



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

INGRID SAMANTHA TAVARES DE FIGUEIREDO

**MODULAÇÃO DO PROCESSO CICATRICIAL DE FERIDAS CUTÂNEAS
EXPERIMENTAIS POR UMA BIOMEMBRANA DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE
Calotropis procera (AIT.) R. Br**

FORTALEZA-CE

2011

INGRID SAMANTHA TAVARES DE FIGUEIREDO

**MODULAÇÃO DO PROCESSO CICATRICAL DE FERIDAS CUTÂNEAS
EXPERIMENTAIS POR UMA BIOMEMBRANA DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE
Calotropis procera (AIT.) R. Br**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia da Universidade Federal do
Ceará como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Profa. Dr^a Nylane Maria Nunes de
Alencar

FORTALEZA-CE

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

F49m Figueiredo, Ingrid Samantha Tavares de

Modulação do processo cicatricial de feridas cutâneas experimentais por uma biomembrana de proteínas do látex de *Calotropis procera* (AIT.) R. Br / Ingrid Samantha Tavares de Figueiredo. – 2011.

137 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.

Orientadora: Profa. Dr^a Nylane Maria Nunes de Alencar

1. Calotropis 2. Proteínas 3. Cicatrização I. Título.

CDD 615.1

INGRID SAMANTHA TAVARES DE FIGUEIREDO

**MODULAÇÃO DO PROCESSO CICATRICAL DE FERIDAS CUTÂNEAS
EXPERIMENTAIS POR UMA BIOMEMBRANA DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE
Calotropis procera (AIT.) R. Br**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Tese aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Dept^o de Fisiologia e Farmacologia - UFC
Orientadora

Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão
Dept^o de Morfologia - UFC

Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo
Dept^o de Química Orgânica e Inorgânica - UFC

Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Centro de Ciências da Saúde
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Socorro Vanesca Frota Madeira
Centro de Ciências da Saúde
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Dedico...

Aos meus pais

Por terem feito com todo amor a minha educação uma prioridade

Ao meu esposo Marcus Braz

Pelo imenso incentivo, amor e cumplicidade

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, fonte da minha fé e fortaleza. Por me guiar por caminhos retos e me fazer crer além daquilo que meus olhos são capazes de ver;

À minha orientadora **Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar**, pela contribuição marcante na minha trajetória profissional. Pela confiança, conselhos, incentivos, por sempre enxergar as possibilidades e torná-las reais. E principalmente, por ser meu referencial e minha grande amiga;

Ao Professor **Dr. Márcio Viana Ramos**, pelas valiosas sugestões no desenvolvimento dos experimentos, pelas cobranças muitas vezes inesperadas, porém necessárias e que contribuíram para meu crescimento profissional;

Ao Professor **Dr. Marco Andrey Cipriani Frade**, por ter me acolhido de forma tão receptiva em seu laboratório, permitindo o aprendizado do modelo de cicatrização por primeira intenção;

À Professora **Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo**, por toda atenção nas etapas de confecção das biomembranas, pelo acolhimento em seu laboratório e por gentilmente aceitar participar da banca examinadora desta tese de Doutorado;

À Professora **Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão**, a quem tenho muita admiração. Pelas valiosas sugestões nas nossas tentativas de padronização dos experimentos de imunohistoquímica. Por ser sempre uma pessoa tão gentil e de agradável convivência;

À Professora **Dra. Socorro Vanesca Frota Madeira** que se mostrou tão disposta em participar desta banca e pelo constante incentivo;

À Professora **Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira** por gentilmente aceitar participar da banca examinadora desta tese de Doutorado;

Ao **Vagnaldo Fechine**, pela contribuição valiosa na análise da densidade microvascular;

À Professora **Gutencilda Colares**, a quem tenho um enorme carinho e gratidão pela disponibilidade em acompanhar as etapas de obtenção de imagens na morfologia;

Ao **Thiago Andrade**, amigo que conquistei durante meu estágio na USP e que mesmo distante, contribuiu de forma valiosa com sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às mestrandas **Lyara Freitas** e **Rachel Sindeaux** (antigas IC's), que desde o início deste trabalho se mostraram envolvidas, atenciosas, disponíveis, amigas e, assim, tornado menos árduo o desenvolvimento desta pesquisa. À **Patrícia Bastos**, que mesmo não tendo uma participação direta nos meus trabalhos, sempre se dispôs a ajudar, por ser uma pessoa amiga e a quem posso confiar. ***Serei sempre grata por toda ajuda, amizade e por terem feito parte da minha história!***

Às IC's **Luana do Carmo** e **Tamires Goebel**, pela confiança, por toda atenção, pela ajuda impagável na finalização deste trabalho, por todo empenho demonstrado e por terem me concedido o privilégio de ensiná-las um pouco sobre cicatrização.

Aos amigos de longas datas, **Karoline Sabóia** e **Flávio Bitencourt**, pela paciência que demonstram frente aos meus momentos de ansiedade, por sempre se mostrarem tão disponíveis no desenvolvimento das últimas etapas desta tese e por termos o privilégio de compartilharmos uma sólida amizade.

Aos meus amigos, **Caesar Osório**, por estar sempre disposto a ajudar em t aquilo que precisei e pela valiosa contribuição nas análises de citotoxicidade; **Ítalo Cavalcante**, por toda atenção e parceria harmoniosa que temos estabelecido nas análises toxicológicas desenvolvidas em nosso laboratório; **Tiago Olinda**, pelos vários momentos alegres e de descontração que temos compartilhado ao longo da nossa pós-graduação; **Danilo Gonçalves**, pelos conselhos sábios e por sempre minimizar minhas angústias profissionais próprias desta reta final.

À **Patrícia Sâmara**, técnica do nosso laboratório, a quem tenho uma enorme gratidão pela colaboração em todos os momentos que precisei!

À minha grande amiga **Raquel Sombra**, pelo auxílio na execução dos experimentos realizados neste trabalho, por me oferecer uma amizade tão sincera e autêntica, por me confortar com suas palavras sábias nos momentos mais difíceis.

À minha família amada, meus pais **Dagoberto Moreira e Aparecida Tavares**, pela família linda que temos, por terem renunciado seus sonhos em função dos meus e por terem feito da minha educação uma prioridade. Às minhas irmãs que tanto amo, **Monique e Camila**, pelo apoio constante, união em todas as horas, pelos momentos felizes convividos e por acreditarem nos meus ideais. ***Vocês são fundamentais na minha vida!***

À minha segunda família, meus sogros **Arimatéia e Carmélia Braz**, minhas cunhadas **Adelly e Ana Monique**, por serem apoio constante e compreenderem minha ausência do convívio familiar.

Ao meu marido **Marcus Braz**, por tudo que representa pra mim: meu grande amigo, conselheiro, parceiro, cúmplice, por me confortar da maneira que só ele sabe, pela paciência demonstrada, por acreditar em mim e por ser o ***grande amor da minha vida!***

Muito obrigada!

RESUMO

MODULAÇÃO DO PROCESSO CICATRICIAL DE FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS POR UMA BIOMEMBRANA DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* (AIT.) R. Br

O látex da planta medicinal *Calotropis procera* (Apocynaceae) é um produto químico complexo, constituído de uma diversidade de moléculas e tem sido amplamente utilizado na medicina popular sobre enfermidades dermatológicas. O potencial da fração de proteínas do látex (PL) em induzir danos celulares foi avaliado pelos testes de MTT e LDH. Além disso, PL foi utilizada no preparo de uma biomembrana associada ao poli (álcool vinílico) (BioMem PVA/PL 0,2% e 1%). As propriedades físico-química das membranas controle (PVA 1%) e teste (BioMem PVA/PL 1%) foram avaliadas através da espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA). O efeito das proteínas do látex na cicatrização foi investigado após indução de feridas incisionais ou excisionais no dorso de camundongos, seguido da implantação da BioMem PVA/PL 0,2% ou 1%. O processo cicatricial foi avaliado de acordo com os parâmetros: análise macroscópica (indução da neoformação tecidual em feridas incisionais e edema, hiperemia, redução da área e reepitelização em feridas excisionais); microscópica (degranulação de mastócitos, edema, infiltrado de leucócitos, número de fibroblastos e colagênese). Marcadores e mediadores da fase inflamatória (MPO, nitrito, IL-1 β e TNF- α) foram avaliados em feridas incisionais e excisionais. O efeito da BioMem PVA/PL sobre a densidade microvascular foi avaliado em feridas incisionais. O possível efeito de PL em estimular diretamente macrófagos foi investigado em uma cultura de células. PL não apresentou *in vitro* citotoxicidade sobre neutrófilos humanos, visto pela baixa atividade de LDH e a alta viabilidade dos neutrófilos pelo teste do MTT. A análises físico-químicas demonstraram que não ocorreram interações fortes do PVA com PL, já que não foi observada a formação de novas bandas ou o deslocamento destas. Além disso, a solubilização destes compostos tornou a BioMem PVA/PL termicamente mais estável. Nos modelos experimentais de cicatrização, as análises macroscópicas demonstraram que BioMem PVA/PL 0,2% e 1% induziram a neoformação tecidual em feridas incisionais nos dias 2, 7 e 14 após a implantação das membranas. Entretanto, não interferiu na densidade da microvascularização ao tecido neoformado. Em feridas excisionais, BioMem PVA/PL 0,2% induziu aumento do edema, mas não interferiu na hiperemia na fase inflamatória. Na fase proliferativa da cicatrização, acelerou a redução da área das feridas e favoreceu a reepitelização. A análise microscópica de feridas incisionais e excisionais evidenciou que BioMem PVA/PL 0,2% ou 1% conferiu um estímulo à degranulação de mastócitos, edema e migração de leucócitos na fase inflamatória do processo cicatricial. Na fase proliferativa foi evidenciado aumento na população de fibroblastos e colagênese. A análise da reepitelização de feridas excisionais evidenciou um aumento da

espessura do epitélio neoformado. A implantação da BioMem PVA/PL 0,2% aumentou os níveis de marcadores e mediadores da resposta inflamatória, tais como MPO, nitrito, IL-1 β e TNF- α . Macrófagos cultivados de camundongos e estimulados com PL foram induzidos a liberação de TNF- α e IL-1 β . A análise integrada de todos os resultados sugerem que as proteínas do látex (PL) atuam significativamente na fase inflamatória da cicatrização, o que parece influenciar diretamente as fases subseqüentes do processo cicatricial.

Palavras-Chave: *Calotropis procera*, proteínas, feridas, cicatrização.

ABSTRACT

HEALING PROCESS MODULATION OF EXPERIMENTAL CUTANEOUS WOUNDS BY A BIOMEMBRANE OF LATICIFERS PROTEINS FROM *Calotropis procera* (AIT.) R. Br

The latex of the medicinal plant *Calotropis procera* (Apocynaceae) is a complex chemical, consisting of a variety of molecules and has been widely used in folk medicine on skin diseases. The potential of the latex proteins fraction (LP) in induce cell damage was assessed by MTT and LDH tests. Moreover, LP was used to prepare a biomembrana associated with poly (vinyl alcohol) (BioMem PVA/PL 0,2% and 1%). The physical-chemical properties of control (PVA 1%) and test (BioMem PVA/PL 1%) were assessed by infrared spectroscopy (FTIR) and thermogravimetric (TGA) analysis. The effect of laticifers proteins at healing was investigated after induction of incision or excision wounds on the back of mice, followed by implantation of BioMem PVA/PL 0,2% or 1%. Healing process was evaluated by the parameters: macroscopic analyses (induction of tissue neoformation of incisional wounds and edema, hyperemia, area reduction and re-epithelialization of excision wounds); microscopic (mast cell degranulation, edema, leucocyte infiltrate, number of fibroblasts and collagenesis). Inflammatory markers and mediators (MPO, nitrite, IL-1 β e TNF- α) were evaluated in incision and excision wounds. Microvessel density was evaluated in incision wounds. The possible effect of soluble protein fraction (LP) to directly stimulate macrophages was investigated in a cell culture. PL shows no cytotoxicity *in vitro* in human neutrophils, since the low activity of LDH and high viability of neutrophils by MTT test. The physico-chemical analysis showed that no strong interaction with PVA and LP occurred, since was not observed the formation of new bands or the displacement of these. Futhermore, the solubility of these compounds became the BioMem PVA/PL more thermally stable. At experimental healing models, macroscopic analyses showed that BioMem PVA/PL 0,2% e 1% leads tissue neoformation in incisional wounds at the 2, 7 and 14 days after membrane implantation. However, no effect on the microvascular density to neoformed tissee of incisional wounds were seen. At excisional wounds, BioMem PVA/PL 0,2% induce increase of edema, but not hyperemia at inflammatory phase. Moreover, accelerated the reduction in the wound area and an improved re-epithelialization at proliferative phase of wound healing. Microscopic analysis of incisional and excisional wounds showed that BioMem PVA/PL 0,2% or 1% lead a stimulus to mast cell degranulation, edema, leucocyte migration at inflammatory phase of the cicatricial process. At the proliferative phase, was evidenced an increase in the population of fibroblasts and collagenesis. Re-epithelialization of excisional wounds showed an increased thickness of the newly formed epithelium. BioMem PVA/PL 0,2% implantation increased the levels of markers and mediators of

the inflammatory response, such as MPO, nitrite, IL-1 β and TNF- α . Culture mouse macrophages stimulated with PL were induced to release of TNF- α e IL-1 β . Integrated analysis of all results suggest that PL act significantly in the inflammatory phase of healing, which seems to directly influence the subsequent phases of the healing process.

Key-Words: *Calotropis procera*, proteins, wounds, healing.

LISTA DE FIGURAS

1	Camadas da pele.....	17
2	Representação das fases do processo cicatricial.....	23
3	Aspectos gerais da planta <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R. Br.....	33
4	Efeito das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) sobre a liberação de lactato desidrogenase (LDH) por neutrófilos.....	59
5	Efeito das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) sobre a viabilidade de neutrófilos.....	59
6	Espectro infravermelho: BioMem PVA/PL 1% (a), PVA 1% (b) e PL 1% (c).....	61
7	Termogramas TG e DTG: PVA 1%, PL e BioMem PVA/PL 1%.....	62
8	Fotografias representativas da neoformação tecidual em fragmentos de pele de animais submetidos a feridas incisionais.....	63
9	Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a degranulação de mastócitos no tecido neoformado de feridas incisionais.....	68
10	Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a fibroplasia e colagênese no tecido neoformado de feridas incisionais.....	69
11	Fotomicrografias de feridas incisionais.....	70
12	Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase no tecido neoformado de feridas incisionais.....	75
13	Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre os níveis de nitrito no tecido neoformado de feridas incisionais.....	76
14	Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β no tecido neoformado de feridas incisionais.....	78
15	Aspectos macroscópicos representativos de feridas excisionais.....	82

16	Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a redução da área de feridas excisionais.....	84
17	Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a reepitelização de feridas excisionais.....	85
18	Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a degranulação de mastócitos em feridas excisionais.....	89
19	Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a fibroplasia e colagênese de feridas excisionais.....	91
20	Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a reepitelização de feridas excisionais.....	92
21	Fotomicrografias de feridas excisionais.....	93
22	Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em feridas excisionais.....	96
23	Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β em feridas excisionais.....	97
24	Efeito das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> (PL) sobre a liberação de TNF- α e IL-1 β por macrófagos peritoneais de camundongos.....	99

LISTA DE TABELAS

1	Atribuições das principais freqüências dos materiais (PVA 1%, PL), através da análise da membrana PVA/PL 1%.....	61
2	Avaliação macroscópica do efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a neoformação tecidual em feridas incisionais.....	64
3	Avaliação microscópica do efeito das membranas (PVA e PVA/PL) sobre o edema e infiltrado de leucócitos (neutrófilos e mononucleares) no tecido neoformado de feridas incisionais.....	66
4	Análise da densidade microvascular ao tecido neoformado de feridas incisionais.....	80
5	Avaliação microscópica do efeito das membranas (PVA e PVA/PL 0,2%) sobre o edema e infiltrado de leucócitos (neutrófilos e mononucleares) em feridas excisionais	88

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

BioMem PVA/PL -	Biomembrana de poli (álcool vinílico) associada às proteínas do látex
ANOVA -	Análise de Variância
C3a -	Terceiro componente do sistema complemento ativado
C5a -	Quinto componente do sistema complemento ativado
EGF -	Fator de crescimento endotelial
FGF -	Fator de crescimento de fibroblasto
FTIR -	Infravermelho por transformada de Fourier
GM-CSF -	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
H -	Hora
H&E -	Hematoxilina-eosina
HARP -	Peptídeo regulador de afinidade da heparina
ICAM -	Moléculas de adesão intercelular
IL1- β -	Interleucina 1 beta
IL-6 -	Interleucina 6
IL-8 -	Interleucina 8
KGF -	Fator de crescimento de queratinócitos
LDH -	Lactato desidrogenase
MAC-1 -	Antígeno de macrófago-1
MCP -	Proteína quimiotática de monócitos-1
MEC -	Matriz extracelular
MIP -	Proteína inflamatória de macrófagos
MMPs -	Metaloproteinases de matriz
MTT -	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NO -	Óxido Nítrico

PDEGF -	Fator de crescimento de células endoteliais derivados de plaquetas
PDGF -	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PF-4 -	Fator plaquetário – 4
Ph -	Potencial hidrogeniônico
PL -	Proteínas do látex
PVA -	Álcool Polivinílico
ROS -	Espécies reativas de oxigênio
TG -	Termogravimetria
TGF -	Fator de crescimento transformante
TIMPsI -	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TNF- α -	Fator necrose tumoral alfa
VEGF -	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Anatomia e Morfofisiologia da pele.....	21
1.2	Úlceras cutâneas.....	23
1.3	Cicatrização.....	26
1.4	Látex e laticíferos.....	34
1.5	Biomateriais	40
2	JUSTIFICATIVA.....	44
3	OBJETIVOS.....	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1	Isolamento da fração protéica do látex da planta <i>Calotropis procera</i> (Ait) R. Br.....	46
4.2	Análise <i>in vitro</i> da citotoxicidade de PL.....	47
4.3	Elaboração das biomembranas e caracterização físico-química.....	49
4.4	Animais.....	51
4.5	Modelos Experimentais de Cicatrização.....	51
4.6	Parâmetros Avaliados.....	53
4.6.1	Análise macroscópica.....	53
4.6.2	Análise histológica.....	54
4.7	Análise de mediadores inflamatórios.....	57
4.8	Avaliação da densidade vascular ao tecido neoformado de feridas incisionais.....	60
4.9	Análise estatística dos dados.....	61
5	RESULTADOS.....	62
5.1	Proteínas do látex não apresentam citotoxicidade em neutrófilos humanos.....	62
5.2	Propriedades físico-química das membranas.....	64

5.3	Efeito da BioMem PVA/PL sobre as diferentes etapas do processo cicatricial de feridas incisionais cutâneas em camundongos	66
5.3.1	BioMem PVA/PL induz aumento da neoformação tecidual em feridas incisionais.....	66
5.3.2	BioMem PVA/PL intensifica o edema e a infiltração leucocitária no tecido neoformado de feridas incisionais.....	68
5.3.3	BioMem PVA/PL induz degranulação de mastócitos no tecido neoformado de feridas incisionais.....	71
5.3.4	BioMem PVA/PL aumenta a população de fibroblastos e a produção de colágeno no tecido neoformado de feridas incisionais.....	71
5.3.5	BioMem PVA/PL aumenta os níveis de marcadores e mediadores da resposta inflamatória no tecido neoformado de feridas incisionais.....	74
5.3.6	BioMem PVA/PL não interferiu na densidade da vascular no tecido neoformado de feridas incisionais.....	79
5.4	Efeito da BioMem PVA/PL sobre as diferentes etapas do processo cicatricial de feridas excisionais cutâneas em camundongos	81
5.4.1	A implantação da BioMem PVA/PL em feridas excisionais induziu aumento do edema, mas não interferiu na hiperemia.....	81
5.4.2	A implantação da BioMem PVA/PL diminui a área e favorece reepitelização de feridas excisionais	83
5.4.3	A implantação da BioMem PVA/PL intensifica o edema, infiltrado de leucócitos e a degranulação de mastócitos em feridas excisionais.....	86
5.4.4	A implantação da BioMem PVA/PL aumenta a população de fibroblastos, produção de colágeno e a espessura do novo epitélio de feridas excisionais.....	90
5.4.5	A implantação da BioMem PVA/PL aumenta os níveis de marcadores e mediadores da resposta inflamatória em feridas excisionais.....	95
5.4.6	As proteínas do látex de <i>C.procera</i> (PL) induzem a liberação de TNF- α e IL-1 β por macrófagos cultivados de camundongos.....	98
6	DISCUSSÃO.....	100

