERKER; HOM, 2012). Os fatores de coagulação ativados convertem a protrombina em trombina, resultando na quebra de fibrinogênio em fibrina e a formação de um tampão rico em fibrina (YOUNG; MCNAUGHT, 2011).

O tampão imediatamente formado funciona como um escudo protetor temporário, que evita a perda de fluidos e eletrólitos no local, organiza uma matriz provisória importante para que as células inflamatórias alcancem o sítio da agressão, bem como a formação de uma barreira impermeável ao influxo de microorganismos (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008; MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETO, 2009).

O estabelecimento da matriz provisória constitui uma reserva de proteínas biologicamente ativas, tais como: trombina, fator de crescimento tumoral (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que promovem a quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e ativação de macrófagos, (KONDO; ISHIDA, 2010; DELAVARY *et al.*, 2011).

1.3.2 Fase inflamatória

A inflamação que ocorre durante a cicatrização é bastante semelhante às condições inflamatórias agudas, sendo a matriz provisória formada na hemostasia essencial para o influxo de células inflamatórias. A resposta pode ser subdividida em vascular e celular, sendo a primeira representada pela vasodilatação local, com conseqüente extravasamento de líquidos para o espaço extravascular causando o edema, além do aumento no fluxo sanguíneo, responsável pela hiperemia (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; MACHADO, 2011).

Na etapa inicial da inflamação, os neutrófilos são os primeiros leucócitos a alcançarem o sítio da lesão, atraídos pelos fatores quimiotáticos liberados pelas plaquetas (PDGF), pelas células do sistema imunológico e pela ativação do sistema complemento. Sua ação fagocítica permite a eliminação de bactérias e restos celulares. Após 48 horas, os monócitos chegam ao local, são ativados e transformam-se em macrófagos (SZPADERSKA; DIPIETRO, 2005; GANTWERKER; HOM, 2012).

Os macrófagos são células-chave para estruturar a transição da inflamação para a proliferação celular, pois atuam na digestão de microorganismos sobreviventes, remoção de neutrófilos mortos e debris celulares, degradação do tampão de fibrina e liberação de óxido nítrico (NO) (GUTWEIN *et al.*, 2012). Os macrófagos também liberam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento endotelial (EGF), fator de crescimento transformador (TGF- β) e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) (KONDO; ISHIDA, 2010). Os fatores de crescimento desempenham múltiplos e importantes papéis no processo de reparo, como exemplo o PDGF, que estimula a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos na fase inicial da inflamação e também impulsiona a proliferação de fibroblastos na fase proliferativa (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

O NO exerce um papel importante na modulação de alguns eventos ligados ao reparo tecidual. É uma molécula de sinalização intercelular difusível produzida por uma reação de conversão de L-arginina em L-citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS).

Três isoformas desta enzima são conhecidas, no qual duas são constitutivamente expressas: endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) enquanto que a última é induzida em processos inflamatórios (iNOS). A eNOS e iNOS podem ser, respectivamente, detectada e induzida em queratinócitos, fibroblastos e capilares endoteliais. Os metabólitos estáveis do NO, o nitrito (NO^{2-}) e nitrato (NO^{3-}) estão relacionados à deposição de colágeno dentro da ferida (WITTE; BARBUL, 2002; LUO; CHEN, 2005; ISHIDA *et al.*, 2012). Apresenta diversas funções no decorrer da cicatrização de feridas, como: mediação da vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e indução da permeabilidade vascular durante a fase inflamatória (KUTNER; FRIEDMAN, 2013).

As citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α são produzidas pelos queratinócitos e células das glândulas sudoríparas mesmo na pele íntegra, sendo liberadas somente após a injúria tecidual (KONDO; ISHIDA, 2010). Assim, a liberação precoce de citocinas pró-inflamatórias pelos polimorfonucleares que invadem a ferida parecem ser de grande importância para a indução da expressão de fatores de crescimento (VEGF e KGF), dessa forma a liberação desses mediadores em conjunto estimula a cicatrização (HUBNER *et al.*, 1998).

O TNF- α é uma das primeiras citocinas a ser liberada durante um processo inflamatório, com meia-vida é de aproximadamente 20 minutos, apesar disso, diversas alterações metabólicas são provocadas por esse mediador, como: ativação da cascata de coagulação, aumento na expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular e também estímulo para a liberação de mediadores químicos pró-inflamatórios, como os eicosanoides. A IL-6 atinge concentrações plasmáticas detectáveis em 60 minutos após a lesão, algo que está relacionado com o grau de lesão tecidual após uma cirurgia. Sua função é de promover a maturação e ativação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T. Já a IL-1 é produzida pelos macrófagos, fibroblastos e células endoteliais ativadas durante a inflamação local (OLIVEIRA, 2011).

A cicatrização é favorecida pela produção de citocinas pró-inflamatórias no local da lesão, que conduzem a inflamação a fim de reparar o tecido, mas em altas concentrações podem causar instabilidade dinâmica, dificultando a evolução do processo (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Para promover uma regulação na inflamação local, a IL-10 é liberada e exerce uma importante função de modular essa etapa, pois regula a infiltração de neutrófilos e monócitos para o local da lesão, além de inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF- α , e também de quimiocinas, como proteínas inflamatórias para macrófagos 1- alfa

(MIP-1 α) e proteínas quimiotáticas para monócitos 1 (MCP-1) (SATO; OHSHIMA; KONDO, 1999; PERANTEAU *et al.*, 2008).

TGF- β está envolvido em cada fase da cicatrização, desde a sua liberação pelas plaquetas, neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e migração de queratinócitos. Assim como a IL-10, também modula a resposta inflamatória e promove a formação de um tecido de granulação que induz a proliferação de fibroblastos e sua diferenciação, migração de células endoteliais e angiogênese (MARGADANT; SONNENBERG, 2011).

Outra linhagem de células que contribui para a liberação de mediadores inflamatórios são os mastócitos. Estão amplamente distribuídos no organismo, principalmente na pele, e apresentam uma influência expressiva na reparação tecidual, pois respondem rapidamente a um trauma, além de estimularem a resposta inflamatória e imunológica (MARTIN; LEIBOVICH, 2005). Os grânulos dos mastócitos contêm histamina, heparina e mediadores quimiotáticos, que atraem monócitos, neutrófilos e eosinófilos para o local de ativação. O processo de liberação do conteúdo granular é conhecido por degranulação, no qual um aumento de cálcio intracelular permite o escape dessas substâncias após uma anterior sensibilização dos mastócitos através do receptor de IgE (Imunoglobulina E). Existem produtos que não estão presentes nos grânulos, mas são liberados pela membrana dos mastócitos: os leucotrienos, que apresentam atividade vasoativa, aumentando a permeabilidade vascular e edema no local (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

Além dos fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias, outras substâncias com propriedades vasoativas também são liberadas, como a serotonina, bradicinina, prostaglandinas e histamina (STRODTBECK, 2001). Após a lesão, os mastócitos liberam o conteúdo de seus grânulos que estimulam a proliferação de células endoteliais. As aminas vasoativas liberadas: histamina e serotonina provocam vasodilatação e aumentam a permeabilidade nos vasos e atraem os neutrófilos e monócitos, e além do explícito aumento da resposta inflamatória, a síntese de colágeno também pode ser estimulada por essas células, influenciando assim no processo de remodelação da ferida e na formação da cicatriz (LI; CHEN, 2007; WILGUS, 2008; CHEN *et al.*, 2014).

1.3.3 Fase proliferativa

Os principais eventos desta etapa são devido à atividade celular para recompor a barreira epitelial, promover a formação de uma nova matriz, fornecer suprimento sanguíneo apropriado e reforçar o tecido que sofreu a injúria (WORLEY, 2004). Durante a fase

inflamatória, a liberação de plasma, macrófagos, neutrófilos e fatores de crescimento são importantes para ativação de queratinócitos nas margens da ferida (SANTORO; GAUDINO, 2005).

Células estaminais, estimuladas pelo fator de crescimento da epiderme (EGF) liberado pelos macrófagos e eosinófilos, provenientes dos folículos capilares começam a se diferenciar em queratinócitos, que vão recompor a camada basal e migrar das bordas ao centro da ferida (SANTORO; GAUDINO, 2005). Durante a reepitelização, uma camada de exsudato presente na camada mais externa da ferida fornece umidade necessária para a produção de fatores essenciais para o reparo, além de proteger a ferida da desidratação e da infecção (GANTWERKER; HOM, 2012).

Após 24 horas da injúria, os queratinócitos já começam a se locomover a partir das bordas livres da ferida, sendo necessárias algumas modificações celulares para a migração, como o achatamento e alongamento celular, formações de filamento de actina e projeções de pseudopodes. Estes conseguem se movimentar devido aos seus receptores de superfície de integrina que interagem com a matriz extracelular provisória rica em fibrina e fibronectina. Uma única camada de queratinócitos segue em direção ao centro da ferida para reconstruir a membrana basal. Para promover a total reepitelização, os queratinócitos que já haviam migrado para o local começam a se diferenciar e se estratificar em camadas para recompor a barreira epidérmica (LI; CHEN, 2007; KONDO; ISHIDA, 2010).

O novo tecido que substitui o coágulo formado na ferida, o tecido de granulação, começa a se formar no espaço da ferida em aproximadamente quatro dias após a lesão, onde numerosos capilares se difundem no novo estroma adotando uma aparência granular. Os macrófagos permanecem no sítio da lesão após a inflamação e contribuem continuamente através da liberação de fatores de crescimento necessários para estimular a fibroplasia e angiogênese (SINGER; CLARK, 1999; KONDO; ISHIDA, 2010).

Na primeira semana, os fibroblastos começam a migrar para o leito da ferida, eles são estimulados por fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento tumoral β (TGF- β) liberado pelos macrófagos, e pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) secretado pelas plaquetas. A função dos fibroblastos é produzir glicosaminoglicanos, proteoglicanos e colágeno, que vão compor o tecido de granulação. Os fibroblastos são fontes únicas de colágeno e fibronectina, proteínas constituintes do tecido conectivo da derme, e a síntese de colágeno adequada é fundamental para a cicatrização de feridas (MCDUGALL *et al.*, 2006; YOUNG; MCNAUGHT, 2011). É o colágeno que proporciona força e integridade ao tecido, e quando depositado de forma escassa, a cicatriz se torna frágil e a ferida pode

ressurgir depois (CORSETTI *et al.*, 2010). A síntese de colágeno continua até a 6ª semana após a injúria, sendo proporcional a relação entre a expressão de colágeno correlacionada e a força tensil do tecido (WILD *et al.*, 2010). Além disso, a produção de NO nesta etapa é capaz de estimular a proliferação de queratinócitos e fibroblastos, além do papel crucial na angiogênese; e na remodelação tecidual, através do incentivo na deposição de colágeno (KUTNER; FRIEDMAN, 2013).

Durante o processo de cicatrização, os fibroblastos que migram para o local dão início à proliferação celular e se transformam em miofibroblastos, que são essenciais para o processo de contração da ferida por segunda intenção. A migração de células endoteliais é facilitada pela ação de metaloproteinases (MMP) secretadas pelos fibroblastos (GUTWEIN *et al.*, 2012). Além disso, fibroblastos liberam o fator de crescimento de queratinócitos (KGF) que contribuem para a reepitelização (TSIROGIANNE; MOUTSOPOULOS; MOUTSOPOULOS, 2006).

A angiogênese se refere ao processo de formação de novos vasos sanguíneos, de grande importância para fornecer nutrientes e oxigênio para o tecido de granulação. Em resposta a hipóxia, fatores de crescimento são liberados para reparar os vasos lesionados e induzir a produção de novos. As células endoteliais migram através da matriz extracelular e se proliferam originando pequenos brotos capilares. Este processo é estimulado pelo FGF liberado pelos macrófagos, que promove a liberação de proteases pelas células endoteliais facilitando a sua migração, bem como o VEGF secretado pelos queratinócitos e macrófagos (TSIROGIANNE; MOUTSOPOULOS; MOUTSOPOULOS, 2006; YOUNG, A., MCNAUGHT, 2011; GANTWERKER; HOM, 2012).

1.3.4 Fase de remodelação tecidual

A remodelação tecidual é a fase final da cicatrização, tem início na fase proliferativa, quando os fibroblastos sintetizam o colágeno e outros componentes da matriz extracelular, responsável pela formação de um tecido cicatricial maduro. Sabe-se que a resposta inflamatória inicial, que ocorre logo após a lesão, é capaz de influenciar a reparação tecidual por muito tempo, até mesmo quando a presença das células inflamatórias no tecido cicatricial é reduzida (WILGUS, 2008).

Do ponto de vista clínico, esta fase influencia bastante na qualidade do novo tecido formado, dependendo da síntese e organização das fibras de colágeno que fornecem resistência à ferida. Em resumo, as particularidades principais desta fase são a agregação de

pequenos capilares em vasos mais calibrosos e redução na atividade metabólica celular, sendo a acelularidade e avascularização características de uma ferida madura (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010).

O colágeno constitui 50% das proteínas envolvidas na cicatrização, sua concentração varia com o tipo de tecido envolvido, sendo o tipo I o colágeno que predomina na derme intacta, e o segundo mais importante, o tipo III (REINKE; SORG, 2012). No tecido cicatricial, as fibras de colágeno sintetizadas são menores, pouco organizadas e bastante frágeis, conferindo a este tecido uma espessura fina, pálida e de fácil rompimento (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

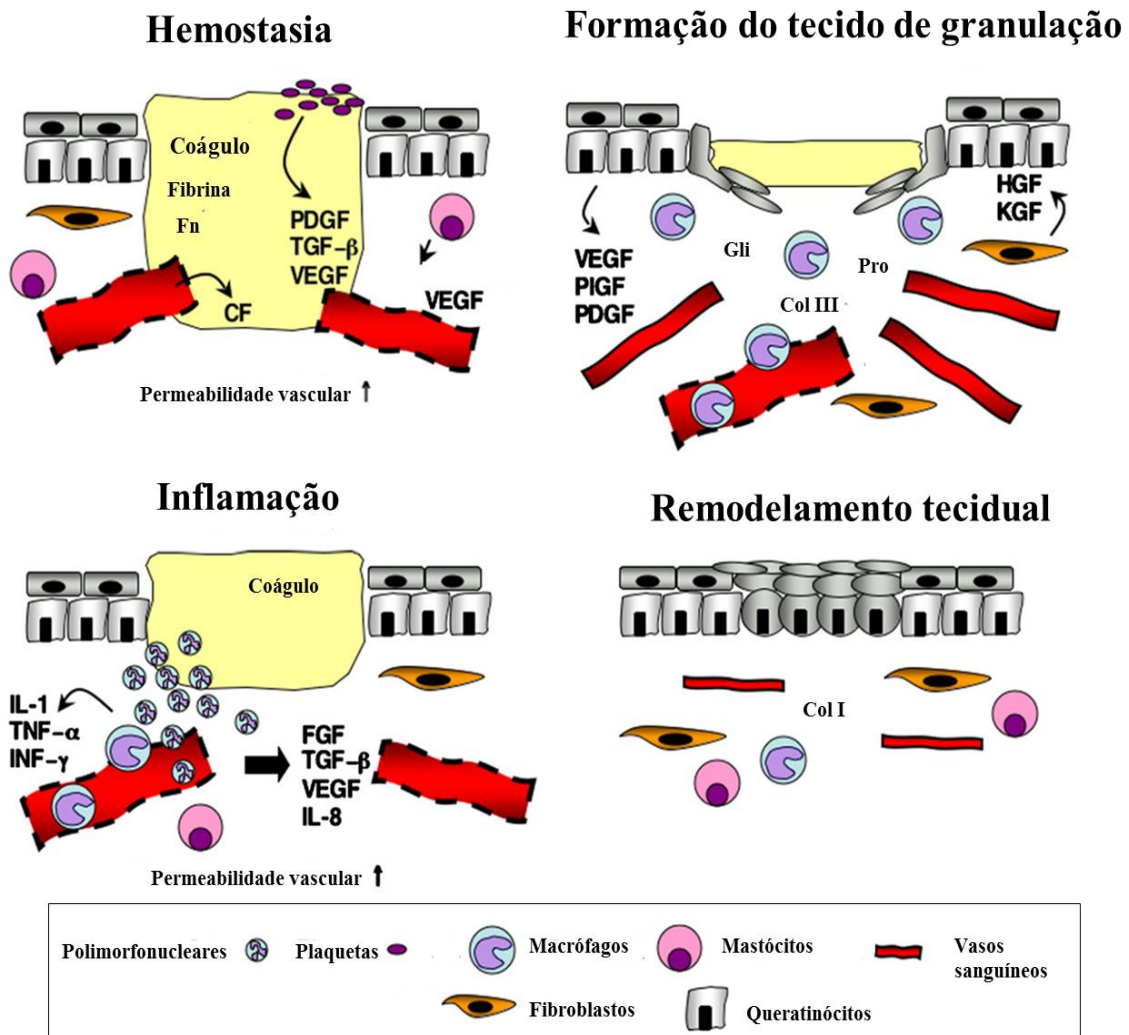
O colágeno do tipo III, que foi aleatoriamente depositado no tecido de granulação, aos poucos é substituído pelo tipo I, uma forma mais resistente, até alcançar a proporção da pele normal de 4:1 organizando o tecido e aumentando a sua força tensil. A resistência tensil é máxima após oito semanas do início do reparo, correspondendo a 80% da tração original. Além disso, nesta fase as metaloproteinases estabilizam a síntese de colágeno (WILD *et al.*, 2010; NAWAZ; BENTLEY, 2010; GUTWEIN *et al.*, 2012).

As metaloproteinases participam da regulação de mecanismos relacionados às diferentes etapas da cicatrização como ativação ou degradação de mediadores inflamatórios, e remodelamento da cicatriz por degradação proteolítica (GILL; PARKS, 2008). A reparação do tecido ocorre pelo equilíbrio entre a ativação e inibição de diferentes metaloproteinases (KONDO; ISHIDA, 2010). As metaloproteinases de matriz (MMP) são responsáveis pela degradação do colágeno, evento característico da transição do tecido de granulação para a cicatriz, sendo destacadas a MMP-2 e MMP-9 que participam da remodelação tecidual e estabilização do tecido reparado (KYRIAKIDES *et al.*, 2009; KONDO; ISHIDA, 2010).

O tecido lesionado formado apresenta redução no seu volume de forma gradual, de acordo com a maturação da estrutura formada, apresentando uma coloração inicial avermelhada, consequência da inflamação local, evoluindo para uma cor rósea pálida correspondente ao processo final e formação de uma cicatriz (BLANCK, 2008).

Um processo cicatricial ideal envolveria uma rápida hemostasia, inflamação adequada, proliferação, diferenciação e migração de células, angiogênese, reepitelização e remodelamento tecidual. Porém, prolongamentos e interrupções nos eventos fundamentais de cada fase podem atrasar ou ocasionar feridas crônicas que não cicatrizam (GUO; DIPIETRO, 2010). A figura 4 ilustra resumidamente todos os eventos celulares que caracterizam a cicatrização.

Figura 4– Representação das fases do processo cicatricial



Esta figura ilustra as etapas da cicatrização: hemostasia, inflamação, proliferação celular e remodelamento tecidual. A hemostasia é marcada pelo extravasamento sanguíneo, aumento na permeabilidade vascular, ativação e agregação plaquetária. O coágulo formado consiste em plaquetas e componentes da matriz extracelular (Fn: fibronectina e fibrina). O influxo de células, polimorfonucleares e monócitos, caracteriza a inflamação, no qual um conjunto de fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias controlam o recrutamento de células para o local da ferida. Os monócitos que chegam ao local são ativados e transformam-se em macrófagos. Durante a formação do tecido de granulação, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais contribuem para a formação de novos vasos. Os fibroblastos sintetizam componentes que irão compor a matriz provisória constituída de glicosaminoglicanos (Gli), proteoglicanos (Pro), colágeno III (Col III). A transformação do tecido de granulação em tecido cicatricial é marcada pela acelularidade, maturidade de vasos sanguíneos neoformados e troca de colágeno do tipo III pelo tipo I (Col I) (Adaptada de EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007).

1.4 Tratamentos disponíveis para cicatrização de feridas cutâneas

Os curativos e dispositivos de feridas integram uma importante fração no mercado farmacêutico de cuidado com feridas. Os curativos tradicionais, como ataduras, algodão e gazes, tinham como objetivo absorver o exsudato das feridas e mantê-las secas prevenindo a invasão de bactérias no local. No entanto, as últimas décadas de estudos demonstraram que um ambiente úmido facilita o processo de cicatrização. Além disso, nenhum curativo sozinho é ideal para tratar feridas, a combinação de curativos depende do tipo da ferida a ser tratada (BOATENG *et al.*, 2008).

A escolha do tratamento de feridas deve levar em conta três requisitos importantes: a saúde geral do paciente, o ambiente da ferida e as propriedades específicas dos curativos selecionados. As principais características de um curativo ideal são: manter um ambiente úmido para a ferida, remover o excesso de exsudato, permitir a difusão de gases, proteger contra microorganismos, promover proteção mecânica, ser confortável, minimizar a dor, não alergênico e rentável (WATSON; HODGKIN, 2005).

Vários produtos tais como: hidrogéis, espumas, hidrocolóides (carboximetilcelulose), alginato, colágeno, celulose, algodão e filmes são utilizados para tratar feridas e queimaduras por causa da sua influência na resposta celular local. Além de alguns produtos naturais com: propriedades, emolientes, reepitelizadora, adstringente, antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-oxidante são capazes de acelerar o processo de cicatrização de feridas (MOGOSANU; GRUMEZESCUB, 2014).

O foco da pesquisa no tratamento de feridas é o desenvolvimento de curativos mais eficientes e menos dispendiosos, que sejam biocompatíveis e biodegradáveis para fornecer melhores condições para a cicatrização de feridas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (MOURA *et al.*, 2013).

1.5 Recursos naturais

Desde o início da humanidade, práticas e conhecimentos sobre os produtos da natureza incrementavam valores culturais e econômicos para as comunidades, ainda mais com o interesse no desenvolvimento de recursos naturais sustentáveis, que permitiu uma maior conscientização sobre a importância econômica da biodiversidade e os fundamentos da ciência e sua relação com a sociedade (SOUZA *et al.*, 2014).

O conhecimento adquirido pelo uso das plantas na medicina popular é bastante extenso, mas ainda não foi completamente confirmado pelos estudos científicos. O uso de extratos e infusões de plantas para tratar infecções comuns na ausência de qualquer evidência científica quanto à sua eficácia apresenta riscos à população, por isso intensos esforços estão sendo aplicados a fim de validar os usos tradicionais pela determinação dos seus efeitos farmacológicos reais. Além de que a descoberta de novas plantas e compostos ativos, que sugerem atividades farmacológicas, é de grande importância para a inovação biotecnológica industrial (LIMA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2014)

A OMS estima que 80% da população de países em desenvolvimento confiam na medicina popular para os cuidados mais básicos à saúde. É interessante notar que 25% das substâncias derivam de plantas, e outra boa parte são análogos sintéticos de compostos protótipos isolados de plantas (TAMILSELVAN *et al.*, 2014).

A fitoterapia tem se expandido devido a grande aceitação e acessibilidade à população, além de outras vantagens como: redução dos efeitos adversos comparados a fármacos sintéticos, validação científica das propriedades farmacológicas, melhores técnicas de controle de qualidade, diversidade nas formas de apresentação de produtos fitoterápicos e melhor conhecimento químico, farmacológico e clínico das drogas vegetais e seus derivados (MELO *et al.*, 2006).

O governo brasileiro lançou um programa conhecido pela sigla RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), contendo 71 plantas utilizadas pela medicina popular brasileira. Este programa foi lançado com a finalidade de apoiar a fitoterapia como tratamento alternativo para doenças, além de incentivar pesquisadores brasileiros a validar as propriedades farmacológicas destas plantas, bem como testar a sua eficácia e segurança entre as diversas indicações e usos populares. Como consequência dos estudos, o programa também visa a elaboração do RENAFITO (Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos) (BRASIL, 2008).

A procura de novas substâncias de fontes naturais está aumentando gradativamente, pois estas demonstram ser mais bem toleradas pelo organismo que as drogas alopáticas. Pesquisadores de diversas áreas estão investigando novas plantas a fim de descobrir novos compostos que apresentem atividade cicatrizante, para isso estudos em animais e humanos devem se realizados para determinar sua eficácia. O processo de cicatrização deve ser monitorado pela taxa de contração das feridas, força tensil, análises histopatológicas em diferentes modelos (SHIVANIRAWAT *et al.*, 2012).

O uso de agentes de origem natural tem conquistado muita importância no tratamento e manejo de feridas, pois o tempo de reparo tem se mostrado menor que outras terapias convencionais e o risco de complicações infecciosas é reduzido, devido a variedade de componentes que apresentam atividades biológicas, tais como: antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória, que são os responsáveis por restaurar a estrutura dos tecidos lesionados. Substâncias presentes nos óleos essenciais e no látex de plantas laticíferas estão ganhando importância na prática clínica (YARISWAMY, *et al.*, 2013; TRIVELLATOGRASSI, *et al.*, 2013).

Diversas substâncias de origem natural já estão sendo utilizadas popularmente no tratamento de feridas cutâneas, como: mel e tintura de confrei (*Symphytum officinale* L.) (SANTOS *et al.*, 2012), própolis (BARBOSA *et al.*, 2009), papaína (FERREIRA *et al.*, 2003), calêndula (*Calendula officinallis*), óleo de girassol (*Helianthus annuus*), arnica (*Solidago microglossa* DC), rosa mosqueta (*Rosa aff. rubiginosa*) (OLIVEIRA, 2008), folhas da *Aloe vera* (SEGUNDO *et al.*, 2007). Além disso, um produto já está sendo comercializado contendo componentes do látex da *Hevea brasiliensis* (seringueira): creme-gel Regederm®.

1.6 Potencial farmacológico de plantas que produzem látex

As plantas sofrem diversos tipos de estresse ambiental, por isso mecanismos de defesa são desenvolvidos contra patógenos e predadores, como insetos e herbívoros. Os produtos do metabolismo secundário como o látex são liberados quando a planta sofre alguma injúria, a seiva sela a área lesada e previne a entrada de patógenos, no entanto, a função biológica do látex na planta ainda não está completamente esclarecida (AZZARKAN *et al.*, 2004; MATOS *et al.*, 2013).