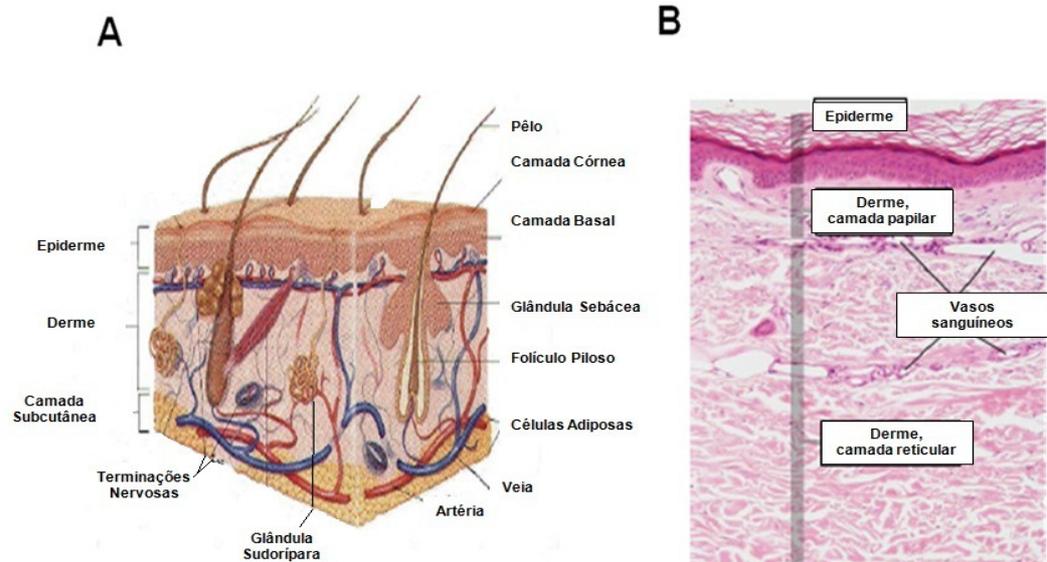
7	CONCLUSÃO.....	115
	REFERÊNCIAS.....	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia e Morfofisiologia da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, podendo atingir até 16% do peso corporal. Apresenta-se constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Esses dois tecidos celulares são justapostos e intimamente unidos. Abaixo da derme localiza-se a hipoderme, que serve de suporte e união com os tecidos adjacentes (Figura 1). A pele, juntamente com os seus apêndices (pêlos, glândulas sudoríparas e sebáceas) constitui um órgão complexo responsável por funções essenciais nos mecanismos homeostáticos, incluindo proteção do organismo contra agressões do meio externo, manutenção do equilíbrio hídrico, termo-regulação, absorção, resposta imunológica, detecção sensorial, cicatrização entre outras (BARTHEL; ABERDAM, 2005; CLARK *et al.*, 2007).

Figura 1 – Camadas da pele



(A) Representação esquemática das camadas da pele. (JOHNSON, 2003). **(B)** Corte histológico da pele humana corado pelo método de Hematoxilina-eosina; aumento de 400x.

Epiderme

A epiderme é composta de células epiteliais e forma a camada protetora externa da pele, não contém vasos sanguíneos ou terminações nervosas, além de receber nutrientes por difusão a partir dos vasos sanguíneos presentes na derme. (EDWARDS, 2005; HABIF, 1996; SOUTO *et al.*, 2006). Sua espessura e estrutura variam de acordo com a região do corpo. A pele é mais espessa na palma das mãos e na sola dos pés, onde a epiderme é constituída de cinco camadas celulares (germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea), com células sendo produzidas na camada germinativa (mais profunda) para formar os queratinócitos e movendo-se através das outras camadas em direção à camada córnea (superficial) (ABRAHAMS; CRAVEN; LUMLEY, 2005; EDWARDS, 2005). Este processo de diferenciação epidérmica é influenciada por meio de fatores de crescimento (EGF, TGF- α , TGF- β , KGF, GM-CSF), interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8), vitamina A, retinóides e chalonas (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

Derme

A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo vascular sobre a qual a epiderme esta firmemente apoiada em sua porção superior. Nesta camada situam-se os vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, ductos sudoríparos, glândulas sebáceas alveolares e músculos eretores do pêlo, ligados aos folículos pilosos. (ABRAHAMS; CRAVEN; LUMLEY, 2005; EDWARDS, 2005; HABIF, 1996; REHDER *et al.*, 2004). A derme é constituída por duas camadas distintas, a camada papilar (superior) e a camada reticular (inferior). A camada papilar ou derme papilar localiza-se próxima à epiderme e é constituída por um tecido conjuntivo frouxo, formando uma série de ondulações denominadas papilas dérmicas (EDWARDS, 2005). A camada reticular ou derme reticular estende-se da base da camada papilar ao tecido subcutâneo. Constituída de tecido conjuntivo denso é composta por fibras espessas de colágeno em uma organização semelhante a uma malha com direção preferencial. Não se observa delimitação definida entre derme papilar e reticular, uma vez que a mudança em tamanho nas fibras de colágeno ocorre de forma gradual entre as duas camadas (WYSOCKI, 2012). Entretanto, esta organização é

importante para a identificação da direção preferencial da contração cutânea após uma lesão (ARNOLD *et al.*, 1994; IRION, 2005). As células existentes na derme são classificadas como residentes, tais como os fibroblastos, macrófagos, mastócitos e, ainda, células transitórias como neutrófilos, linfócitos e monócitos. Encontrados na circulação sanguínea, extravasam para o tecido quando ocorre reação inflamatória em resposta a trauma ou infecção (EDWARDS, 2005).

Tecido celular subcutâneo (Hipoderme)

O tecido subcutâneo é a camada mais profunda da pele, formada principalmente por tecido adiposo. Ancora a pele aos músculos e se espessa quando o indivíduo ganha peso. Constitui uma fonte de triglicérides para o corpo e conseqüentemente é uma fonte de energia. As funções desta camada incluem prevenção da perda calor pelo corpo e proteção dos órgãos internos (BARANOSKI; AYELLO, 2004; EDWARDS, 2005).

A perda da integridade da pele, atingindo a camada epidérmica e pelo menos a derme papilar, alterando a estrutura anatômica e/ou fisiológica dos tecidos afetados, resulta na formação de úlcera, que pode resultar em desequilíbrio fisiológico substancial ocasionando desabilidade significativa ao paciente ou até mesmo óbito (CLARK *et al.*, 2007).

1.2 Úlceras cutâneas

Úlcera ou ferida cutânea é representada pela interrupção da continuidade anatômica da pele (envolvendo epiderme e/ou derme), em maior ou em menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica que aciona de imediato as frentes da defesa orgânica para o reparo (ARNOLD, 1994; KOKANE, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2009).

Dentre as patologias mais freqüentes, feridas continuam a ser um desafiador problema clínico, com complicações iniciais e tardias, apresentando uma freqüente causa de morbidade e mortalidade. Na tentativa de reduzir esta problemática, muito esforço tem-se centrado na compreensão da fisiologia e tratamento de feridas com

ênfase em novas abordagens terapêuticas e no contínuo desenvolvimento de tecnologias para os cuidados de feridas cutâneas (VELNAR *et al.*, 2009).

Poucos são os estudos epidemiológicos sobre úlceras, entretanto estes vêm aumentando de acordo com o aumento da expectativa de vida da população mundial, tornando-se mais freqüente na prática médica. Úlceras que não cicatrizam, principalmente em pacientes idosos, podem tornar-se crônicas por anos e até mesmo levar estes pacientes a óbito. Os altos custos dos tratamentos de patologias relacionadas à deficiência cicatricial aumentam a importância dos estudos em busca de novas alternativas de curativos capazes de interagir com o tecido lesado, tendo por objetivo acelerar o processo (MENKE *et al.*, 2008; JAUL, 2009).

A maioria dos casos de úlcera é causada por isquemia secundária a estase venosa, diabetes *mellitus* e pressão da pele (BROD, 1998; CLARK *et al.*, 2007). Dados provenientes de estudos nos Estados Unidos informam que 15,5% da população mundial com idade superior a 30 anos é composta de diabéticos, dos quais cerca de 15% desenvolvem úlceras de difícil cicatrização ao longo da vida, principalmente, nos membros inferiores. Assim, 6% das internações hospitalares relacionadas aos diabéticos são conseqüência dessas úlceras e, em caso de amputação, o tempo médio de internação é cerca de três semanas. Esses casos geram para os sistemas de saúde custo extra que varia de U\$ 8.000 a U\$ 12.000/paciente. Fora constatado que cerca de 40 a 68% dos pacientes que sofreram amputação vão a óbito em cinco anos (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

No Brasil, um alto índice de pessoas são acometidas com alterações na integridade da pele, independente do sexo, idade ou etnia, constituindo assim, um sério problema de saúde pública. Porém, poucos são os dados estatísticos que comprovem este fato, devido os registros desses atendimentos serem escassos. Entre os diversos tipos de lesões, conforme o manual de condutas para úlceras neutróficas e traumáticas (2002), as mais frequentes encontradas nos serviços de atenção primária à saúde são as úlceras dos tipos venosas, arteriais, pressão e neurotróficas, geralmente, comuns em algumas patologias que acometem o sistema nervoso periférico, como a hanseníase, o alcoolismo e o diabetes mellitus, doenças endêmicas no Brasil.

Dentre as inúmeras moléstias crônicas, a morbidez dessas doenças requer do paciente portador de feridas crônicas conviver com o tratamento longo e rigoroso, com sucessivas internações hospitalares e realização de várias trocas de curativos diariamente, o que em conjunto, afeta negativamente a sua vida e de seus familiares (PETUCO; MARTINS, 2006).

Durante a internação desses pacientes portadores de ferida é possível a instalação de vários estigmas, levando o doente à marginalização por parte dos outros pacientes e até mesmo dos familiares e amigos. A lesão por apresentar secreção com odor fétido, comprometendo à imagem corporal, resulta em isolamento social, evidenciando assim a importância da intervenção terapêutica na melhoria da qualidade de vida dos pacientes (JAUL, 2009; MENKE *et al.*, 2007; SALOME; 2010).

As feridas podem ser classificadas de acordo com diversos critérios, sendo o tempo necessário para que haja a restauração da integridade anatômica e funcional da pele um fator importante na classificação clínica. Como consequência de um trauma ou procedimentos cirúrgicos, as feridas que cicatrizam de forma ordenada e em tempo hábil (5-10 dias ou dentro de até 30 dias) são classificadas clinicamente como agudas (BISCHOFF; KINZL; SCHMELZ, 1994; DOUGHTY; SPARKS-DeFRIESE, 2012; MENKE *et al.*, 2007; ROBSON; STEED; FRANZ, 2001). Entretanto, quando a evolução do processo cicatricial ocorre de forma retardada, incompleta e não progride de maneira ordenada, ocasionando resultados anatômicos e funcionais insatisfatórios, as feridas são classificadas como crônicas. Embora o período de tempo não esteja claramente definido pela literatura, são consideradas úlceras crônicas aquelas cuja cicatrização ocorreu em um tempo superior a 06 semanas (ROLDÁN-MARÍN *et al.*, 2009; SHAI; MAIBACH, 2005). Estas podem ser resultado de várias causas, incluindo neuropatias, insuficiência venosa ou arterial, queimaduras, vasculites, inflamação crônica ou agressões repetitivas ao tecido (KOMARCEVIC *et al.*, 2000; MENKE *et al.*, 2007; ROLDÁN-MARÍN *et al.*, 2009).

1.3 Cicatrização

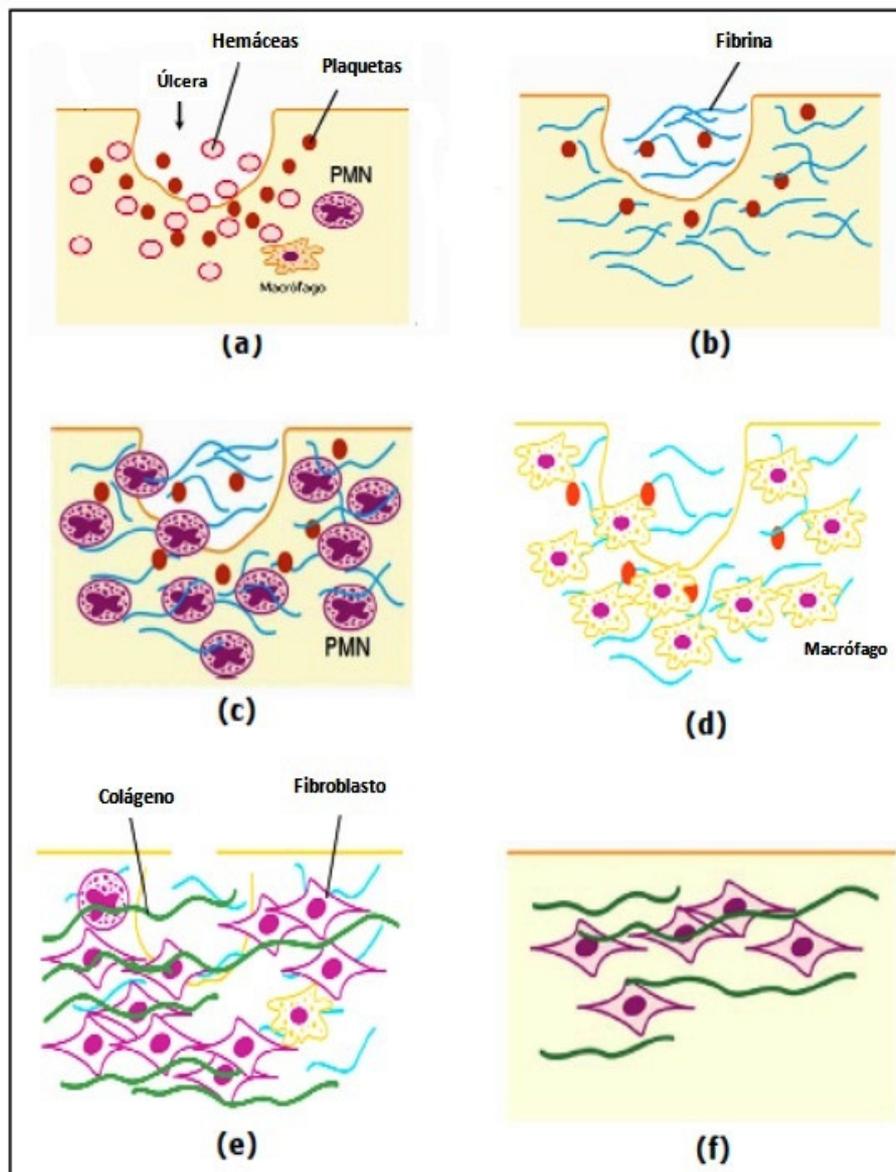
O processo de cicatrização é um evento biológico dinâmico e multifatorial, que envolve uma complexa série de eventos sobrepostos, com a participação de elementos celulares e/ou extracelulares específicos. Sabe-se que o equilíbrio entre mediadores estimulatórios e inibitórios durante o processo de cicatrização é essencial para alcançar a homeostasia após a lesão e restauração da função e continuidade anatômica da pele (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006a; EMING *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2007; VELNAR *et al.*, 2009). Em virtude da sobreposição de eventos que ocorrem ao longo do processo cicatricial e das características distintas que são observadas em cada etapa, o processo cicatricial pode ser didaticamente dividido em quatro fases: **hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento** (GURTNER *et al.*, 2008) (Figura 2).

Hemostasia

Após lesão do tecido e rompimento dos vasos sanguíneos, inicia-se o extravasamento sanguíneo que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; WERNER *et al.*, 2003). As plaquetas se aderem às fibras de colágeno expostas no endotélio lesado por meio de receptores específicos (glicoproteínas - GPIIb/IX/V), em seguida são ativadas, liberam seu conteúdo granular e, conseqüentemente estimulam a ativação local dos fatores da coagulação plasmática.

As plaquetas liberam não apenas os fatores da coagulação necessários para controlar o sangramento e perda de fluido e eletrólitos, mas também moléculas sinalizadoras (citocinas e fatores de crescimento), que iniciam a resposta cicatricial. Os dois fatores mais importantes são o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator transformador de crescimento-beta (TGF- β). O PDGF inicia a quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos. TGF- β adiciona outro sinal importante para o início da cascata da cicatrização por atrair macrófagos e os estimular a secretar citocinas adicionais incluindo fator de crescimento de fibroblastos (FGF), PDGF, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1-beta (IL-1 β) (DIEGELMANN; EVANS, 2004; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

Figura 2 - Representação das fases do processo cicatricial



(a) Úlcera imediatamente após a lesão tecidual; (b) Hemostasia; (c) Início da fase inflamatória; (d) Fase inflamatória tardia; (e) Fase Proliferativa; (f) Fase de remodelamento (Adaptado de BEANES *et al.*, 2003).

As plaquetas liberam não apenas os fatores da coagulação necessários para controlar o sangramento e perda de fluido e eletrólitos, mas também moléculas sinalizadoras (citocinas e fatores de crescimento), que iniciam a resposta cicatricial. Os dois fatores mais importantes são o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator transformador de crescimento-beta (TGF- β). O PDGF inicia a quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos. TGF- β adiciona outro sinal importante para o início da cascata da cicatrização por atrair macrófagos e os estimular a secretar citocinas adicionais incluindo fator de crescimento de fibroblastos (FGF), PDGF, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1-beta (IL-1 β) (DIEGELMANN; EVANS, 2004; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

As células inflamatórias são quimiotaticamente atraídas ao reservatório de moléculas armazenadas no coágulo, o que inicia a inflamação, a próxima etapa na sequência do processo de cicatrização (BROUGHTON; JANIS, ATTINGER, 2006b; NAGY *et al.*, 2008; RICHARDSON *et al.*, 2004; STOJADINOVIC *et al.*, 2008; VELNAR *et al.*, 2009).

Fase inflamatória

A resposta inflamatória ocorre para conter ou neutralizar o agente causador da lesão. O ambiente no qual inicia-se a inflamação é uma mistura de tecido lesado, componentes do coágulo (plaquetas, células sanguíneas vermelhas, fibrina), proteínas extravasadas do plasma, e material estranho introduzido no momento em que houve a lesão (STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009). A fase inflamatória é caracterizada pelos sinais típicos do processo inflamatório localizado, como dor, rubor, calor e edema, resultado da vasodilatação e da permeabilidade capilar aumentada (BAUM; ARPEY, 2005; MONACO; LAWRENCE, 2003).

No final da fase de hemostasia, ocorre ativação de componentes do sistema complemento por superfícies estranhas, como um implante ou parede celular bacteriana, onde os fragmentos C5a e C3a iniciam eventos moleculares, principalmente o aumento da permeabilidade vascular e infiltração de neutrófilos (STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009). A presença de mastócitos no tecido lesado também contribui para a resposta inflamatória. Por meio da degranulação liberam histamina, proteases, leucotrienos e citocinas, resultando no aumento da

permeabilidade capilar, o que promove a migração de leucócitos (STRONCEK, 2009).

Os neutrófilos começam a se infiltrar na ferida dentro de 24-36h. Este processo é precedido pelo rolamento destes leucócitos ao longo do endotélio vascular. As moléculas de adesão presentes na superfície das células endoteliais como as P-selectinas e E-selectinas, assim como as moléculas de adesão intercelular -1 e 2, são cruciais no processo de rolamento (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007). Essas moléculas interagem com as integrinas presentes na superfície dos neutrófilos incluindo CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (MAC-1), CD11c/CD18 (gp150, 95) e CD11d/CD18. Os neutrófilos recrutados iniciam o desbridamento do tecido lesionado e fagocitose de agentes infecciosos, através da liberação de várias substâncias antimicrobianas, tais como as enzimas proteolíticas estocadas especialmente em grânulos azurofílicos (lisozimas, mieloperoxidase, elastase, catepsinas, hidrolases ácidas, lactoferrina, etc), além de serem expressiva fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO) (FUJIMAKI *et al.*, 2003). Em níveis normais, ROS (radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, oxigênio simples) são de fundamental importância para a síntese protéica, ácidos nucleicos e uma ampla variedade de espécies moleculares, mas em concentrações excessivas promovem elevada ação inflamatória (KARU *et al.*, 1995; SWAIN *et al.*, 2002). Os neutrófilos têm meia vida curta, entram em apoptose dentro de 24 à 48 horas, mas havendo processo infeccioso na lesão a presença dos neutrófilos torna-se mais prolongada podendo comprometer a cicatrização (DIEGELMANN; EVANS, 2004; EMING *et al.*, 2007).

Como parte da resposta inflamatória tardia, em 48 à 72 horas após o ferimento, monócitos são recrutados da circulação sanguínea, favorecido por vários fatores quimiotáticos produzidos pelas plaquetas e neutrófilos, como o fator plaquetário-4 (PF-4), fatores de crescimento (TGF- β 1 e PDGF), citocinas (IL-1 β e TNF- α) e as proteínas quimiotáticas para monócitos 1 (MCP-1) e 2 (MCP-2) (BEANES *et al.*, 2003; FERGUSON, 1999; REICHERT, 2009). Na área da lesão, monócitos ativados se diferenciam em macrófagos, sendo estes considerados a célula regulatória mais importante da reação inflamatória, com papel importante em todas as fases da cicatrização (EMING *et al.*, 2007).

Leibovich e Ross (1975) demonstraram que a depleção de monócitos do sangue e macrófagos do tecido local em cobaias, resulta não somente no grave retardo do desbridamento tecidual, mas também na demora da proliferação de fibroblastos e subsequente fibrose da ferida. Estas células da resposta inflamatória tardia fagocitam, digerem, destroem organismos patogênicos, removem *debris* celulares e neutrófilos remanescentes. Esses processos importantes realizados por monócitos/macrófagos permitem induzir a angiogênese e formação do tecido de granulação (LEWIS *et al.*, 1999). Além disso, macrófagos secretam várias enzimas (como por exemplo, colagenases), citocinas (IL-1 e TNF- α), PDGF e TGF- β que atrairá fibroblastos para a úlcera, além de induzir estas células a produzir colágeno (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006b).

Acredita-se que os macrófagos são mais importantes que os neutrófilos para a resolução satisfatória da inflamação. Estudos em que os neutrófilos foram depletados, o reparo não foi prejudicado, mas quando os macrófagos foram removidos, houve limpeza limitada do tecido necrótico no local da lesão, resultando em processo de cicatrização prolongado (BAUM; ARPEY, 2005; BEANES *et al.*, 2003; DIEGELMANN; EVANS, 2004; GURTNER *et al.*, 2008; STRONCEK, 2009). Entretanto, o conhecimento de como os neutrófilos promove o reparo de feridas ainda é escasso. Em contradição aos estudos que demonstram a pouca participação dos neutrófilos no reparo de feridas, pacientes com doenças caracterizadas pela deficiência da função de polimorfonucleares, tais como a síndrome de deficiência de adesão do leucócito tipo 1 ou condições de alteração na polimerização da actina de polimorfonucleares houve um comprometimento no desfecho do processo cicatricial (EMING *et al.*, 2009; KUIJPERS *et al.*, 1997; ROSS *et al.*, 1993).

A transição da fase inflamatória para fase proliferativa da cicatrização é marcada pela presença de macrófagos ativados na úlcera, visto que estes irão mediar a síntese de óxido nítrico, angiogênese, fibroplasia e colagênese (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006b; DIEGELMANN; EVANS, 2004; EMING *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2007).

Fase proliferativa

A proliferação é a fase responsável pelo fechamento da lesão propriamente dita e tem início geralmente três dias após a lesão. Esta etapa envolve angiogênese, formação de matriz provisória e reepitelização. Os maiores eventos dessa fase são a formação do “tecido de granulação”, devido à aparência granular gerada pelos capilares neoformados (angiogênese), proliferação e migração dos fibroblastos para a lesão (fibroplasia) (BEANES *et al.*, 2003; KARUKONDA *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2007; STADELMANN *et al.*, 1998).

Os fibroblastos, células de origem mesenquimal, são fundamentais na produção da matriz extracelular (MEC). Estas células migram para a lesão valendo-se de alterações morfológicas que possibilitam a expansão de segmentos da membrana celular ao acaso, chamados lamelopódios, que são análogos dos pseudópodos das células epiteliais em migração (CHAN *et al.*, 1992; GIANCOTTI *et al.*, 1990).

A matriz sintetizada pelos fibroblastos é inicialmente composta de fibrinogênio, fibronectina, tenascina e proteoglicanos como o ácido hialurônico (HARDING; PATEL, 2002). Em seguida, os fibroblastos assumem uma nova função que é a de sintetizar proteínas. Gradualmente estas células mudam seu fenótipo migratório para um fenótipo profibrótico, que começa pela dispersão do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi pelo citoplasma até apresentarem-se repletos de novas proteínas, representada principalmente pelo colágeno (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER 2006b; STADELMANN *et al.*, 1998).

A produção de grande quantidade de colágeno nesta fase pode ser explicada pela evidente expressão de TGF- β . Além disso, os fatores de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e epidermal (EGF), liberados principalmente por plaquetas e macrófagos, são os principais sinais para a ativação dos fibroblastos. Assim, os fibroblastos sintetizam colágeno tipo III, contribuindo para a aquisição da resistência tênsil da cicatriz e se diferenciam em miofibroblastos (induzidos pelos PDGF, TGF- β , IL-1 β , TNF α secretado pelos macrófagos) para a contração da lesão (CHAN *et al.*, 2008; HEAD *et al.*, 2006; HORAN *et al.*, 2005; JANIS, 2006; LI *et al.* 2007; OEHMICHEN *et al.*, 2009; ROMANA-SOUZA *et al.*, 2009; STRAMER *et al.*, 2007).

A contração mediada pelos miofibroblastos e a migração de células epiteliais a partir da borda da lesão favorece o fechamento do leito aberto da úlcera. A contração reduzida pode levar ao retardamento da cicatrização, enquanto um excesso e/ou contração prolongada pode resultar em perda de função e cicatriz hipertrófica (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006b; FRADE, 2003; GURTNER *et al.*, 2008; SCHMIDT *et al.*, 2009; STOJADINOVIC *et al.*, 2008). Após o fechamento da úlcera, por volta do décimo dia após o início do processo de reparo, os miofibroblastos sofrem alterações morfológicas desencadeadas por mecanismos sinalizadores, que os levam ao fenômeno de apoptose (STADELMANN *et al.*, 1998; WILLIAMS, 1991)

O colágeno é a proteína mais abundante no reino animal, representa 30% do total de proteínas do corpo humano e 50% do conteúdo protéico da cicatriz. Sintetizado pelos fibroblastos, o colágeno proporciona força, integridade e estrutura. Harrison e Laurent (1993); Shock e Laurent (1996) relataram que o aumento da deposição de colágeno durante a cicatrização de feridas pode ocorrer devido ao aumento da produção de colágeno e também devido ao aumento do número de células produtoras. Se uma quantidade insuficiente de colágeno for depositada, a úlcera e conseqüentemente a cicatriz serão frágeis e podem tornar-se deiscente. Assim, a síntese adequada de colágeno é fundamental para a cicatrização de úlceras cutâneas (CORSETTI *et al.*, 2009; DIEGELMANN; EVANS, 2004; MONACO; LAWRENCE, 2003).

O aumento da atividade celular durante o processo cicatricial causa aumento do metabolismo e uma demanda maior de nutrientes. A deficiência desses nutrientes pode impedir ou dificultar a cicatrização (BROUGHTON; JANIS, 2006b; MACKAY; MILLER, 2003). Assim, a formação de novos vasos (angiogênese) é de grande importância na recuperação do tecido lesado e na formação do tecido de granulação. A angiogênese, neoformação capilar ou neovascularização ocorre na matriz extracelular do leito da ferida com a migração e estimulação mitogênica das células endoteliais, que são elementos protagonistas deste processo (ARNOLD; WEST, 1991). Vasos e capilares lesados fornecem células endoteliais que invadem a matriz provisória da lesão formando um broto. Esses brotos se estendem e conectam a outro capilar para formar uma rede vascular permitindo a circulação do

sangue (BARANOSKI; AYELLO, 2004). Vários fatores de crescimento e citocinas parecem estar envolvidos com a angiogênese, tais como TGF- α , TGF- β , PDGF, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), peptídeo regulador de afinidade da heparina (HARP), dentre outros (ARNOLD; WEST, 1991).

A restauração da epiderme inicia-se em poucas horas após o surgimento da lesão. A injúria na pele representa um estímulo inicial à migração de células epiteliais ao leito da ferida (SANTORO; GAUDINO, 2005). Este processo denominado de reepitelização é representado pela migração e proliferação de queratinócitos da epiderme adjacente para a área da lesão. Além disso, ocorre a diferenciação do novo epitélio em epiderme estratificada e a restauração da membrana basal, que conecta a epiderme com a derme subjacente (LI *et al.*, 2007).

Os queratinócitos utilizam seus receptores de integrina para interagir com a matriz provisional rica em fibronectina, fibrina e colágeno tipo V. Esses receptores interagem com as moléculas de colágeno neoformado na lesão regulando a direção da migração dos queratinócitos. Neste processo de restauração do epitélio, plaquetas e macrófagos ativados produzem EGF, TGF- α e TGF- β , que estimulam a proliferação epitelial. Além disso, citocinas produzidas na fase inflamatória, tais como IL-1 β e TNF- α estimulam fibroblastos a sintetizar e secretar os fatores de crescimento de queratinócitos 1(KGF-1), 2 (KGF-2) e IL-6, os quais estimulam os queratinócitos vizinhos proliferarem e se diferenciarem para formar um novo epitélio, cujo resultado final é o fechamento da úlcera (BAUM; ARPEY, 2005; BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006b; MONACO; LAWRENCE, 2003; LI *et al.*, 2007; STOJADINOVIC *et al.*, 2008).

Fase de remodelação

Nesta fase do processo cicatricial há uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal. Os macrófagos começam a desaparecer junto à redução da angiogênese e proliferação de fibroblastos, ou seja, a redução gradual da celularidade e vascularidade são observadas nesta etapa. Além disso, através da ação de collagenases ocorre um equilíbrio entre formação de colágeno novo e

degradação de colágeno velho (BARANOSKI; AYELLO, 2004; KARUKONDA *et al.*, 2000).

As principais citocinas envolvidas nesta fase são TNF- α , IL-1 β , PDGF, TGF- β produzidas pelos fibroblastos, além das que são produzidas pelas células epiteliais, tais como EGF e TGF- β (KARUKONDA *et al.*, 2000). Estes mediadores regulam a produção de metaloproteinases de matriz (MMPs), que incluem colagenases intersticiais, colagenase tipo IV e gelatinases e de inibidores teciduais de metaloproteinases (STOJADINOVIC *et al.*, 2008).

A matriz provisória, composta por colágeno tipo III, proteoglicanos e fibronectina é repostada por uma matriz mais espessa, resistente e organizada, composta por colágeno tipo I (DOUGHTY; SPARKSDeFRIESE, 2012; GURTNER *et al.*, 2008). A homeostase entre síntese e degradação de colágeno tem por objetivo restaurar a estrutura tecidual original (ABREU; MARQUES, 2005; CORSETTI *et al.*, 2009).

Na derme não sujeita ao processo cicatricial, o colágeno tipo I é mais abundante que o colágeno tipo III, porém durante as fases precoces da cicatrização de feridas, ocorre um predomínio do colágeno III sintetizado pelos fibroblastos no tecido de granulação. Após período de um ano ou mais, a derme gradualmente retorna ao fenótipo pré-lesão estável, ocorrendo uma predominância do colágeno tipo I (LI *et al.*, 2007). O colágeno da cicatriz, mesmo após um ano de maturação, não será tão organizado quanto o colágeno encontrado na pele não lesada. A força tênsil (uma avaliação funcional do colágeno) de um tecido cicatricial alcança um nível máximo de 70% a 80% da força pré-lesão (BARANOSKI; AYELLO, 2004; BROUGHTON; JANIS, 2006; LI *et al.*, 2007; STADELMANN *et al.*, 1998).

1.4 Látex e laticíferos

O termo látex é freqüentemente utilizado para descrever um líquido, geralmente de aspecto leitoso, liberado pelas plantas quando estas sofrem algum tipo de injúria, seja por dano mecânico ou por ataque de herbívoros (KEKWICK, 2001). Embora, o látex na maioria das vezes apresente aspecto leitoso, este fluido também pode apresentar aspecto amarelado, laranja, incolor ou ainda marrom

(PICKARD, 2008). Nas plantas, o látex encontra-se dentro de células ou fileiras de células especializadas denominadas de laticíferos. Considerando seus aspectos anatômicos, dois tipos distintos de laticíferos podem ser observados. Os laticíferos articulados são formados por células seqüenciais interconectadas por perfurações em suas paredes celulares. Os laticíferos não articulados são formados por uma única célula alongada que se desenvolve nos espaços intercelulares (AGRAWAL; KONNO, 2009).

Plantas laticíferas

A produção de látex ocorre em mais de 12.500 espécies de plantas distribuídas entre mais de 900 gêneros, compreendendo aproximadamente 22 famílias (HAGEL *et al.*, 2008). A maioria das plantas produtoras de látex pertence às famílias Euphorbiaceae (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1987b) e Apocynaceae (BROCKBANK; LYNN, 1979), embora plantas pertencentes a outras famílias também produzam esta substância (DELTA, 1982).

Dentre a diversidade de plantas laticíferas, a mais conhecida é a seringueira (*Hevea brasiliensis*), uma árvore nativa da Amazônia. A borracha produzida por esta planta é amplamente utilizada pela indústria para produção de vários utensílios tais como luvas, brinquedos, bicos de mamadeira, chupeta, balões de festa, preservativos, entre outros (SUSSMAN *et al.*, 2002). Como o látex de *H. brasiliensis* é intensamente explorado por apresentar valor comercial, a maior parte dos estudos bioquímicos já desenvolvidos com fluidos laticíferos se refere ao látex desta planta. A maioria destas pesquisas restringiu-se a estudar proteínas envolvidas em processos indutores de alergia em pessoas submetidas a contínuo contato com utensílios produzidos com seu látex (KIMATA, 2005; POSCH *et al.*, 1997; SUSSMAN *et al.*, 2002).

Calotropis procera (Ait.) R. Br.

A planta *Calotropis procera* pertence à família Apocynaceae onde estão inseridas mais de 2.000 espécies em aproximados 280 gêneros. Esta planta é originária da Ásia e África e, atualmente, encontra-se disseminada pelas regiões

tropicais do planeta como, por exemplo, na América do Sul. É uma planta arbustiva, podendo chegar a atingir entre 3 e 4 metros de altura. Apresenta como característica peculiar uma intensa produção de látex branco que flui abundantemente quando se rompem os tecidos, principalmente nas partes verdes da planta (LORENZI; MATOS, 2002). No estado do Ceará, esta planta é conhecida popularmente pelos nomes de Hortêncica, Ciúme ou Flor-de-seda (Figura 3).

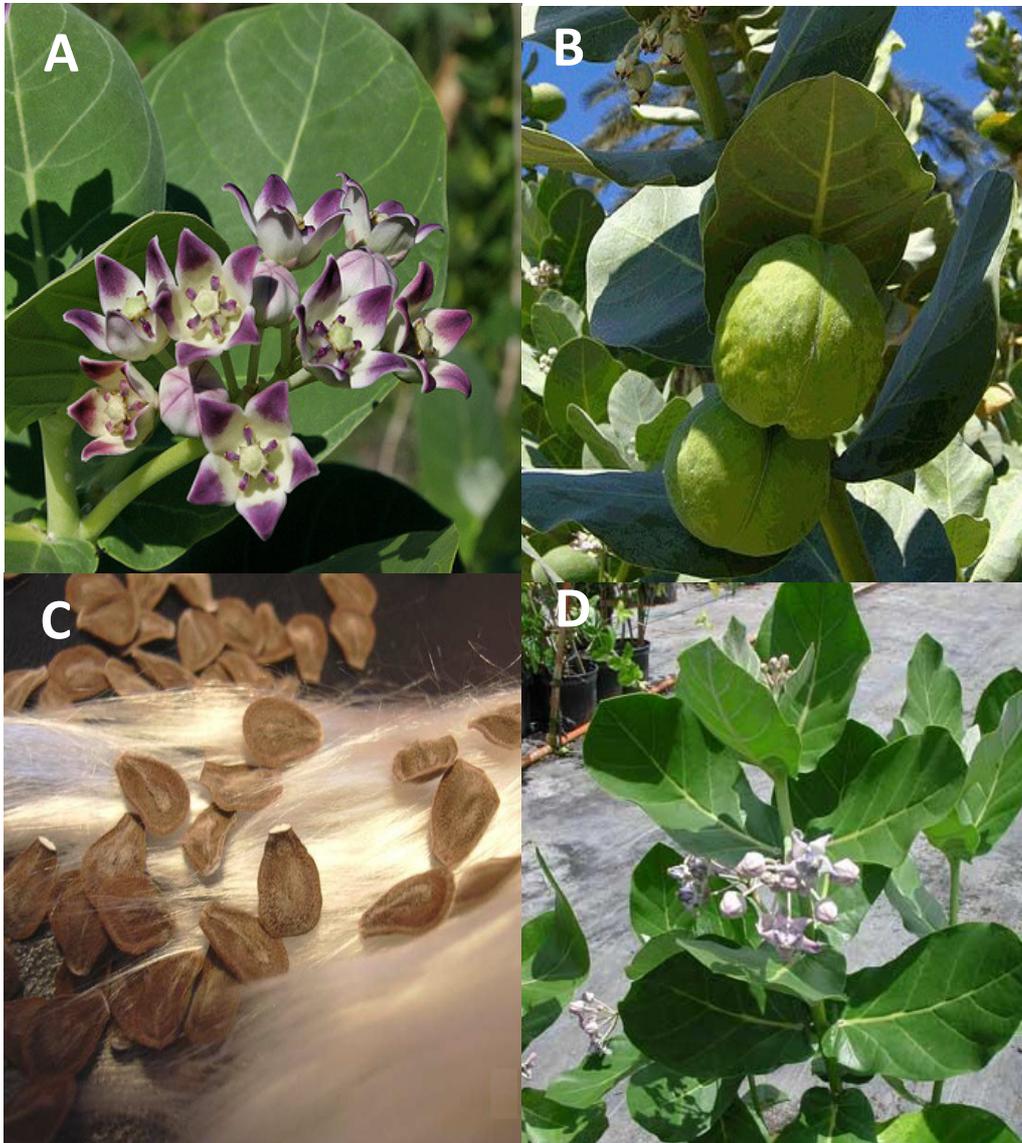
Composição química do látex

Por ser o conteúdo de células especializadas, os fluidos laticíferos apresentam em sua constituição carboidratos, lipídeos e proteínas (MORCELLE *et al.*, 2004). Neste fluido também já foram encontrados metabólitos secundários tais como poliisopreno, alcalóides, cardenólídeos, compostos fenólicos, terpenos, taninos e flavonóides (AGRAWAL; KONNO, 2009).

Dentre a grande variedade de proteínas já identificadas no látex de plantas temos beta-1,3-glucanases (CHEYE; CHEUNG, 1995), lisozimas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) (GIORDANI; LAFON, 1993), lectinas, quitinases (JEKEL *et al.*, 1991), amilases (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1987a), inibidores de proteinases (ARCHER, 1983; SRITANYARAT *et al.*, 2006), oxidases (AGRAWAL; KONNO, 2009) dentre outros. Mais de 110 plantas produtoras de látex distribuídas em diferentes famílias são conhecidas por apresentar atividade proteolítica. Estas são pertencentes à classe das proteinases cisteínicas, serínicas e aspárticas (DOMSALLA; MELZIG, 2008).