O látex se apresenta na natureza como um fluido viscoso, coloidal com aspecto leitoso, de cor branca ou amarela, contém uma mistura complexa de vários componentes: proteínas, alcaloides, terpenos, taninos, amido, açúcares, óleos, resinas, gomas e enzimas, alguns desses compostos ilustram o objetivo defensivo na produção do látex pela planta, no entanto, outras substâncias presentes ainda apresentam funções biológicas desconhecidas (KONNO, 2011; BADGUJAR, 2014).

Mais de 20.000 espécies dentre as 40 famílias de plantas são produtoras de látex. As pertencentes às famílias Euphorbiaceae, Moraceae e Apocynaceae são as mais descritas pelo uso na medicina popular. Dentre as indicações mencionadas, algumas espécies que liberam látex têm sido estudadas pelas suas propriedades farmacológicas e tem demonstrado atividade cicatrizante e analgésica (RAJESH *et al.*, 2005; KONNO, 2011). Por exemplo, o látex do mamão (*Carica papaya*) que apresentou propriedade cicatrizante em modelo experimental de queimaduras, corroborando com as indicações populares para tratamento de doenças de pele (GURUNG; SKALKO-BASNET, 2009).

As famílias Euphorbiaceae e Apocynaceae se destacam pelo seu uso popular por várias nações no tratamento de feridas (BADGUJAR, 2014). Atividade antimicrobiana do látex da *Euphorbia caducifolia* já tem sido relatada na literatura, além do seu potencial na reparação de feridas, pela ação nas diferentes etapas da cicatrização (PATIL *et al.*, 2012; GOYAL; NAGORI; SASMAL, 2012). O extrato metanólico da raiz de *Carissa spinarum* (Apocynaceae) demonstrou atividade antimicrobiana e cicatrizante em modelo experimental (SANWAL; CHAUDHARY, 2011).

A família Apocynaceae compreende mais de 200 gêneros divididos em duas subfamílias (Apocynoideae e Plumerioideae) e alcança 2.000 espécies distribuídas entre regiões tropicais e subtropicais do planeta (SOUSA, 2009). Muitos dos seus membros constituem uma fonte evidente de descobertas farmacológicas, compostos isolados e utilizados clinicamente tais como a vimblastina, vincristina e reserpina, que surgiram a partir

de estudos fitoquímicos de plantas desta família (SOARES *et al.*, 2010). Além disso, diversos produtos químicos isolados já identificados em diversas plantas da família Apocynaceae, como: alcalóides, proteases, inibidores de proteases, quitinas e lectinas, passam continuamente por estudos científicos, como por exemplo, o efeito de proteases isoladas do látex de *Wrightia tinctoria* (Apocynaceae) que foram capazes de aumentar a contração de feridas cutâneas excisionais em camundongos (KONNO, 2011; YARISWAMY *et al.*, 2013).

As pesquisas com o látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), iniciadas em 1993 já demonstravam inúmeras aplicabilidades na área médica, por sua ação indutora da angiogênese, semelhante ao fator crescimento vascular endotelial, atividade que começou a ser comprovada em animais de laboratório a partir de 1997 (MRUÉ, 1996; MRUÉ *et al.*, 2004; MRUÉ; ZBOROWSKI, 2006; MENDONÇA, 2008).

No ano de 2002, pesquisas com Biomembrana a base de látex se tornaram alvo de investidores da empresa Pelenova Biotecnologia S.A. Após parcerias com institutos de pesquisa privados, empresas líderes em dermocosméticos e universidades públicas, entre os anos de 2005 e 2008, estudos avançaram como a finalidade de avaliar o potencial terapêutico de frações protéicas encontradas no soro do látex da seringueira (VALEANT). Em modelo de cicatrização de feridas na parede esofágica de cães foi relatado que um material à base do látex natural estimulou a cicatrização de feridas, efeito que foi atribuído à estimulação evidente na vascularização da lesão (NEVES-JUNIOR *et al.*, 2006).

Em 2008, a Regederm®, um gel-creme inovador foi produzido pela Pelenova com a finalidade de acelerar o processo cicatricial. Esta formulação contém proteínas bioativas isoladas do látex natural da *Hevea Brasiliensis*, responsáveis pelo estímulo a angiogênese, aceleração cicatricial e recomposição tecidual (VALEANT). O produto é comercializado pela Valeant Farmacêutica do Brasil Ltda, e a sua bula informa que seu uso está indicado para o tratamento de feridas cutâneas, independente da sua etiologia.

Estudos mostram que o látex da *Calotropis procera*, uma planta da família Apocynaceae, apresenta propriedade antioxidante (ROY *et al.*, 2005); atividade pró-inflamatória e anti-inflamatória (ALENCAR *et al.*, 2006); alivia a hiperalgesia (KUMAR *et al.*, 2011) e possui atividade anticonvulsivante (LIMA *et al.*, 2012). Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma biomembrana de álcool polivinílico contendo proteínas do látex da *C. procera* que foi capaz de melhorar a remodelação tecidual e acelerar a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos (FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

1.6 Proteínas do látex de *Himatanthus drasticus*

O pequeno gênero *Himatanthus* pertence à família Apocynaceae e abrange 14 espécies diferentes, que se destacam pelos estudos sobre suas atividades: antitumoral, anti-inflamatória, antiulcerosa, antiespasmódica e antimicrobiana (MOUSINHO *et al.*, 2011). Dentre as diferentes espécies do gênero: *H. surucuuba* (PERDUE, G.P., BLOMSTER, R.N., 1978; LEÃO *et al.*, 2007), *H. obovatus* (MESQUITA *et al.*, 2005), *H. drasticus* (COLARES *et al.*, 2008), *H. bracteatus* e *H. articulatus* (AGRA *et al.*, 2007) são as que estão em maior evidência na utilização popular para o tratamento de tumores. Além das espécies descritas, a *H. lancifolius* se destacou pela sua inserção na primeira Farmacopéia Brasileira devido a suas propriedades medicinais (REBOUÇAS *et al.*, 2011).

O látex de *H. surucuuba* demonstrou atividade leishmanicidal *in vitro* e *in vivo* modulando o efeito imunomodulatório de macrófagos residentes (SOARES *et al.*, 2010). Um estudo verificou o efeito de *H. articulatus* em linhagens de células tumorais e atestou a atividade antiproliferativa neste modelo (REBOUÇAS *et al.*, 2011), além de atividade antibacteriana e antifúngica de extratos da planta (SEQUEIRA *et al.*, 2009). Extrato contendo alcalóides extraídos da *H. lancifolius* indicaram atividade antimicrobiana (SOUZA *et al.*, 2004).

A *Himatanthus drasticus* é uma planta medicinal popularmente conhecida como janaguba, tiboma, jasmim-manga, raivosa, pau-de-leite, joanaguba e sucuuba. A sua distribuição geográfica compreende o sudeste do Brasil até a Guiana Francesa, Suriname e Guiana, com predomínio no Nordeste do país, Minas Gerais, Pará e Roraima. No Ceará, é conhecida popularmente por janaguba e cresce mais frequentemente no extremo sul do estado, principalmente na Chapada do Araripe (Figura 5) (SPINA, 2004; AMARO *et al.*, 2006).

No nordeste do Brasil, a população utiliza o látex da *Himatanthus drasticus* extraído do caule da planta adicionado à água (leite de janaguba) e explorada pelas comunidades locais sem nenhum controle. Essa preparação é comercializada por 25 a 30 reais/litro e a recomendação dos comerciantes locais é a tomada de 30 a 145 mL/dia uma a duas vezes por dia (MATOS *et al.*, 2013).

Em julho de 2014, um estudo publicado por Ribeiro e colaboradores, entrevistou uma comunidade na Chapada do Araripe, no Ceará, no qual o látex da *Himatanthus drasticus* foi citado por cerca de 80% dos entrevistados, sendo mencionado por nove propriedades de uso pela população: câncer, tosse, gastrite, úlceras, diabetes, inflamações no fígado e parasitoses.

Um levantamento etnobotânico de espécies medicinais presentes na Floresta Nacional do Araripe (Ceará) declarou que a *Himatanthus drasticus* (janaguba) estava entre seis espécies registradas no estudo por seu potencial de apresentar substâncias bioativas. Entre as indicações mais mencionadas no estudo, a cicatrização de feridas foi referida em 29% do total das citações ligadas ao uso das espécies, inclusive a *H. drasticus* (SOUZA *et al.*, 2014).

O extrato metanólico das folhas de *H. drasticus* apresentou atividade antitumoral significativa no modelo de Sarcoma 180, além de baixa toxicidade em doses administradas por via oral em camundongos (SOUSA *et al.*, 2010). Outro modelo experimental em camundongos demonstrou atividade citoprotetora do látex de *H. drasticus* em úlceras gástricas induzidas por etanol (LEITE *et al.*, 2009).

Estudos fitoquímicos revelaram que o látex de *H. drasticus* possui diversos compostos que possuem atividades biológicas importantes, tais como taninos, terpenos e ácidos graxos (SOUZA *et al.*, 2014). Em 2010, Lucetti e colaboradores já haviam demonstrado que um triterpeno isolado deste látex, o acetato de lupeol, possui atividade anti-inflamatória e antinociceptiva.

Alguns estudos bioquímicos e farmacológicos estão sendo realizados pelo nosso grupo de pesquisa com uma fração protéica isolada do látex de *H. drasticus* (HdLP). Em modelo de indução de lesões gástricas por etanol em camundongos, HdLP demonstrou importante atividade protetora da mucosa gástrica, sendo este efeito relacionado a via NO/GMP_C/K_{ATP} e da glutathiona (MARQUES, 2011). E mais recentemente, o látex bruto e a fração (HdLP) de *H. drasticus* apresentaram uma potente atividade anti-inflamatória administrada por via oral, ao inibir a migração de neutrófilos na menor concentração utilizada, sendo este efeito também evidenciado quando HdLP foi administrada pela via intravenosa. Além disso, HdLP também demonstrou atividade anti-nociceptiva por via intravenosa. Devido à presença do acetato de lupeol no látex de *H. drasticus*, a fração HdLP foi testada para determinar a sua presença, sendo o resultado encontrado negativo, demonstrando que a atividade farmacológica encontrada em HdLP decorre das proteínas hidrossolúveis contidas na fração e não ao lupeol (MATOS *et al.*, 2013).

A medicina popular é de grande importância para a farmacologia, pois através de relatos da comunidade os estudos se tornam possíveis, e assim podem trazer um retorno positivo para a população, bem como chamar atenção para possíveis efeitos tóxicos provocados pelo mau uso. Então, como demonstrado acima, o uso medicinal do látex da *H. drasticus* está correspondendo com os estudos científicos publicados e considerando o seu

potencial farmacológico, justifica-se a investigação do efeito das proteínas do látex sobre a cicatrização de feridas cutâneas.

Figura 5–*Himatanthus drasticus*



Planta *Himatanthus drasticus* (A); caule da planta antes da extração (B); durante a extração (C); caule após a extração (D) (Fonte: Sousa, 2009).

2. Justificativa

A pele como maior órgão do corpo humano está sujeita a agressões constantes, que são responsáveis pela ruptura da sua integridade produzindo as feridas ou úlceras cutâneas. Após a injúria o processo de cicatrização é iniciado, mas falhas podem ocorrer e o reparo das lesões pode atrasar. O tratamento de feridas crônicas continua sendo um desafio na prática clínica, pois as feridas são bastante frequentes e apresentam riscos de complicações tardias que aumentam a morbidade e mortalidade. Portanto, muitos esforços têm sido aplicados para o melhor entendimento do mecanismo fisiológico da cicatrização bem como das interferências que ocorrem durante este processo (MENKE *et al.*, 2007; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

Estudos em busca de substâncias com atividade cicatrizante são estimulados devido aos altos custos no tratamento de feridas crônicas, sendo as substâncias derivadas de fonte natural o maior destaque baseado nos conhecimentos da medicina popular, praticada há séculos, pois, em comparação às terapias convencionais, o tempo de reparo parece ser menor e o risco de complicações infecciosas também (LIMA *et al.*, 2006). Além disso, componentes com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas tem demonstrado considerável importância no manejo de feridas (YARISWAMY *et al.*, 2013).

O látex de diversas plantas apresenta moléculas bioativas que estão em evidência no tratamento de feridas, porém os mecanismos moleculares ainda não são bem estabelecidos (YARISWAMY, *et al.*, 2013; TRIVELLATOGRASSI, *et al.*, 2013). O creme-gel Regederm® do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* tem sido uma alternativa promissora para pacientes com feridas crônicas, dessa forma, conhecendo o potencial farmacológico do látex de *H. drasticus* e sua atividade anti-inflamatória evidenciada na literatura (MATOS *et al.*, 2013), justificamos o interesse em desenvolver esse estudo, e possivelmente sugerir uma nova atividade biológica das proteínas isoladas do látex de *H. drasticus* (HdLP) como substâncias úteis no tratamento de feridas cutâneas.

3 Objetivo

Avaliar o efeito do tratamento tópico de uma pomada contendo proteínas isoladas do látex de *Himatanthus drasticus* (HdLP) (Mart.) Plumel sobre a cicatrização de feridas excisionais em camundongos.

3.1 Objetivos específicos

- Desenvolver uma formulação para a aplicação tópica de HdLP sobre feridas excisionais;
- Observar o efeito da formulação contendo HdLP em protocolo experimental de irritabilidade dermal;
- Avaliar macroscopicamente o efeito de HdLP sobre a área média das feridas, bem como sobre os parâmetros de: edema, hiperemia, tecido cicatricial e reepitelização em feridas excisionais;
- Estudar efeito de HdLP sobre as alterações histológicas: infiltrado leucocitário, degranulação de mastócitos, fibroplasia, colagênese e reepitelização;
- Investigar o efeito da HdLP na liberação de mediadores inflamatórios (mieloperoxidase, óxido nítrico, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10);

4. Materiais e Métodos

4.1. Reagentes

- ✓ Cloridrato de xilazina 2% (Anasedan®- Vetbrands);
- ✓ Cloridrato de ketamina 10% (Dopalen®- Vetbrands);
- ✓ Sabonete líquido anti-séptico (LM farma);
- ✓ Álcool etílico 70%;
- ✓ Iodopovidona 10% (Biotrat);
- ✓ Solução salina – cloreto de sódio estéril a 0,9% (Pharmace – Ceará; Brasil).

4.2 Equipamentos

- ✓ Balança para pesagem dos animais modelo ID-1500 (FILIZOLA);
- ✓ Câmera fotográfica Nikon L20;
- ✓ Luva cirúrgica (Luvatex);
- ✓ Molde metálico vazado (punch), área 1cm²;
- ✓ Panos de campo estéreis;
- ✓ Paquímetro Messen;
- ✓ Pinças cirúrgicas;
- ✓ Tesoura de ponta fina 11,5cm (QUINELATO ÍRICL)

4.3 Processamento do látex de *Himatanthus drasticus* e obtenção da fração proteica (HdLP)

A *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel pertence à família Apocynaceae. Uma amostra foi coletada no bairro Edson Queiroz, na cidade de Fortaleza, no qual a exsicata foi identificada pelo número 40408 e está depositada no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará.

A coleta do látex foi realizada através de incisões no ápice caulinar de plantas saudáveis e gotejamento em tubos do tipo Falcon diluído em água destilada (1:1 v/v). Em seguida, os tubos foram levemente agitados e mantidos à temperatura ambiente. O processamento do látex foi realizado no Laboratório de Plantas Laticíferas da Universidade Federal do Ceará, sob a supervisão do Prof. Dr. Márcio Viana Ramos. Para tanto, as amostras

foram submetidas à centrifugação (8.000 x g, 25 min., 10°C). Este procedimento permite a precipitação da fração insolúvel rica em dímeros de isopreno (borracha), a qual é denominada “Hdp” (*Himatanthus drasticus* precipitate). Tal fração foi posteriormente descartada. O sobrenadante obtido foi exaustivamente dialisado contra água destilada por 72h, a 25°C, sob suave agitação. Após a primeira hora de diálise (volume 1:1) a fração não retida pela membrana de diálise (8kDa) foi coletada e denominada “Água da diálise”. Esta fração é constituída por metabólitos hidrofílicos e de pequeno tamanho molecular ($M_r < 8kDa$). A fração retida no interior da membrana de diálise foi novamente centrifugada, nas condições anteriormente descritas, o sobrenadante foi recuperado e liofilizado. Esta fração, rica em proteínas solúveis e ausente de borracha, é denominada “HdLP” (*Himatanthus drasticus* latex proteins) (MATOS *et al.*, 2013). A fração obtida HdLP foi utilizada para produção da pomada que foi usada no modelo experimental de feridas excisionais.

4.4 Produção da pomada contendo a fração proteica HdLP

As pomadas que foram utilizadas no estudo foram desenvolvidas no Laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia sob supervisão do Prof. Said Gonçalves da Cruz Fonseca. A formulação foi estabelecida considerando as características do princípio ativo (origem proteica e hidrofílica) e das lesões cutâneas abertas (maior necessidade de oclusão), sendo definida a forma farmacêutica pomada A/O (característica lipofílica).

As três concentrações de HdLP (0,5%, 1,0% e 2,0 %) na pomada foram escolhidas baseadas em estudos descritos na literatura (GOYAL; NAGORI; SASMAL, 2012). Inicialmente, a fração proteica foi pesada, sendo o peso proporcional à sua concentração final, e dissolvida em água destilada (fase aquosa). Em seguida, para emulsionar as proteínas dissolvidas foi utilizada a lanolina anidra numa proporção de até 10% do peso final da pomada, acrescentando lentamente fase aquosa à lanolina e homogeneizando bastante a mistura. Após a incorporação das proteínas na fase oleosa da formulação o peso foi preenchido em q.s.p. com gel petrolato polietileno (Veículo de maior proporção na pomada) para a obtenção de uma preparação semi-sólida homogênea de cor esverdeada. Finalmente, as pomadas HdLP 0,5%, 1,0% e 2,0% foram transferidas para bisnagas (15 g) de alumínio (protegidas da luz) previamente esterilizadas e armazenadas em geladeira para maior conservação da forma farmacêutica. Os excipientes utilizados foram manipulados na mesma proporção utilizada pela pomada HdLP (mas sem a incorporação das proteínas) e foi

produzido o controle negativo (Veículo) para posterior utilização em protocolos experimentais.

As bisnagas foram armazenadas em geladeira e permaneceram lacradas até a realização dos tratamentos. A aplicação nas lesões cutâneas dos animais foi realizada somente quando a pomada atingiu a temperatura ambiente para minimizar o desconforto da administração tópica.

4.5 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem swiss ($25 \pm 3,0$ g) provenientes do Biotério da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN-UFC) e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Os animais permaneceram em gaiolas individuais e macroambiente controlado (período de 12h claro/escuro), temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($55 \pm 10\%$) com fornecimento *ad libitum* de ração e água. Os animais disponibilizados para experimentação permaneceram na sala de manutenção do Laboratório de Bioquímica e Farmacologia/UFC por três dias para aclimação.

Os protocolos descritos a seguir foram realizados de acordo com os padrões éticos estabelecidos nos Princípios Éticos na Experimentação Animais adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), analisados e aprovados (sob o nº 39/2014) pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará.

4.6 Protocolo experimental 1: teste de irritabilidade dermal

Um tratamento tópico que provoca uma resposta de irritação na pele é capaz de prejudicar a cicatrização, prolongando a inflamação no tecido e atrasando o seu processo de reparo (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Em vista disso, o teste de irritabilidade dermal foi realizado em animais com pele íntegra e pele escarificada para avaliar se a formulação contendo as proteínas HdLP causariam alguma reação de irritação cutânea. O protocolo foi realizado conforme procedimento descrito anteriormente com algumas modificações (JYA *et al.*, 2008).

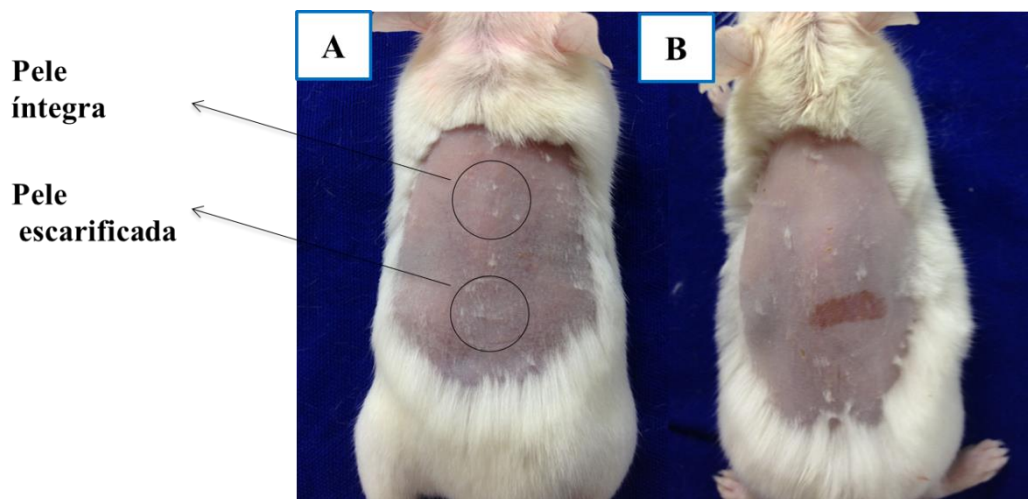
Camundongos swiss machos ($19 \pm 1\text{g}$) foram anestesiados e tricotomizados na superfície dorsal, 24 horas após o procedimento, os animais foram novamente anestesiados e a escarificação foi feita na pele do dorso do animal com o auxílio de uma lixa grossa de aço inox até a presença de um fluido de tecido visível, porém sem sangue. A região escarificada foi identificada pelo escurecimento e perda de brilho na pele nua. A pele íntegra logo acima

da região escarificada também foi avaliada durante o protocolo experimental (Figura 6). Após o procedimento os animais foram distribuídos em 3 três grupos: sham (sem tratamento), Veículo e HdLP 2,0%. O tratamento foi realizado uma vez ao dia durante 6 dias, no qual a dose de 50 mg foi administrada sob uma área de 1cm² tanto na pele íntegra quanto na pele escarificada.

4.6.1. Parâmetros macroscópicos avaliados

A espessura da pele submetida ao tratamento, tanto da pele íntegra quanto da pele escarificada, foi medida com auxílio de um paquímetro digital (mm²) nos tempos 0, 1, 4 e 6 horas após o primeiro tratamento, e a cada 24 horas durante 6 dias. As reações cutâneas foram observadas somente na região escarificada e classificadas através dos seguintes parâmetros: sinais flogísticos de edema, eritema (onde foram atribuídos escores: 0: ausente, 1: leve, 2: moderado e 3: intenso), crosta e exsudato (ausência e presença). Após a coleta de dados os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Figura 6 – Animal tricotomizado para o teste de irritabilidade dermal



Camundongo anestesiado e previamente (24 h antes) tricotomizado antes de se submeter ao procedimento de escarificação na região posterior do dorso, logo abaixo a pele íntegra. (A) Pele íntegra, que não foi escarificada. (B) Pele que sofreu o processo de escarificação com lxa inox. O tratamento foi realizado nas duas regiões e os parâmetros de espessura, edema, eritema, presença de crosta e exsudato foram avaliados antes e 1,4 e 6 horas após o primeiro tratamento, bem como uma vez ao dia durante 6 dias.

4.7 Protocolo experimental 2: procedimento cirúrgico de indução de feridas excisionais

4.7.1 Procedimento anestésico e cirúrgico

Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina 2% (10mg/Kg) associado ao cloridrato de cetamina 10% (100mg/Kg), por via intramuscular (i.m.) (HALL; CLARKE, 1991). Após a anestesia, foi realizada a tricotomia da região dorsal por tração manual e assepsia com iodopovidona 1%, seguido de álcool etílico a 70%. Foi demarcada uma ferida excisional circular (área de 1,0 cm²) na superfície dorsal dos animais com auxílio de um *punch* cirúrgico para biópsia de pele, atingindo a região dermo-epidérmica. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam por via subcutânea (s.c.) 1 mL de solução salina estéril 0,9% para reposição fluídica e foram mantidos em ambiente aquecido até a completa recuperação da anestesia (CARDOSO *et al.*, 2007).

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais em estante ventilada utilizada exclusivamente para este protocolo experimental, durante todo o período de avaliação. A maravalha não foi adicionada às gaiolas durante as primeiras 48 horas, para evitar interferências no processo de cicatrização, seja por contaminação e contato com a área da lesão. As gaiolas foram higienizadas diariamente para manutenção do ambiente limpo durante o período experimental.

4.7.2 Grupos experimentais

Após a total recuperação, os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais descritos abaixo e os tratamentos foram realizados. O grupo SHAM se refere aos animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos, mas não receberam nenhum tipo de tratamento (controle da cirurgia), enquanto que os grupos que receberam tratamento foram divididos em:

- I. Grupo controle negativo do tratamento, animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos tratados apenas com Veículo da pomada (excipientes);
- II. Grupo controle positivo do tratamento, animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos tratados com o creme-gel Regederm® (produto comercializado composto por proteínas isoladas do látex de seringueira *Hevea brasiliensis*) para reparação cutânea;

III. Grupos HdLP, animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos seguidos de tratamento com pomada contendo HdLP a 0,5%; 1,0% e 2,0%;

A aplicação tópica de todos os produtos descritos acima foi realizada uma única vez por dia com auxílio de cotonetes descartáveis em quantidade suficiente para cobrir a lesão (1 cm²). Ao final dos protocolos experimentais, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical no 14º dia de avaliação.

4.8 Avaliação de parâmetros macroscópicos

4.8.1 Sinais flogísticos característicos da fase inflamatória: edema e hiperemia

O edema foi categorizado pelo aspecto de intumescimento (devido ao acúmulo de líquido) no leito e/ou bordas da lesão. A hiperemia foi avaliada através da observação de um aspecto avermelhado na ferida (rubor). Os dois parâmetros foram registrados no 2º e 4º dia após a indução cirúrgica da lesão. A classificação dos parâmetros flogísticos varia de acordo com a sua frequência (%) e intensidade na ferida, atribuindo escores que representam: ausência (0), leve (1), moderado (2) e intenso (3) (MELO *et al.*, 2011).

4.8.2 Avaliação planimétrica da área das feridas

Nos dias 2, 7, 9 e 12 após a cirurgia, a área média das feridas de todos os animais dos grupos experimentais foi mensurada. Um paquímetro foi utilizado para a mensuração dos diâmetros horizontal e vertical da lesão, e posteriormente, calculada a área pela equação: $A = \pi \times R \times r$, onde “A” representa a área (cm²), “R” o raio do diâmetro maior e “r” o raio do menor diâmetro da ferida, respectivamente (PRATA; HADDAD; GOLDENBERG, 1998).