A análise por eletroforese bidimensional do látex de *H. brasiliensis* revelou a presença de mais de duzentos polipeptídeos, dos quais vários são enzimas (POSCH *et al.*, 1997; KEKWICK, 2001). Além disso, foi relatada a ocorrência de proteases do tipo serínicas nesta planta (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1986).

Figura 3 - Aspectos gerais da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.



A: Inflorescência; **B:** Fruto globoso; **C:** Sementes ligadas a fios de seda; **D:** Planta jovem de *C. procera* (EIN GEDI, 2009).

No látex de *Calotropis procera*, várias moléculas também já foram identificadas. Em análises químicas dos extratos brutos do látex de *C. procera*, diversos compostos têm sido identificados, tais como cardenolídeos ativos, enzimas proteolíticas, alcalóides e carboidratos (SEIBER *et al.*, 1982), além de esteróides, terpenos e carbonatos orgânicos (GALLEGOS-OLEA *et al.*, 2002). Além disso,

proteínas do tipo cisteínica, quitinases e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo vegetal foram detectadas (FREITAS *et al.*, 2007). Recentemente, duas proteases cisteínicas (DUBEY; JAGANNADHAM, 2003; SINGH *et al.*, 2010) e uma osmotina (FREITAS *et al.*, 2011) foram identificadas no látex de *C. procera* e Ramos *et al.* (2010) detectaram a presença de proteína com atividade de inibidor de papaína.

A diversidade molecular encontrada nos diversos fluidos laticíferos estudados sugere que este tecido especializado deve estar ativamente envolvido em eventos biológicos distintos no vegetal. Estes eventos vão desde o acúmulo de carbonos nos polímeros de isopreno utilizados para a síntese de borracha, até em aspectos defensivos traduzidos pela ocorrência de diversas proteínas relacionadas aos mecanismos de defesa de plantas contra pragas e patógenos (KEKWICK, 2001). Esta diversidade molecular ainda pode estar estreitamente relacionada com eventos toxicológicos e até letais observados para mamíferos que se alimentam de folhas da *C. procera* (BADWI *et al.*, 1998).

Potencial farmacológico da planta Calotropis procera

Calotropis procera é uma planta bem conhecida e bastante utilizada na medicina popular, principalmente na Índia, por apresentar diversas propriedades curativas (WARRIER *et al.*, 1994). No Ceará, o látex desta planta é utilizado pela população de baixa renda sendo aplicado sobre doenças bacterianas e fúngicas de pele. Dentre a diversidade das atividades farmacológicas relevantes desta planta, grande parte desta está relacionada ao seu látex.

Estudos mostram que o produto da extração do látex íntegro de *C. procera* com solvente orgânico possui atividade antibacteriana (SHUKLA; KRISHNAMURTI, 1961; LARHSINI *et al.*, 1997), molusquicida (HUSSEIN *et al.*, 1994) e esquistossomicida (SHARMA; SHARMA, 2000). Ensaio preliminares revelaram que o extrato orgânico apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* (SEHGAL *et al.*, 2005).

A aplicação tópica diária do látex íntegro extraído com água reduziu a área de feridas induzidas no dorso de animais, sugerindo que o látex de *C. procera* apresenta ação cicatrizante (RASIK *et al.*, 1999). A mesma preparação, quando

administrada por via oral, apresentou efeito antipirético (LARHSINI *et al.*, 2002) e foi capaz de reduzir a diarreia em ratos induzida pela ingestão de óleo de mamona (KUMAR *et al.*, 2001), inibiu a inflamação induzida por Carragenina (KUMAR; BASU, 1994) e reduziu as contorções abdominais induzida por ácido acético (DEWAN *et al.*, 2000). Entretanto, dependendo da via de administração, o extrato aquoso deste látex induz processos pró-inflamatórios em animais (SINGH *et al.*, 2000; SHIVKAR; KUMAR, 2003). Com relação às propriedades farmacológicas acima citadas, é importante destacar que os estudos foram conduzidos utilizando extratos aquosos e/ou orgânicos obtidos de uma preparação íntegra do látex onde pouca ou nenhuma caracterização bioquímica das moléculas envolvidas nos eventos farmacológicos observados foi realizada. Alguns destes resultados são atribuídos a compostos orgânicos do metabolismo secundário produzidos pela planta e não há descrições sobre o envolvimento de suas proteínas. Assim, embora uma riqueza de atividades tenha sido observada em estudos exploratórios, a identificação de princípios ativos é ausente.

Por outro lado, alguns trabalhos demonstram o potencial farmacológico de proteínas do látex de *C. procera* (PL). Nesses estudos, uma fração rica em proteínas solúveis em água (PL), livre em borracha e compostos com massa molecular inferior a 8.000 Da foi utilizada. Ficou determinado que as proteínas do látex exibiram atividade anti-inflamatória quando avaliadas em diferentes modelos animais (ALENCAR *et al.*, 2004; ALENCAR *et al.*, 2006) e apresentaram ação analgésica de forma dose-dependente (SOARES *et al.*, 2005). Esses achados dão suporte à utilização do látex por populares como instrumento para combater a dor de dente, sendo aplicado através de cotonete embebido com o látex sobre o dente afetado.

Proteínas do látex (PL) de *C. procera* também foram investigadas quanto à capacidade de inibir os efeitos letais provocados no curso de uma infecção bacteriana sistêmica induzida por *Salmonella enterica* sorotipo *Typhimurium* utilizando camundongos. Neste trabalho, foi observado que enquanto 100% dos animais infectados por *S. Typhimurium* morreram em 7 dias, os animais tratados com PL permaneceram protegidos por tempo indefinido. A análise do perfil celular e bioquímico sanguíneo revelou que PL apresentou ação imunoestimulante, evitando a leucopenia provocada pela infecção bacteriana. PL protegeu os animais da

infecção bacteriana por um mecanismo de ação indireto já que PL não apresentou ação *in vitro* contra *S. Typhimurium* (OLIVEIRA, 2009; LIMA-FILHO *et al.*, 2010).

Após identificação da presença de atividade antiinflamatória, a fração protéica do látex foi submetida ao fracionamento em coluna de CM-Sepharose em pH 5,0 e os picos obtidos (PI, PII e PIII) foram testados em modelos animais. Como resultado, foi interessante observar que os três picos apresentaram atividade antiinflamatória, mas somente PI induziu intensa produção de óxido nítrico, uma molécula envolvida no processo de migração celular na resposta inflamatória, que em alta quantidade no soro inibe a diapedese. Neste estudo, considerável avanço foi realizado quanto à identificação de moléculas envolvidas em eventos farmacológicos promovidos pelo látex e quanto à observação de que diferentes proteínas do látex desempenham suas atividades através de mecanismos distintos (RAMOS *et al.*, 2009).

Na literatura, relatos de eventos toxicológicos e até letais são observados quando o látex de *C. procera*, na sua forma íntegra, é dado por via oral a mamíferos (EL-BADWI *et al.*, 1998). Por outro lado, animais que receberam PL durante 35 dias consecutivos não apresentaram mudanças nos parâmetros bioquímicos sanguíneos, renais e hepáticos, mantendo-se rigorosamente similares aos do grupo controle (RAMOS *et al.*, 2006). A administração diária da fração protéica do látex não promoveu morte dos animais e nem ocasionou rejeição ao consumo da amostra. Toxicidade aguda não foi registrada durante o período experimental (RAMOS *et al.*, 2006). Neste contexto, proteínas do látex parecem ser excelentes candidatas a estudos de propriedades farmacológicas já que, até o momento, não foram observadas alterações fisiológicas negativas nos animais que receberam a fração.

1.5 Biomateriais

A elaboração de biomateriais que sejam capazes de fornecer um suporte biomimético e estrutural para células vivas é o principal objetivo da pesquisa de engenharia tecidual devido à grande incidência de pessoas com lesões de pele como queimaduras e úlceras (LAMMERS *et al.*, 2009; SELIKTAR, 2005). Para o desenvolvimento de biomateriais que possibilitem a integração entre células e membranas sintéticas, destinados à uma variedade de aplicações biomédicas,

algumas de suas propriedades são muito importantes, tais como: biocompatibilidade; não ser citotóxico; biodegradabilidade e biomecânica apropriada, que são as propriedades mecânicas necessárias para sua utilização biológica (CHUANG *et al.*, 1999; GRIFFITH, 2002; RATNER *et al.*, 2004).

Atualmente, observa-se que o conceito de biocompatibilidade evoluiu e não mais se supõe que materiais biocompatíveis devam ser absolutamente inertes ou inócuos, mas que as respostas induzidas ao organismo hospedeiro sejam controláveis. A biocompatibilidade dos biomateriais é avaliada principalmente pela reação do tecido onde é usada em relação ao biomaterial. Os biomateriais podem ser classificados como bioinertes ou bioativos. Bioinertes são materiais que não desempenham nenhuma atividade no hospedeiro quando implantados, enquanto que os bioativos estimulam a uma resposta desejada. O material biocompatível ideal, utilizado como indutor da cicatrização de feridas deveria ser bioativo, induzindo o estímulo a todas as fases da cicatrização e cessando sua atividade após o término do mesmo, além de ser reabsorvível, não sendo necessário uma segunda etapa cirúrgica para a remoção do biomaterial. Também é importante salientar que os produtos decorrentes da sua reabsorção não deveriam interferir no processo de cicatrização (CHESTER, 1987; LALOR *et al.*, 2011; WILLIAMS, 1987).

Uma biomembrana produzida a partir do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* (BLN) tem sido utilizada como curativo no tratamento de úlceras crônicas em humanos (FRADE *et al.*, 2004; 2006). Vários modelos experimentais têm sido feitos com o intuito de estudar a atividade cicatrizante da BLN em diferentes condições. Mrué (2000) evidenciou que uma prótese de BLN favorece a cicatrização de paredes esofágicas de cães com lesões experimentais, atuando como indutora da neoangiogênese e reepitelização. Além disso, essa biomembrana mostrou-se eficaz em acelerar a cicatrização de queimaduras induzidas no dorso de porcos da raça Nilo (ARMANI; COUTINHO-NETTO, 2001). Quando utilizada em cirurgias de meringoplastia para a neoformação de membrana timpânica, confere um índice de sucesso de 98% (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Nas pterigioplastias, em substituição ao clássico curativo com membrana amniótica humana, favorece a substituição da área excisada com um novo epitélio (COUTINHO-NETTO; MRUÉ, 2003), além da eficácia na reconstrução da conjuntiva de córneas de coelho (PINHO *et al.*, 2004).

Um dos mais importantes fatores na evolução da biocompatibilidade de um material é sua aceitação pelo hospedeiro, obtendo uma resposta inflamatória que deve assemelhar-se com o processo de cicatrização normal (MRUÉ *et al.*, 2004). Massuda; Oliveira (2005) estudaram um modelo de colesteatoma com perfuração intencional na membrana timpânica de ratos seguida da introdução da BLN. Observou que a presença de BLN favorece o recrutamento de leucócitos e debridamento local, além de provocar aumento da produção de citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8) e fatores de crescimento pelas células inflamatórias. Mais recentemente foi demonstrado, comprovando o exposto acima, a eficácia de BLN em induzir a neoformação tecidual na cicatrização de feridas incisionais experimentais, sugerindo que este efeito está especialmente relacionado à sua participação na fase inflamatória do processo cicatricial (ANDRADE *et al.*, 2011) e que parece ter proteínas envolvidas nestes efeitos (SILVA-PITZ, 2011).

Em relação aos polímeros sintéticos utilizados em preparações de matrizes, o PVA é uma das primeiras macromoléculas sintéticas testadas para produzir matrizes esponjosas para regeneração de tecidos. De fato, o poli (álcool vinílico) (PVA) também representa um dos mais atrativos polímeros sintéticos biomédicos devido à combinação de qualidades tais como biocompatibilidade, biodegradável, além de não mutagênico, atóxico e, quando na forma de membrana possui excelente transparência e consistência macia (BERGER *et al.*, 2004; COSTA JR; MANSUR, 2007; ISENBERG; WONG, 2006; SUNG *et al.*, 1999; YANG, *et al.*, 2010; YUO *et al.*, 2007).

Com a sua excelente capacidade de formação de filmes, PVA é um bom candidato para obtenção de membranas e hidrogéis. Os polímeros formados por ele têm grande aplicação como sistema de liberação de fármacos (AZEVEDO, 2002; SUNGA *et al.*, 2010). Como o PVA é uma substância bioinerte, este tem sido muito estudado devido às propriedades anteriormente mencionadas.

O PVA é freqüentemente combinado com moléculas naturais que possam ser reconhecidas pelas células favorecendo uma adesão preliminar e conseqüentemente a subsequente colonização de matrizes (AWAD *et al.*, 2004; MOSCATO *et al.*, 2008). Geralmente, polímeros sintéticos não possuem uma superfície química que é familiar às células; assim, a adição de polímeros biológicos

como o colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos, indubitavelmente melhoram o reconhecimento de matrizes pela interação celular (SHIN *et al.*, 2003; SIONKOWSKA, 2011). Em relação às moléculas geralmente combinadas com polímeros sintéticos, a gelatina representa uma proteína natural derivada da desnaturação do colágeno, que mantém muitos grupos funcionais úteis à adesão celular, que de fato, permite uma interação molecular com células e reduz a natureza hidrofóbica de muitos materiais sintéticos, favorecendo o ataque celular (AWAD *et al.*, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

A pele sofre lesões por meio da exposição a agentes químicos, físicos e biológicos de diversos tipos ocorridos facilmente. Doenças como diabetes, esclerose sistêmica, hanseníase e anemia também causam sérios prejuízos ao tegumento, e, sendo consideradas doenças crônicas, além de interferir na qualidade de vida da população, eleva os gastos públicos, diante da necessidade de tratamentos prolongados (CRAECKER *et al.*, 2008; JAUL, 2009; SALOME, 2010). Desta forma, as pesquisas desenvolvidas na compreensão dos fatores envolvidos com o processo de reparação tissular e, simultaneamente na descoberta e elaboração de novos biomateriais, são importantes para aprimorar o tratamento de pacientes com lesões de pele.

Diversos tipos de curativos estão disponíveis no mercado para o tratamento de feridas, os quais podem ser encontrados nas mais variadas formas, desde a simples cobertura com gazes até os mais complexos, os chamados curativos bioativos (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; SHAI; MAIBACH, 2005). Tendo em vista as características próprias do que é considerado o “curativo ideal” para feridas e a diversidade de opções existente no mercado, torna-se desafiadora a decisão entre os profissionais de saúde e instituições quanto à melhor escolha, considerando que a maioria dos produtos disponíveis é de alto custo, o que torna inviável nos países subdesenvolvidos. Neste sentido, torna-se necessário a busca de novos recursos, com menor custo, eficácia e acessíveis à população.

Assim, como a biomembrana do látex da seringueira *Hevea brasiliensis*, a qual vem sendo utilizada como uma alternativa promissora em pacientes com feridas crônicas, acreditamos que este estudo possa sugerir uma nova aplicação biotecnológica, de baixo custo, para as proteínas do látex de *C. procera* como substâncias úteis no tratamento de feridas cutâneas.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi elaborar e avaliar o efeito de uma biomembrana de proteínas do látex de *C.procera*, associada a um polímero, o poli (álcool vinílico) (BioMem PVA/PL) sobre o processo cicatricial de feridas experimentais incisionais e excisionais. Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Produzir a biomembrana e avaliar suas propriedades físico-químicas;
- ✓ Investigar se há um efeito citotóxico das proteínas do látex de *C.procera* em neutrófilos humanos cultivados;
- ✓ Avaliar macroscopicamente o efeito da BioMem PVA/PL em feridas incisionais e excisionais;
- ✓ Analisar o efeito da BioMem PVA/PL na vascularização ao tecido neoformado de feridas incisionais;
- ✓ Analisar microscopicamente o efeito da BioMem PVA/PL na fase inflamatória e proliferativa de feridas incisionais e excisionais;
- ✓ Investigar o efeito da BioMem PVA/PL na liberação de marcadores (MPO) e mediadores inflamatórios (óxido nítrico, TNF- α e IL-1 β);
- ✓ Avaliar o efeito da fração protéica de *C.procera* (PL) na liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos cultivados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento da fração proteica do látex da planta *Calotropis procera* (Ait) R. Br.

As proteínas utilizadas nesse trabalho foram extraídas do látex da planta *Calotropis procera* (Ait) R. Br. (Apocynaceae). Esta espécie vegetal foi identificada pelo Prof. Dr. Edson de Paula Nunes, taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde o exemplar de exsicata N. 32.663 foi depositado.

Este arbusto foi facilmente encontrado em várias localidades da cidade de Fortaleza, principalmente na área litorânea. A coleta do látex foi realizada no período da manhã, entre os anos de 2009 e 2011, através de incisões no ápice caulinar de plantas saudáveis em tubos do tipo Falcon com água destilada (1:2 v/v). Vale ressaltar que o procedimento de coleta do látex em água minimiza o efeito natural de “coagulação” que ocorre nesse fluido logo após sua exsudação. Após a coleta, os tubos foram levemente agitados e mantidos à temperatura ambiente até o seu processamento no laboratório.

O processamento do látex foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais da Universidade Federal do Ceará, sob a supervisão do Prof. Dr. Márcio Viana Ramos. Inicialmente, o látex foi submetido à centrifugação a 5.000 x g; 10 °C por 10 minutos e o precipitado obtido, constituído principalmente de borracha, foi descartado. O sobrenadante foi, então, submetido à diálise contra água destilada (1:10 v/v) a 8 °C durante 60 horas, com trocas da água a cada 4 horas, utilizando uma membrana de diálise com capacidade de retenção de moléculas com massa molecular superior a 8.000 Da. Em seguida, o material foi novamente centrifugado sob as mesmas condições anteriores, e um sobrenadante límpido, rico em proteínas e destituído de borracha foi obtido (ALENCAR *et al.*, 2006). Esta fração, designada como Proteínas do Látex (PL), foi liofilizada e utilizada na confecção das biomembranas testadas nos experimentos deste trabalho.

4.2 Análise *in vitro* da citotoxicidade de PL

Para avaliar o potencial das proteínas do látex de *C. procera* (PL) em induzir danos celulares, foram realizados os seguintes protocolos em polimorfonucleares de humanos cultivados:

Separação de polimorfonucleares (PMNs)

Sangue humano cedido pelo Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará (HEMOCE) foi utilizado para obtenção de neutrófilos, através do método descrito por Henson (1971) e modificado por Lucisano & Mantovani (1984). Após coleta, o sangue foi centrifugado (1500 x *g* 15 min a 4°C) e o plasma desprezado. Ao sedimento foi adicionado uma solução de gelatina 2,5% (p/v) em solução salina (NaCl 0,15M), em quantidade equivalente a duas vezes o volume de sedimento. A mistura foi homogeneizada, incubada a 37 °C por 15 minutos e centrifugada a 800 x *g* por 10 minutos a 25 °C. Ao sedimento obtido, adicionou-se solução de cloreto de amônio [(NH₄Cl), 0,83%; pH 7,2], previamente aquecido a 37 °C, para a lise das hemácias. Decorridos 5 minutos, o material foi centrifugado (800 x *g*, 10 minutos a 25°C) e o sedimento suspenso em solução de NaCl 0,15M para uma outra centrifugação a 800 x *g* por 10 minutos a 25°C.

As células foram suspensas em 2,0 mL de solução de Hanks (pH 7,2) contendo 0,1% de gelatina, e uma alíquota foi diluída 1:100 em líquido de Turk para contagem do número de células em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de exclusão ao corante azul de tripan, obtendo-se preparações de células com viabilidade de aproximadamente 90%, contendo cerca de 95% de neutrófilos (Renzi *et al.*, 1993).