4.8.3 Avaliação dos parâmetros indicativos da fase proliferativa

Entre os parâmetros utilizados para avaliar a cicatrização na fase proliferativa foi acompanhado o surgimento do tecido cicatricial na ferida dos animais nos dias 9, 10 e 12 dias após a cirurgia. Este tecido aparece substituindo o tecido lesionado no decorrer do processo de reparação tecidual sendo caracterizado pela sua localização entre a pele normal e a área ulcerada, ser levemente rosado e frágil, além de apresentar ausência de pigmentação e pelos no local. O surgimento do tecido cicatricial e a reepitelização foram avaliados quanto à sua

presença ou ausência na ferida dos animais, sendo representada na forma de resultados pela porcentagem de cada grupo experimental no período descrito (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010).

4.9 Coleta das amostras para estudo

Posteriormente ao estudo macroscópico, os animais de cada grupo (n=5/dia/grupo) foram selecionados de forma aleatória e a anestesia foi realizada como descrito anteriormente. As lesões cutâneas dorsais foram removidas, cuidadosamente, contornando as margens do local atingido e contemplando um centímetro de pele saudável, atingindo até a camada muscular. Após a biópsia dos tecidos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

4.10 Estudo histopatológico

Os dias 2, 7, 9 e 14 após a indução cirúrgica da lesão excisional foram escolhidos para avaliar as etapas do curso da cicatrização: inflamação e proliferação celular.

4.10.1 Confeção de lâminas histológicas

As amostras de tecido coletadas foram fixadas em solução tamponada de formaldeído 10% (v/v)(pH 7,4) durante 24 horas e, seguidas para o processamento histológico de inclusão em parafina. Após o processo de desidratação, fixação e parafinização dos tecidos, segmentos de 5 µm de espessura foram elaborados em micrótomo e organizados em lâminas microscópicas. Logo em seguida, estas foram aplicadas às técnicas de coloração: hematoxilina-eosina (H&E) para avaliação de infiltrado leucocitário, fibroblastos e reepitelização; azul de toluidina (AT) para análise de degranulação de mastócitos; ou tricômio de Massom (TM) para determinação de colágeno.

Com as lâminas histológicas confeccionadas, a análise microscópica foi possível através da aquisição de fotomicrografias, nos aumentos de 40x, 200x e 400x, pelo microscópio óptico com câmera digital acoplada (LEICA RM 2235), sendo estas gravadas em formato TIF e posteriormente examinadas pelo programa ImageJ® versão 1.43, para avaliação da fibroplasia, colagênese e reepitelização. Antes da obtenção das fotomicrografias,

a luminosidade, a objetiva e a altura do condensador foram padronizados(NOURSADEGHI *et al.*, 2008).

4.10.2 Avaliação do infiltrado de leucócitos

As lâminas histológicas coradas pela técnica de H&E foram utilizadas para a análise do infiltrado de leucócitos no local da lesão no 2º dia após a indução da lesão. O infiltrado foi classificado em termos de células polimorfonucleares ou células mononucleares presentes nos campos microscópicos. A análise foi realizada em 10 campos diferentes em cada lâmina, no aumento de 400x em microscópio óptico (n=5/dia/grupo), estimados em 5 regiões da derme papilar e em 5 reticular. Os resultados foram expressos como a média do número de células/campo (CAVAZANA *et al.*, 2014).

4.10.3 Avaliação de mastócitos íntegros e degranulados

Cortes histológicos das feridas excisionais foram submetidos à coloração pela técnica azul de toluidina, que marcam um tipo celular: o mastócito. Isto é possível pela característica de metacromasia, os grânulos presentes nos mastócitos são corados em azul. Durante a cicatrização das feridas, os mastócitos são atraídos para o sítio da lesão e liberam diversos mediadores pré ou neo-formados, este processo de liberação de mediadores é descrito como degranulação (SUNTAR *et al.*, 2011).

Para avaliar a participação dos mastócitos durante o processo cicatricial foram escolhidos os dias 2, 7 e 9 após a indução da lesão, abrangendo a fase inflamatória e proliferativa, sendo duas formas determinadas: o mastócito íntegro (I) e o degranulado (D). Com o auxílio de um microscópio óptico (aumento de 400x), 15 campos por ferida foram selecionados aleatoriamente, dispostos a partir das bordas da lesão. A contagem permitiu quantificar mastócitos íntegros e degranulados por campo (n=5/dia/grupo) e os resultados foram expressos como a média percentual de células \pm erro padrão da média (EPM), conforme o cálculo: mastócitos I ou D x 100/total de células (MATSUMURA *et al.*, 2007).

4.10.4 Avaliação da fibroplasia

Este evento foi avaliado a partir da confecção das lâminas histológicas, coradas pelo método H&E, foram adquiridas 8 fotomicrografias (3132 x 2325 pixels) de cada ferida

(n=5/grupo/dia), no aumento de 400x. As imagens capturadas foram de 4 regiões na derme papilar e 4 regiões na derme reticular no leito da ferida, sendo representativas dos dias 7, 9 e 14 após a cirurgia. A quantificação das células foi realizada pelo programa ImageJ® versão 1.46 utilizando o plugin “Cell counter”, onde é feita a marcação de célula por célula em cada imagem, sendo o resultado representado pela média do número de células \pm erro padrão da média (EPM) de cada ferida (ANDRADE *et al.*, 2011).

4.10.5 Avaliação de colagênese

A colagênese se refere ao acúmulo de colágeno sintetizado pelos fibroblastos na área lesionada, uma etapa que representa a importância da proliferação, migração e atividade destas células na recomposição tecidual. A quantificação do colágeno na área ulcerada foi permitida pela obtenção de imagens provenientes das lâminas histológicas representativas das feridas excisionais dos dias 9 e 14 após a indução da lesão, coradas pelo método do tricrômio de Masson. Para tanto, 6 fotomicrografias (aumento de 400x) foram adquiridas de cada lesão: abrangendo 3 regiões da derme superior e 3 da derme inferior (n=5/grupo/dia).

Para a determinação da proporção de colágeno existente no tecido lesionado, cada fotomicrografia foi desmembrada em 24 imagens (372x272 pixels) e, em seguida, analisadas pelo programa ImageJ® versão 1.46, utilizando o plugin “Colour deconvolution” para a coloração “Azan-Mallory”, onde somente a coloração azul foi mensurada pelo outro plugin “Threshold”, no qual permite a obtenção do resultado em porcentagem de colágeno existente em cada imagem equivalente ao número total de pixels, sendo o resultado expresso pela média \pm erro padrão da média (EPM) de cada ferida (CARVALHO *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2011).

4.10.6 Avaliação de reepitelização

A reepitelização ocorre pela formação de uma nova camada de revestimento epitelial que se inicia a partir das bordas em direção ao centro da lesão, aumentando a também espessura durante este processo (SANTORO; GAUDINO, 2005).

Lâminas histológicas coradas pelo método de H&E correspondentes aos dias 9 e 14 após a cirurgia foram fotografadas (aumento de 100x) e o comprimento e a espessura do novo epitélio, foram adquiridas 6 fotomicrografias de cada ferida (n=5/grupo/dia) iniciando pela borda da ferida (término de pele íntegra) até a outra margem da lesão. O comprimento foi

analisado no 9º dia e os resultados foram expressos como percentual de reepitelização (área reepitelizada x 100/ área total lesionada)(SCHNEIDER; GARLICK; EGLES, 2008). A espessura do novo epitélio foi verificada por 18 medidas da camada basal à granular exceto extrato córneo (queratina) no 14º dia (BARANOWSKY *et al.*, 2010).

4.11 Estudo de mediadores inflamatórios

4.11.1 Atividade da enzima mieloperoxidase

A enzima mieloperoxidase está localizada nos grânulos azurófilos de neutrófilos de forma expressiva, e a sua atividade enzimática está correlacionada com a presença de polimorfonucleares no tecido (SOUZA *et al.*, 2001; PATTERSON *et al.*, 2014). Portanto, a atividade de mieloperoxidase foi estimada nas feridas excisionais coletadas nos dias 2,3 e 4 após a cirurgia, com o intuito avaliar a participação de neutrófilos na fase inflamatória da cicatrização.

Uma solução tamponada de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio) foi utilizada para a incubação das amostras teciduais coletadas (n=6/grupo/dia), seguindo a proporção de 50 mg de tecido por mL de tampão, onde foi feita a homogeneização (POLITRON®) seguida de centrifugação (1500 g/15 min a 4°C). O sobrenadante resultante do processamento tecidual foi repassado para eppendorfs e sujeito a três etapas seguidas de congelamento (- 20°C; 10 minutos cada) e descongelamento, submetendo o *pellet* de células ao choque térmico. O conteúdo foi novamente centrifugado (1500 x g; 15 min a 4°C) para remoção de contaminantes. Na etapa final, as amostras foram plaqueadas em duplicatas (7 µL em placas de 96 poços) e adicionada 200 µL da solução de leitura (5 mg O-dianisidine; 15 µL H₂O₂ 1%; 3 mL tampão fosfato; 27 mL água destilada). A absorbância foi lida no comprimento de onda de 460 nm no tempo zero e novamente após 1 minuto, sendo a mudança da absorbância plotada numa curva padrão de neutrófilos, expressa como neutrófilos/mg de tecido. Este resultado foi representado como atividade da enzima mieloperoxidase.

4.11.2 Determinação dos níveis de nitrito

As feridas excisionais foram coletadas nos dias 2, 4 e 9 (n=6/grupo/dia) após a cirurgia para examinar a participação do óxido nítrico ao longo do processo cicatricial. A avaliação do

conteúdo total de nitrato/nitrito ($\text{NO}^3^-/\text{NO}^2^-$) foi determinada pela reação de Griess, que indica a formação de óxido nítrico.

Primeiramente os tecidos foram pesados e triturados (POLITRON®) com auxílio de uma solução resfriada de cloreto de potássio (KCl a 1,15%), após a obtenção dos homogenatos de cada amostra (10% de tecido) a centrifugação foi realizada para a obtenção do sobrenadante (1500g; 15 minutos). Para que todo o nitrato (NO^3^-) presente no sobrenadante se convertesse em nitrito (NO^2^-), as amostras obtidas foram plaqueadas (placa de 96 poços) em duplicata (80 μL de cada sobrenadante) e incubadas por 12 horas com uma solução reagente (40 μL da enzima nitrato redutase, substrato NADPH, KH_2PO_4 em água destilada). Uma curva padrão de referência de nitrito também foi plaqueada, a partir de uma diluição contínua (1:2) de uma solução de nitrato de sódio (NaNO_2) de 200 μM . Após a conversão de nitrato em nitrito, 80 μL da solução de Griess (1% de sufamilamida em 1% H_3PO_4 / 0,1% de NEED/água destilada/1:1:1:1) foi adicionada em cada poço. A coloração púrpura final obtida pela reação leitura foi feita na absorbância de 540 nm e os resultados foram expressos em μM de NO_2^- , usando como referência a curva padrão de nitrito para a obtenção dos valores (CHEN *et al.*, 2000).

4.11.3 Dosagem *in situ* de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10)

Após a coleta no 2º dia após a cirurgia, os tecidos (n=6/grupo) foram triturados e homogeneizados (POLYTRON®) em solução de PBS. A determinação de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α no sobrenadante resultante do processamento das amostras foram detectadas por ELISA. Primeiramente, as placas de 96 poços foram incubadas com anticorpo murino anti-IL-1 β , anti-IL-6, anti-IL-10 ou anti-TNF- α (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IL-1 β), 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (TNF- α), 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; kit da R&D systems- Cat. N° DY501, DY510, DY406 e DY417, respectivamente) por 12h a 4°C (SAFIEH-GARABEDIAN *et al.*, 1995). Posteriormente a incubação, as amostras foram incluídas em duplicata nos poços e novamente incubadas por mais 2h a 4°C, nesta etapa uma curva com várias diluições de cada citocina por acrescentada em cada placa. Em seguida, cada placa foi lavada três vezes com uma solução tamponada de PBS/Tween 20 (0,05% SIGMA). Os anticorpos monoclonais biotinizados IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α diluídos (1:1000 com BSA/Tween 1%) foram adicionados às placas e incubados por 2h. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e foi adicionado 100 μL do complexo diluído (1:5000) de HRP-avidina. Após 20 minutos, foi acrescentado o reagente de cor o-

fenilenodiamina (OPD, 50 μ L) e as placas submetidas à nova incubação a 37°C por mais 20 minutos, em completa ausência de luz. Para interromper a reação enzimática e realizar a leitura, 50 μ L da solução contendo ácido sulfúrico 1M (H₂SO₄) foi adicionado. A leitura foi verificada em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de sobrenadante/mg de tecido, sendo a concentração das amostras obtidas a partir de uma curva padrão de cada citocina com 11 concentrações diferentes, partindo de uma diluição contínua, sendo as concentrações iniciais de 4000 pg/mL para IL-1 β e IL-6 e 2000 pg/mL para IL-10 e TNF- α .

4.12 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) ou em valores de mediana, variando com o tipo de parâmetro avaliado. Para comparações múltiplas de valores numéricos entre os grupos foi utilizado o teste de ANOVA, seguido por Newman-Keuls ou por Bonferroni. As medianas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunn's, e para variáveis nominais foi utilizado o teste de Fisher. Os resultados que representaram diferença estatística utilizaram valores de $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Efeito do tratamento tópico com fração protéica (HdLP 2,0%) em teste de irritabilidade dermal em camundongos

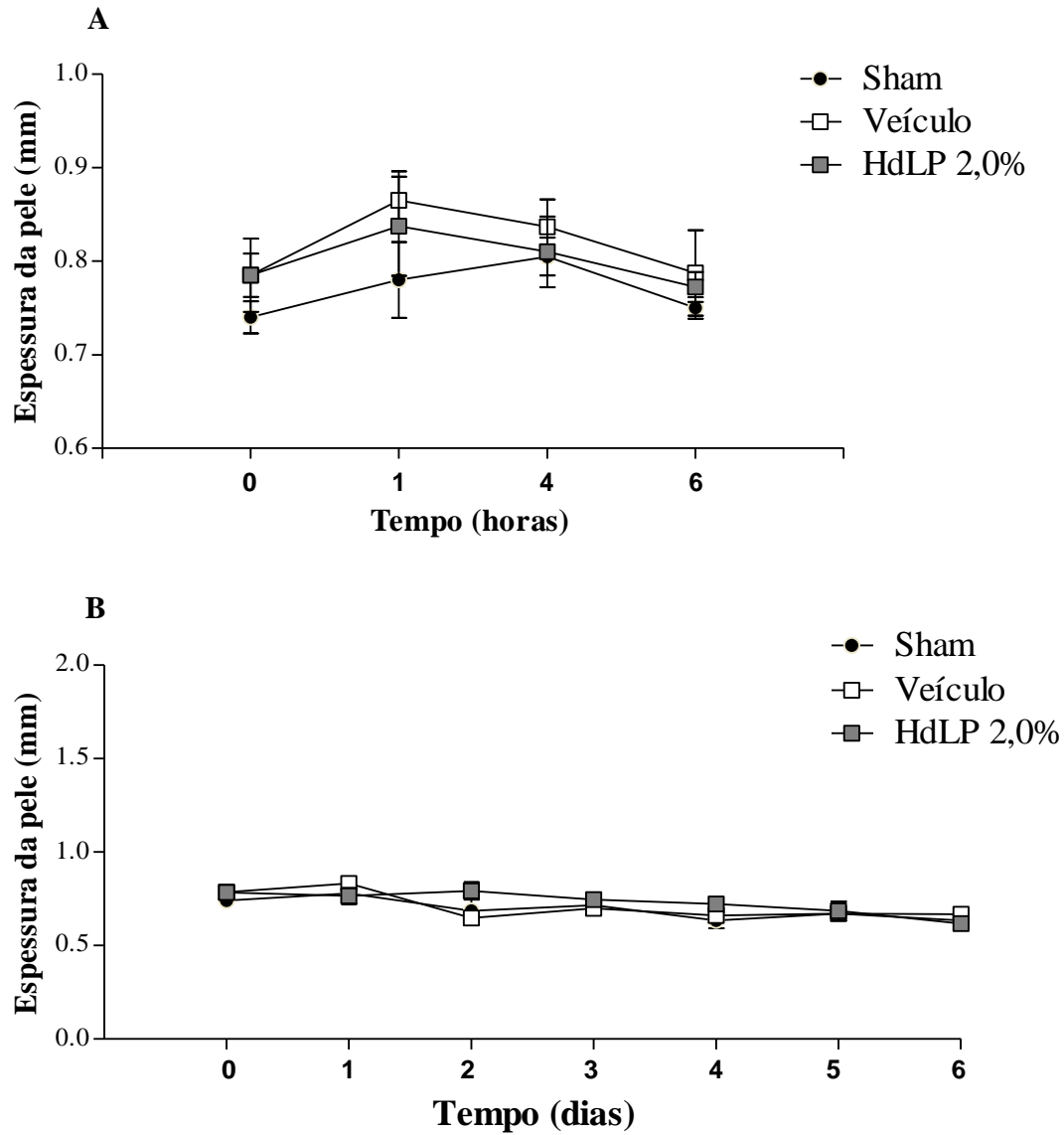
5.1.1 Tratamento tópico com a fração HdLP não induz irritação cutânea em pele íntegra

Não foram observadas alterações na espessura da pele íntegra nos grupos tratados com Veículo e com HdLP 2,0% após única (Figura 7A) ou múltiplas (Figura 7B) aplicações tópicas, demonstrando que não houve nenhuma reação irritante no local, sendo os dados dos grupos que receberam o tratamento bem próximos do grupo sham, que não recebeu nenhum tratamento.

5.1.2. Tratamento tópico com a fração HdLP não induz irritação cutânea em pele escarificada

Um dia após a escarificação foi observada um leve edema nos animais do grupo Sham, enquanto que os grupos Veículo e HdLP 2,0% não apresentaram edema. Todos os grupos experimentais apresentaram formação de crosta nos dois períodos avaliados bem como ausência de exsudato (Tabela 1). A escarificação provocou um leve aumento na espessura da pele dos animais do grupo Sham na primeira hora de avaliação, enquanto que os animais tratados com Veículo e HdLP 2,0% não apresentaram alterações na espessura sendo os dois grupos diferentes significativamente do grupo Sham. Na 6^o hora após o tratamento tópico, o grupo Sham ainda apresentava alterações na espessura demonstrando um leve processo inflamatório, enquanto que os demais grupos não apresentaram alterações (Figura 8A). No 1^o e 2^o dia após o início do tratamento foi possível observar que o grupo Sham teve um aumento na espessura enquanto que os grupos tratados Veículo e HdLP 2,0% não foram capazes de provocar irritabilidade na área escarificada (Figura 8B).

Figura 7 – Representação do tratamento tópico com HdLP em pele íntegra após aplicação única (A) e múltiplas (B) aplicações.



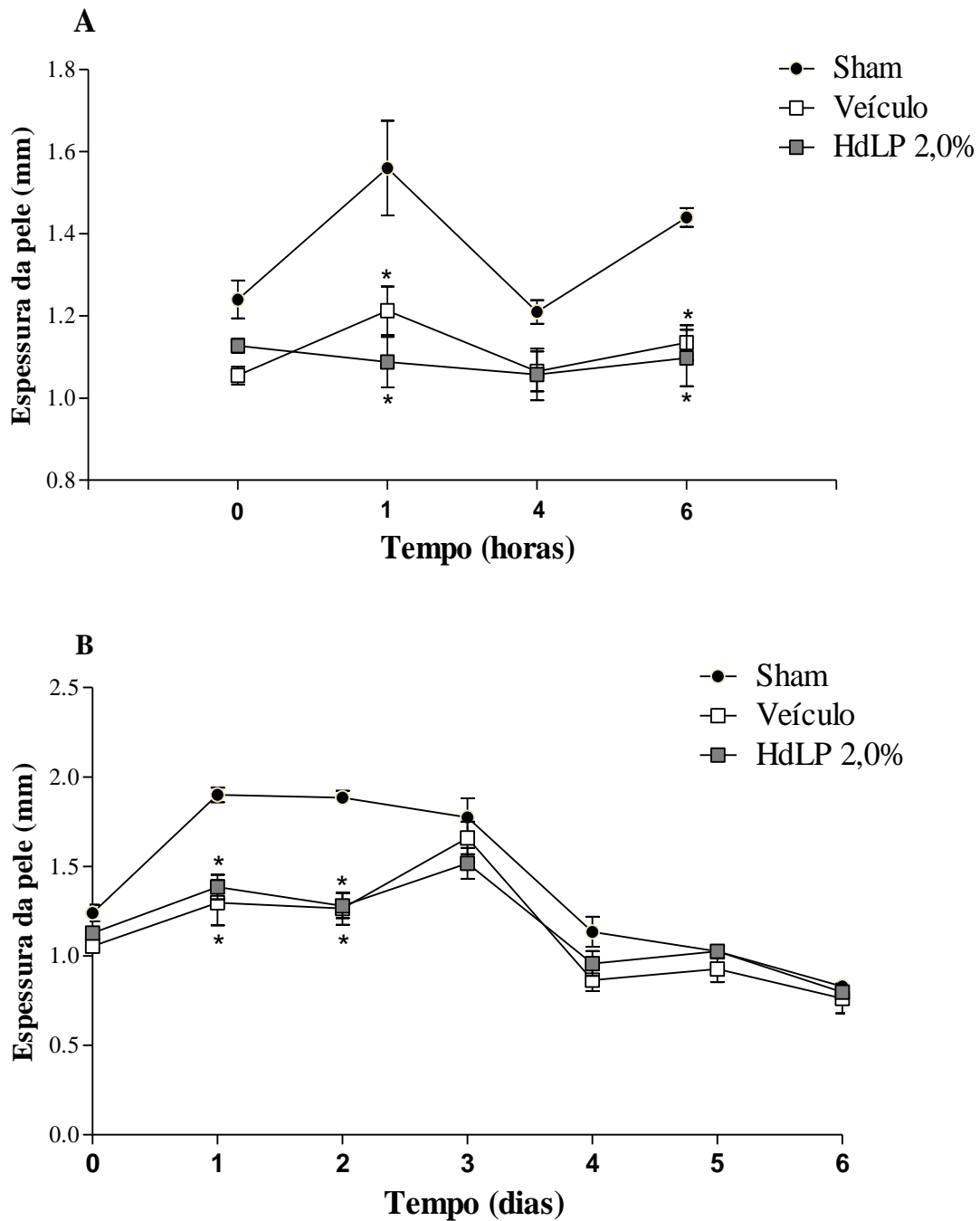
Camundongos foram tricotomizados um dia antes do início do tratamento tópico na região dorsal. A espessura da pele íntegra foi mensurada antes, 1, 4 e 6 horas após uma única aplicação tópica (A), bem como após múltiplas doses, sendo o tratamento e a avaliação realizados uma vez ao dia durante 6 dias (B). O grupo Sham não recebeu nenhum tratamento. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) ($n = 5/\text{grupo}$).

Tabela 1 – Representação de parâmetros macroscópicos avaliados em pele escarificada

Grupos experimentais	Edema		Hiperemia		Crosta		Exsudato	
	1º	2º	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Sham	1 (0 -1)	0	0	0	P	P	A	A
Veículo	0	0	0	0	P	P	A	A
HdLP 2,0%	0	0	0	0	P	P	A	A

Camundongos foram tricotomizados um dia antes do início do tratamento tópico na região dorsal. As reações cutâneas foram observadas no 1º e 2º dia após a escarificação e classificadas através dos seguintes parâmetros: sinais flogísticos de edema, eritema (onde foram atribuídos escores: 0: ausente, 1: leve, 2: moderado e 3: intenso), crosta e exsudato (ausência e presença). O grupo Sham não recebeu nenhum tratamento. A: ausente e P: presente. Os resultados foram expressos como a mediana e variações entre os dados de cada grupo.

Figura 8 – Representação do tratamento tópico com HdLP em pele escarificada após aplicação única (A) e múltiplas (B) aplicações.



Camundongos foram tricotomizados um dia antes do início do tratamento tópico na região dorsal. A espessura da pele escarificada foi mensurada antes, 1, 4 e 6 horas após uma única aplicação tópica (A), bem como após múltiplas doses, sendo o tratamento e a avaliação realizados uma vez ao dia durante 6 dias (B). O grupo Sham não recebeu nenhum tratamento. * $p < 0,05$ representa a diferença estatística em comparação ao grupo Sham. Os resultados são expressos em média \pm EPM ($n = 5/\text{grupo}$; ANOVA seguido do teste de Newmann-Keuls).

5.2 Aspectos macroscópicos de feridas excisionais sob o tratamento contendo a fração proteica (HdLP)

5.2.1 O tratamento tópico com HdLP não influenciou os parâmetros de edema e hiperemia tecidual

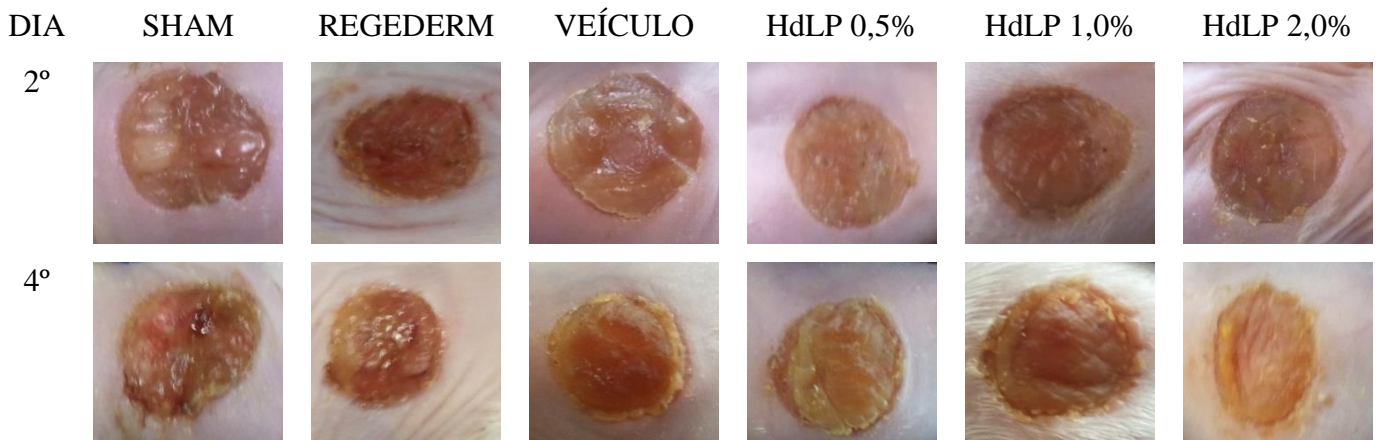
Os sinais flogísticos de edema e hiperemia foram observados nos 2º e 4º dia após indução cirúrgica das feridas (Tabela 2). Imagens foram registradas para representar os aspectos macroscópicos dos diferentes grupos experimentais (Figura 9). As feridas do grupo Sham apresentaram-se edemaciadas com intensidade variando de leve a moderado nos dois dias de avaliação. No 2º dia, o edema ocorreu com menor frequência nos demais grupos experimentais, mas com mediana e variação semelhantes 1 (0 – 2). No entanto, somente o tratamento com HdLP 2,0% foi capaz de atenuar o edema de forma significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo Sham, com mediana e variações de 1 (0 – 1) e 1 (1 – 2), respectivamente. No 4º dia não houve mudanças significativas na intensidade do edema entre os grupos experimentais. Em relação à hiperemia, as feridas de todos os grupos experimentais apresentaram uma variação na intensidade de leve à intensa, mas nenhuma diferença representativa foi demonstrada entre os grupos experimentais.

Tabela 2 – Avaliação macroscópica dos sinais flogísticos em feridas excisionais

Grupos experimentais	Edema		Hiperemia	
	2º dia	4º dia	2º dia	4º dia
Sham	100%/ 1 (1-2)	100%/ 1 (1-2)	100%/ 1 (1-2)	100%/ 1 (1-2)
Regederm®	80%/ 1 (0-2)	60%/ 1 (0-2)	88%/ 1,5 (0-2)	80%/ 1 (0-2)
Veículo	68%/ 1 (0-2)	68%/ 1 (0-1)	95%/ 1 (0-2)	86%/ 1 (0-3)
HdLP 0,5 %	67%/ 1 (0-2)	71%/ 1 (0-3)	67%/ 1 (0-2)	71%/ 1 (0-2)
HdLP 1,0 %	76%/ 1 (0-2)	76%/ 1 (0-2)	81%/ 1 (0-2)	81%/ 1 (0-2)
HdLP 2,0 %	61%/ 1 (0-1)*	62%/ 1 (0-2)	85%/ 1 (0-2)	76%/ 1 (0-2)

Os animais foram submetidos à cirurgia para a indução da ferida e distribuídos entre os grupos experimentais. O tratamento tópico foi realizado com: Regederm®, Veículo e três formulações contendo concentrações diferentes de HdLP (0,5%, 1,0% e 2,0%). Os animais pertencentes ao grupo Sham foram sujeitos ao procedimento cirúrgico, mas não foram receberem nenhum tratamento. Os parâmetros de edema e hiperemia foram observados no 2º e 4º dia quanto à frequência (%) e intensidade (0- ausente, 1- leve, 2- moderado e 3- intenso) e expressos como mediana e variação, respectivamente. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham (n=10 animais/grupo; Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn).

Figura 9 – Representação macroscópica dos sinais flogísticos de edema e hiperemia nos grupos experimentais



As imagens representam aspectos flogísticos de edema e hiperemia em feridas excisionais avaliados no 2° e 4° dias após a cirurgia. O tratamento tópico foi realizado com: Regederm®, Veículo e HdLP (0,5%, 1,0% ou 2,0%). Os animais pertencentes ao grupo Sham foram sujeitos ao procedimento cirúrgico, mas não receberam nenhum tratamento.

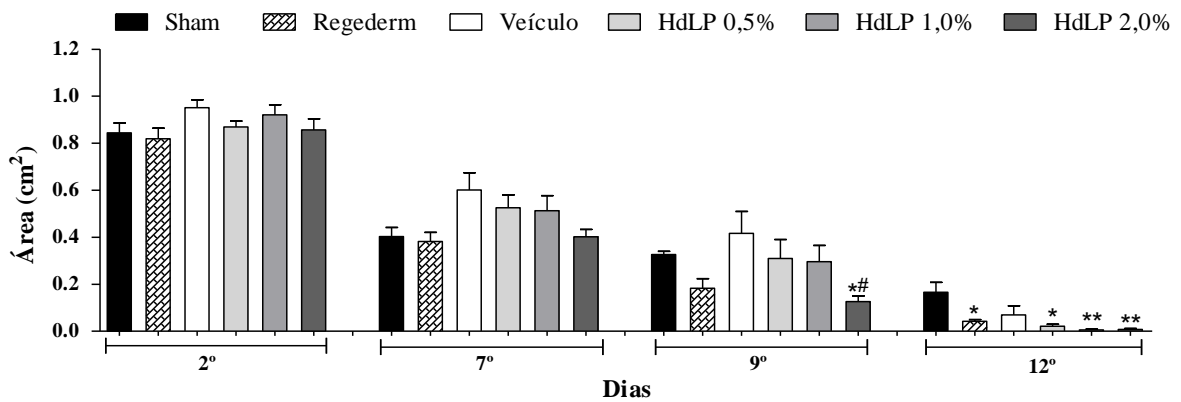
5.2.2 O tratamento tópico com HdLP foi capaz de reduzir a área das feridas excisionais

A área média das lesões foi determinada com o objetivo de investigar o efeito do tratamento tópico com as proteínas HdLP 0,5%, 1,0% e 2,0% sobre a contração das feridas excisionais. As medidas foram realizadas nos dias 2, 7, 9 e 12 após a indução da ferida (Figura 10).

As diferenças significativas entre os grupos experimentais só foram observadas a partir do 9° dia, no qual os grupos controle Sham ($0,32 \pm 0,01 \text{ cm}^2$) e Veículo ($0,41 \pm 0,09 \text{ cm}^2$) não apresentavam diferença entre si. O tratamento com HdLP 2,0% ($0,12 \pm 0,02 \text{ cm}^2$) favoreceu a redução da área das feridas de forma significativa ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos controle. Um resultado semelhante na contração das feridas foi obtido pelo grupo Regederm® ($0,18 \pm 0,04 \text{ cm}^2$), porém não ocorreu de forma significativa.

Esses resultados foram semelhantes aos dados obtidos no 12° dia, no qual a contração na área foi significativa ($p < 0,01$) nos grupos tratados com HdLP 1,0% ($0,005 \pm 0,003 \text{ cm}^2$) e HdLP 2,0% ($0,007 \pm 0,004 \text{ cm}^2$) em relação ao grupo Sham ($0,17 \pm 0,04 \text{ cm}^2$), enquanto que HdLP 0,5% ($0,02 \pm 0,009 \text{ cm}^2$) apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao Sham. No mesmo período, o grupo Regederm® ($0,04 \pm 0,007 \text{ cm}^2$), também foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) a área das feridas em relação ao Sham.

Figura 10—Evolução da área das feridas durante o processo de cicatrização de feridas excisionais



Os animais foram submetidos à cirurgia para a indução da ferida e distribuídos entre os grupos experimentais. O tratamento tópico foi realizado com: Regederm®, Veículo e três pomadas contendo diferentes concentrações de HdLP (0,5%, 1,0% e 2,0%). Os animais pertencentes ao grupo Sham foram sujeitos ao procedimento cirúrgico, mas não foram receberam nenhum tratamento. A área das feridas foi planimetricamente determinada nos dias 2, 7, 9 e 12 após a cirurgia. Resultados estão expressos como a média \pm EPM da área média das feridas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e # $p < 0,05$ com o grupo Veículo (n=10 animais/grupo; ANOVA seguido de Bonferroni).

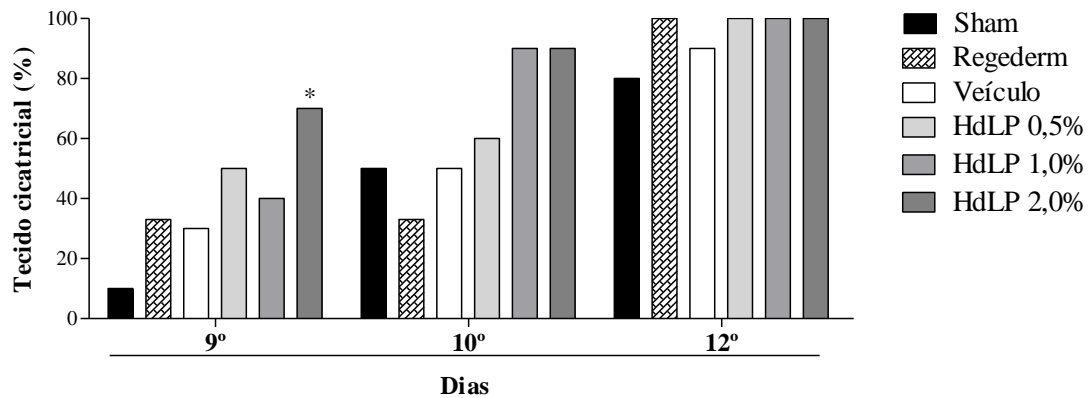
5.2.3 O tratamento tópico com HdLP favorece o aparecimento de tecido cicatricial e a reepitelização em feridas cutâneas

O registro foi feito de acordo com a presença ou ausência do parâmetro na ferida excisional, sendo registradas imagens que representam o surgimento do tecido cicatricial e da reepitelização em todos os grupos experimentais (Figura 13).

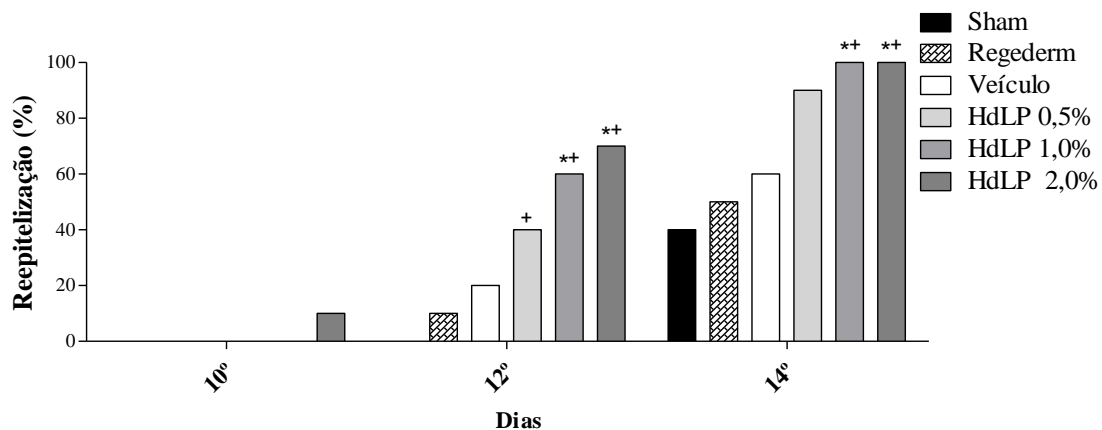
No 9º dia após indução das lesões, foi verificada a presença de tecido cicatricial em somente 10% dos animais do grupo Sham, enquanto que 30% das feridas do grupo Veículo já apresentavam este tecido ao redor da crosta. O grupo tratado com HdLP 2,0% induziu de forma significativa ($p < 0,05$) o surgimento do tecido em 70% das lesões em comparação aos grupos controles. Os demais grupos tratados HdLP 0,5% e HdLP 1,0% (50% e 40%, respectivamente) não apresentaram diferenças significativas. Em relação ao 10º dia, houve um aumento na presença de tecido cicatricial nos grupos controle Sham e Veículo (ambos com 50%), enquanto que 90% dos animais dos grupos HdLP 1,0% e 2,0% já apresentaram este tecido. Foi observado que no 12º dia de avaliação, a frequência do tecido cicatricial atingia, respectivamente, 80% e 90% das feridas do grupo Sham e Veículo e 100% das lesões dos grupos tratados com Regederm®, HdLP 0,5%, 1,0% e 2,0% (Figura 11).

A reepitelização da ferida foi considerada quando a crosta se desprende totalmente do tecido cicatricial, não sendo mais possível mensurar a área lesionada. Este parâmetro foi observado a partir do 10º dia até o 14º dia após a indução da lesão (Figura 12).

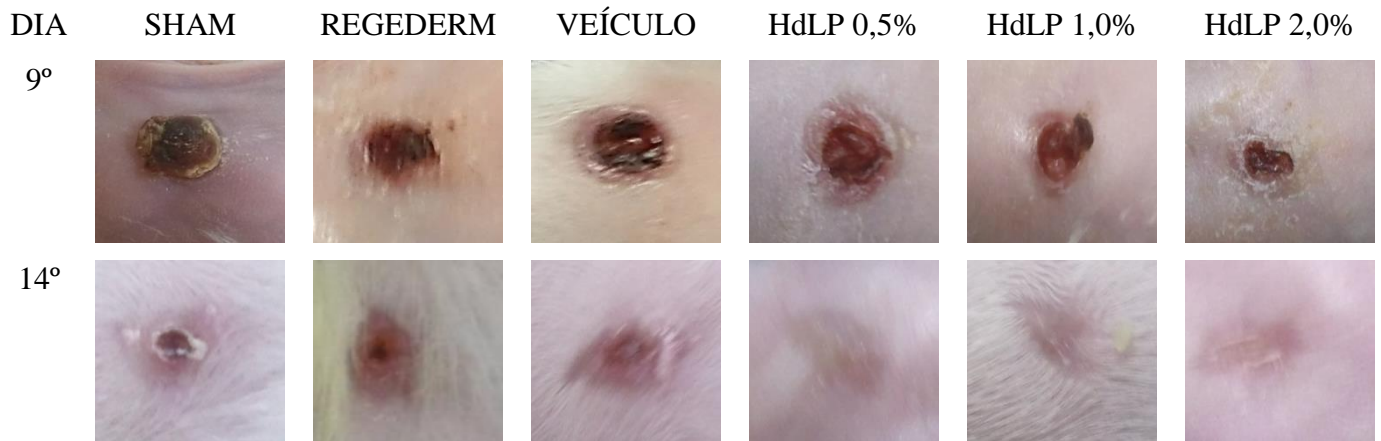
Já no 10º dia, a maioria dos grupos experimentais não possuíam nenhuma ferida reepitelizada, no entanto, HdLP 2,0% apresentou 10% de suas feridas reepitelizadas. Na análise do 12º dia, o grupo Sham ainda não apresentava nenhuma ferida reepitelizada, enquanto que os grupos tratados com HdLP 0,5%, 1,0% e 2,0% (40%, 60% e 70%, respectivamente) apresentaram maior porcentagem de reepitelização em comparação ($p < 0,05$) ao Regederm® (10%) e Sham. Ao final da análise, no 14º dia, somente 40% das feridas do grupo Sham, 50% do Regederm® e 60% do Veículo apresentavam-se reepitelizadas, no entanto, o tratamento com HdLP 1,0% e 2,0% induziu a reepitelização em todas as feridas do grupo de forma significativa ($p < 0,05$) em comparação ao Sham e Regederm®.

Figura 11– Efeito de HdLP sobre o surgimento do tecido cicatricial em feridas excisionais

Os animais foram submetidos à cirurgia para a indução da ferida e distribuídos entre os grupos experimentais. O tratamento tópico foi realizado com: Regederm®, Veículo e três pomadas contendo diferentes concentrações de HdLP (0,5%, 1,0% e 2,0%). Os animais pertencentes ao grupo Sham foram sujeitos ao procedimento cirúrgico, mas não receberam nenhum tratamento. O surgimento do tecido cicatricial foi observado nos dias 9, 10 e 12 após a cirurgia. Resultados estão expressos como a percentual de feridas que apresentam o tecido cicatricial nas bordas da lesão. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham ($n = 10$ animais/grupo; Teste de Fisher).

Figura 12 – Efeito de HdLP sobre o início da reepitelização em feridas excisionais

Os animais foram submetidos à cirurgia para a indução da ferida e distribuídos entre os grupos experimentais. O tratamento tópico foi realizado com: Regederm®, Veículo e três pomadas contendo diferentes concentrações de HdLP (0,5%, 1,0% e 2,0%). Os animais pertencentes ao grupo Sham foram sujeitos ao procedimento cirúrgico, mas não foram receberem nenhum tratamento. Esta análise foi feita nos dias 10, 12 e 14 após a cirurgia. Resultados estão expressos como a percentual de feridas reepitelizadas. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e + $p < 0,05$ com o grupo Regederm® ($n = 10$ animais/grupo; Teste de Fisher).

Figura 13 – Representação macroscópica do tecido cicatricial e da reepitelização nos grupos experimentais

As imagens representam aspectos da fase proliferativa do processo cicatricial no 9° dia (tecido cicatricial) e 14° (reepitelização) em feridas excisionais. O tratamento tópico foi realizado com: Regederm®, Veículo e HdLP (0,5%, 1,0% ou 2,0%). Os animais pertencentes ao grupo Sham foram sujeitos ao procedimento cirúrgico, mas não foram receberam nenhum tratamento.

5.3 Avaliação histológica do efeito do tratamento tópico com HdLP em feridas excisionais

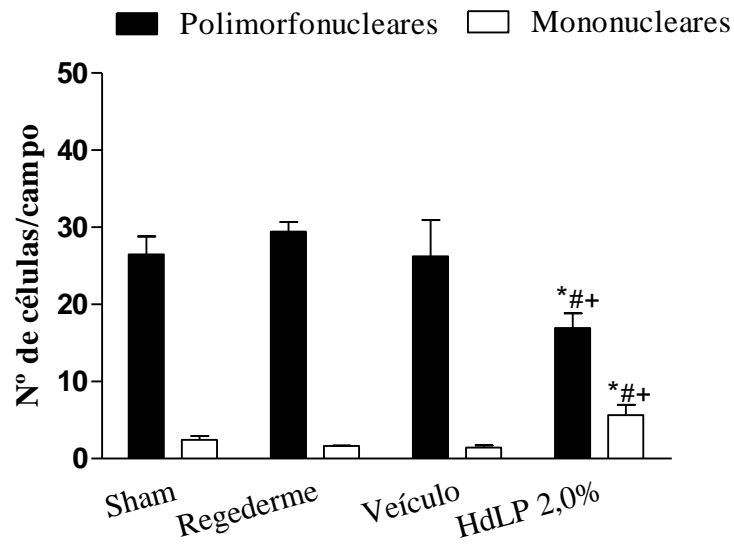
No intuito de avaliar microscopicamente a evolução do processo de cicatrização foram confeccionadas lâminas histológicas correspondentes aos dias: 2º, 7º, 9º e 14º após a indução cirúrgica das lesões. A pomada contendo HdLP 2,0% foi escolhida para a investigação histológica por ter apresentado uma redução na área das feridas mais significativa que as demais doses utilizadas na análise macroscópica (HdLP 0,5% e 1,0%).

5.3.1 O tratamento tópico com HdLP 2,0% diminui o infiltrado polimorfonuclear e aumenta o mononuclear

O infiltrado de leucócitos foi avaliado de forma quantitativa, no qual regiões com maior densidade de células foram quantificadas, com distinção de polimorfonucleares e mononucleares, para cada campo observado em lâminas histológicas do 2º dia após a indução cirúrgica da lesão. A avaliação foi realizada em regiões da derme papilar e reticular. Foi possível observar neste período uma predominância de infiltrado leucocitário na parte da crosta e na derme papilar em todos os grupos experimentais.

A análise quantitativa de polimorfonucleares demonstrou que as feridas do grupo Sham ($26,48 \pm 1,4$) não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos Veículo ($26,25 \pm 3,0$) e Regederm® ($29,45 \pm 0,7$), no entanto o tratamento com HdLP 2,0% ($16,93 \pm 1,2$) foi capaz de reduzir significativamente o infiltrado de polimorfonucleares quando comparado aos demais grupos experimentais (Figura 14). Da mesma forma, não foi encontrada nenhuma diferença no infiltrado de mononucleares entre os grupos Sham ($2,73 \pm 0,4$), Veículo ($1,7 \pm 0,11$) e Regederm® ($1,65 \pm 0,01$), no entanto, HdLP 2,0% ($5,08 \pm 0,8$) aumentou de forma significativa o número de células em relação aos demais grupos ($p < 0,05$).

Figura 14 – Análise histológica do infiltrado de leucócitos após o tratamento com HdLP 2,0%



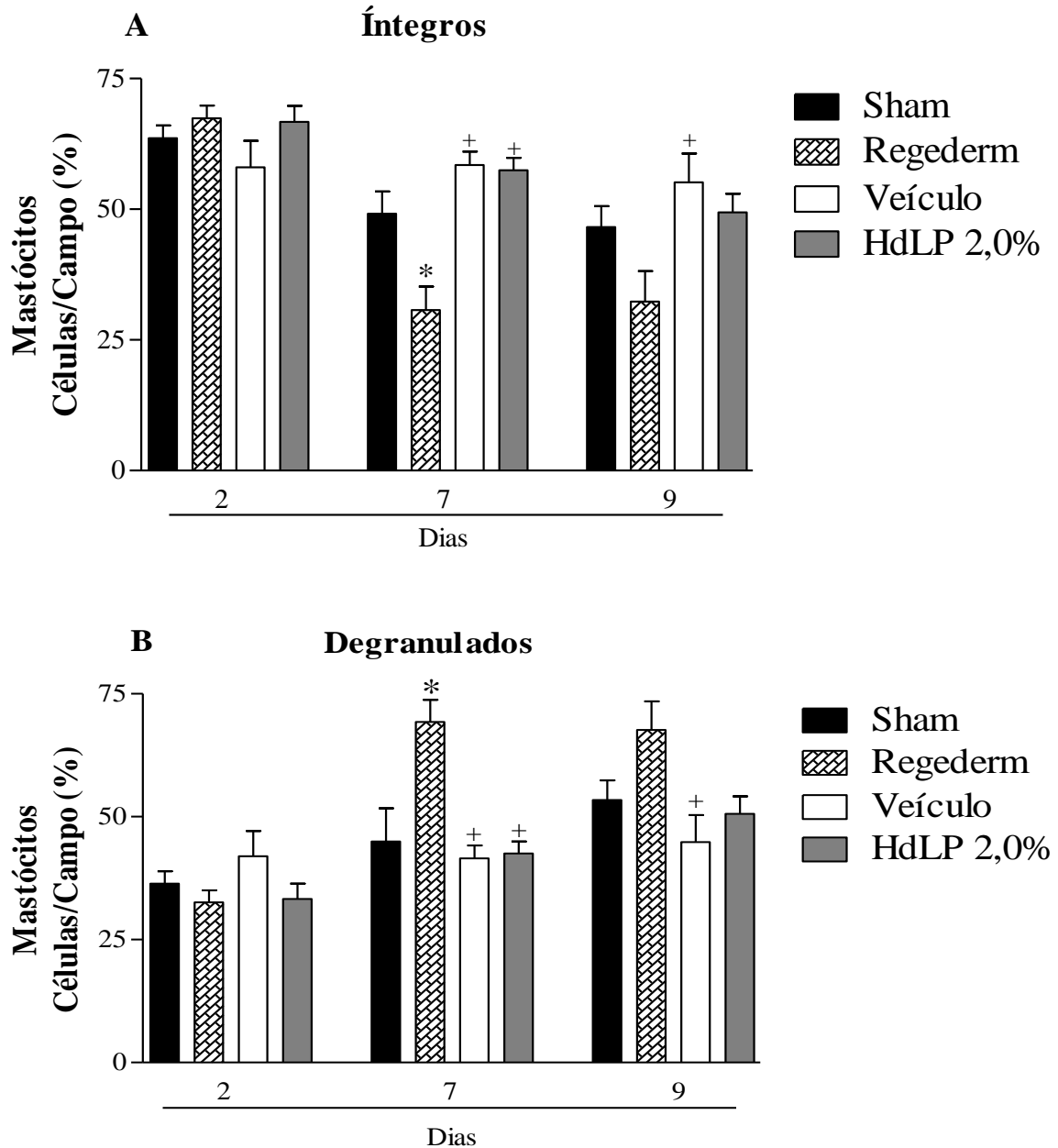
Os animais foram submetidos à cirurgia para a indução da ferida e distribuídos entre os grupos experimentais: Sham, Regederm®, Veículo e HdLP 2,0%. As feridas excisionais foram coletadas no 2º dia após a cirurgia para a confecção de lâminas histológicas. O infiltrado leucocitário foi quantificado em 10 campos/ferida, distribuído entre derme papilar e reticular, com distinção de células polimorfonucleares e mononucleares (aumento de 400x). Os resultados foram expressos como a média do número de células/campo \pm EPM. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham, # $p < 0,05$ ao grupo Veículo e + $p < 0,05$ ao grupo Regederm® (n=5 animais/grupo; ANOVA seguido de Bonferroni).

5.3.2 O tratamento tópico com HdLP 2,0% não interfere na degranulação de mastócitos em feridas excisionais

As lâminas histológicas coradas por azul de toluidina foram confeccionadas com a finalidade de analisar o efeito do tratamento de HdLP 2,0% sobre a degranulação mediadores inflamatórios pelos mastócitos. A avaliação foi feita no dia 2, 7 e 9 após a indução da ferida excisional, considerando mastócitos íntegros (Figura 15A) e degranulados (Figura 15B) no tecido correspondente a área lesionada. No 2º dia, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais. Em relação ao 7º dia, os grupos Sham ($44,96 \pm 6,73$) e Veículo ($41,55 \pm 2,5$) apresentaram semelhança no número de mastócitos degranulados. Da mesma forma, o tratamento com HdLP 2,0% ($42,55 \pm 2,41$) não alterou a porcentagem de mastócitos degranulados quando comparado com os grupos controle, enquanto que no grupo tratado com Regederm® ($69,30 \pm 4,49$) foi observado uma significativa ($p < 0,05$) degranulação em relação aos demais grupos experimentais avaliados neste período.

No 9º dia, o resultado foi semelhante ao obtido no 7º dia análise, a porcentagem de mastócitos degranulados do grupo Regederm® ($67,66 \pm 5,8$) permaneceu maior que os mastócitos íntegros no mesmo período, apresentando diferença significativa somente em relação ao grupo Veículo ($44,84 \pm 5,4$). Este resultado revela que HdLP 2,0% não interfere na degranulação de mastócitos em nenhum período estudado.

Figura 15 – Efeito do tratamento com HdLP 2,0% sobre a degranulação de mastócitos



Os animais foram submetidos à cirurgia para a indução da ferida e distribuídos entre os grupos experimentais: Sham, Regederm®, Veículo e HdLP 2,0%. As feridas excisionais foram coletadas no 2º, 7º e 9º dia após a cirurgia para a confecção de lâminas histológicas, posteriormente coradas com azul de toluidina. Os mastócitos íntegros (A) e degranulados (B) foram quantificados em 15 campos/lâmina (aumento de 400x). Os resultados estão expressos como a média da porcentagem de mastócitos/campo \pm EPM. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham, # $p < 0,05$ ao grupo Veículo e + $p < 0,05$ ao grupo Regederm® (n=5 animais/grupo; ANOVA seguido de Bonferroni).