Os neutrófilos obtidos foram utilizados nos ensaios de atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e teste do MTT para avaliar *in vitro* a toxicidade das proteínas do látex de *C. procera* (PL).

Atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)

A determinação da atividade da enzima citoplasmática LDH pode ser utilizada como parâmetro da medida de integridade de uma membrana celular frente a diferentes estímulos. O princípio do teste baseia-se na conversão de piruvato a lactato pela LDH na presença de NADH. A oxidação do NADH à NAD⁺ é medido cineticamente em uma amostra, correlacionado com a quantidade de LDH e expresso em U/L. Assim, a integridade celular é inversamente proporcional à quantidade de LDH liberada.

Os neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados em tubos apropriados por 15 minutos a 37 °C com 10 µL solução de Hanks (HBSS- células sem tratamento), solução salina 150 mM (veículo- controle negativo), proteínas do látex dissolvidas em solução salina 150 mM (1, 5, 10, 25, 50 e 100µg/mL) ou Triton X-100 (0,2%), cuja atividade citotóxica é bem caracterizada, foi utilizado como controle positivo. Em seguida, os tubos foram centrifugados (755 g, 10 min a 4°C) e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade da enzima LDH.

Para determinação da atividade de LDH, alíquotas de 250 µL do substrato (Kit LDH – liquiform) foram pré-incubados por 3 minutos a 37°C. Em seguida, adicionou-se 25 µL da amostra em triplicatas e a leitura da absorbância foi obtida a 340 nm (t₁=1 min e t₃=3 min) em espectrofotômetro. A atividade da enzima LDH foi calculada seguindo-se as especificações do fabricante e expressa em U/L.

Avaliação da viabilidade celular – teste do MTT

A viabilidade celular dos neutrófilos foi determinada pelo método colorimétrico MTT (MOSMANN, 1983). O princípio baseia-se na capacidade da mitocôndria de células viáveis de reduzirem pelo sistema enzimático succinato-tetrazol redutase, o sal de tetrazólio (MTT) de cor amarela, a um sal – formazan, que possui cor púrpura. Assim, a ausência da redução do MTT indica uma diminuição da atividade metabólica mitocondrial.

Para o ensaio, os neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados em tubos apropriados por 15 minutos a 37 °C com 10 µL solução de Hanks (HBSS - células sem tratamento), solução salina 150 mM (veículo- controle negativo),

proteínas do látex dissolvidas em solução salina 150 mM (1, 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) ou Triton X-100 (0,2%- controle positivo) em estufa a 37 °C com 5% de tensão de CO₂ durante 30 minutos. Decorrido esse período, a placa foi centrifugada (15 x g; 15 minutos) para sedimentação das células. O sobrenadante foi descartado, substituído pela solução (200 µL) contendo 10mg/mL de MTT e incubado por mais 3 horas (37 °C; 5% de CO₂). As placas foram novamente centrifugadas nas mesmas condições acima, o sobrenadante descartado e adicionado então 150 µL de DMSO puro para lise das células e solubilização do formazan. As placas foram agitadas durante 15 minutos e a absorbância foi medida em leitor de microplacas no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram quantificados em absorbância, através do percentual de redução do corante e a absorbância do grupo controle foi relacionada a 100% de células viáveis.

4.3 Elaboração das biomembranas e caracterização físico-química

4.3.1 Elaboração das biomembranas

As biomembranas utilizadas neste estudo foram preparadas no Laboratório de Polímeros do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará sob a supervisão da Profa. Dra. Nágila Ricardo.

Inicialmente, foi preparada a solução de poli (álcool vinílico) (PVA) 1% m/v e de proteínas do látex de *Calotropis procera* (PL) 0,2% e 1%, de modo que 0,1 g de PVA e 0,1 g / 0,02 g de PL foram separadamente dissolvidas em 10 mL de água destilada, sob agitação. Após total homogeneização, a solução de PVA foi misturada com as de PL (PVA 1% + PL 1% ou PVA 1% + PL 0,2%), também sob agitação. As misturas resultantes das composições estabelecidas foram filtradas em funil de placa sinterizada sob vácuo e vertidas em placas de Petri (13,0 cm de diâmetro/1,0 cm de altura) e secas em estufa de circulação de ar a 40 °C até a evaporação total do solvente. Durante as etapas de evaporação do solvente e secagem, os materiais foram devidamente protegidos para evitar contaminação. A biomembrana elaborada com PVA associada à PL foi denominada **BioMem PVA/PL**.

4.3.2 Caracterização físico-química

Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

A técnica espectroscópica do infravermelho usa a região do infravermelho do espectro eletromagnético e é utilizada para identificar grupos funcionais e a estrutura molecular presente na amostra. Esta técnica se baseia no fato de que as ligações químicas das moléculas possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula. Se a molécula receber radiação eletromagnética com exatamente a mesma energia de uma dessas vibrações, então a radiação será absorvida. Porém, nem todas as vibrações moleculares provocam absorção de energia no infravermelho.

As interferências em cada comprimento de onda foram registradas em um perfil espectral. Todas as amostras foram analisadas no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC) utilizando um espectrofotômetro Perkin Elmer 2000 na região de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} . As amostras foram previamente secas e maceradas na presença de nitrogênio líquido.

Análise Termogravimétrica (TG)

A técnica de análise termogravimétrica (TG) tem sido fundamental na avaliação da estabilidade térmica de membranas poliméricas. Esta é uma técnica de análise, na qual a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo. O termograma permite obter informações sobre a estabilidade térmica dos materiais e possibilita entender como ocorre sua decomposição e reações químicas tais como desidratação, oxidação e combustão (BRITTO, 2003). A perda de massa foi avaliada através do analisador termogravimétrico (TGA) Shimadzu, modelo TGA-50H, com temperatura variando de $25\text{-}800\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob fluxo de nitrogênio de 20 mL/min e taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ no Laboratório de Análises Térmicas do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.4 Animais

Os protocolos descritos a seguir envolvendo o uso de animais de experimentação foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto de pesquisa que inclui todos os procedimentos realizados neste trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da Universidade Federal do Ceará (CEPA), o qual foi registrado sob o número de processo 24/09.

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem *Swiss* (25 g \pm 3,0 g) adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (Biocen - UFC). Os animais foram mantidos durante os experimentos em caixas limpas individuais de polipropileno na sala de manutenção de animais do laboratório de Farmacologia e Bioquímica, sob condições adequadas de luz (fotoperíodo - 12 h de luz), temperatura (25 °C) e acesso à ração e água *ad libitum*. Para a realização de todos os procedimentos cirúrgicos descritos a seguir, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina 10% associado a cloridrato de xilazina 2% nas doses de 115 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente, por via intramuscular (i.m.) (HALL; CLARKE, 1991) e sacrificados por deslocamento cervical.

4.5 Modelos Experimentais de Cicatrização

Feridas incisionais ou excisionais foram induzidas para investigação do efeito da BioMem PVA/PL na neoformação tecidual subcutânea ou na cicatrização de feridas excisionais, respectivamente.

Padronização dos grupos experimentais

Foram utilizados 15 animais/grupo para todas as abordagens experimentais descritas neste trabalho. Utilizaram-se como grupos controles animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos, não sofrendo, contudo, implantação de membranas (**Grupo-Sham**) ou seguido da implantação de uma membrana contendo 1% de O poli (álcool vinílico) (**Grupo-PVA**). A BioMem PVA/PL foi testada em duas

concentrações distintas, 0,2% ou 1% (**Grupos BioMem PVA/PL 0,2 % ou 1%**). As membranas foram previamente esterilizadas por irradiação com luz ultravioleta (UV) antes das abordagens experimentais.

4.5.1 Modelo de cicatrização por primeira intenção de feridas incisionais

Este modelo é apropriado para investigar o potencial de implantes subcutâneos em induzir a neoformação tecidual, sendo preferível em relação a outros modelos experimentais, por evitar a influência de fatores exógenos, tal como contaminação por microorganismos (KYRIAKIDES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2011).

Para tanto, os animais foram anestesiados, conforme descrito no item 3.3 e, submetidos à tricotomia por tração manual de parte da região dorsal. Foi realizada a antisepsia utilizando-se iodopovidona 1% seguido de etanol 70% e posicionados campos operatórios esterilizados sobre os animais para indução das feridas cirúrgicas com auxílio de um bisturi (n° 15) a partir de uma incisão cutânea linear de aproximadamente 0,5 cm (CHANG *et al.*, 1980). Em seguida, foi introduzida uma pinça roma para divulsionamento entre o tecido celular subcutâneo e a fáscia muscular, local esse que acomodou o implante de membrana. Após implantação ou não de uma membrana, esta incisão foi suturada com fio nylon 5-0 para que a cicatrização ocorresse por primeira intenção.

4.5.2 Modelo de cicatrização por segunda intenção de feridas excisionais

Neste trabalho também avaliamos a cicatrização por segunda intenção a partir da indução cirúrgica de feridas excisionais. Este modelo envolve a completa remoção da epiderme, derme e tecido subcutâneo em uma extensão significativa. As vantagens desta abordagem podem ser ditadas pela possibilidade de monitorização da taxa de cicatrização, com base no volume da área da ferida, a organização histológica do tecido conjuntivo e os aspectos inerentes à reepitelização (DAVIDSON, 1998).

Ferida excisional circular foi induzida na superfície dorsal dos animais utilizando-se de um *punch* cirúrgico (1cm²) para biópsia de pele (CARDOSO *et al.*,

2007). O implante de membrana com dimensão de 12 mm foi introduzido sobre a fáscia muscular de forma que ficasse acomodado sob as bordas da pele íntegra. Após implantação da membrana, a exceção dos animais Sham, as feridas não foram suturadas para que a cicatrização ocorresse por segunda intenção. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam por via subcutânea (s.c.) 1 mL de solução salina estéril para reposição fluídica e foram mantidos em ambiente aquecido até a completa recuperação da anestesia.

4.6 Parâmetros Avaliados

4.6.1 Análise macroscópica

Para o estudo macroscópico do tecido neoformado no modelo de incisão, a pele dos animais foi removida nas proximidades da ferida incisional nos dias 2, 7 e 14 após a cirurgia (n=5/grupo/dia), afixada em uma prancha e fotografada em 8 Mega pixels (Sony, DSC – T2). A análise foi realizada de forma semi-quantitativa, conforme sua intensidade, de acordo com os escores: (0): ausência; (1): leve; (2): moderado e (3): intenso.

No modelo de cicatrização por segunda intenção, a área das feridas excisionais foi estimada nos dias 2, 4, 7, 9, 12, e 14 após a cirurgia (n=5/grupo/dia), através da mensuração dos diâmetros horizontal e vertical, com o auxílio de um paquímetro e, do cálculo da área pela equação: $A = p.R.r$, onde “A” representa a área, “R” o raio maior e “r” o raio menor da ferida (PRATA *et al.*, 1988).

A presença dos sinais flogísticos de edema e hiperemia foi avaliada no segundo dia após a indução de feridas excisionais (MELO *et al.*, 2011). O edema foi registrado quando se observava um aspecto tumefeito no leito e/ou bordas da lesão e confirmado, quando necessário, por meio de compressão digital com o polegar revestido por luva estéril, onde estando o edema presente, formava-se uma depressão. A presença de hiperemia foi notificada quando se constatava um aspecto avermelhado “rubor”. Ambos os sinais flogísticos também foram classificados de forma semi-quantitativa, conforme sua intensidade, e de acordo com os escores (0): ausência; (1): leve; (2): moderado e (3): intenso.

A evolução do ferimento para a cicatrização também foi acompanhada pelo surgimento do tecido cicatricial em substituição à área lesionada. O tecido cicatricial foi diferenciado da pele normal circundante pelo surgimento das seguintes características: 1) tecido frágil e rosado, localizado entre a pele normal e área lesionada e 2) ausência de pigmentação. Assim, no dias 12 e 14 após a indução das feridas, notificou-se a quantidade de animais que apresentavam substituição completa da crosta por uma cicatriz (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2010).

4.6.2 Análise histológica

As análises microscópicas de feridas incisionais e excisionais foram realizadas no intuito de verificar o efeito da implantação de BioMem PVA/PL nas diferentes etapas do processo cicatricial.

Coleta de amostras de feridas incisionais e excisionais.

Após a remoção da pele nos dias 2, 7 e 14 para o estudo macroscópico, conforme descrito anteriormente, foram retirados 2 fragmentos cilíndricos do tecido neoformado sobre a região da cirurgia (n=5/grupo/dia). Este procedimento foi realizado com a utilização de “*punches*” de 4 mm de diâmetro. Após a coleta dos tecidos os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical.

As feridas excisionais foram removidas, seguindo as mesmas condutas anestésicas, nos dias 2, 7 e 14 após a cirurgia (n=5/grupo/dia). Durante este procedimento, tomou-se o cuidado de remover parte do fragmento de pele normal em volta da lesão, abrangendo um centímetro além de cada margem e aprofundando-se até o plano muscular. Após ressecção das feridas, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical.

Confecção das lâminas histológicas

Feridas incisionais e excisionais foram removidas, fixadas em solução tamponada de formaldeído 10% (v/v) (pH 7,4) durante 24 horas e, posteriormente, processadas em padrão histológico habitual. Com auxílio de um micrótomo, secções

de 5 µm de espessura foram dispostas em lâminas de microscopia e submetidas às técnicas de coloração hematoxilina-eosina (H&E), azul de toluidina ou tricrômico de Mallory. A partir das lâminas histológicas, fotomicrografias foram obtidas por um microscópio óptico, acoplado a uma câmera digital de alta resolução (Leica DM 2000). As imagens capturadas foram salvas em formato JPEG e analisadas pelo software ImageJ 1.43 (U.S. National Institutes of Health, USA (NOURSADEGHI *et al.*, 2008).

Avaliação de edema e infiltrado de leucócitos

A análise do edema e infiltrado de leucócitos foi realizada em lâminas histológicas obtidas pelo método de Hematoxilina e eosina (H&E), provenientes de feridas incisionais e excisionais dos dias 2, 7 e 14 após a cirurgia. Estes parâmetros foram analisados de forma semi-quantitativa, através dos escores: (0) ausente; (1) leve; (2) moderado e (3) intenso em 15 campos/lâmina no aumento de 400x. O edema foi avaliado na derme superficial e profunda e os leucócitos em campos com maior densidade de infiltrado, sendo distribuído entre a crosta, derme superficial e profunda. Os resultados foram expressos como a mediana e variação dos escores em 5 lâminas/grupo/dia (AKKOL *et al.*, 2009).

Avaliação de mastócitos íntegros e degranulados

A técnica de coloração com azul de toluidina evidencia outro tipo de célula inflamatória nos tecidos, o mastócito. Esta célula contém no seu citoplasma numerosos grânulos com mediadores químicos como a histamina e heparina. A heparina, altamente sulfatada, é revelada pelo azul de toluidina produzindo o fenômeno da metacromasia. Os mastócitos quando ativados liberam os mediadores inflamatórios recém-formados ou pré-formados, um processo conhecido como degranulação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Desta forma, mastócitos íntegros e degranulados foram avaliados em lâminas histológicas obtidas pelo método azul de toluidina, provenientes de feridas incisionais e excisionais nos dias 2, 7 e 14 após a cirurgia. A contagem diferencial foi realizado em 15 campos/lâmina (aumento de 400x), distribuídos entre as bordas de

pele normal (adjacente à ferida) e na área da ferida. Os resultados foram expressos em percentual como a média \pm erro padrão da média (EPM) do número de mastócitos em 5 lâminas/grupo/dia, conforme a relação: mastócitos íntegros ou degranulados x 100/ total (MATSUMURA *et al.*, 2007).

Avaliação da fibroplasia

A fibroplasia traduz-se pela proliferação de fibroblastos e sua migração para o interior da ferida. A quantificação destas células foi realizada em lâminas histológicas provenientes de feridas incisionais e excisionais dos dias 7 e 14 após a cirurgia pelo método de H&E. Foram obtidas 10 fotomicrografias por lâmina (aumento de 400x), sendo 5 da derme superior e 5 da derme inferior. A partir destas imagens foram selecionadas 20 regiões de 800 x 1536 pixels (= 11 x 21 μ m) e a contagem de fibroblastos foi realizada pelo *Plugin "Cell counter"* do *software ImageJ® 1.46*. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) do número de fibroblastos de 20 regiões em 5 lâminas/grupo/dia. (ANDRADE *et al.*, 2011).

Avaliação da colagênese

A deposição de colágeno no leito de uma lesão ocorre como consequência da proliferação e migração de fibroblastos, fenômeno este conhecido como colagênese. Este parâmetro foi avaliado em lâminas histológicas provenientes de feridas incisionais e excisionais do dia 14 após a cirurgia pelo método do tricrômico de Mallory. Foram obtidas 6 fotomicrografias por lâmina (aumento de 200x), sendo 3 da derme superior e 3 da derme inferior. A partir destas imagens foram selecionados 24 regiões de 374 x 260 pixels (= 10 x 7 μ m) para análise da colagênese. A distribuição da cor azul, referente à deposição de colágeno, foi quantificada como percentagem do número total de pixels em cada região através do *plugin "Colour Deconvolution/Threshold"* do *software ImageJ*. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da percentagem do número total de pixels de 18 regiões em 5 lâminas/grupo (CARVALHO *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2011).

Avaliação da reepitelização

A reepitelização foi definida como a área da ferida excisional que havia sido recoberta por um novo epitélio e pela espessura deste tecido recém-formado (LI *et al.*, 2007). Fotomicrografias de lâminas coradas pelo método de H&E foram obtidas (aumento de 100x) e analisadas pelo software Leica DM 2000. A reepitelização foi determinada em lâminas representativas do dia 7 após a cirurgia, através da medida do comprimento do novo epitélio em 6 imagens de 655 x 492 μm , tendo como ponto de partida as bordas da ferida e expresso como percentual de reepitelização: (área reepitelizada x 100) / área total da ferida (SCHNEIDER; GARLICK; EGLES, 2008). A espessura do epitélio recém-formado foi determinada em lâminas representativas do dia 14 após a cirurgia, através de 18 medidas em imagens de 655 x 492 μm (BARANOWSKY *et al.*, 2010).

4.7 Análise de mediadores inflamatórios

Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, é utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado. Amostras de feridas incisionais e excisionais foram utilizadas para determinação de atividade da enzima mieloperoxidase nos diferentes tempos de seguimento experimental (SOUZA *et al.*, 2001). Os tecidos coletados foram incubados em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio) na proporção de 50 mg de tecido por mL, homogeneizados em POLITRON® e centrifugados (1500 g/15 min a 4°C). O sobrenadante obtido foi transferido para um eppendorf e submetido ao choque térmico no *pellet* de células em três etapas de congelamento e descongelamento (- 20°C; 10 minutos cada). O sobrenadante foi novamente homogeneizado e centrifugado (1500 x g; 15 min a 4°C) para melhor remoção de contaminantes. Em seguida, as amostras foram plaqueadas (duplicatas de 7 μL em placas de 96 poços) e adicionado 200 μL da solução de leitura (5 mg O-dianisidine; 15 μL H₂O₂ 1%; 3 mL tampão fosfato; 27 mL H₂O). A leitura da absorbância foi obtida a 460 nm (t₀=0 min e t₁=1 min) em leitor de ELISA. A

mudança na absorvância foi plotada em uma curva padrão de neutrófilos, expressa como neutrófilos/mg de tecido e interpretada como atividade da enzima mieloperoxidase.