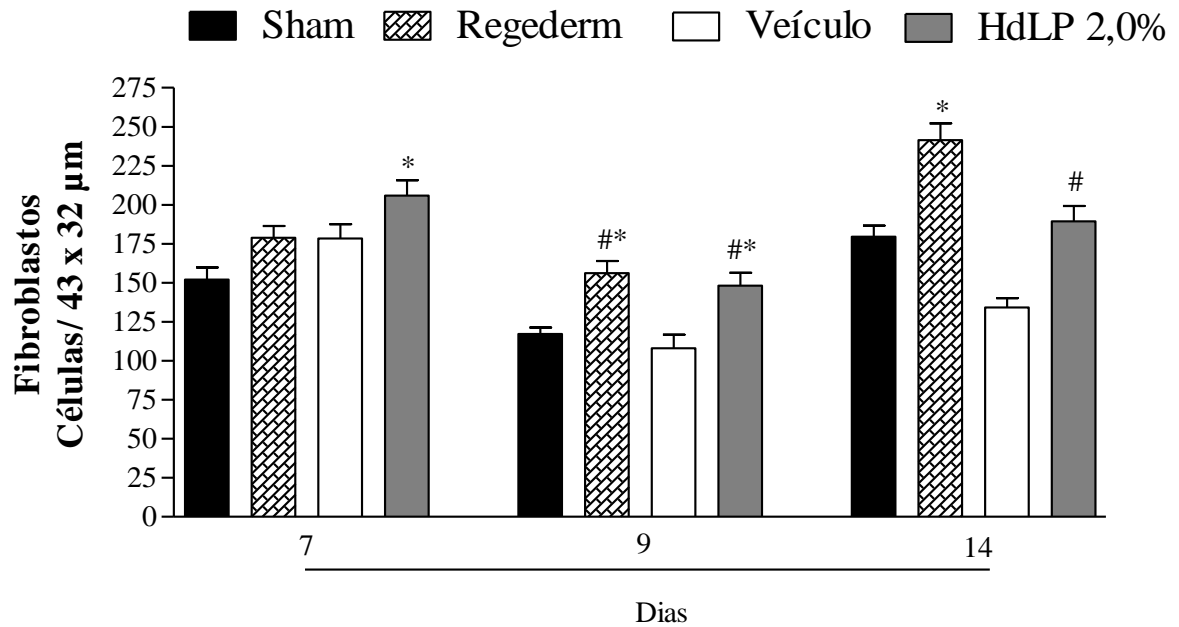
5.3.3 O tratamento tópico com HdLP 2,0% estimula a proliferação de fibroblastos em feridas excisionais

O processo de fibroplasia foi avaliado quantitativamente em lâminas histológicas de feridas excisionais coradas por H&E, correspondentes aos dias 7, 9 e 14 após a cirurgia (Figura 16).

No 7º dia, não houve diferença entre os grupos controles Sham ($152,1 \pm 7,84$), Veículo ($178,3 \pm 9,25$) e Regederm® ($178,8 \pm 7,49$), enquanto que as feridas tratadas com HdLP 2,0% ($205,90 \pm 9,75$) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de fibroblastos em comparação ao grupo Sham. Da mesma forma, no 9º dia o Sham ($117,3 \pm 3,90$) e Veículo ($108,1 \pm 8,61$) exibiram resultados semelhantes, enquanto que um aumento no número de fibroblastos foi observado não só no grupo tratado com HdLP 2,0% ($148,20 \pm 8,29$) mas também no grupo Regederm® ($156,2 \pm 7,70$), sendo estes resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação aos grupos controle.

No último dia de análise das feridas excisionais, o 14º dia, o grupo controle positivo Regederm® ($241,30 \pm 10,85$) demonstrou um maior desempenho na estimulação da fibroplasia em comparação ao grupo Sham ($179,60 \pm 7,11$), enquanto que durante este mesmo período, o grupo tratado com HdLP 2,0% ($189,15 \pm 9,82$) também intensificou o processo de fibroplasia, mas apresentou diferença significativa somente em comparação ao grupo Veículo ($134,20 \pm 5,93$).

Figura 16 – Efeito do tratamento tópico com HdLP 2,0% sobre a fibroplasia



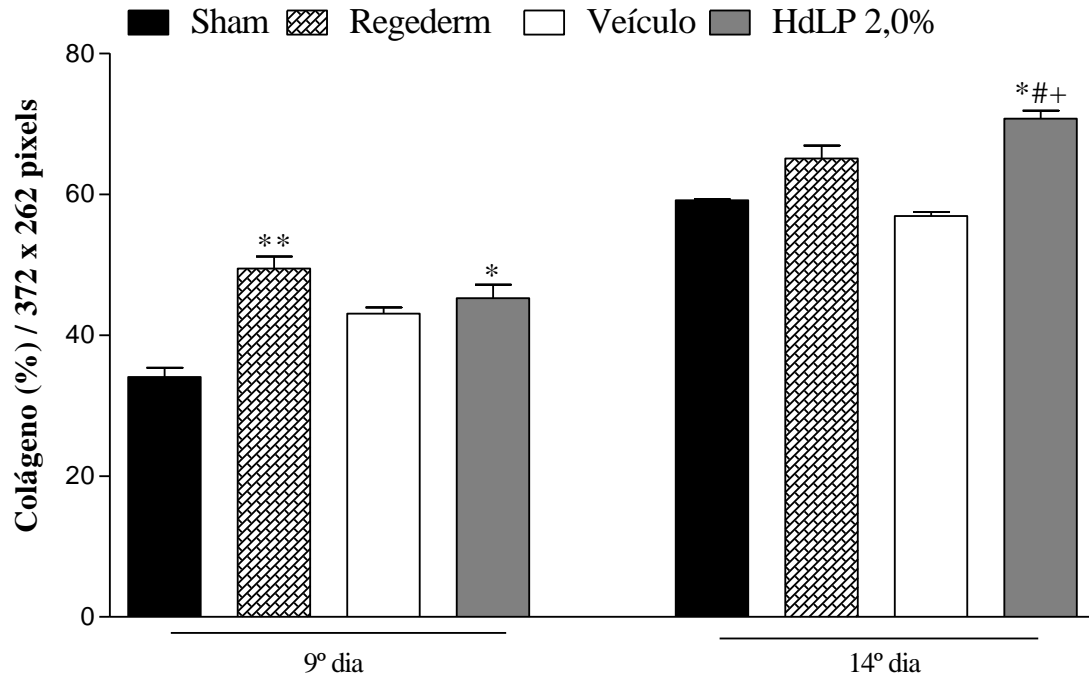
Os animais foram submetidos à cirurgia para a indução da ferida e distribuídos entre os grupos experimentais: Sham, Regederm®, Veículo e HdLP 2,0%. As feridas excisionais foram coletadas no 7º, 9º e 14º dia após a cirurgia para a confecção de lâminas histológicas, posteriormente coradas por H&E. A quantificação dos fibroblastos foi realizada através do Plugin “Cell counter” do *softwareImageJ*®. Os resultados foram expressos como a média ± EPM do número de fibroblastos. *p<0,05 indica diferença estatística comparado com o grupo Sham, #p<0,05 ao grupo Veículo (n=5 animais/grupo; ANOVA seguido de Bonferroni).

5.3.4 O tratamento tópico com HdLP 2,0% intensifica a deposição de colágeno em feridas excisionais

A colagênese foi avaliada quantitativamente no 9º e 14º dias após a indução das feridas excisionais (Figura 17). Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas por Tricrômio de Masson foram capturadas para representar o processo de colagênese em todos os grupos experimentais (Figura 18 e 19).

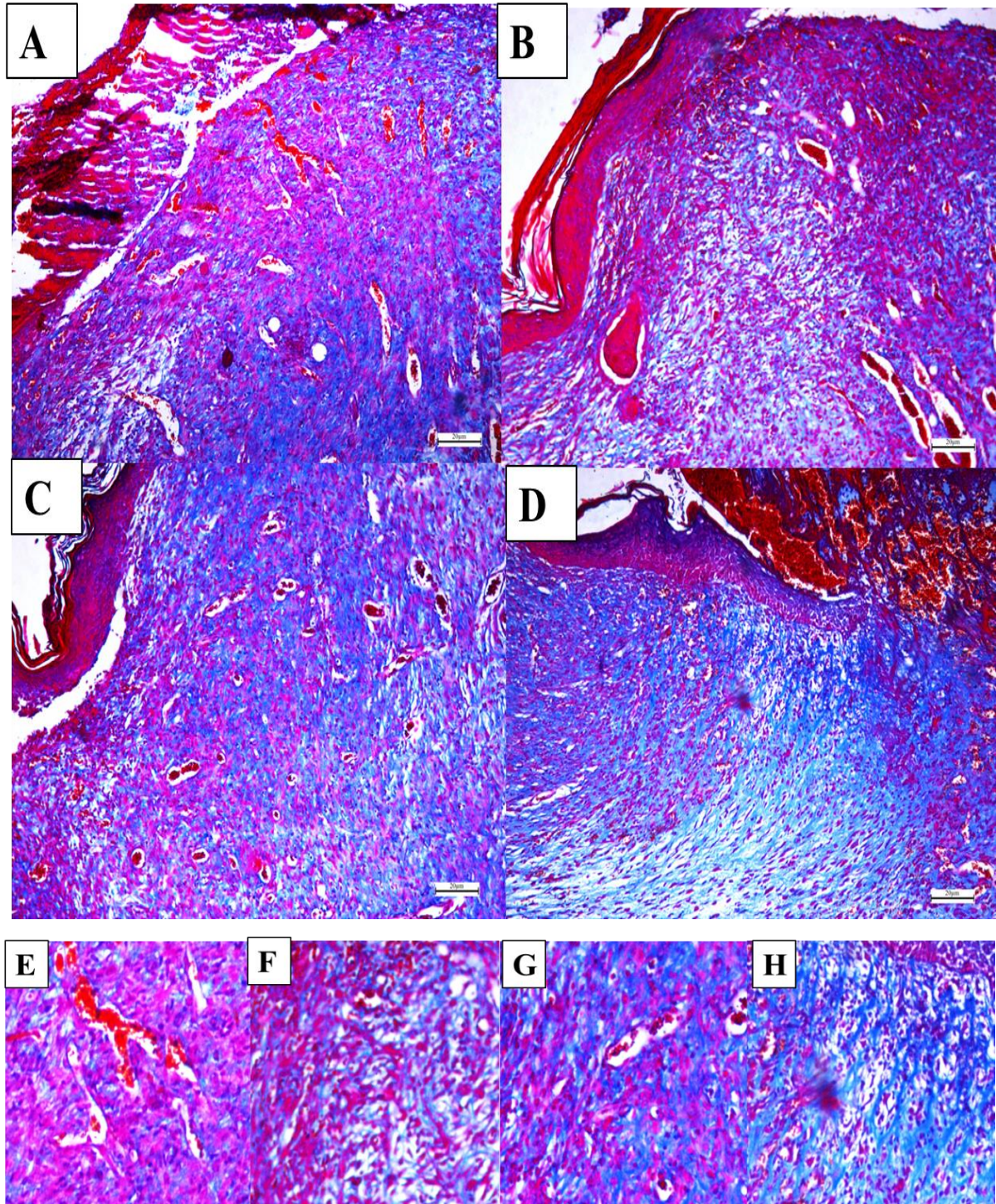
No 9º dia, as feridas do grupo Sham ($36,53\% \pm 2,63$) apresentavam menor deposição de colágeno em comparações os demais grupos experimentais, mas nenhuma diferença foi encontrada em relação ao Veículo ($43,07 \pm 0,84$). Já os grupos controle positivo Regederm® ($49,47\% \pm 1,68$) e HdLP 2,0% ($45,25\% \pm 1,90$) apresentaram maior intensidade na deposição do colágeno, demonstrando diferença significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) quando comparado ao grupo controle Sham. Em relação ao 14º dia de análise, foi observado um aumento na deposição de colágeno mais pronunciado no leito da ferida em todos os grupos experimentais em relação ao dia 9, os grupos Sham ($59,15 \pm 0,14$), Veículo ($56,91\% \pm 0,57$) apresentavam resultados semelhantes, enquanto que somente o grupo tratado com HdLP 2,0% ($70,71\% \pm 1,13$) foi capaz de estimular significativamente a colagênese ($p < 0,05$) em comparação ao Regederm® ($63,38\% \pm 1,08$) e os demais grupos experimentais.

Figura 17 – Efeito do tratamento tópico com HdLP 2,0% sobre a deposição de colágeno



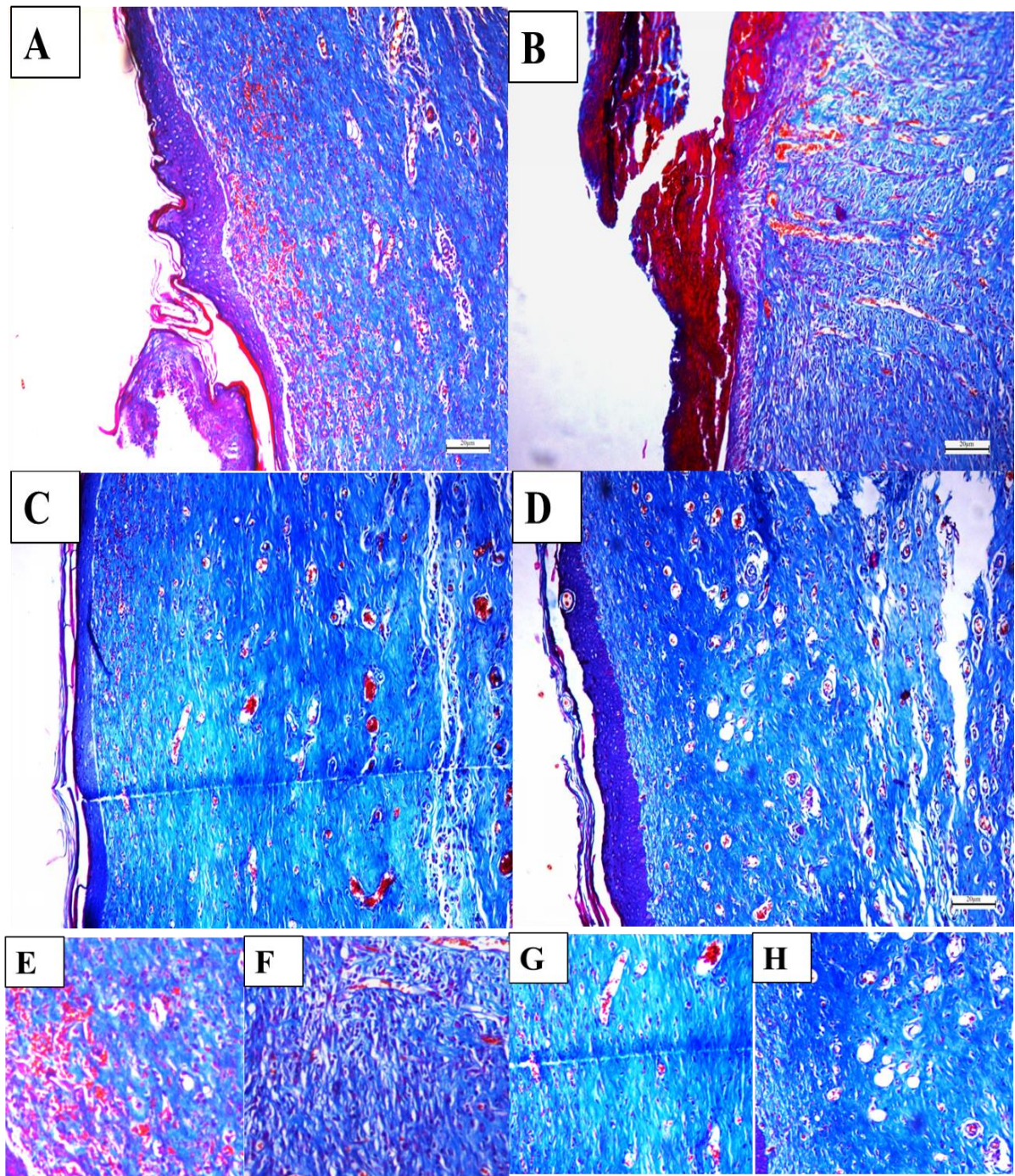
Os animais foram submetidos à cirurgia para a indução da ferida e distribuídos entre os grupos experimentais: Sham, Regederm®, Veículo e HdLP 2,0%. As feridas excisionais foram coletadas no 9º e 14º dia após a cirurgia para a confecção de lâminas histológicas, posteriormente coradas pelo método de Tricrômio de Masson. A quantificação do colágeno foi realizada, em 24 imagens (372x272 pixels) de cada ferida, através do Plugin “Colour deconvolution” do *softwareImageJ*®. Os resultados foram expressos como a média ± EPM da porcentagem do número total de pixels. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham, # $p < 0,05$ ao grupo Veículo e + $p < 0,05$ ao grupo Regederm® (n=5 animais/grupo; ANOVA seguido de Bonferroni).

Figura 18– Representação histológica da deposição de colágeno no 9º dia



Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas por Tricrômio de Masson que a deposição de colágeno no leito das feridas no 9º dia após a cirurgia (aumento de 100x) e aproximação das imagens para melhor visualização da fibras colágenas no tecido. Sham (A; E); Regederm®(B; F); Veículo (C; G) e HdLP 2,0% (D; H).

Figura19– Representação histológica da deposição de colágeno no 14º dia



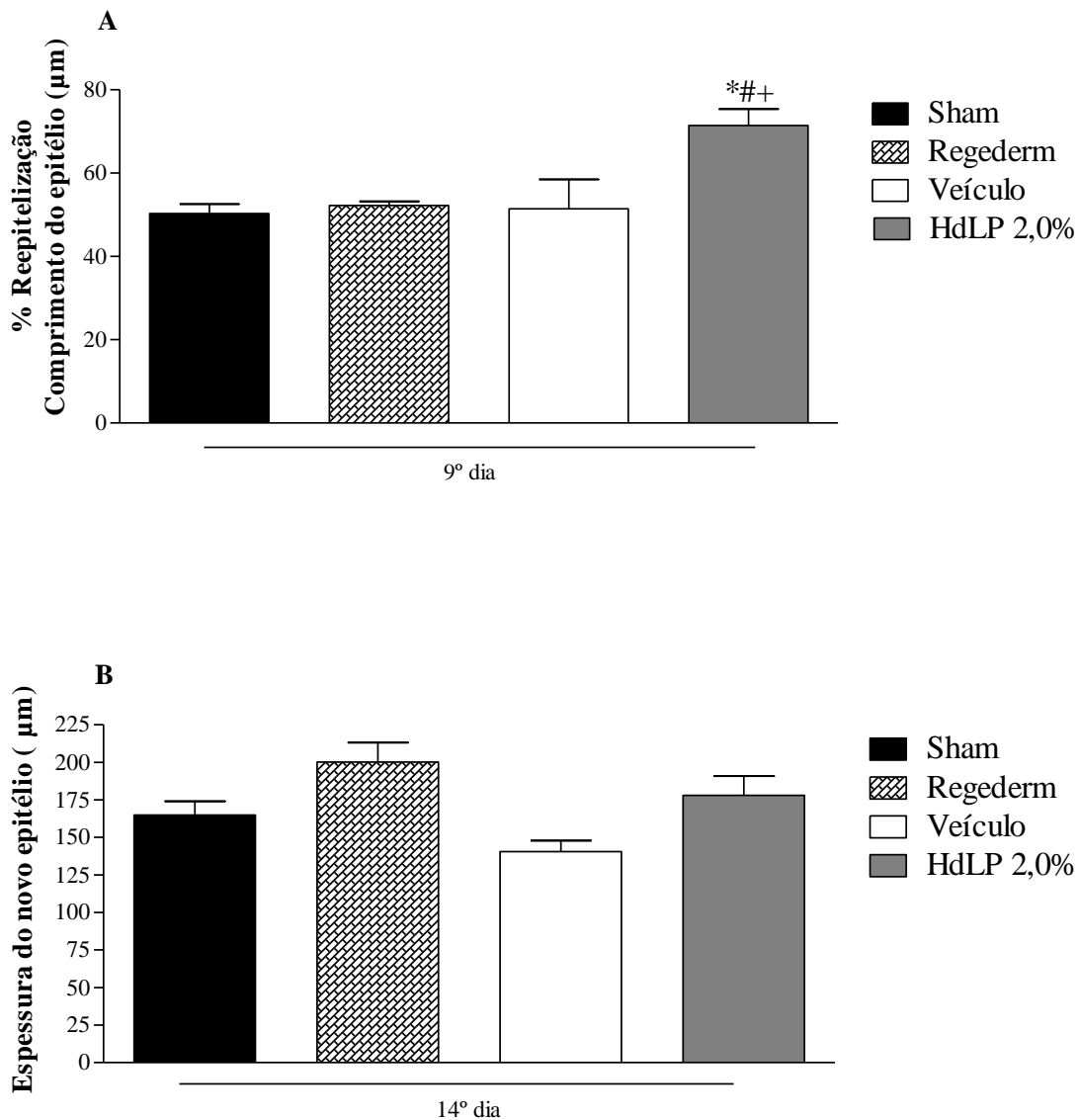
Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas por Tricrômio de Masson que a deposição de colágeno no leito das feridas no 14º dia após a cirurgia (aumento de 100x) e aproximação das imagens para melhor visualização das fibras colágenas no tecido. Sham (A; E); Regederm®(B; F); Veículo (C; G) e HdLP 2,0% (D; H).

5.3.5 O tratamento tópico com HdLP 2,0% estimulou o processo de reepitelização em feridas excisionais

O processo de reepitelização também foi mensurado microscopicamente de acordo com o comprimento (Figura 20A) do novo epitélio formado a partir das bordas da lesão (tecido cicatricial) no 9º dia, e a espessura (Figura 20B) do novo epitélio formado no 14º dia. Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas por H&E foram capturadas para representar esta etapa da cicatrização em todos os grupos experimentais (Figura 22 e 23).

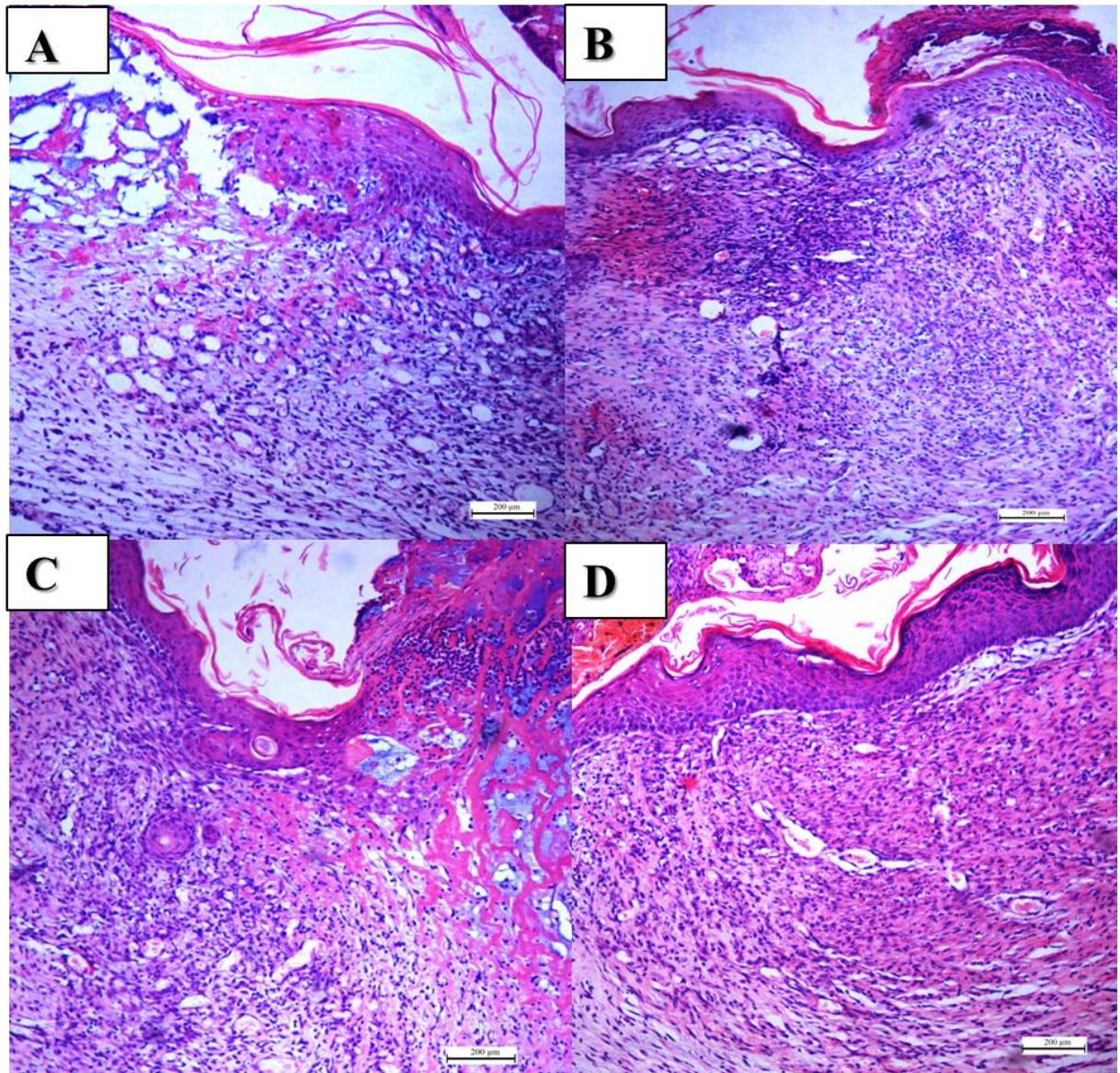
No 9º dia após a cirurgia, é possível observar que o tratamento com HdLP 2,0% ($71,42\% \pm 3,96$) acelerou a reepitelização em relação ao comprimento total da área lesionada, demonstrando diferença significativa ($p < 0,05$) entre os demais grupos experimentais, Sham ($50,33\% \pm 2,24$), Regederm®® ($52,25\% \pm 0,95$) e Veículo ($51,46\% \pm 7,05$). Em relação à espessura do novo epitélio não foi encontrada nenhuma diferença estatística entre os grupos experimentais.

Figura 20– Influência do tratamento tópico com HdLP 2,0% sobre a reepitelização de feridas excisionais



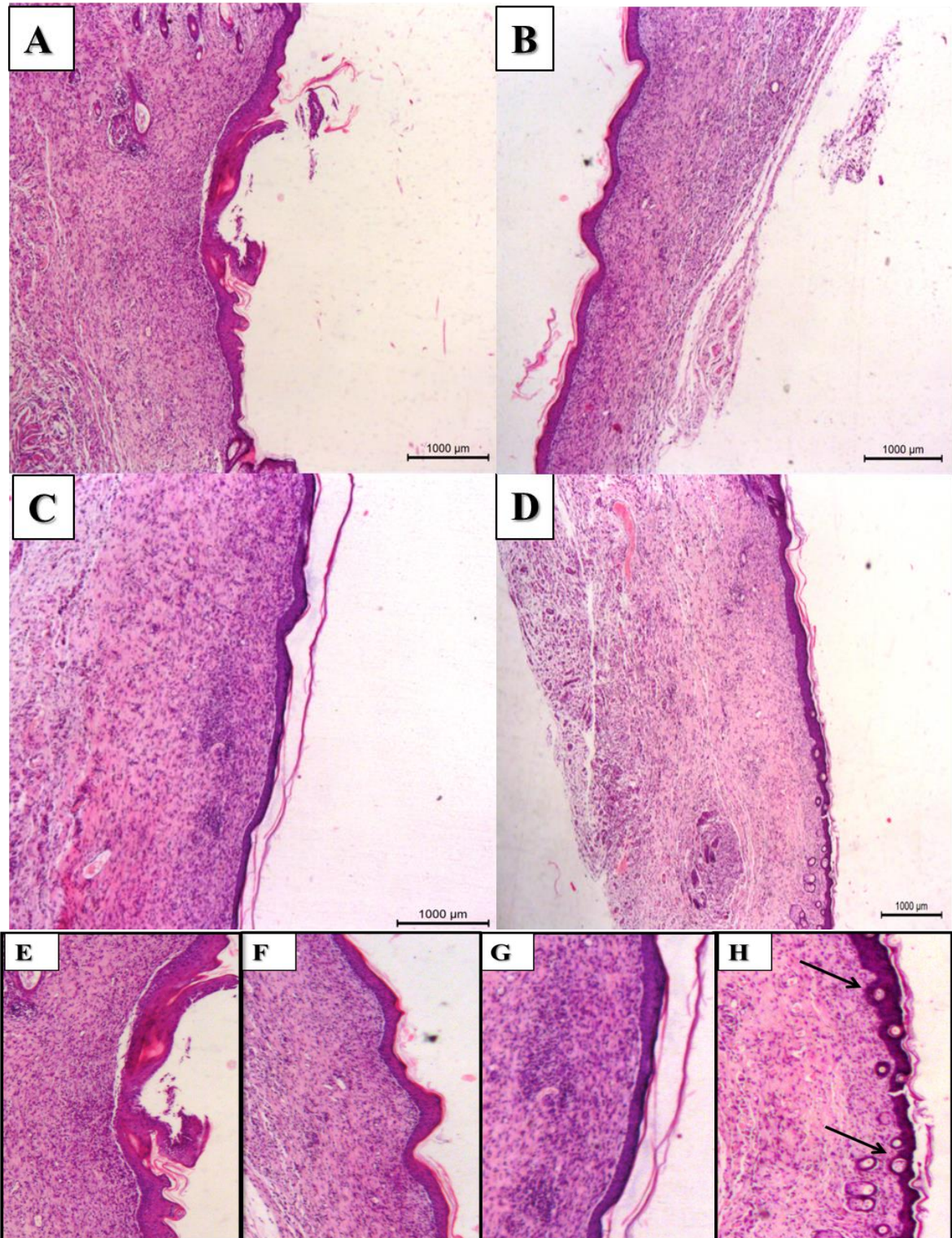
Os animais foram submetidos à cirurgia para a indução da ferida e distribuídos entre os grupos experimentais: Sham, Regederm®, Veículo e HdLP 2,0%. As feridas excisionais foram coletadas no 9º e 14º dia após a cirurgia para a confecção de lâminas histológicas, posteriormente coradas por H&E. O comprimento e a espessura do novo epitélio foram mensurados com auxílio do *software* ImageJ®, em feridas parcialmente reepitelizadas representando o 9º dia, e em feridas totalmente reepitelizadas representando o 14º dia após a cirurgia, respectivamente. Os resultados foram expressos como média do percentual de reepitelização (A) e da espessura do novo epitélio ± EPM (B). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham, # $p < 0,05$ ao grupo Veículo e + $p < 0,05$ ao grupo Regederm® (n=5 animais/grupo; ANOVA seguido de Bonferroni).

Figura 21– Representação histológica do processo de reepitelização no 9º dia



Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas por H&E, que representam o início do processo de reepitelização, de todos os grupos experimentais no 9º dia após a cirurgia (aumento de 100x). Sham (A); Regederm®(B); Veículo (C) e HdLP 2,0% (D).

Figura 22– Representação histológica do processo de reepitelização no 14º dia



Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas por H&E, que representam a espessura do novo epitélio, de todos os grupos experimentais no 14º dia após a cirurgia (aumento de 40x) bem como ampliações das figuras. A seta indica presença de folículos pilosos no grupo HdLP 2,0%. Sham (A; E); Regederm®(B; F); Veículo (C; G) e HdLP 2,0% (D; H).

5.4 Avaliação do efeito do tratamento com HdLP sobre os mediadores inflamatórios em feridas excisionais

5.4.1 O tratamento tópico com HdLP 2,0% reduz a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) durante a fase inflamatória da cicatrização em feridas excisionais

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi mensurada no dia 2, 3 e 4 após a indução da lesão (Figura 23A). No 2º dia, já é possível observar uma redução na atividade de MPO pelo grupo HdLP 2,0% em comparação aos resultados semelhantes do Sham e Veículo mas nenhuma diferença estatística foi constatada neste período. No entanto, foi evidenciada uma redução significativa ($p < 0,05$) na atividade de MPO por HdLP 2,0% ($67,93 \pm 9,13$) no 3º dia em comparação ao grupo Sham ($166,3 \pm 28,54$) e Veículo ($197,2 \pm 29,89$).

Já no 4º dia de análise, a atividade da enzima foi reduzida não só pelo tratamento com HdLP 2,0% ($57,53 \pm 12,93$) mas também pelo Veículo ($106,60 \pm 6,85$), demonstrando uma diferença significativa ($p < 0,001$) dos dois grupos em comparação ao grupo Sham ($203,90 \pm 26,89$).

5.4.2 O tratamento tópico com HdLP 2,0% reduz os níveis de óxido nítrico (NO) na fase inflamatória mas estimula sua produção durante a fase proliferativa de feridas excisionais

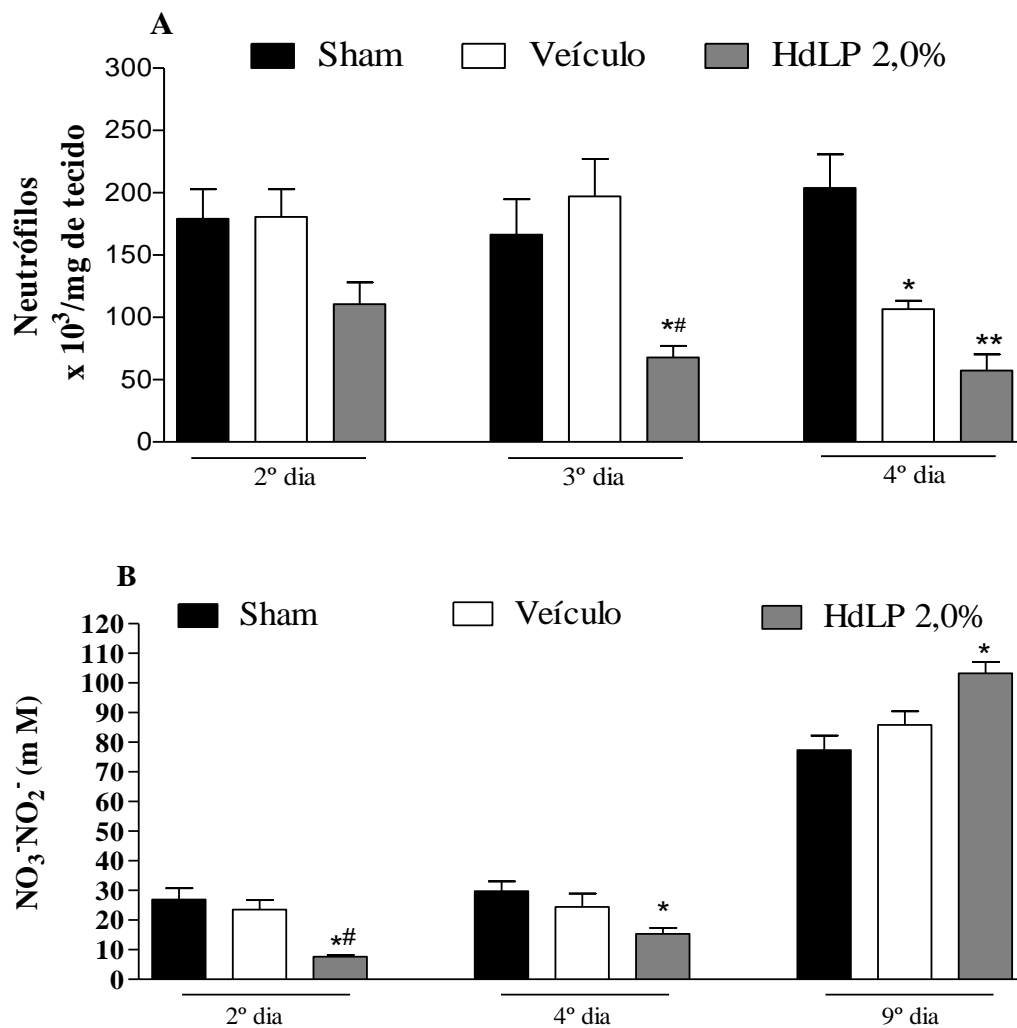
Os níveis de óxido nítrico (NO) foram determinados indiretamente pela medida de nitrito nas amostras teciduais de feridas excisionais. Para se ter uma melhor compreensão sobre o efeito do tratamento das lesões com as proteínas HdLP 2,0% as feridas foram coletadas no dia 2 e 4, que corresponde a fase inflamatória, e no 9 dia, que corresponde a fase proliferativa da cicatrização (Figura 23B).

Nenhuma diferença entre o grupo Sham ($26,33 \pm 3,01$) e Veículo ($20,00 \pm 3,26$) foi observada nos níveis de NO correspondentes ao 2º dia, enquanto que o tratamento com HdLP 2,0% apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) em comparação aos grupos Sham e Veículo. Da mesma forma, no 4º dia o grupo HdLP 2,0% ($17,31 \pm 2,39$) atenuou significativamente os níveis de NO, sendo observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) somente quando comparado ao grupo Sham ($29,25 \pm 2,59$). Em relação ao 9º dia, os níveis de NO detectados foram maiores nos três grupos experimentais em comparação aos apresentados no 4º dia, não foi possível observar nenhuma diferença estatística entre os grupos controles Sham ($77,31 \pm 4,9$) e Veículo ($85,87 \pm 4,57$), no entanto, as feridas cutâneas tratadas com

HdLP 2,0% ($103,38 \pm 3,75$) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de NO em relação ao grupo Sham.

Esses resultados indicam que o tratamento com HdLP 2,0% em feridas excisionais foi capaz de modular os níveis de NO, reduzindo-os durante a fase inflamatória (2° e 4° dias) e estimulando a sua produção na fase proliferativa (9° dia).

Figura 23 – Efeito do tratamento tópico com HdLP 2,0% sobre a atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e os níveis de óxido nítrico (NO)



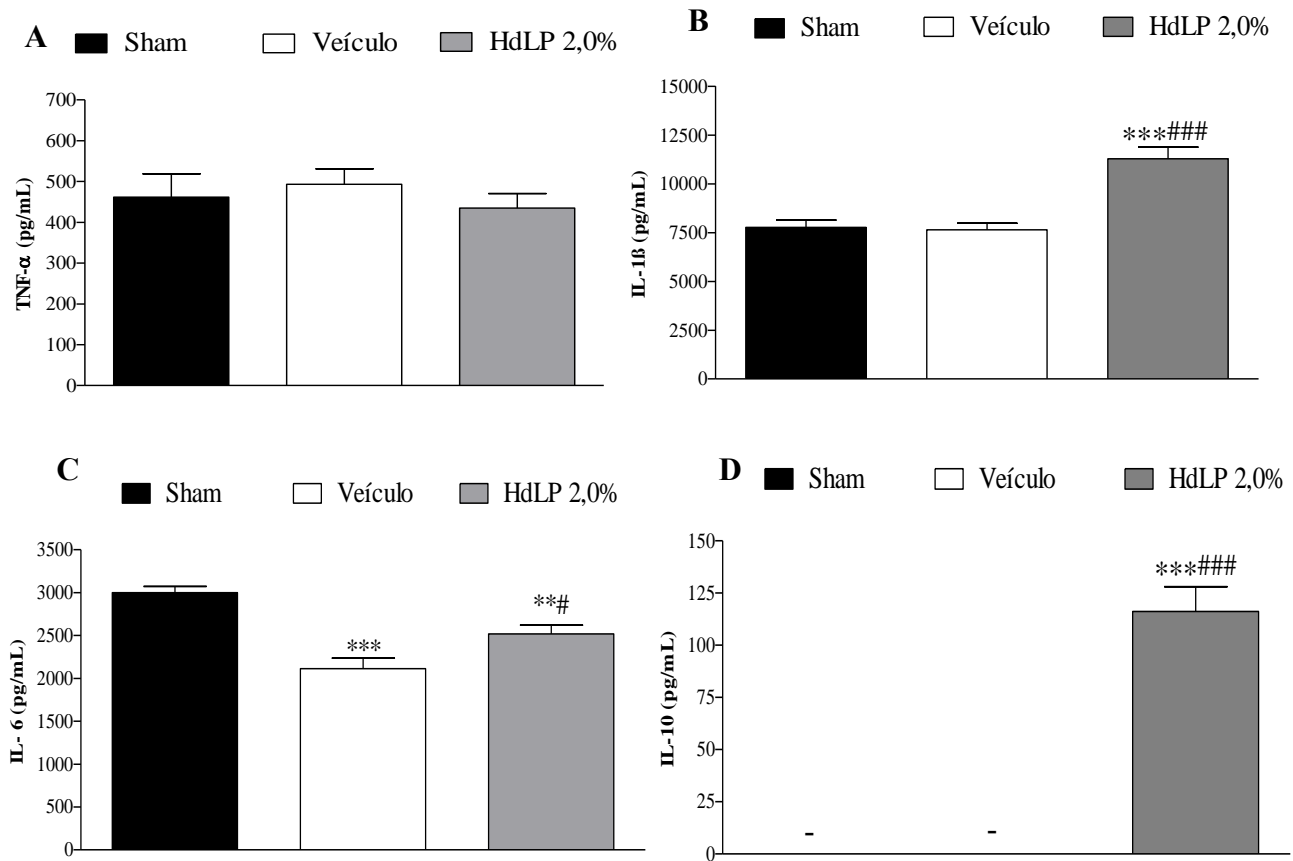
Os animais foram submetidos à cirurgia para a indução da ferida e distribuídos entre os grupos experimentais. O tratamento tópico foi realizado com Veículo e formulação contendo HdLP 2,0%. Os animais pertencentes ao grupo Sham foram sujeitos ao procedimento cirúrgico, mas não foram receberam nenhum tratamento. (A) A coleta das feridas excisionais foi feita nos dias 2,3 e 4 após a indução da lesão e a atividade da enzima MPO foi determinada como indicador indireto da atividade de neutrófilos no leito da ferida. (B) Nos dias 2, 4 e 9 os tecidos foram coletados para a determinação dos níveis de nitrito pela reação de Griess. Os resultados de MPO e NO foram expressos como a média \pm EPM, respectivamente, do número de neutrófilos $\times 10^3/\text{mg}$ de tecido e da concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (μM). $*p < 0,05$ e $**p < 0,001$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e $\#p < 0,05$ ao grupo Veículo ($n=5$ animais/grupo; ANOVA seguido de Bonferroni).

5.4.3 O tratamento tópico com HdLP 2,0% modula a liberação de citocinas

As amostras coletadas das feridas excisionais, que correspondiam ao 2º dia após a indução da lesão, não demonstraram diferença nos níveis de TNF- α entre os grupos experimentais: Sham ($461,8 \pm 57,38$), Veículo ($493,3 \pm 37,59$) e HdLP 2,0% ($434,70 \pm 35,98$) (Figura 24A).

Em relação aos níveis de IL-1 β , o grupo tratado com HdLP 2,0% ($11280 \pm 593,1$) apresentou um aumento significativo ($p < 0,001$) nos seus níveis em comparação aos grupos controles (Figura 24B). Quanto a IL-6, foi possível observar que as feridas do grupo Sham ($3000 \pm 73,39$) apresentavam níveis significativamente mais elevados comparados aos dos grupos Veículo ($2113 \pm 122,80$) e HdLP 2,0% ($2519 \pm 102,5$), sendo evidenciada uma diferença estatística ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 24C). A determinação dos níveis de IL-10 em amostras de feridas dos grupos Sham e Veículo demonstraram níveis indetectáveis, enquanto que o grupo tratado com HdLP 2,0% ($116,2 \pm 11,85$) foi capaz de estimular a sua produção de forma significativa ($p < 0,001$) em relação aos demais grupos controle (Figura 24D).

Figura 24 – Efeito do tratamento tópico com HdLP 2,0% sobre os níveis das citocinas: TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10



Os animais foram submetidos à cirurgia para a indução da ferida e distribuídos entre os grupos experimentais. O tratamento tópico foi realizado com Veículo e formulação contendo HdLP 2,0%. Os animais pertencentes ao grupo Sham foram sujeitos ao procedimento cirúrgico, mas não foram receberam nenhum tratamento. As feridas excisionais foram coletadas no 2º dia após a cirurgia e os níveis de TNF- α (A), IL-1(B), IL-6(C) e IL-10 (D) foram determinados. Os homogenatos de tecidos foram obtidos e a dosagem de citocinas foi feita por ELISA. Os resultados foram expressos em picograma de citocina/mL do sobrenadante/mg de tecido. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham, # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ ao grupo Veículo (n=5; ANOVA; seguido de Bonferroni).

6. Discussão

Grande esforço tem sido aplicado no estudo do processo de reparo tecidual, bem como os caminhos que levam a desordem dos eventos que dificultam a conclusão da cicatrização de feridas cutâneas. Através de uma melhor compreensão sobre este processo é possível desenvolver terapias inovadoras que revolucionem o reparo de feridas (WONG; GURTNER; LONGAKE, 2013). Portanto, há um grande interesse na descoberta de substâncias com propriedades cicatrizantes que favoreçam um menor tempo de reparo, maior eficácia, baixo custo e fácil acessibilidade, permitindo assim o desenvolvimento de melhores estratégias no manejo terapêutico de feridas cutâneas.

Apesar dos enormes avanços no desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica, a capacidade de estimular a reparação de feridas ainda é limitada. Assim sendo, muitos estudos tem sido realizados com a finalidade de discriminar melhor agentes cicatrizantes, que correspondam ao ritmo dos problemas encontrados na cicatrização de feridas, tarefa que parece ser desafiadora para o meio científico (KUMAR *et al.*, 2007; KOKANE *et al.*, 2009).

As plantas medicinais sempre foram bastante adotadas para o tratamento de doenças de pele, distúrbios dermatológicos e especialmente cortes, feridas e queimaduras (KOKANE *et al.*, 2009). Esse imenso potencial para o tratamento de feridas está associado a composição rica em substâncias bioativas, que restauram a função e estrutura dos tecidos lesionados, sendo a maioria deles produtos do metabolismo secundário da planta presentes nos óleos essenciais e no látex de plantas laticíferas (THAKUR *et al.*, 2011; YARISWAMY *et al.*, 2013).

A *Himatanthus drasticus* produz um látex conhecido por “leite de janaguba”, rico em triterpenos, como o lupeol, betulina, ácido betulínico e calenduladiol, utilizado pela medicina popular para o tratamento de úlceras e outras afecções, como gastrite, hemorróidas, inflamações, parasitoses e alguns tipos de câncer, sendo algumas dessas indicações reconhecidas por ensaios preliminares farmacológicos apoiando o uso como analgésico, anti-inflamatório, anti-tumoral e imunoestimulante (COLARES *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2010; LUCETTI *et al.*, 2010; MOUSINHO *et al.*, 2011; BALDAUF *et al.*, 2013). Os estudos farmacológicos que atestem as atividades biológicas de compostos da *H. drasticus* ainda são escassos, sendo ainda mais restritas as pesquisas que investigam o potencial biotecnológico do látex dessa planta. Além disso, ainda não existem publicações que evidenciem sua atividade cicatrizante bastante relatada pelo uso popular do látex da janaguba.

No nosso estudo, uma formulação foi desenvolvida para proporcionar o tratamento tópico das proteínas isoladas do látex de *H. drasticus* (HdLP) em feridas cutâneas experimentais, para isso foi levado em conta as características das substâncias utilizadas bem como o modelo de lesão aberta (feridas excisionais), dessa forma uma pomada A/O foi elaborada. O veículo utilizado na pomada foi o gel de petrolato polietileno, um veículo inerte e bastante utilizado em formulações de uso tópico, principalmente pomadas, permitindo dessa forma um efeito oclusivo nas lesões e uma melhor absorção das proteínas HdLP. Antes da utilização em modelo de cicatrização, foi observado o efeito do tratamento tópico da pomada contendo HdLP bem como do veículo da formulação sobre a pele íntegra e escarificada, e nenhuma reação de irritação cutânea foi observada. Com isso, a atividade cicatrizante da fração proteica HdLP foi observada através da análise macroscópica, histológica e de mediadores inflamatórios de feridas cutâneas experimentais.

O teste de irritabilidade dermal revelou que o veículo da formulação e a pomada de HdLP 2,0% não causaram irritação à pele intacta e nem à pele escarificada, durante o tratamento tópico. O leve aumento de espessura na pele intacta que foi observado após uma hora da aplicação dos dois produtos testados, Veículo e HdLP 2,0%, se deve a própria umidificação da pele durante a absorção das pomadas. Enquanto que a espessura da pele escarificada foi discretamente menor que o grupo Sham, demonstrando que a irritação do processo de escarificação pode ter sido reduzida pela aplicação tópica dos dois produtos testados. A irritação cutânea provocada em resposta ao tratamento tópico de uma formulação pode atrasar ou prejudicar o progresso da cicatrização na ferida, portanto, o teste de irritabilidade dermal é importante para avaliar possíveis efeitos adversos que podem ocorrer após uma única aplicação do produto, ou após um período de tempo mais prolongado de utilização do produto (OECD, 1987; JIA *et al.*, 2008).

O óleo essencial de *Lippia sidoides* em diferentes concentrações foi capaz de induzir uma resposta inflamatória em pele escarificada, mas não atrapalhou o processo de cicatrização de feridas cutâneas, demonstrando que altas concentrações de óleo essencial podem irritar a pele, aumentar o edema e promover o eritema, sendo o óleo puro inapropriado para o uso tópico (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Outro estudo analisou o uso tópico de pomadas contendo o látex de *Euphorbia caducifolia* (ECL) a 0,25%, 0,50%, 1,0% e 2,0% observou que somente a concentração de 2,0% e o látex bruto favoreceu irritação dérmica nos animais (GOYAL; NAGORI; SASMAL, 2012).

Matos e colaboradores (2013) demonstraram que 94,4% do látex bruto de *H. drasticus* é composto pela fração da borracha, enquanto que 3,1% apresentam proteínas solúveis em

água. Sabe-se que reações de hipersensibilidade podem ocorrer após a exposição à alérgenos provenientes do látex bruto de plantas laticíferas (RAMOS *et al.*, 2007). Com base nisso, a fração rica em proteínas (HdLP) utilizada no nosso estudo foi obtida através de um processo de centrifugações que eliminou os metabólitos secundários do látex de alta massa molecular, ou seja, a parte da borracha, provenientes do látex bruto da *H. drasticus*. Dessa forma, acreditamos que a ausência de irritação dermal observada, após o tratamento tópico da pomada contendo HdLP nos animais, ocorreu devido a ausência de alérgenos provenientes da fração da borracha do látex.

Após o teste de irritabilidade dermal, estudos biológicos foram realizados para avaliar o efeito do tratamento tópico da pomada contendo HdLP em concentrações diferentes (0,5%, 1,0% e 2,0%) sobre a cicatrização de feridas cutâneas excisionais em camundongos. A cicatrização de feridas pode ocorrer de duas formas: por primeira intenção, que é quando a aproximação das margens da ferida ocorre com auxílio de algum método, como a sutura, por exemplo, enquanto que por segunda intenção, as bordas da ferida estão afastadas e o reparo se dá através do crescimento interno do tecido de granulação e pelo processo de reepitelização (NAWAZ; BENTLEY, 2010; GUTWEIN *et al.*, 2012). O modelo de indução cirúrgica de feridas excisionais (ou abertas) foi escolhido por possibilitar o estudo dos mecanismos envolvidos na cicatrização que ocorre pelas margens da ferida, permitindo a avaliação da reepitelização, fibroplasia, angiogênese e da cicatriz formada. Além disso, o tratamento medicamentoso é realizado topicamente, minimizando efeitos sistêmicos e facilitando a análise farmacológica (GALIANO *et al.*, 2004).

A intensidade da inflamação é representada pelos seus sinais flogísticos de: hiperemia ou rubor, edema, calor, dor e perda da função do tecido lesionado. A vasodilatação, mediada pelas prostaglandinas, é responsável pelo rubor local, já o edema ocorre devido ao aumento na permeabilidade vascular, que permite o extravasamento de líquido para o espaço intersticial (WILD *et al.*, 2010; MACHADO, 2011). O tratamento com as diferentes concentrações de HdLP 0,5%, 1,0% e 2,0% induziu um edema e hiperemia de forma leve a moderada, resultado semelhante aos dos grupos controles, tanto no 2º quanto no 4º dia após a indução da lesão, assim podemos presumir que a fração protéica não induz processo inflamatório em lesões excisionais.

As feridas excisionais apresentam maior risco de infecção por propiciar uma porta de entrada, especialmente por bactérias. Se o tecido infeccionar, a ferida demora mais tempo para cicatrizar e um forte exsudato é formado em consequência da infecção (SCHMIDT *et al.*, 2009). No entanto, não houve presença de infecção nas feridas avaliadas, já que não

apresentaram sinais sugestivos, como presença de pus ou odor fétido, nem retardo no processo cicatricial.