Determinação dos níveis de nitrato/nitrito ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$)

Amostras de feridas incisionais provenientes dos dias 2 e 7 após a cirurgia foram utilizados para determinação conteúdo total de nitrato/nitrito ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) pela reação de Griess como um indicador da produção de óxido nítrico (CHEN *et al.*, 2000). Em seguida, amostras do tecido neoformado foram coletadas, pesadas, homogeneizadas com auxílio de um POLITRON[®] em uma solução resfriada de cloreto de potássio (KCl) a 1,15% (homogenato a 10%) e centrifugados (1500 x g; 15 minutos) para obtenção do sobrenadante. O sobrenadante do macerado foi plaqueados (placas de 96 poços) em duplicata (80 μL de cada amostra) e incubados em uma solução (0,04 mL de nitrato redutase, NADPH, KH_2PO_4 e água destilada) por 12 horas para que o NO_3^- das amostras fosse convertido em NO_2^- . No dia subsequente, uma curva-padrão de referência de NO_2^- , apartir de uma diluição seriada de uma solução de NaNO_2 foi preparada e plaqueada. Foram adicionados 80 μL da solução de Griess (1% de sufamilamida em 1% H_3PO_4 / 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina dihidroclorato/água destilada/1:1:1:1) em cada poço. A coloração púrpura/magenta foi medida em leitor de ELISA com filtro de 540 nm. Os valores obtidos para as amostras experimentais foram plotados com curva padrão e expressos em μM de NO_2^- .

Dosagem in situ de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α)

Amostras de feridas incisionais e excisionais foram coletadas no dia 2 após a cirurgia, conforme descrito anteriormente, para dosagem de IL-1 β e TNF- α . O tecido coletado foi homogeneizado em solução de PBS e processado como descrito por Safieh - Garabedian *et al.* (1995). A detecção de IL-1 β e TNF- α foi determinada no sobrenadante do macerado da amostra por ELISA (CUNHA *et al.*, 1993). Placas de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo anti-IL-1 ou anti- TNF- α murino (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$; kit da R&D systems- Cat. N° DY501 ou DY510,

respectivamente). Após sensibilização das placas, as amostras foram adicionadas em duplicata e a curva padrão foi adicionada em várias diluições e incubadas por 24h a 4 °C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão PBS/Tween-20 (0,05% SIGMA) e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado anti- IL-1 β ou anti- TNF- α diluídos (1:1000 com BSA/Tween 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50 μ L do complexo HRP-avidina diluído 1:5000 foram adicionados. Decorridos 15 minutos, o reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50 μ L) foi adicionado e as placas foram incubadas na ausência de luz a 37 °C por 15 a 20 min. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ (1M) e a densidade óptica medida a 490 nm em espectrofotômetro. As concentrações de citocinas contidas nas amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão com 11 pontos, obtida por diluição seriada, sendo as concentrações iniciais de 2000 pg/mL para TNF- α ou 4000 pg/mL para IL-1 β . Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de sobrenadante/mg de tecido.

Determinação de TNF- α e IL-1 β no sobrenadante de cultura de macrófagos estimulado com a fração protéicas do látex de C. procera (PL)

Objetivando investigar se a indução na liberação de TNF- α e IL-1 β pela BioMem PVA/PL em feridas incisionais e excisionais seria através da estimulação de PL sobre macrófagos residentes, foi realizada esta abordagem experimental.

Para tanto, macrófagos (M ϕ s) peritoneais foram obtidos de camundongos saudáveis seguindo o método descrito por Cunha; Ferreira (1986). Para isto, os animais foram tratados por via intraperitoneal com 2 mL de tioglicolato a 4% em água destilada. Após quatro dias, foi administrado por via intraperitoneal 3 mL do meio RPMI heparinizado, pH 7,4 e os animais sacrificados para coleta do exsudato peritoneal em condições estéreis. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em RPMI por centrifugação a 100 x g durante 5 minutos. O precipitado final foi ressuspenso em 1 mL de RPMI, sendo então diluído (1:20) em solução de Turk para contagem total das células em câmara de Neubauer. As células foram ressuspenso em RPMI, na concentração de 2 x 10⁶ células /mL e distribuídas em placas de cultura de 24 poços (1 mL/poço).

Para aderência dos macrófagos, a placa foi incubada por 1 hora em estufa de CO₂ a 5%. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células aderidas (95% de macrófagos) foram lavadas três vezes com RPMI, sendo incubadas novamente por 12 horas em CO₂ a 5%. Após esse período, as células foram novamente lavadas com RPMI e incubadas como a seguir: RPMI (controle negativo), LPS (1µg/mL; controle positivo) e proteínas do látex de *Calotropis procera* (500 µg/mL). Após 5 horas de incubação, os sobrenadantes da cultura de macrófagos foram coletados e utilizados para dosagem de TNF-α e IL-1β através do método ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”). A viabilidade celular foi avaliada pela técnica de exclusão com azul de Trypan.

4.8 Avaliação da densidade vascular ao tecido neoformado de feridas incisionais

A análise da densidade vascular ao tecido neoformado foi realizada na pele proveniente do segundo dia após a cirurgia após a indução de feridas incisionais. Para isso, os animais foram anestesiados e a pele removida parcialmente, de forma que houvesse completa exposição do tecido neoformado. Imagens digitais dos tecidos neoformados foram capturadas de forma padronizada, utilizando-se, para tanto, um microscópio de luz (aumento de 16x, eixo microscópico: oblíquo a 40°), equipado com uma câmera digital (C7070 Wide Zoom, OLYMPUS). Para cada pele removida, selecionaram-se os quatro campos adjacentes ao tecido neoformado (superior, inferior, direito e esquerdo), tendo como referência os pontos cirúrgicos (suturas). As imagens obtidas foram utilizadas para avaliar as zonas de maior densidade vascular, seguindo-se os parâmetros de área neovascular, comprimento vascular total e número de vasos (WEIDNER, 1995) pelo Sistema de Quantificação de Angiogênese - SQUAN (FECHINE – JAMACARU, 2006). O sistema foi previamente calibrado para reconhecer o espectro de cores relativo à estrutura de interesse (microvasculatura). Esse procedimento habilitava o *software* a identificar e segmentar automaticamente os vasos sanguíneos. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (EPM) da área neovascular (mm²), comprimento vascular total (mm) e número de vasos.

4.9 Análise estatística dos dados

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) ou mediana, de acordo com o parâmetro avaliado. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas das médias ou do teste de Kruskal-Wallis e Dunn's para as medianas. Valores de $p < 0,05$ representaram diferença estatística entre os dados sob intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

5.1 Proteínas do látex não apresentam citotoxicidade em neutrófilos humanos

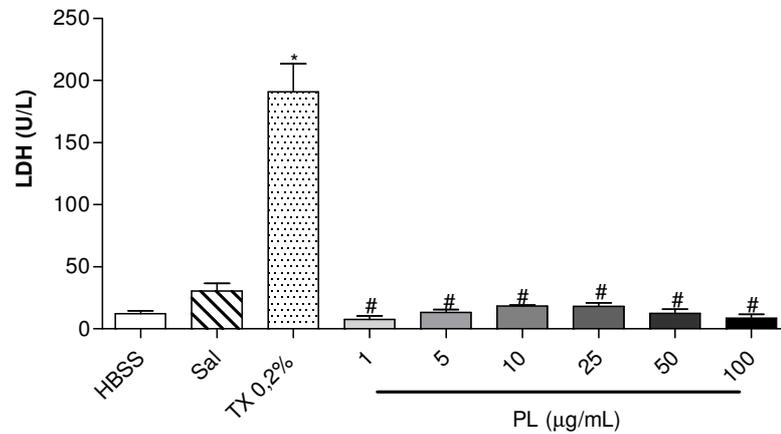
Atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)

O possível efeito das proteínas do látex (PL) sobre a integridade da membrana de neutrófilos foi investigado pela determinação da atividade da enzima LDH (Figura 4). Conforme esperado, um aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade de LDH foi conferido pelo composto Tx-0,2% ($191 \text{ U/L} \pm 22,4$), quando comparado ao controle negativo ($26,1 \text{ U/L} \pm 5,7$). Nenhum estímulo nocivo à integridade dos neutrófilos foi conferido por PL, em diferentes concentrações, o que pode ser visto pela atividade de LDH (U/L) entre 7,5 a 8,7.

Análise da viabilidade celular - MTT

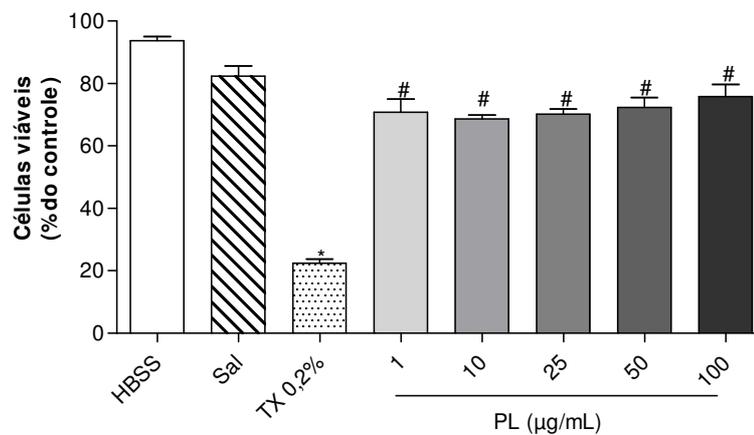
A avaliação da viabilidade de neutrófilos frente às proteínas do látex (PL) foi demonstrada pelo método de MTT (Figura 5). O composto Tx 0,2%, cuja atividade citotóxica é bem caracterizada, reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a viabilidade celular em $22,34\% \pm 1,4$, comparado ao controle negativo ($82,34\% \pm 3,2$). PL não induziu citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas, apresentando neutrófilos viáveis em torno de 69% a 75,8%.

Figura 4 - Efeito das proteínas do látex de *Calotropis procera* (PL) sobre a liberação de lactato desidrogenase (LDH) por neutrófilos.



Neutrófilos foram incubados com solução de Hanks (HBSS- sem tratamento), solução salina 150mM (veículo- controle negativo), Triton X-100 (TX 0,2%- controle positivo) ou proteínas do látex (1, 5, 10, 25, 50 ou 100µg/mL). As barras representam a média \pm EPM dos valores de LDH (U/L). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o controle negativo e # $p < 0,05$ ao controle positivo (ANOVA - teste de Bonferroni).

Figura 5 - Efeito das proteínas do látex de *Calotropis procera* (PL) sobre a viabilidade de neutrófilos.



Neutrófilos foram incubados com solução de Hanks (HBSS- sem tratamento), solução salina 150mM (veículo- controle negativo), Triton X-100 (TX 0,2%- controle positivo) ou proteínas do látex (1, 5, 10, 25, 50 ou 100µg/mL). As barras representam a média \pm EPM do % de células viáveis. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o controle negativo e # $p < 0,05$ ao controle positivo (ANOVA - teste de Bonferroni).

5.2 Propriedades físico-química das biomembranas

A figura 6 mostra os espectros de infravermelho obtidos para o PVA 1%, PL e membrana PVA/PL 1%. Os espectros **b** e **c** mostram frequências características do poli (álcool vinílico) (PVA) e das proteínas do látex de *C. procera* (PL), respectivamente, demonstrando a integridade dessas substâncias, considerando, de forma respectiva, os métodos de preparo e isolamento aplicados (RAJENDRAN *et al.*, 2004; GONZAGA, 2006).

Como pode-se observar, salvo as frequências em 1735 cm^{-1} , referente ao grupamento carbonila (C=O) e 854 cm^{-1} , referente à ligação C-H, registradas no espectro do PVA e as frequências em 1544 cm^{-1} , referente às ligações N-H e C-N, próprias da proteína, as demais frequências registradas nos espectros **b** e **c** são comuns às duas substâncias, com pequenas variações de valores, o que é comum para o tipo de análise aplicada.

Esse comportamento pode ser observado no espectro da BioMem PVA/PL1% (espectro **a**), onde a presença das duas substâncias está registrada. A identificação das frequências do C=O, C-H, C-N e N-H, de forma destacada, bem como das demais frequências no espectro da biomembrana, é indicação da não ocorrência de ligação química covalente entre as substâncias, havendo, provavelmente, interações eletrostáticas fracas de van der Waals e ligações de hidrogênio.

As pequenas diferenças das bandas registradas no espectro da membrana, em relação aos valores observados nos espectros dos componentes isolados, confirmam a não modificação da biomembrana formada. A tabela 1 mostra as principais bandas dos materiais estudados.

Os termogramas de TG para o PVA 1%, PL 1% e da membrana PVA/PL 1% em atmosfera de nitrogênio estão mostrados na figura 7. O primeiro evento de perda de massa a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ esta associada à água adsorvida, como foi observada no espectro de infravermelho. Os outros eventos são atribuídos à decomposição (200 , 300 e $330\text{ }^{\circ}\text{C}$). Desta forma, observou-se que a solubilização de PL no PVA tornou a BioMem PVA/PL 1% termicamente mais estável.

Figura 6. Espectro infravermelho: BioMem PVA/PL 1% (a), PVA 1% (b) e PL 1% (c).

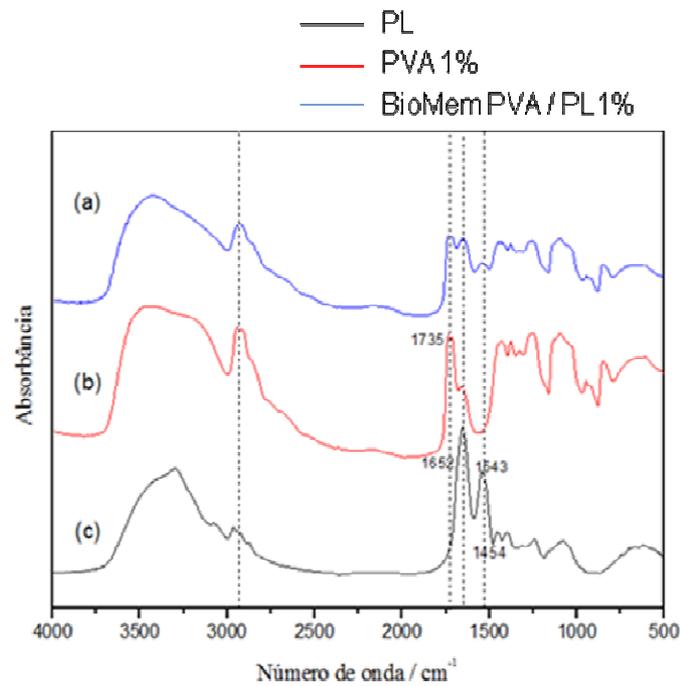
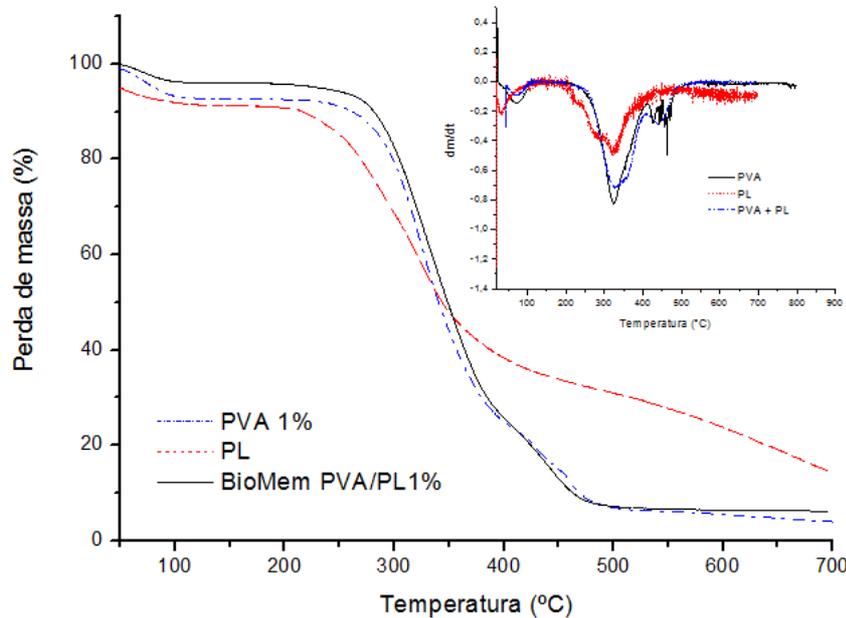


Tabela 1. Atribuições das principais frequências dos materiais (PVA 1%, PL), através da análise da membrana PVA/PL 1%.

Nº de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3428	ν O-H (A e B)
2926	ν C-H de CH ₂ e CH ₃ (A e B)
1725	ν C=O (A)
1643	ν_{as} COO ⁻ (A e B)
1540	ν CN, δ NH (B)
1267	ν CN, δ NH (B) e ν CO (A e B)
1095	ν (C-C) (A e B)
852	δ C-H (A)

ν = estiramento simétrico; ν_s = estiramento assimétrico; δ = deformação; A = frequência do PVA; B = frequência de PL

Figura 7. Termogramas TG e DTG: PVA 1%, PL e BioMem PVA/PL 1%.



5.3 Efeito da BioMem PVA/PL sobre as diferentes etapas do processo cicatricial de feridas incisoriais cutâneas em camundongos

5.3.1 BioMem PVA/PL induz aumento da neoformação tecidual em feridas incisoriais

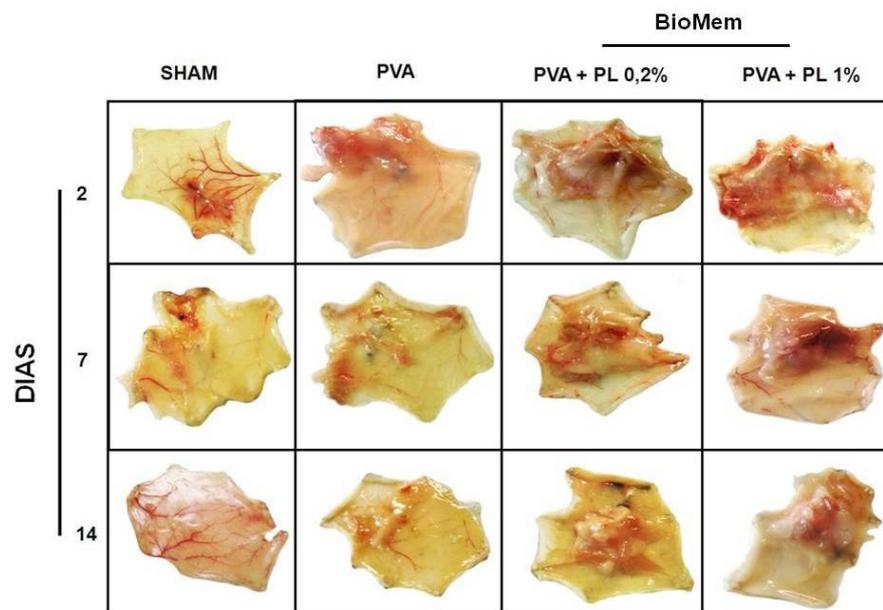
A avaliação macroscópica do tecido neoformado foi realizada nos dias 2, 7 e 14 após a indução de feridas incisoriais (Figura 8; tabela 2). A análise realizada no dia 2 demonstrou que animais submetidos apenas a cirurgia (grupo Sham) ou à implantação de uma membrana contendo somente PVA apresentaram leve efeito à formação de um novo tecido, com medianas e variações de 0 (0 - 1) e 1 (0 - 2), respectivamente. Entretanto, a neoformação tecidual foi conferida de forma intensa e significativamente diferente do grupo Sham ($p < 0,05$), nos animais submetidos à implantação da BioMem PVA/PL nas concentrações de 0,2% ou 1%, com mediana e variações de 3 (2-3).

A evolução do seguimento experimental demonstrou que no 7º dia a intensidade da neoformação tecidual manteve-se sutil nos animais dos grupos Sham

e PVA, com mediana e variações de 0 (0-1) e 0 (0-2), respectivamente. O maior estímulo ainda foi conferido aos animais que receberam o implante da BioMem PVA/PL nas concentrações testadas, 0,2% e 1%, com medianas e variações de 3 (1-3) e 3 (2-3), respectivamente. Neste período, as diferenças foram significativas quando comparados aos grupos Sham e PVA ($p < 0,05$).

No 14º dia após a cirurgia, um tecido com aspecto fibroso foi evidenciado nos animais que receberam os implantes dos dois tipos de membranas, PVA e PVA/PL. Entretanto, a intensidade na deposição de tecido nos animais com implante da membrana PVA ocorreu de forma discreta e sem diferença significativa com o grupo Sham. Por outro lado, no grupo com implante da BioMem PVA/PL 0,2% ou 1%, a neoformação tecidual foi moderada e diferente em relação aos grupos Sham e PVA ($p < 0,05$) com medianas e variações de 1 (0-1), 2 (2-3) e 2 (1-3), respectivamente.