O tratamento tópico com HdLP 2,0% promoveu um menor infiltrado de polimorfonucleares e estimulou um maior infiltrado de mononucleares. A intensa migração de neutrófilos para o local lesionado é o primeiro evento celular da reação inflamatória, sendo as primeiras a alcançar o sítio, impulsionadas pelo gradiente quimiotático que reconhecem e fagocitam bactérias e tecidos lesionados. A eliminação de patógenos presentes no tecido ocorre pela liberação de enzimas hidrolíticas e proteínas bactericidas armazenadas previamente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos, tais como mieloperoxidase (MPO), espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio, algo que estimula a produção de citocinas como IL-1 β e óxido nítrico (NO) (ANDRADE *et al.*, 2011; BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006). Após o 2º dia, o número de neutrófilos cai enquanto que os monócitos circulantes vão alcançando o sítio inflamatório, transformando-se em macrófagos, células teciduais ativas, que ocupam um papel central no reparo tecidual devido a sua capacidade de produzir diversos fatores de crescimento e citocinas (GILLITZER; GOEBELER, 2001).

A migração de neutrófilos foi avaliada indiretamente pela atividade de MPO, no qual o tratamento com HdLP 2,0%, reduz a atividade de MPO também evidenciada no 2º dia, sendo mais pronunciada ainda no 3º dia, sugerindo que a migração dos neutrófilos declina durante este período, sendo este encerramento mais precoce que os demais grupos experimentais. A resposta inflamatória inicial do tecido à injúria é um mecanismo de defesa que fornece resistência às possíveis contaminações microbianas. Mas um longo processo inflamatório pode atrasar a cicatrização, sendo assim, um composto com atividade anti-inflamatória se torna interessante como alternativa terapêutica para encurtar o período de reparo (SÜNTAR *et al.*, 2011). Muitos esforços têm sido aplicados no desenvolvimento de terapias que reduzam a inflamação com foco nos mediadores primários da inflamação (WIDGEROW, 2012). Alguns estudos relatam que a atividade anti-inflamatória contribuiu para uma maior rapidez no reparo de feridas cutâneas: extrato metanólico de *Ranunculus pedatus* e *Ranunculus constantinopolitanus* (AKKOL *et al.*, 2012), extratos de *Centaurea ibérica* (KOCA *et al.*, 2009), óleo fixo de *Caryocar coriaceum* (OLIVEIRA *et al.*, 2010), suco de caju (*Anacardium occidentale*) (VASCONCELOS, 2011) e extratos de *Michauxia L'Hérit*, uma espécie nativa da Turquia (GÜVENÇ *et al.*, 2012).

Durante a resposta inflamatória tardia, o macrófago ativado é essencial para a transição da fase inflamatória para a proliferativa, atuando na angiogênese, fibroplasia e

síntese de óxido nítrico (NO), além de numerosas enzimas secretadas pelos macrófagos, incluindo as colagenases. Os seus principais produtos são as citocinas pró-inflamatórias: TNF- α , IL-1 e IL-6, que neutralizam agentes invasivos e limitam o dano tecidual, além de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, TGF- β e inibidores de metaloproteinases, que combatem o recrutamento e ativação de células inflamatórias, reduzem a formação de radicais livres de oxigênio (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006; BANGERT; BRUNNER; STINGL, 2011; WIDGEROW, 2012). Nossos resultados indicam que o tratamento com HdLP 2,0% influencia na produção de citocinas, reduzindo os níveis de IL-6, aumentando os de IL-1 β e estimulando a produção de IL-10. Na cicatrização, células epiteliais e macrófagos são fontes de IL-1 β , desempenhando um papel importante na transição entre a inflamação e o reparo da ferida, pois além de estimular o recrutamento de neutrófilos, sua outra função é estimular proliferação de células epiteliais e fibroblastos, bem como aumentar a expressão de fator de crescimento de queratinócitos (KGF), que intensifica a proliferação de queratinócitos (WERNER; KRIEG; SMOLA, 2007; ISHIDA; MUKAIND; KONDO, 2008; ERMERTCAN *et al.*, 2008). Em relação às etapas mais tardias da cicatrização, a IL-1 β também age através da regulação da colagênese (VELNAR; BAILEY; SMRKOL, 2009). Já a IL-10 inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em macrófagos ativados e neutrófilos, reduzindo a migração de leucócitos para o local, inibindo síntese de várias quimiocinas, como a proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1) e proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1a) (SATO; OHSHIMA; KONDO, 1999; PERANTEAU *et al.*, 2008). Dessa forma, sugerimos que HdLP 2,0% promove um equilíbrio na resposta inflamatória tecidual, modulando o recrutamento de leucócitos, principalmente os neutrófilos, mas não alterando a liberação de IL-1 β e IL-10 pelas células inflamatórias. Figueiredo (2011) demonstrou que uma biomembrana contendo proteínas isoladas do látex de *Calotropis procera* foi capaz de induzir a produção de IL-1 β e TNF- α em feridas cutâneas, o que contribuiu para o efeito cicatrizante final observado.

Uma perspectiva importante para o reparo é a modulação do óxido nítrico (NO) produzido durante a fase inflamatória e proliferativa, pois este é capaz de regular a formação de colágeno, a proliferação celular e a contração da ferida. Acredita-se que a síntese de NO é mais intensa nas fases iniciais da inflamação, porém, durante a fase proliferativa ainda ocorre a sua produção principalmente pelos fibroblastos (CORSETTI *et al.*, 2010). No nosso estudo, o tratamento com as proteínas HdLP 2,0% foi capaz de reduzir os níveis de NO nas feridas excisionais no 2º dia após a cirurgia. Na fase inflamatória, altos níveis de NO podem interagir com radicais livres derivados do oxigênio (ROS) produzidos por neutrófilos e macrófagos,

resultando numa outra espécie oxidativa, o peroxinitrito, uma molécula que induz apoptose celular e necrose dependendo da sua concentração no local da ferida (SONEJA; DREWS; MALINSKI, 2005). Dessa forma, HdLP 2,0% foi eficiente em modular os efeitos pró-inflamatórios consequentes à produção de NO. Além disso, durante a fase proliferativa (9º dia) o aumento nos níveis de NO induzido por HdLP 2,0% pode ter contribuído no processo de reepitelização e na produção de colágeno, de extrema relevância na cicatrização de feridas excisionais. Em concordância com o nosso resultado, um trabalho que testou uma aplicação tópica de nanopartículas liberadores de NO foi capaz de estimular o recrutamento de fibroblastos, a síntese de colágeno, e como consequência, antecipou o reparo das feridas experimentais (HANG *et al.*, 2012).

Em pacientes diabéticos com feridas crônicas, há uma redução na produção de vários fatores de crescimento, algo que está relacionado aos baixos níveis de NO na fase proliferativa. Com base nisso, Herculano e colaboradores (2011) desenvolveram uma matriz de látex natural da borracha capaz de liberar NO com relevante aplicação como biomaterial no tratamento de feridas crônicas.

Outro tipo celular importante na cicatrização são os mastócitos, que se acumulam nas bordas da ferida e controlam os principais eventos da cicatrização: modulando a inflamação, a proliferação de elementos celulares e a remodelação da matriz recém-formada durante o fenômeno de reparo (OEHMICHEN *et al.*, 2009). Respondem a diferentes estímulos, responsáveis pela ativação de seus receptores de superfície de imunoglobulina E (IgE) e consequente liberação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo a histamina, fatores de crescimento, proteases e citocinas armazenados em seus grânulos (IBA *et al.*, 2004; AZEVEDO *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 2013). Neste modelo experimental, HdLP 2,0% não interferiu na degranulação de mastócitos em nenhum período avaliado, demonstrando que apesar da sua atividade anti-inflamatória, a liberação dos mediadores pré-formados pelos mastócitos não foi alterada pelo tratamento com HdLP, favorecendo assim uma modulação da resposta inflamatória e permitindo a sua ação nas fases proliferativa e de remodelação tecidual, importantes para a resolução da cicatrização. Entre os fatores de crescimento e citocinas liberados pelos mastócitos estão: TNF- α , IL-4, FGF, VEGF e EGF, capazes de estimular a proliferação de fibroblastos, células epiteliais, endoteliais e a produção de colágeno, além das serina proteases que auxiliam no processo de remodelação da matriz extracelular (OEHMICHEN *et al.*, 2009). Um estudo recente realizou o bloqueio da degranulação de mastócitos, promovido pelo cromoglicato disódico durante o reparo de feridas, e demonstrou que a formação da cicatriz foi reduzida sem prejudicar a resistência da

ferida à ruptura, e a resposta inflamatória também foi observada através deste mecanismo, evidenciando que intensidade da inflamação pode afetar as fases subsequentes da cicatrização de feridas (CHEN *et al.*, 2014).

Quando a pele sofre algum tipo de injúria o processo de cicatrização para restaurar a integridade do tecido é essencial para a reconstrução da barreira entre o ambiente interno e externo, sendo ideal que o processo ocorra o mais rápido possível e com o mínimo de dor (SÜNTAR *et al.*, 2010b; SABOL *et al.*, 2012). O tratamento com HdLP 2,0% estimulou a redução da área das feridas a partir do 7º dia, sendo mais evidente no 9º e no 12º dia, indicando que mesmo as proteínas HdLP atenuando o processo inflamatório, as fases subsequentes da cicatrização não sofreram delongas, dessa forma, a contração das feridas foi favorecida ao final do processo. Da mesma forma, Akkol e colaboradores (2012) demonstraram que a atividade anti-inflamatória dos extratos metanólicos de *Ranunculus pedatus* e *Ranunculus constantinopolitanus* contribuíram para a aceleração do reparo das feridas experimentais.

Durante o processo cicatricial ocorre a liberação de citocinas e fatores de crescimento que atraem fibroblastos para a ferida, esse é o primeiro evento da fase proliferativa. Os fibroblastos começam a migrar após 3 ou 4 dias, onde começam a sintetizar uma nova matriz rica em colágeno, que constitui o tecido cicatricial. Assim, o objetivo deste novo tecido é, aos poucos, substituir o tecido de granulação formado durante a inflamação por um tecido conjuntivo mais forte e elástico, e posteriormente a formação da cicatriz (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; MONTES *et al.*, 2009). Em associação com os fibroblastos, os queratinócitos que estão em intensa migração e proliferação com sentido para o centro da ferida, começam a se diferenciar para recompor a barreira epidérmica, ilustrando na superfície da lesão a presença de um tecido mais delicado (LI; CHEN, 2007; KONDO; ISHIDA, 2010; SANCHIS *et al.*, 2012). Dessa forma, o tecido cicatricial vai separando o tecido de granulação da camada superior da lesão (SCHMIDT *et al.*, 2009). No nosso modelo experimental, foi observado macroscopicamente que no 9º dia o grupo HdLP 2,0% foi capaz de antecipar o surgimento do tecido cicatricial.

A reepitelização é uma fase crítica da cicatrização, pois além de retomar a barreira cutânea contra infecções, auxilia no reparo final. Os queratinócitos respondem a injúria tecidual iniciando a proliferação e migração das bordas ao centro da lesão, durante o processo inflamatório diversos fatores de crescimento são liberados por macrófagos e fibroblastos, ativando essas células nas margens da ferida, principalmente o KGF. Além disso, a deficiência de KGF em feridas cutâneas é capaz de retardar a angiogênese por um mecanismo

depende de VEGF (SANTORO; GAUDINO, 2005; PENG; HE; LUO, 2011; NISHIYAMA, T. *et al.*, 2011). A completa reepitelização das feridas foi estimada em porcentagem e HdLP 2,0% induziu a reepitelização de algumas feridas já no 10º dia após a cirurgia, sendo esse efeito mais pronunciado ainda no 12º dia, quando os outros grupos tratados HdLP 0,5% e 1,0% também apresentaram maior percentual de feridas reepitelizadas em relação aos grupos controles. Após a análise macroscópica, a concentração de HdLP 2,0% foi escolhida para a análise histológica. Nossos resultados demonstraram que o comprimento da camada reepitelizada no 9º dia foi maior no grupo HdLP 2,0% em relação aos demais grupos, enquanto que não foi encontrada nenhuma diferença na espessura do epitélio no 14º dia. Estudos em animais sugerem que a molécula de NO desempenha um papel importante na regulação da atividade dos queratinócitos. Foi demonstrado que em baixas concentrações *in vitro*, NO induz a proliferação celular, já em altas concentrações há um aumento na diferenciação celular (STRODTBECK, 2001). Outro trabalho, desta vez *in vivo*, realizou um tratamento com um inibidor seletivo (L-NIL) da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) durante o processo de reparo tecidual, resultando num atraso e comprometimento da reepitelização das feridas, causado pela redução do número de queratinócitos no leito da ferida, demonstrando que NO exerce uma tarefa fundamental na regulação da reepitelização. Acredita-se que o mecanismo de NO seja semelhante ao de KGF, onde ambos estimulam a proliferação de queratinócitos (STALLMEYER *et al.*, 1999).

Além de recomporem a barreira física da pele com o meio externo, os queratinócitos são importantes na regulação da atividade dos fibroblastos, pois secretam fatores de crescimento e enzimas que atuam no remodelamento tecidual (WONG; GURTNER; LONGAKE, 2013). O tratamento com HdLP 2,0% foi capaz de induzir uma maior proliferação de fibroblastos no 7º e 9º dias, o que provavelmente contribuiu para a maior deposição de colágeno observada no 9º e 14º dias. Os fibroblastos que foram atraídos para o local da ferida diferenciam-se em miofibroblastos, um tipo celular importante para o tecido de granulação devido a sua capacidade de sintetizar o colágeno que irá recompor o tecido lesionado, estes auxiliam a contração do tecido facilitando a redução da área da ferida. Acredita-se que este mecanismo seja via estimulação de TGF- β , que também auxilia na conversão do colágeno durante a remodelação do tecido (MURAWALA; TANAKA; CURRIE, 2012; WANG; ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2013). Os miofibroblastos do tecido conjuntivo são morfologicamente diferenciados dos fibroblastos pela presença de microfilamentos de actina contráteis (α -SMA) associados à miosina que forma um complexo de adesão à integrinas especializado. Apesar dos fibroblastos produzirem forças de tração, que

facilitam a contração das feridas, são os miofibroblastos que fornecem a resistência em relação ao tecido circundante (TOMASEK *et al.*, 2002; WROBEL *et al.*, 2002). Um estudo com feridas agudas induzidas por irradiação demonstrou que a administração oral de *Aloe vera* (AV) induziu a estimulação de TGF- β e FGF, que aumentou a proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno e angiogênese. Acredita-se que esse efeito tenha relação com a ativação de macrófagos, que por sua vez ativam a fagocitose, a produção de óxido nítrico e fatores de crescimento contribuindo para a contração da ferida (ATIBA *et al.*, 2011). Além disso, outro estudo revela que as feridas de camundongos knockout para iNOS apresentaram menor deposição de colágeno pelos fibroblastos, sendo este efeito revertido quando um doador de NO foi adicionado às lesões experimentais, indicando que há uma conexão direta entre a liberação de NO e a produção de colágeno (NICHOLS *et al.*, 2012).

Colágeno é o tipo mais predominante de proteínas do organismo, é sintetizado e posteriormente remodelado pelos fibroblastos através do estímulo de alguns fatores, como: PDGF, FGF, TGF- β , IL-1 e TNF (ENOCH; LEAPER, 2005). A matriz extracelular em que os fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos estão alocados é constituída principalmente por colágeno imaturo (tipo III), proteoglicanos, glicosaminoglicanos, fibonectina e ácido hialurônico. Dessa forma, a síntese de colágeno é de extrema importância para o suporte dessa matriz, além de reconstituir o alinhamento e a integridade da pele (SCHREML *et al.*, 2010). A taxa dessa proteína no tecido de granulação aumenta com a progressão da cura, sendo um parâmetro interessante para avaliar a cicatrização (YARISWAMY, *et al.*, 2013). Yariswamy e colaboradores (2013) relataram que o aumento na deposição de colágeno observado pelo tratamento tópico com proteases do látex de *Wrightia tinctoria*, que foi capaz de acelerar a contração das feridas. Da forma semelhante, uma pomada contendo proteases do látex da *Plumeria rubra* acelerou o reparo tecidual, o que foi atribuído à redução do número de células inflamatórias bem como uma maior deposição de colágeno no leito da ferida (CHANDA *et al.*, 2011). Em outro estudo, o tratamento com uma pomada a partir do látex de *Calotropis gigantea* exerceu um importante papel na cicatrização de feridas cutâneas em ratos, através da maior contração de feridas, indução da síntese de colágeno e melhor organização do epitélio formado, esse efeito foi atribuído aos diversos componentes biologicamente ativos presentes no látex (SARATHA; SUBRAMANIAN; SIVAKUMAR, 2010).

De acordo com os estudos relatados acima é possível que a pomada de HdLP 2,0% tenha promovido um ambiente mais propício para a cicatrização de feridas, considerando sua ação anti-inflamatória, regulando a migração e atividade de polimorfonucleares e modulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) e anti-inflamatória (IL-10), o que

possivelmente antecipou a fase proliferativa, contribuindo para a migração e atividade dos fibroblastos, e conseqüentemente maior deposição de colágeno. Dessa forma, a contração das feridas foi mais rápida e a estruturação do novo epitélio ocorreu de forma mais organizada. Hipotetizamos que HdLP pode atuar na ativação de células-chave para a condução da cicatrização, como o macrófago, bem como na liberação de citocinas e mediadores inflamatórios, que fornece um meio mais adequado para que o reparo aconteça de forma rápida e eficiente.

Alguns produtos naturais que possuem propriedades emolientes, adstringentes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes podem melhorar o processo de cicatrização, sendo necessário que um ou mais fases da cicatrização sejam estimuladas para que haja um reforço no processo de cicatrização (SCHMIDT, C. *et al.*, 2009; SÜNTAR *et al.*, 2010a; AKKOL *et al.*, 2012; MOGOŞANU; GRUMEZESCUB, 2014). Além disso, formulações umectantes permitem uma maior retenção da umidade e favorecerem o movimento de queratinócitos, esse mecanismo é apoiado pela informação de que feridas abertas ressecadas demoram mais tempo para cicatrizar do que as feridas ocluídas e úmidas (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; SARNOFF, 2011). Considerando que as substâncias de origem natural são de fácil acesso, baixo custo e mais seguras, muito interesse têm sido aplicado na identificação de constituintes ativos com atividade cicatrizante, além do mecanismo de ação pelo qual essas substâncias atuam. Apesar de várias plantas serem alvo de estudos farmacológicos, muito ainda precisa ser analisado (THAKUR *et al.*, 2011).

O látex de *Himatanthus drasticus* é bastante mencionado na literatura pelo seu uso popular, inclusive no tratamento de úlceras, e sabe-se que diversas moléculas bioativas estão presentes em sua composição (SOUZA *et al.*, 2014). Em vista disso, tivemos um interesse em investigar sua possível atividade cicatrizante sendo amparado pelos estudos que indicavam sua atividade anti-inflamatória. A formulação de pomada escolhida neste estudo auxiliou a ação das proteínas isoladas (HdLP) na contração das feridas cutâneas excisionais, se tornando uma ferramenta interessante para o manejo de úlceras que apresentam dificuldade no processo de cicatrização, no entanto, mais estudos farmacológicos devem ser realizados, considerando as principais condições patológicas envolvidas no atraso da cicatrização, para que se tenha informações mais precisas a respeito do mecanismo de ação dessas proteínas bem como da sua aplicabilidade na prática clínica.

7. Conclusão

A pomada contendo HdLP 2,0% apresentou atividade cicatrizante em feridas cutâneas excisionais em camundongos ao estimular duas fases do processo de reparo tecidual, modulando a inflamação, através da regulação da infiltração de leucócitos, liberação de mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico e IL-1 β e IL-10. Além disso, foi capaz de impulsionar a fibroplasia e colagênese, acelerando a contração das lesões. Esse resultado sugere uma nova aplicabilidade biológica das proteínas de *Himatanthus drasticus* no tratamento de feridas cutâneas, no entanto uma maior investigação deve ser realizada para propor o seu mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. **J Biol Chem**, v. 275, p. 5425-5430, 2000.
- AGRA, M.F. *et al.* Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Braz J Pharmacogn**, v. 17, p. 114–140, 2007.
- AKKOL, E.K. *et al.* Wound healing and anti-inflammatory properties of *Ranunculus pedatus* and *Ranunculus constantinopolitanus*: A comparative study. **J Ethnopharmacol**, v. 139, p. 478–484, 2012.
- ALENCAR, N.M. *et al.* Pro and antiinflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflamm Res**, v. 55, p. 559–564, 2006.
- AL-NUAIMIA, Y., SHERRATTA, M.J., GRIFFITHS, C.E.M. Skin health in older age. **Maturitas**, v. 79, p. 256–264, 2014.
- AMARO, M.S. *et al.* Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de janaguba (*Himatanthus drasticus* (mart.) Plumel. – apocynaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, p.63-71, 2006.
- ANDRADE, T.A.M. *et al.* The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 44,p. 1036-1047, 2011.
- ATIBA, A. *et al.* Aloe vera oral administration accelerates acute radiation delayed wound healing by stimulating transforming growth factor- β and fibroblast growth factor production. **Am J Surg**, v. 201, p. 809–818, 2011.
- AZARKAN, M. *et al.* Detection of three wound-induced proteins in papaya látex. **Phytochemistry**, v. 65, p. 525–534, 2004.
- AZEVEDO, L.H. *et al.* Mast cell concentration in the wound healing process of incisions made by different instruments. **Lasers Med Sci**, v. 24, p. 585 - 590, 2009.
- BADGUJAR, S.B. Evaluation of hemostatic activity of látex from three *Euphorbiaceae* species. **J Ethnopharmacol**, v. 151, p. 733–739, 2014.
- BALDAUF, C. *et al.* Tapping latex and alleles? The impacts of latex and bark harvesting on the genetic diversity of *Himatanthus drasticus* (Apocynaceae). **Forest Ecol Manag**, v. 310, p. 434–441, 2013.
- BANGERT, C., BRUNNER, P.M., STINGL, G. Immune functions of the skin. **Clin. Dermatol.**, v. 29, p. 360–376, 2011.

BARANOWSKY, A.; MOKKAPATI, S.; BECHTEL, A.; M KRUGEL, J.; MIOSGE, N. Impaired wound healing in mice lacking the basement membrane protein nidogen 1. **Matrix Biol**, v. 29, p. 15 - 21, 2010.

BLANCK, M., **Fisiopatologia das feridas**, In: Grupo ICE (Editor), *Enfermagem e úlceras por pressão: Da reflexão sobre a disciplina às evidências nos cuidados*, p.261-276, 2008.

BOATENG, J.S. *et al.* Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems:A Review. **J Pharmac Sci**, v. 97, p. 2892 ,2008.

BRASIL, 2008. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Portaria Interministerial nº 2960 em 9 de dezembro de 2008. **Publica Programa de Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Diário Oficial da União.

BROUGHTON II, G., JANIS, J.E., ATTINGER, C.E. Wound healing: an overview. **Plast. Reconstr. Surg.** v. 117, 2006.

BROWN, K.L., PHILLIPS, T.J. Nutrition and wound healing. **Clin Dermatol**, v. 28, p. 432 – 439, 2010.

BURNS, T *et al.* **Rook's Textbook of Dermatology**. 8th ed. Chichester – UK: Wiley-Blackwell, 2010.

CARDOSO, J.F. *et al.* Effects of cigarette smoke in mice wound healing is strain dependent. **ToxicolPathol**, v.35, p.890–896, 2007.

CARVALHO, P.T.; MAZZER, N.; DOS REIS, F.A.; BELCHIOR, A.C.; SILVA, I.S. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cir. Bras.**, v.21, p.177-183, 2006.

CAVAZANA, W. C. *et al.* Comparative study of tissue reactivity to n-butyl-2-cyanoacrylate and nylon monofilament thread on pericranium-cutaneous flaps in rats. **Acta Cir Bras**, v. 29, p.263, 2014.

CECCHI, R. Estimating wound age: looking into the future. **Int J Legal Med**, v. 124, p. 523 – 536, 2010.

CHANDA, I. *et al.* A Protease Isolated from the Latex of *Plumeria rubra*Linn (Apocynaceae) 2: Anti-inflammatory and Wound-Healing Activities. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 755-760, 2011.

CHAYAMITI, E.M.P.C. *et al.*, **Manual de assistência integral às pessoas com feridas**. Secretaria Municipal da Saúde de Ribeirão Preto. Terceira edição, 2011.

CHEN, J.C.; CHEN, H.M.; SHYR, M.H.; FAN, L.L.; CHI, T.Y.; CHI, C.P.; CHEN, M.F. Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. **J. Formos. Med. Assoc.**, v. 99, n.3, p. 213 – 218, 2000.

CHEN, L. *et al.* Blockade of Mast Cell Activation Reduces Cutaneous Scar Formation. **Mast Cells and Dermal Repair**, v.9, p. 1 – 10, 2014.

- CHORILLI, M., MICHELIN, D.C., SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, p.11-23, 2007.
- CHU, D.H. Overview of biology, development, and structure of skin. Development and Structure of Skin. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine** (7th ed., p. 57-73), 2008.
- COLARES, A.V. *et al.* Phytochemical and biological preliminar study of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel(Janaguba). **Pharmacogn Mag**, v. 4, p. 73–77, 2008.
- CORSETTI, G. *et al.* Topical application of dressing with aminoacids improves cutaneous wound healing in aged rats. **Acta Histochemic**, v. 112, p. 497—507, 2010.
- CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: Inhibition by glucocorticoids. **Eur. J. Pharmacol.**, v.129, p.65–76, 1986.
- DEALEY, C. **Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras**, Tradução: Rúbia Aparecida Lacerda, Vera Lucia Conceição Gouveia Santos, 3.ed. São Paulo Atheneu, 2008.
- DELAVARY, B.M. *et al.* Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, v. 216, p. 753 – 762, 2011.
- DIEGELMANN, R.F., EVANS, M.E. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front. Biosci.** v. 9, p. 283-289, 2004.
- EMING, S.A., KRIEG, T., DAVIDSON, J.M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **J Invest Dermatol**, v. 127, p. 514–525, 2007.
- EMINGA, S. A. *et al.* Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model. **Prog Histochem Cyto**, v. 42 , p. 115–170, 2007.
- ENOCH, S., LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. Basic Science, **Surgery** 23:2, 2005.
- ERMERTCAN, A.T. *et al.* Comparison of the effects of collagenase and extract of *Centella asiatica* in an experimental model of wound healing: An immunohistochemical and histopathological study. **Wound Rep Reg**, v. 16, p. 674–681, 2008.
- FALANGA, V. The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. **Blood Cell Mol Dis**, v. 32, p. 88– 94, 2004.
- FERREIRA, M. *et al.* Angiogenic Properties of Natural Rubber Latex Biomembranes and The Serum Fraction of *Hevea brasiliensis*. **Braz J Phys**, vol. 39, p. 564 – 569, 2009.
- FIGUEIREDO, I.S.T. . Efficacy of a membrane composed of polyvinyl alcohol as a vehicle for releasing of wound healing proteins belonging to latex of *Calotropis procera*. **Process Biochem** v. 49, p. 512–519 , 2014.

FIGUEIREDO, I.S.T. *et al.* Efficacy of a membrane composed of polyvinyl alcohol as a vehicle for releasing of wound healing proteins belonging to latex of *Calotropis procera*. **Process Biochem**, v. 49, p. 512–519, 2014.

FIGUEIREDO, I.S.T. **Modulação do processo cicatricial de feridas cutâneas experimentais por uma biomembrana de proteínas do látex de *Calotropis procera* (ait.) R. Br.** Tese (Doutorado em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2011.

FONDER, M.A. *et al.* Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. **J Am Acad Dermatol**, v. 58, p. 185 - 206, 2008.

FREINKEL, R. K., WOODLEY, D.T. **The Biology of the Skin**. 1 ed. United States of America: The Parthenon Publishing Group, 2001.

GABBIANI, G.. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **J Pathol**, v. 200, p. 500–503, 2003.

GALIANO, R.D. *et al.* Quantitative and reproducible murine model of wound healing. **Wound Rep Reg**, v. 12, p. 485 – 492, 2004.

GANTWERKER, E.A., HOM, D.B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Clin Plastic Surg**, v. 39, p. 85–97, 2012.

GARCIA, S.J.F. **Avaliação do efeito cicatrizante do hidrogel de quitosana a 2% no tratamento de lesões cutâneas em camundongos**. 2011, 112f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

GILL, S.E., PARKS, W.C. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. **Int J Biochem Cell B**, v. 40, p. 1334–1347, 2008.

GILLITZER, R., GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **J Leukocyte Biol**, v. 69, p. 513 – 521, 2001.

GOLDBERG, S.R., DIEGELMANN, R.F. Wound Healing Primer. **Surg. Clin. N. Am.** V. 90, p. 1133–1146, 2010.

GOYAL, M., NAGORI, B.P., SASMAL, D. Wound healing activity of latex of *Euphorbia caducifolia*. **J Ethnopharmacol**, v. 144, p. 786–790, 2012.

GRAVES, D.T. *et al.* IL-1 Plays a Critical Role in Oral, But Not Dermal, Wound Healing. **J Immunol**, v. 167, p. 5316–5320, 2001.

GUNTER, C.I., MACHENS, H.. Innovations in wound medicine. **Wound Medicine**, v. 4, p. 9–12, 2014.

GUO, S., DIPIETRO, L.A. Factors affecting wound healing. **J Dent Res**, v 83, p. 219 – 222, 2010.

- GURUNG, S., SKALKO-BASNET, N. Wound healing properties of *Carica papaya* latex: In vivo evaluation in mice burn model. **J Ethnopharmacol**, v. 121, p. 338–341, 2009.
- GUTWEIN, L.G. *et al.* Microbial Barriers. **Clin Plastic Surg**, v. 39, p. 229–238, 2012.
- GÜVENÇ, A. *et al.* Wound healing and anti-inflammatory activities of the *Michauxia* L'Hérit (Campanulaceae) species native to Turkey. **J Ethnopharmacol**, v. 139, p. 401–408, 2012.
- HALL, L.W.; CLARKE, K.W. **Veterinary anaesthesia**, 9. ed, 1991.
- HAN, G. *et al.* Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing by promoting fibroblast migration and collagen deposition. **The American Journal of Pathology**, v. 180, p. 1465 - 1473, 2012.
- HERCULANO, R.D. *et al.* Nitric oxide release using natural rubber latex as matrix. **Mat. Res.**, v.14, p. 355-359, 2011.
- HIROMATSU, Y., TODA, S. Mast Cells and Angiogenesis. **Microsc Res Techniq**, v. 60, p. 64–69, 2003.
- HUBNER, G. *et al.* Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. **Cytokine**, v. 8, p. 548 – 556, 1998.
- IBA, Y. *et al.* Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. **Int Immunopharmacol**, v. 4, p. 1873–1880, 2004.
- ISHIDA, H. *et al.* Nitric Oxide Synthase Gene Transfer Overcomes the Inhibition of Wound Healing by Sulfur Mustard in a Human Keratinocyte In Vitro Model. **ISRN Toxicology**, v. 2012, p. 1 – 9, 2012.
- ISHIDA, Y., MUKAIND, N., KONDO, T. The role of IL-1 receptor antagonist in skin wound healing. **Inflamm Reg**, v. 28, p. 31 – 35, 2008.
- JAUL, E. Non-healing wounds: The geriatric approach. **Arch Gerontol Geriat**, v. 49, p. 224–226, 2004.
- JIA, Y.; ZHAO, G.; JIA, J. Preliminary evaluation: The effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing. **J Ethnopharmacol** v. 120, p. 181–189, 2008.
- JUNG, M. *et al.* Mast Cells Produce Novel Shorter Forms of Perlecan That Contain Functional Endorepellin. **J Biologic Chem**, v. 288, p. 3289–3304, 2013.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J.C. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. **Histologia e Biologia celular: uma introdução a Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 3. Ed, 2012
- KOCA, U. *et al.* In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. ex Spreng. **J Ethnopharmacol**, v. 126, p. 551–556, 2009.

- KOH, T.J., DIPIETRO, L.A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Rev Mol Med**, v. 13, p. 1 – 12, 2011.
- KOKANE, D.D. *et al.* Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. **J Ethnopharmacol**, v. 124, p. 311–315, 2009.
- KOLARSICK, P.A.J. *et al.* Anatomy and Physiology of the Skin. **J Dermatol Nur Assoc**, v. 3, p. 203 – 213, 2011.
- KONDO, T., ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Sci Int**, v. 203, p. 93–98, 2010.
- KONOO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1510–1530, 2011.
- KORPENWAR, A. N. Ethnomedicinal Plants Used by the Tribal's in Cure of Wounds in Buldhana District (MS) INDIA. **Int J Recent Trends Sci Tech**, v. 3, p. 49-53, 2012.
- KUMAR *et al.* **Robbins & Cotran**: Patologia: bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Saunders, p. 49-124, 2005.
- KUMAR, B *et al.* Ethnopharmacological approaches to wound healing—Exploring medicinal plants of India. **J Ethnopharmacol**, v. 114, p. 103–113, 2007.
- KUMAR, V. L. *et al.* Protective effect of proteins derived from the latex of *Calotropis procera* against inflammatory hyperalgesia in monoarthritic rats. **Phytother. Res.**, , 2011.
- KUTNER, A., FRIEDMAN, A. Nitric oxide nanoparticles for wound healing: Future directions to overcome challenges. **Expert Review of Dermatology**, v. 8, p. 451 -461, 2013.
- KYRIAKIDES, T.R *et al.* Mice that lack matrix metalloproteinase-9 display delayed wound healing associated with delayed reepithelization and disordered collagen fibrillogenesis. **Matrix Biol**, v. 28, p. 65–73, 2009.
- LAUA, E. *et al.* A leptina e o seu impacto metabólico nas lipodistrofias. **Rev Port Endocrinol Diabetes Metab**, v. 9, p. 36–40, 2014.
- LEÃO, R.B.A. *et al.* Study of therapeutical use plants in municipality of Santa Bárbara do Pará, State of Pará, Brazil. **Rev Bras Farm** , v. 88, p. 21–25, 2007.
- LEITE, G.O. *et al.* Gastroprotective effect of medicinal plants from Chapada do Araripe, Brazil. **J Young Pharm**, v.1, p. 54–56, 2009.
- LEITE, S.N. **Fototerapia como estímulo à cicatrização de úlceras cutâneas em ratos frente ao estresse oxidativo experimental**. 126f. Tese de Doutorado em Interunidades em Bioengenharia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

LEMOS, F.M.E. **Avaliação e Caracterização de Membranas de Celulose Microcristalina Regenerada para uma Potencial Aplicação em Cicatrização de Feridas Crônicas**. Dissertação (Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais). Rede temática em engenharia de materiais, 2008.

LI, J., CHEN, J., KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin Dermatol**, v. 25, p. 9 – 18, 2007.

LIMA, C.R.O. **Reparação de feridas cutâneas incisionais em coelhos após tratamento com barbatimão e quitosana**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Goiás, 2010.

LIMA, M.R.F. *et al.* Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v. 105, p. 137–147, 2006.

LIMA, R.C.S. *et al.* Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. **Epilepsy & Behavior**, v. 23, p. 123–126, 2012.

LUCETTI, D.L. *et al.* Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **J Inflammation**, v. 7, p. 1-11 , 2010.

LUO, J., CHEN, A. F. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. **Acta Pharmacol Sinic**, v. 26, p. 259–264, 2005.

MACHADO, A.V. **Efeitos da dermatonia no processo de cicatrização da ferida cirúrgica após colicistectomia laparotômica**. Dissertação (Mestrado em ciências da saúde), Universidade Federal de Sergipe, Aracajú, 2011.

MANDELBAUM, S.H., DI SANTIS, E.P., MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. Educação Médica Continuada. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 393-410, 2003.

MARGADANT, C., SONNENBERG, C. Integrin–TGF- β crosstalk in fibrosis, câncer and wound healing. **Europ Mol Biol Organ**, v. 11, p. 97 – 105, 2011.

MARQUES, L.M. **Proteínas isoladas do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae) protegem a mucosa gástrica de camundongos contra lesões induzidas por etanol : envolvimento da via NO/GMPc/KATP e da glutatona**. 126 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2012.

MARTIN, P. Wound Healing—Aiming for Perfect Skin Regeneration. **Science**, v. 276, p. 75 - 81, 1997.

MARTIN, P., LEIBOVICH , S.J.. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **TRENDS in Cell Biology**, v.15, 2005.

MARTINS, A.B. **Concentração e atividade sérica da mieloperoxidase em indivíduos Tabagistas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biotecnologia aplicada à Farmácia), Universidade Estadual Júlio Mesquita, Araraquara, SP, 2010.

MATOS, M.P.V. *et al.* Ethnopharmacological Use and Pharmacological Activity of Latex from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Int J Ind Medic Plants**, v. 29, p. 1122 - 1131, 2013.

MATOS, M.P.V. **Aspectos bioquímicos e etnofarmacológicos do látex de *Himatanthus drasticus* mart. (plumel)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará, 2013.

MATSUMURA. A histopathological and immunohistochemical study of wound healing mechanism and biological effect of low-energy laser irradiation in type 2 diabetic model mice. **Int. J. Oral-Med. Sci.**, v.6, p.1-13, 2007.

MCDUGALL, S. *et al.* Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modelling and clinical implications. **Phil. Trans. R. Soc. A**, v. 364, p. 1385–1405, 2006.

MCNEES, P. Skin and wound assessment and care in oncology. **Semin Oncol Nurs**, v. 22, p. 130–143, 2006.

MELO *et al.* Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **Int. J. Pharm.**, v. 408, p. 113-119, 2011.

MELO *et al.* Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Bot. Bras.**, v. 21, p. 27 – 36, 2007.

MENDONÇA, R.J. **Purificação e caracterização de uma proteína angiogênica, indutora de fibroplasia e cicatrizante presente no Látex Natural da Seringueira *Hevea brasiliensis***. Doutorado em Ciências, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2008.

MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETO, J. Cellular aspects of wound healing. **An. Bras. Dermatol.**, v 84, p.257-62, 2009.

MENKE, M.N. *et al.* Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing. **Gynecol Oncol**, v. 111, p. S87–S91, 2008.

MENKE, N.B. Impaired wound healing. **Clin Dermatol**, v. 25, p. 19–25, 2007.

MESQUITA, M.L. *et al.* Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 783–787, 2005.

MOGOŞANU, G.D., GRUMEZESCUB, A.M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **Intern J Pharm**, v. 463, p. 127– 136, 2014.

MOGOSANU, G.D., GRUMEZESCUB, A.M.. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **Internat J Pharmac**, v. 463, p. 127– 136, 2014.

MONACO, J.L.; LAWRENCE, T. Acute wound healing an overview. **Clin. Plast Surg.**, Philadelphia, v.30, p.1-12, 2003.

MONTES *et al.* Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. **Natureza on line**, v. 7, p. 61- 67, 2009.

MOURA, L.I.F. *et al.* Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review. **Acta Biomater**, v. 9, p. 7093–7114, 2013.

MOUSINHO, K.C. *et al.* Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (mart.) Plumel – Apocynaceae. **J Ethnopharmacol**, v. 137, p. 421– 426, 2011.

MRUÉ, F. *et al.* Evaluation of The Biocompatibility of New Biomembrane. **Mater Res.**, v.7, n.2, p.277-283, 2004.

MRUÉ, F. **Substituição do esôfago cervical por prótese bio sintética de látex. Estudo experimental em cães.** 114 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

MRUÉ, F., ZBOROWSKI, A.C., inventors; Biomembrane suitable for use in substitution, reconstruction of angiogenesis, neoformation or regeneration of human or animal organs or tissues. **European Union.**, 2006.

MURAWALA, P., TANAKA, E.M., CURRIE, J.D. Regeneration: The ultimate example of wound healing. **Semin Cell Dev Biol**, v. 23, p. 954– 962, 2012.

NAWAZ, Z., BENTLEY, G. Surgical incisions and principles os wound healing. **Surgery**, v. 29, p. 59 – 61, 2010.

NETO, M.L.C.B. *et al.* Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cir Bras**, v. 21,p.17 – 22, 2006.

NEVES-JUNIOR, WP. Influence of the fabrication process on the final properties of vascular prothesis made of natural rubber latex. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 100, p. 702-7, 2006.

NICHOLS, S.P. *et al.* Local delivery of nitric oxide: Targeted delivery of therapeutics to bone and connective tissues. **Advanced Drug Delivery Reviews**,v. 64, p. 1177–1188, 2012.

NISHIYAMA, T. *et al.* Delayed Re-Epithelialization in Periostin-Deficient Mice during Cutaneous Wound Healing. **Periostin in Wound Healing**, v. 6, p. 1 – 15, 2011.

NOURSADEGHI, M.; TSANG, J.; HAUSTEIN, T.; MILLER, R.F.; CHAIN, B.M.; KATZ, D.R. Quantitative imaging assay for NF- κ B nuclear translocation in primary human macrophages. **J. Immunol Meth**, v.329, p.194-200, 2008.

NYAME, T.T., CHIANG, H.A., ORGILL, D.P. Clinical Applications of Skin Substitutes. **Surg Clin N Am**, v. 94 p. 839–850, 2014.

OECD, 1987. Guidelines for Testing of Chemicals, Guideline 402. Acute Dermal. Oxicity OECD, Paris.

OEHMICHEN, M. *et al.* Mast cell reactivity at the margin of human skin wounds: An early cell marker of wound survival? **Forensic Sci Int**, v. 191, p. 1–5, 2009.

OLIVEIRA, C.M.B. *et al.* Citocinas e Dor. **Rev Bras Anestesiologia**, v. 61, p. 255-265, 2011.

OLIVEIRA, M.L.M. *et al.* In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. Seeds. **J Ethnopharmacol**, v. 129, p. 214–219, 2010.

PAIVA F. P., MAFFILI, V. V., SANTOS, A.C.S. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. FIOCRUZ, Salvador BA, maio 2005.

PARENTE, L.M.L. *et al.* Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. **Acta Cir Bras**, v. 26, p. 19 – 24, 2011.

PATIL, S.V. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using latex from few *Euphorbian* plants and their antimicrobial potential. **Appl Biochem Biotech**, v. 167, p. 776–790, 2012.

PATTERSON, E. K. *et al.* Carbon monoxide-releasing molecule 3 inhibits myeloperoxidase (MPO) and protects against MPO-induced vascular endothelial cell activation/dysfunction. **Free Rad Biol Med**, v. 70, p. 167–173, 2014.

PENG, C., HE, Q., LUO, C. Lack of Keratinocyte Growth Factor Retards Angiogenesis in Cutaneous Wounds. **J Internat Med Res**, v. 39, p. 416 – 423, 2011.

PERANTEAU, W.H. *et al.* IL-10 Overexpression Decreases Inflammatory Mediators and Promotes Regenerative Healing in an Adult Model of Scar Formation. **J Invest Dermatol**, v.128, p. 1852 - 1860, 2008.

PERDUE, G.P., BLOMSTER, R.N. South American plants. III: Isolation of fulvoplumierin from *Himatanthus sucuuba* (M. Arg.) Woodson (Apocynaceae). **J Pharmac Sci**, v. 67, p. 1322–1323, 1978.

RAJESH, R. *et al.* Procoagulant activity of *Calotropis gigantea* latex associated with fibrin(ogen)olytic activity. **Toxicon**, v. 46, p. 84–92, 2005.

RAMOS, M.V. *et al.* Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. **J Ethnopharmacol**, v. 111, p. 115–122, 2007.

REBOUÇAS, S.O. *et al.* Antiproliferative effect of a traditional remedy, *Himatanthus articulatus* bark, on human cancer cell lines. **J Ethnopharmacol**, v.137, p. 926– 929, 2011.

REINKE, J.M., SORG, H. Wound repair and regeneration. **Eur. Surg. Res.** v. 49, p. 35–43, 2012.

RIBEIRO, D.A. *et al.* Promising medicinal plants for bioprospection in a cerrado area of Chapada do Araripe, northeastern Brazil. **J Ethnopharmacol**, v.155, p. 1522–1533, 2014.

ROMANA-SOUZA, B.; OTRANTO, M.; VIEIRA, A.M.; FILGUEIRAS, C.C.; FIERRO, I.M.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Rotational stress-induced increase in epinephrine levels delays cutaneous wound healing in mice. **Brain Behav. Immunol.**, v.24, p.427-437, 2010.

ROY, S. *et al.* Antioxidant and protective effect of latex of *Calotropis procera* against alloxan-induced diabetes in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 102 , p.470–473, 2005.

SABOL, F. *et al.* Immunohistological changes in skin wounds during the early periods of healing in a rat model. **Vet Med**, v. 57, p. 77–82, 2012.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, p. 1265-1275, 1995.

SANCHIS, A. *et al.* Keratinocyte-Targeted Overexpression of the Glucocorticoid Receptor Delays Cutaneous Wound Healing. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1 – 10, 2012.

SANTORO, M.M., GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocytorepithelization during wound healing. **Exp Cell Res**, v. 304, p. 274– 286, 2005.

SANTOS *et al.* Avaliação do uso do extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta. Cir. Bras.**, v. 21, 2006.

SANWAL, R., CHAUDHARY, A.K. Wound healing and antimicrobial potential of *Carissa spinarum* Linn. in albino mice. **J Ethnopharmacol**, v. 135, p. 792–796, 2011.

SARATHA, V., SUBRAMANIAN, S., SIVAKUMAR, S. Evaluation of wound healing potential of *Calotropis gigantea* latex studied on excision wounds in experimental rats. **Med Chem Res**, v. 19, p. 936–947, 2010.

SARNOFF, D.S. A comparison of wound healing between a skin protectant ointment and a medical device topical emulsion after laser resurfacing of the perioral área. **J Am Acad Dermatol**, v. 64, p. S36 -S43, 2011.

SATO, Y., OHSHIMA, T., KONDO, T. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. **Biochem Bioph Res Co**, v. 265, p. 194–199, 1999.

SCHMIDT, C. *et al.* Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **J Ethnopharmacol**, v. 122, p. 523–532, 2009.

SCHMITZ, M., EBERLEIN, T., ANDRIESSEN, A. Wound treatment costs comparing a bio-cellulose dressing with moist wound healing dressings and conventional dressings. **Wound Medicine**, v. 6, p. 11–14, 2014.

SCHNEIDER, A.; GARLICK, J.A.; EGLES, C. Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds Accelerate Wound Healing. **Bioactive Wound Dressing**, v. 3, 2008.

SCHREML, S. *et al.* Wound healing in the 21st century. **J Am Acad Dermatol**, v. 63, p. 866 - 881, 2010.

SEQUEIRA, B.J. *et al.* Antibacterial and antifungal activity of extracts and exudates of the amazonian medicinal tree *Himatanthus articulatus* (vahl) woodson (common name: sucuba). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 659-661, 2009.

SHIVANIRAWAT *et al.* Wound healing agents from medicinal plants: a review. **Asian Pac J Trop Biomed**, p. 1910 – 1917, 2012.

SIEMIONOW, M.Z., EISENMANN-KLEIN, M. **Plast Reconstr Surg**. Springer Verlag, 2010.

SINGER, A.J., CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 738 - 746, 1999.

SOARES, D.C. *et al.* Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuuba* latex against *Leishmania amazonenses*. **Parasitol Int**, v.59 ,p.173–177, 2010.

SONEJA, A., DREWS, A., MALINSKI, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidativestress in wound healing. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 108 - 119, 2005.

SOUSA, E.L. **Avaliação da atividade antitumoral de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (Janaguba)**. 93f, Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2009.

SOUSA, E.L. *et al.* Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (mart.) Plumel-Apocynaceae (janaguba) in the treatment of sarcoma 180 tumor. **Braz J Pharmac Sci**, v. 46, p. 199 – 203, 2010.

SOUTO, L.R.M. *et al.* Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. **Sao Paulo Med J**, v. 124, p. 71-76, 2006.

SOUZA, D.G.; CASSALI, G.D.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M.M. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.**, v.134, n.5, p.985-994, 2001.

SOUZA, R.K.D *et al.* Ethnopharmacology of medicinal plants of carrasco, northeastern Brazil. **J Ethnopharmacol**, v. 157, p. 99–104, 2014.

SOUZA, W.M., STINGHEN, A.E.M., SANTOS, C.A.M. Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 750–753, 2004.

SPINA, A.P. **Estudos taxonômicos, micro-morfológicos e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. Ex Schult (Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae)**. Tese de Doutorado em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, p. 40, 2004.

STALLMEYER, B. *et al.* The function of nitric oxide in wound repair: Inhibition of inducible Nitric Oxide-Synthase severaly impairs wound reepithelialization. **J Investigat Dermatol**, v. 113, p. 1090 - 1098, 1999.

STRECKER-MCGRAW , M.K., JONES, T.R., BAER, D.G. Soft Tissue Wounds and Principles of Healing. **Emerg Med Clin N Am**, v. 25, p. 1–22, 2007.

STRODTBECK, F. Physiology of Wound Healing. **Newborn and Infant Nursing Reviews**, v. 1, 2001.

SÜNTAR, I.P. *et al.* Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. **J Ethnopharmacol**, v.127, p. 468–477, 2010a.

SÜNTAR, I.P. *et al.* Wound healing potential of Sambucus ebulus L. leaves and isolation of an active component, quercetin 3-O-glucoside. **J Ethnopharmacol**, v. 129, p. 106–114, 2010b.

SÜNTAR, I.P. *et al.* Wound healing acceleration effect of endemic Ononis species growing in Turkey. **J Ethnopharmacol**, v.135, p. 63–70, 2011.

SZPADERSKA, A., DIPIETRO, L.A. Inflammation in surgical wound healing: friend or foe? **Surgery**, v. 137, p. 571 – 573, 2005.

TAMILSELVAN, N. *et al.* A review on some poisonous plants and their medicinal values. **J Acute Dis**, p. 85-89, 2014.

TAZIMA, M.F.G.S., VICENTE, Y.A.M.V.A., MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Fundamentos em clínica cirúrgica - 1ª Parte, capítulo II**. Medicina (Ribeirão Preto), p. 259-64, 2008.

THAKUR, R. *et al.* Practices inWound Healing Studies of Plants. **Evid-Based Compl Alt**, 2011.

TOMASEK, J.J. *et al.* Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. **Mol Cell Biol**, v. 3, p. 349 - 363, 2002.

TRIVELLATOGRASSI, L. *et al.* From popular use to pharmacological validation: a study of the anti-inflammatory,anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. **J Ethnopharmacol**, v. 145, p. 127–138, 2013.

TSIROGIANNE, A.K., MOUTSOPOULOS, N.M., MOUTSOPOULOS, H.M. Wound healing: Immunological aspects. **Injury**, v. 37S, p. S5- S12, 2006.

UPADHYAY, R. Plant latex: A natural source of pharmaceuticals and pesticides. **Int J Green Pharma**, v. 5, p169, 2011.

VALEANT. Monografia do produto: Regederm®. Avanço Biotecnológico para a Recomposição Cutânea. Pelenova Biotecnologia.

VASCONCELOS, M.S. **Atividade antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante do caju (*Anacardium occidentale* L.)**. 78 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, 2011.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOL, J.T. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **J. Int. Med. Res.**, v.37; p. 1528-1542, 2009.

WANG, A.S., ARMSTRONG, E.J., ARMSTRONG, A.W. Corticosteroids and wound healing: clinical considerations in the perioperative period. **Am J Surg**, v. 206, p. 410-417, 2013.

WATSON, N.F.S., HODGKIN, W.W. Wound dressings. **Surgery**, v. 23, p. 52 – 55, 2005.

WERNER, S., KRIEG, T., SMOLA, H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. **J Invest Dermatol**, v. 127, p. 998–1008, 2007.

WIDGEROW, A.D. Cellular resolution of inflammation—catabasis. **Wound Rep Reg**, v.20, p. 2–7, 2012.

WILD, T. *et al.* Basics in nutrition and wound healing. **Nutrition**, v. 26, p. 862 – 866, 2010.

WILGUS, T.A. Immune cells in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair. **Pharmacol Res**, v. 58, p.112–116, 2008.

WITTE, M.B., BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. **Am J Sur**, v.183, p. 406–412, 2002.

WONG, V.W.,GURTNER, G.C., LONGAKE, M.T. Wound healing: a paradigm for regeneration. **Mayo Clinic Proc**, v. 88, p1022 – 1031, 2013.

WORLEY, C.A. The wound healing process symphony. **Dermatol Nursing**. v. 1, p. 179-180, 2004.

WROBEL, L.K. *et al.* Contractility of Single Human Dermal Myofibroblasts and Fibroblasts. **Cell Motil Cytoskel**, v. 52, p. 82–90, 2002.

YARISWAMY, M. *et al.* Topical application of serine proteases from *Wrightia tinctoria* R. Br.(Apocyanaceae) látex augments healing of experimentally induced excision wound in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 149, p. 377–383, 2013.

YOUNG, A., MCNAUGHT, C. The physiology of wound healing. **Surgery**, v. 29, P. 475 – 479, 2011.