Figura 8 – Fotografias representativas da neoformação tecidual em fragmentos de pele de animais submetidos a feridas incisionais.



Camundongos foram submetidos à cirurgia na região dorsal para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2% ou 1%). Os animais do grupo Sham foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, sem implantação de membranas. Nos dias 2, 7 e 14 após a cirurgia os fragmentos de pele foram removidos para análise macroscópica.

Tabela 2 – Avaliação macroscópica do efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a neoformação tecidual em feridas incisionais.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

DIAS	BioMem			
	Sham	PVA	PVA/PL 0,2%	PVA/PL 1%
2	0 (0 - 1)	1 (0 - 2)	3 (2 - 3)*	3 (2 - 3)*
7	0 (0 - 1)	0 (0 - 2)	3 (1 - 3)*#	3 (2 - 3)*#
14	0 (0 - 1)	1 (0 - 1)	2 (2 - 3)*#	2 (1 - 3)*

Os dados representam mediana e variação dos escores do tecido neoformado de dois experimentos isolados: (0) ausente; (1) leve; (2) moderado e (3) intenso para a neoformação tecidual. *p<0,05 indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e #p<0,05 ao grupo PVA (n=15 animais/grupo; Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn).

5.3.2 BioMem PVA/PL intensifica o edema e a infiltração leucocitária no tecido neoformado de feridas incisionais

O efeito da BioMem PVA/PL 0,2% e 1% nas diferentes etapas da neoformação tecidual em feridas incisionais foi analisado microscopicamente e estão representados na figura 11. Os parâmetros inflamatórios de edema e infiltrado de leucócitos foram analisados de forma semi-quantitativa por microscopia em lâminas histológicas provenientes dos dias 2, 7 e 14 após a cirurgia (Tabela 3). O edema entremeado às fibras colágenas foi observado na derme superficial e profunda de todos os grupos experimentais no dia 2 após a cirurgia. Este parâmetro ocorreu de forma leve e sem diferenças significativas nos tecidos de animais dos grupos Sham e PVA, com medianas e variações de 1,5 (1-2) e 2 (1-2), respectivamente. Neste mesmo período, um intenso edema foi verificado nos tecidos de animais que recebem o implante da BioMem PVA/PL nas concentrações de 0,2% e 1%, com semelhantes medianas e variações de 3 (2-3) e, significativamente diferentes

($p < 0,05$) dos grupos Sham e PVA. Nos dias 7 e 14 após a cirurgia, o edema não foi visualizado de forma consistente em nenhum grupo experimental.

A análise histológica evidenciou um infiltrado de leucócitos, basicamente neutrofílico, no tecido neoformado de todos os grupos experimentais do dia 2 após a cirurgia. Vale ressaltar que das três regiões teciduais analisadas (crosta, derme superficial e profunda), uma maior densidade de leucócitos foi conferida na crosta das lesões. A análise semi-quantitativa demonstrou que este parâmetro ocorreu de forma leve para os grupos Sham e PVA, com mediana e variações de 1,5 (1-2). A implantação da BioMem PVA/LP induziu um intenso infiltrado celular no tecido neoformado e diferente dos grupos sham e PVA ($p < 0,05$), com mediana e variações de 3 (1-3) e 3 (2-3) para as concentrações de 0,2% e 1%, respectivamente (figura 11).

A infiltração de leucócitos persistiu no tecido neoformado de todos os grupos experimentais no dia 7 após a cirurgia. A análise demonstrou que o perfil celular era predominantemente mononuclear e, diferente do dia 2, localizava-se basicamente na derme superior e inferior. No que diz respeito às intensidades, o infiltrado ocorreu de forma semelhante e moderada para os grupos Sham, PVA e BioMem PVA/PL 0,2% e intensa para o grupo BioMem PVA/PL 1%, com medianas e variações de 2 (1-3) e 3 (1-3), respectivamente. As diferenças foram significativas ($p < 0,05$) entre o grupo BioMem PVA/PL 1% e o controle Sham.

A redução do infiltrado de leucócitos foi observada no dia 14, quando comparado ao dia 7, em todos os grupos experimentais, exceto no grupo BioMem PVA/PL 0,2%. Este parâmetro ocorreu de forma leve para os grupos controles e moderada para os grupos BioMem PVA/PL 0,2% e 1%, com mediana e variações de 1 (1-2) e 2 (1-3), respectivamente. As diferenças foram significativas ($p < 0,05$) entre PL 0,2% e 1% e os grupos controles.

Tabela 3 – Avaliação microscópica do efeito das membranas (PVA e PVA/PL) sobre o edema e infiltrado de leucócitos (neutrófilos e mononucleares) no tecido neoformado de feridas incisionais.

GRUPOS EXPERIMENTAIS				
DIAS	SHAM	PVA	BioMem	
			PVA/PL 0,2%	PVA/PL 1%
Edema				
2	1.5 (1 - 2)	2 (1 - 2)	3 (2 - 3) ^{* #}	3 (2 - 3) ^{* #}
Infiltrado de leucócitos				
2	1.5 (1 - 2)	1.5 (1 - 2)	3 (1 - 3) ^{* #}	3 (2 - 3) ^{* #}
7	2 (1 - 2)	2 (1 - 3)	2 (1 - 3)	3 (1 - 3) [*]
14	1 (1 - 2)	1 (1 - 2)	2 (1 - 3) ^{* #}	2 (1 - 3) ^{* #}

Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2% ou 1%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. Nos dias 2, 7 e 14 após a cirurgia, os fragmentos de pele foram removidos para confecção de lâminas histológicas H&E. Os dados representam mediana e variação dos escores: (0) ausente; (1) leve; (2) moderado e (3) intenso em 15 campos/lâmina para edema (aumento de 400X). ^{*}p<0,05 indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e [#]p<0,05 ao grupo PVA (n=15 animais/grupo; Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn).

5.3.3 BioMem PVA/PL induz degranulação de mastócitos no tecido neoformado de feridas incisionais

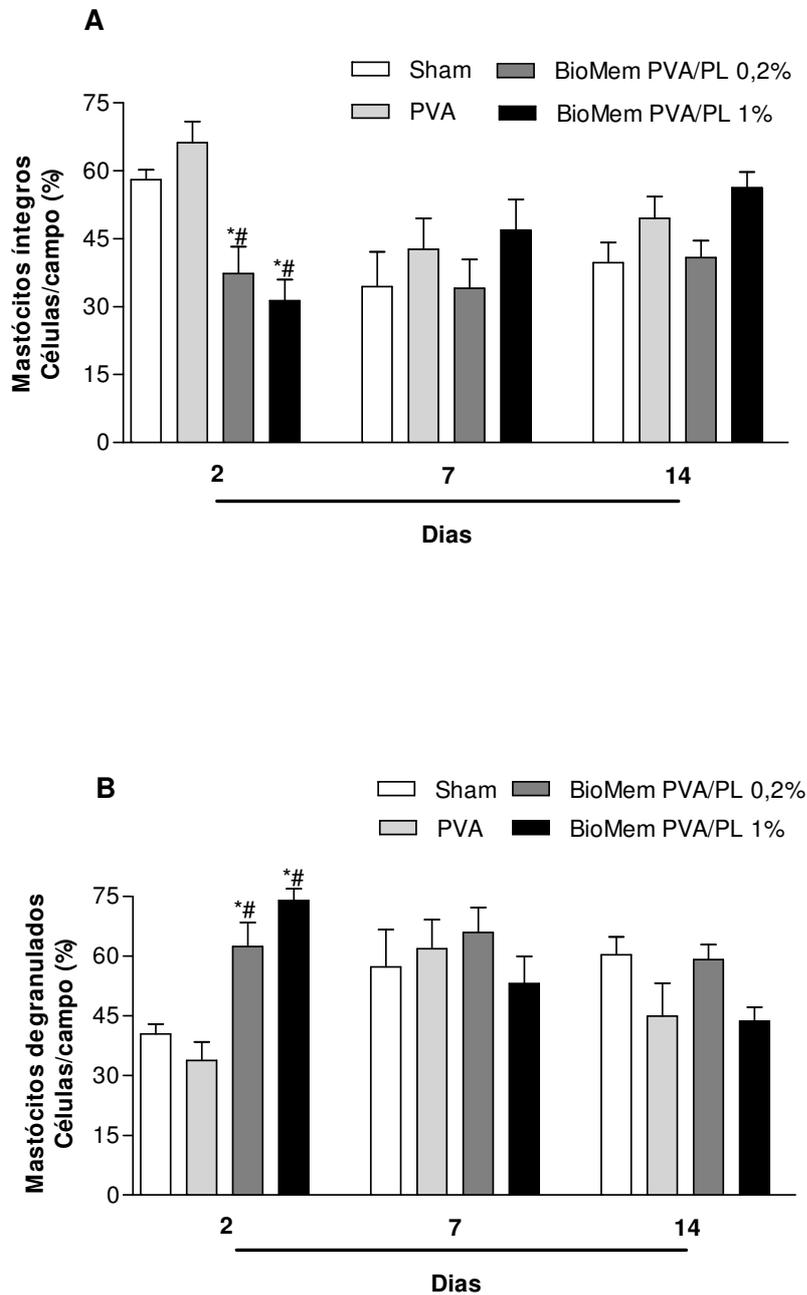
A presença de mastócitos íntegros e degranulados foi evidenciada em todos os grupos experimentais no dia 2 após a cirurgia (Figura 9). O percentual de mastócitos degranulados foi semelhante entre os grupos controles Sham ($40,2\% \pm 2,4$) e PVA ($33,7\% \pm 4,6$). A implantação da BioMem PVA/PL nas duas concentrações testadas conferiu um maior estímulo aos mastócitos, com a média do percentual de células degranuladas em $62,4\% \pm 6,0$ (grupo PVA/PL 0,2%) e $73,6\% \pm 3,0$ (grupo PVA/PL 1%), sendo as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos grupos controles Sham e PVA. A análise realizada em lâminas provenientes do dia 7 e 14 após a cirurgia também demonstrou a presença de mastócitos íntegros e degranulados, embora não houvesse diferença significativa entre os grupos analisados.

5.3.4 BioMem PVA/PL aumenta a população de fibroblastos e a produção de colágeno no tecido neoformado de feridas incisionais

Neste trabalho, a fibroplasia foi avaliada em lâminas provenientes dos dias 7 e 14 após a cirurgia (Figura 10 - A). As análises realizadas demonstram que no dia 7 não houve diferença significativa entre os grupos. No dia 14, nenhuma diferença foi observada entre os controles Sham ($25,1 \pm 4,5$) e PVA ($25,5 \pm 1,8$). Entretanto, a implantação da BioMem PVA/PL nas duas concentrações testadas induziu um maior estímulo à fibroplasia (PVA/PL 0,2% = $43,2 \pm 4$ e PVA/PL 1% = $42,1 \pm 1$), quando comparados aos controles Sham e PVA ($p < 0,05$).

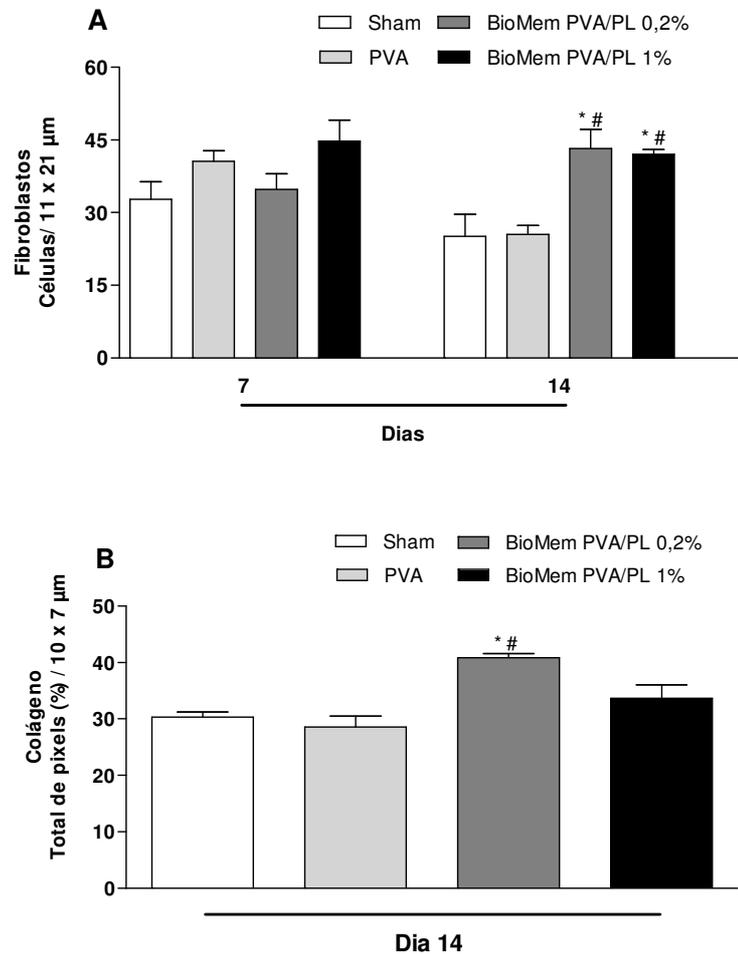
A reconstrução dérmica, estimada a partir da colagênese, foi avaliada em lâminas referentes ao dia 14 após a cirurgia com auxílio do Software ImageJ (Figuras 10 - B). Os dados obtidos demonstram que a colagênese foi evidenciada no tecido neoformado de todos os grupos experimentais e que nenhuma diferença foi observada entre os controles Sham e PVA. O maior estímulo foi conferido aos animais que receberam o implante de membrana com as proteínas do látex na concentração de 0,2% ($40,8\% \pm 0,7$), sendo significativo ($p < 0,05$), quando comparado aos controles Sham e PVA.

Figura 9 – Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a degranulação de mastócitos no tecido neoformado de feridas incisionais.



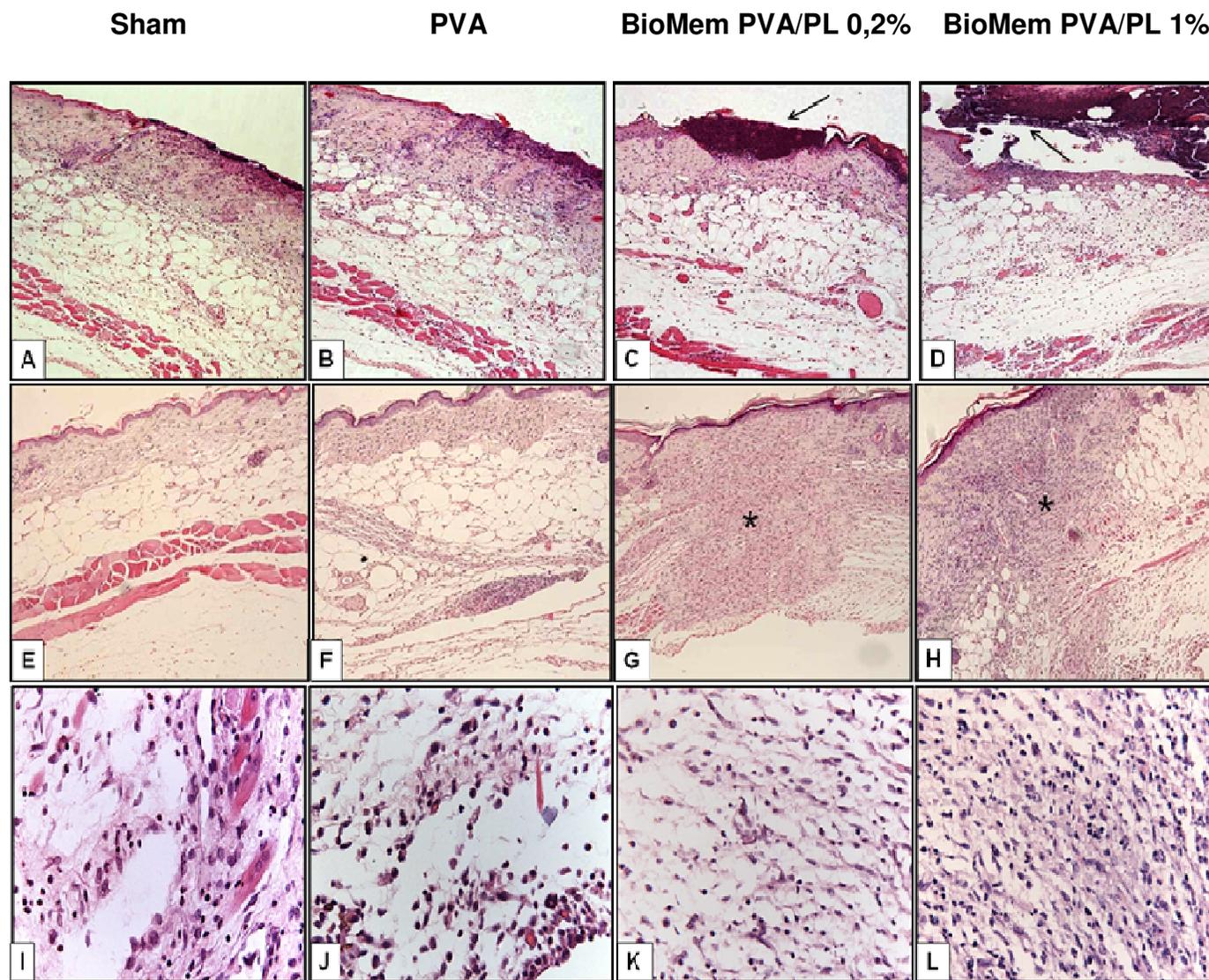
Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2% ou 1%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. Nos dias 2, 7 e 14 após a cirurgia fragmentos de pele foram removidos para confecção de lâminas histológicas coradas com azul de toluidina. Resultados foram expressos como a média \pm erro padrão (EPM) do percentual de mastócitos íntegros (**A**) ou degranulados (**B**) em 15 campos/lâmina (aumento de 400x). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e [#] $p < 0,05$ ao grupo PVA (n=5 animais/grupo/dia; ANOVA - teste de Bonferroni).

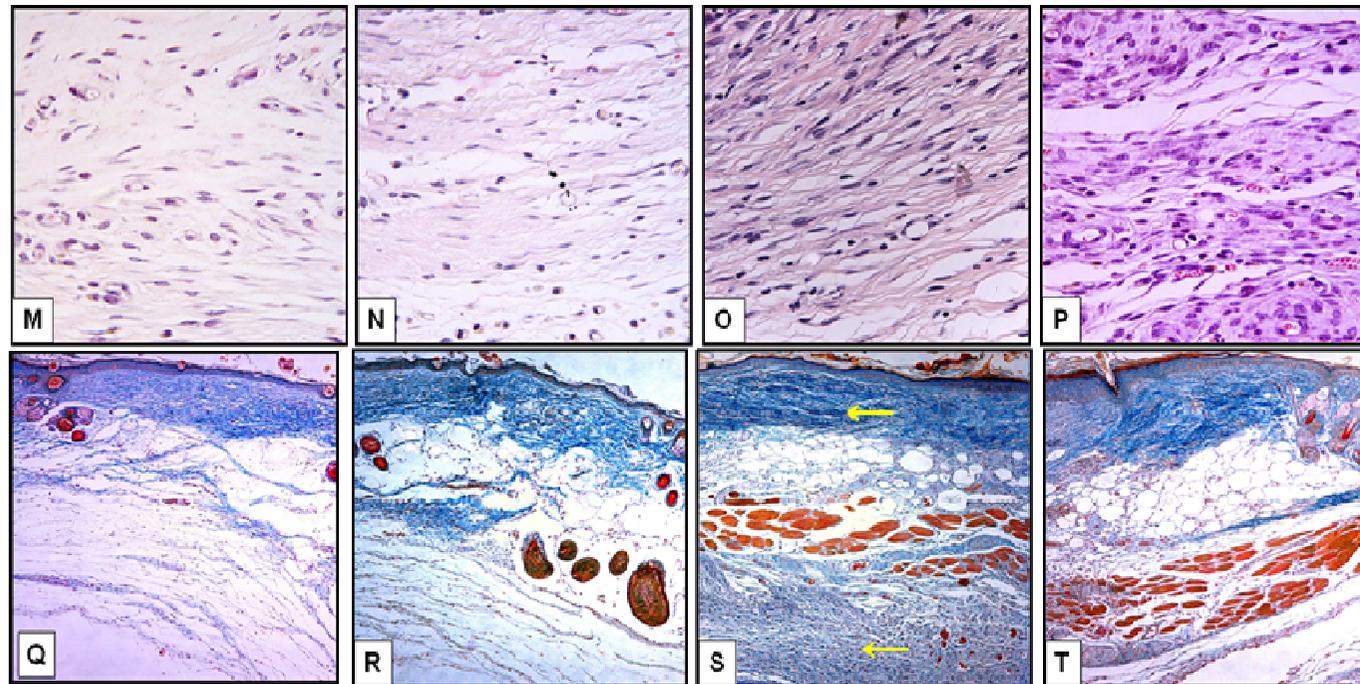
Figura 10 - Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a fibroplasia e colagênese no tecido neoformado de feridas incisionais.



Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2% ou 1%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. Nos dias 7 e 14 após a cirurgia o tecido neoformado foi removido e utilizado para confecção de lâminas histológicas pelos métodos de H&E ou tricrômio de Mallory. A contagem de fibroblastos foi realizada em regiões de 11 x 21 μm pelo *Plugin "Cell counter"* do *software* ImageJ@1.46. Resultados estão expressos como a média \pm E.P.M do número de fibroblastos (**A**). A densidade de colágeno foi determinada em regiões de 10 x 7 μm pelo *Plugin "Deconvolution"* do *software* ImageJ@. Resultados estão expressos como a média \pm E.P.M da porcentagem do número total de pixels (**B**) * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e # $p < 0,05$ ao grupo PVA (n=5 animais/grupo/dia; ANOVA - teste de Bonferroni).

Figura 11 - Fotomicrografias de feridas incisionais.





Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2% ou 1%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. Nos dias 2, 7 e 14 após a cirurgia fragmentos cilíndricos do tecido neoformado de feridas incisionais foram removidos e utilizados para confecção de lâminas histológicas pelos métodos de H&E ou tricrômio de Mallory. **Dia 2** - Sham (**A**), PVA (**B**), BioMem PVA/PL 0,2% (**C**) e 1% (**D**). Seta indica crosta; aumento de 100x - H&E. **Dia 7** - Sham (**E**), PVA (**F**), BioMem PVA/PL 0,2% (**G**) e 1% (**H**). Asterisco indica região com infiltrado de leucócitos; aumento de 100x- H&E. Sham (**I**), PVA (**J**), BioMem PVA/PL 0,2% (**K**) e 1% (**L**) evidencia infiltrado predominantemente mononuclear no dia 7; aumento de 400x- H&E. **Dia 14** - Sham (**M**), PVA (**N**), BioMem PVA/PL 0,2% (**O**) e PL 1% (**P**) evidencia fibroplasia; aumento de 400x - H&E. Sham (**Q**), PVA (**R**), BioMem PVA/PL 0,2% (**S**) e 1% (**T**). Seta evidencia colagênese; aumento de 100x- tricômio de Mallory.

5.3.5 BioMem PVA/PL aumenta os níveis de marcadores e mediadores da resposta inflamatória no tecido neoformado de feridas incisionais

BioMem PVA/PL aumenta a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido neoformado de feridas incisionais

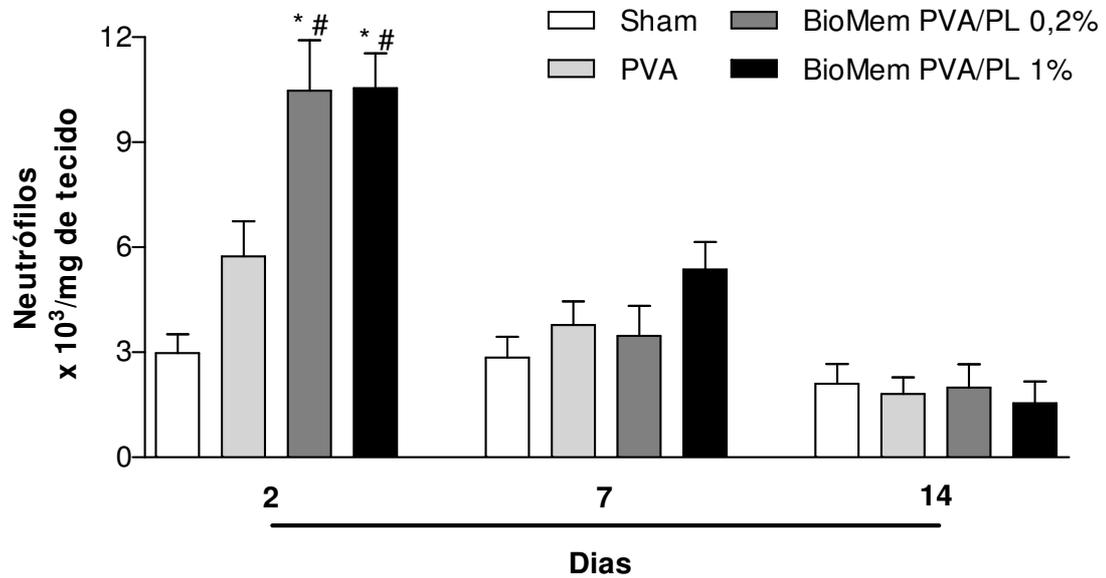
No intuito de confirmar se o infiltrado de leucócitos visto na análise histológica era de fato, predominantemente neutrofílico, nos propomos a determinar a atividade da enzima mieloperoxidase no tecido neoformado nos dias 2, 7 e 14 após a cirurgia (Figura 12). A atividade da enzima foi evidenciada de forma mais expressiva no dia 2. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos controles Sham ($2,9 \pm 0,5$) e PVA ($5,7 \pm 1,0$). Entretanto, as diferenças foram significativas ($p < 0,05$) entre animais que receberam implante de BioMem PVA/PL nas duas concentrações testadas 0,2% ($10,4 \pm 1,4$) e 1% ($10,5 \pm 1,0$) em relação aos controles Sham e PVA. Nos dias 7 e 14 houve redução na atividade da enzima, em relação ao dia 2, mas não havendo diferença significativa entre os grupos.

BioMem PVA/PL aumenta os níveis de nitrato/nitrito ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) no tecido neoformado

No modelo de cicatrização por primeira intenção, investigamos o envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito das proteínas do látex através da determinação dos níveis de nitrito no tecido neoformado de feridas incisionais (Figura 13).

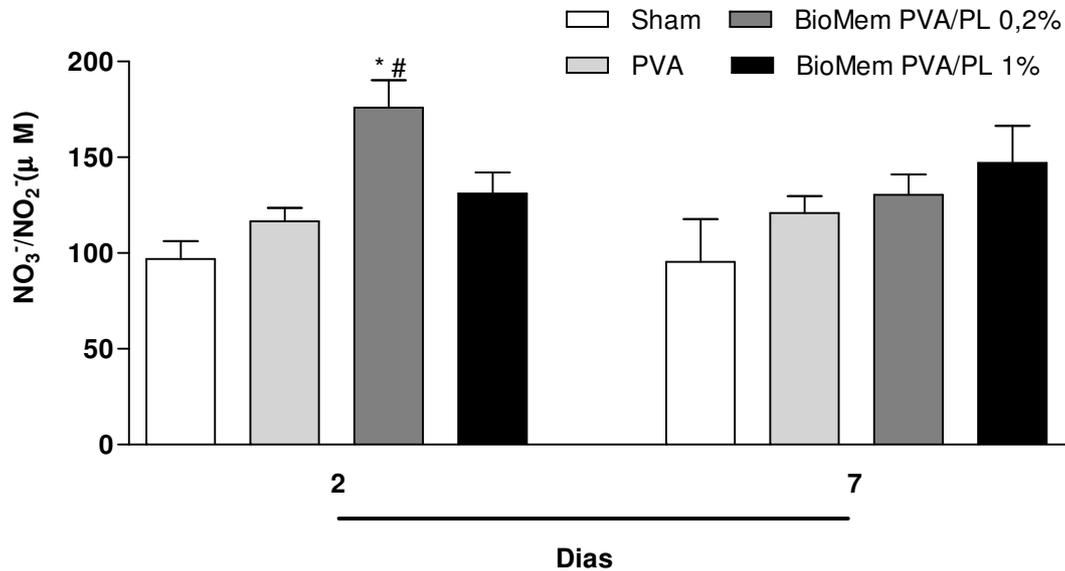
No dia 2 após a cirurgia, nenhuma diferença foi observada nos níveis de nitrito teciduais entre os grupos Sham ($97 \mu\text{M} \pm 0,9$), PVA ($116,6 \mu\text{M} \pm 7,0$) e BioMem PVA/PL 1% ($131,2 \mu\text{M} \pm 11$). Somente a BioMem PVA/PL 0,2% foi eficiente em aumentar de forma significativa os níveis de nitrato/nitrito ($176 \mu\text{M} \pm 14,3$) no tecido neoformado em relação aos grupos Sham e PVA ($p < 0,05$). No dia 7 após a cirurgia, os níveis de nitrato/nitrito tecidual foram estatisticamente iguais em todos os grupos avaliados.

Figura 12 – Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase no tecido neoforado de feridas incisionais.



Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2% ou 1%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. Nos dias 2, 7 e 14 após a cirurgia o tecido neoforado foi removido para determinação da atividade da enzima mieloperoxidase como um indicador do influxo de neutrófilos. Resultados estão expressos como a média \pm E.P.M. do número de neutrófilos $\times 10^3$ /mg de tecido. ** $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e # $p < 0,05$ ao grupo PVA (n=5 animais/grupo; ANOVA - teste de Bonferroni).

Figura 13 - Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre os níveis de nitrito no tecido neoformado de feridas incisionais.

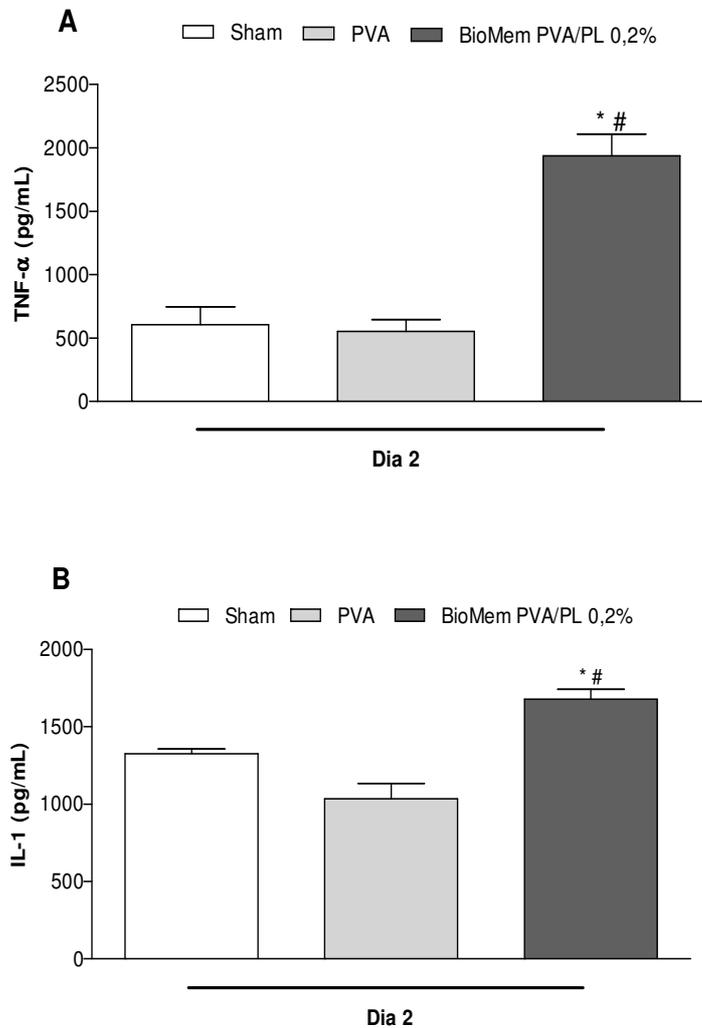


Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2% ou 1%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. Nos dias 2 e 7 após a cirurgia o tecido neoformado de feridas incisionais foi coletado para determinação dos níveis de nitrito através da reação de Griess. Resultados estão expressos como a média \pm E.P.M. da concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (μM). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e # $p < 0,05$ ao grupo PVA ($n=5$; ANOVA - teste de Bonferroni).

BioMem PVA/PL aumenta os níveis de TNF- α e IL-1 β no tecido neoformado de feridas incisionais

O tecido neoformado de feridas incisionais provenientes do dia 2 após a cirurgia foi utilizado para determinação dos níveis de TNF- α e IL-1 β (Figura 14 A e B, respectivamente). As diferenças nos níveis de TNF- α não foram significativas no tecido neoformado entre os grupos Sham (604,5 pg/mL \pm 139) e PVA (550,4 pg/mL \pm 93,6). Entretanto, a implantação de BioMem PVA/PL 0,2% induziu de forma significativa ($p < 0,05$) um aumento dos níveis de TNF- α (1936 pg/mL \pm 170), quando comparados aos grupos controles. Os níveis de IL-1 β determinado no tecido neoformado foram semelhantes entre os grupos controles Sham (1326 pg/mL \pm 29,4) e PVA (1034 pg/mL \pm 100). A implantação BioMem PVA/PL 0,2% (1679 pg/mL \pm 63,6) induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos grupos controles.

Figura 14 - Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β no tecido neoformado de feridas incisionais.



Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2 %). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. No dia 2 após a cirurgia o tecido neoformado de feridas incisionais foi removido para determinação dos níveis de TNF- α (A) e IL-1 β (B). Resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de sobrenadante/mg de tecido. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e # $p < 0,05$ ao grupo PVA (n=5; ANOVA - teste de Bonferroni).

5.3.6 BioMem PVA/PL não interferiu na densidade da vascular no tecido neoformado de feridas incisionais

Após a remoção dos fragmentos de pele no dia 2 após a cirurgia, observamos macroscopicamente uma maior densidade da rede vascular nas adjacências do tecido neoformado dos grupos de animais submetidos aos implantes de membrana. Desta forma, tornou-se interessante a investigação de possíveis diferenças na microvasculatura de animais submetidos ou não aos implantes de membrana. Considerando que as diferenças obtidas na análise macroscópica entre os grupos PL 0,2% e 1% foram mínimas, esta abordagem experimental foi conduzida apenas nos grupos controles e BioMem PVA/PL 0,2%.

Para tanto, a densidade vascular foi avaliada pelo Sistema de Quantificação de Angiogênese - SQUAN, através dos parâmetros de densidade total da área neovascular, comprimento vascular e número de vasos. Os dados obtidos (tabela 4) demonstram que nenhum estímulo à vascularização foi conferido aos animais que receberam implante de membrana com as proteínas do látex de *C.procera*, não havendo diferença significativa entre os grupos analisados.

Tabela 4 – Análise da densidade vascular ao tecido neoformado de feridas incisionais.

PARÂMETROS	GRUPOS EXPERIMENTAIS		
	Sham	PVA	BioMem PVA/PL 0,2%
Área neovascular (mm ²)	33.1 ± 0.9	33.5 ± 0.4	33.6 ± 0.5
Comprimento vascular (mm)	291 ± 8.1	307 ± 5.4	291 ± 4.7
Número de vasos	900 ± 22.7	903 ± 17.6	895 ± 15.4

Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. Os fragmentos de pele foram removidos sobre a área da cirurgia e utilizados para captura de imagens por microscopia óptica (aumento de 16x). A análise da densidade vascular foi realizada pelo Sistema de Quantificação de Angiogênese - SQUAN. Os dados representam a média ± E.P.M da área neovascular, comprimento vascular ou número de vasos (n=5 animais/grupo; ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

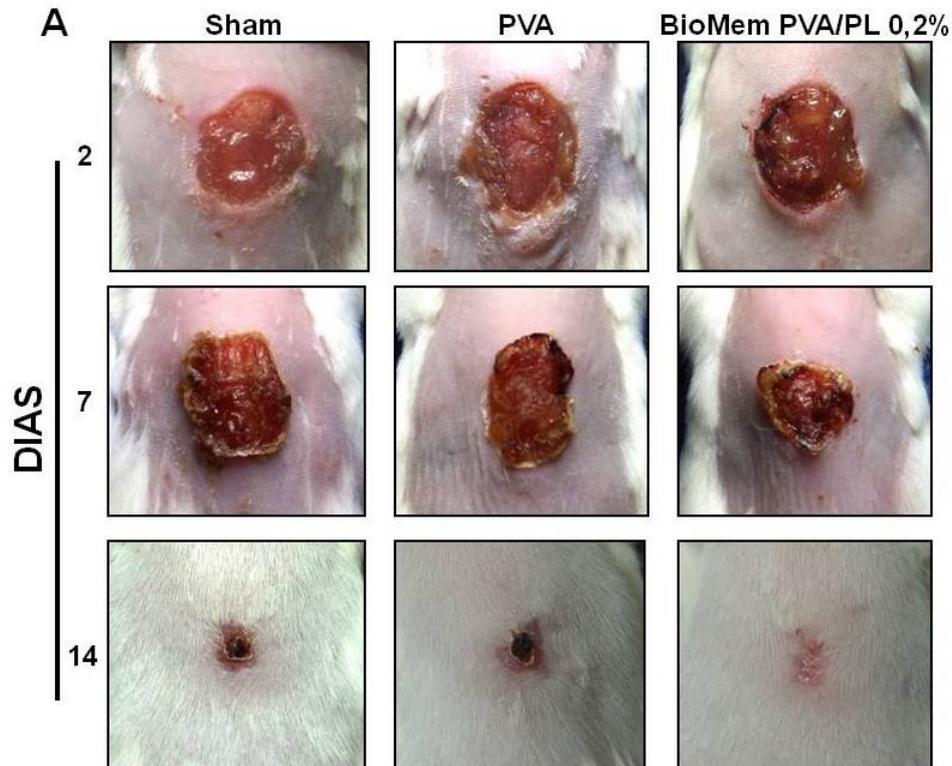
5.4 Efeito da BioMem PVA/PL sobre as diferentes etapas do processo cicatricial de feridas excisionais cutâneas em camundongos

5.4.1 A implantação da BioMem PVA/PL em feridas excisionais induziu aumento do edema, mas não interferiu na hiperemia

A evolução da cicatrização de feridas excisionais foi acompanhada através da análise macroscópica dos parâmetros de edema, hiperemia, área e reepitelização das feridas. Para uma melhor representação dos parâmetros avaliados, imagens digitalizadas foram obtidas nos dias 2, 7 e 14 (Figura 15 - A).

No 2º dia após o procedimento cirúrgico, as feridas de todos os grupos experimentais apresentavam-se edemaciadas e hiperêmicas (Figura 15 - B). O edema ocorreu de forma leve nos grupos controles, com medianas e variações de 1 (0 - 1) e 1 (0 - 2) para os animais Sham e PVA, respectivamente. A implantação de uma membrana com as proteínas do látex (PL 0,2 %) favoreceu um edema de intensidade moderada com mediana e variações de 2 (2 - 3) e, de forma significativa ($p < 0,05$) em relação aos grupos controles Sham e PVA. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos em relação à hiperemia e nos dias subsequentes de avaliação estes parâmetros não foram observados de forma consistente.

Figura 15 - Aspectos macroscópicos representativos de feridas excisionais.



GRUPOS EXPERIMENTAIS

B

Parâmetros	Sham	PVA	BioMem PVA/PL 0,2%
Edema	75%/ 1 (0-1)	90%/ 1 (0-2)	100%/ 2 (2-3) ^{*#}
Dia 2			
Hiperemia	80%/ 1 (0-1)	95%/ 1 (0-2)	100%/ 2 (1-2)

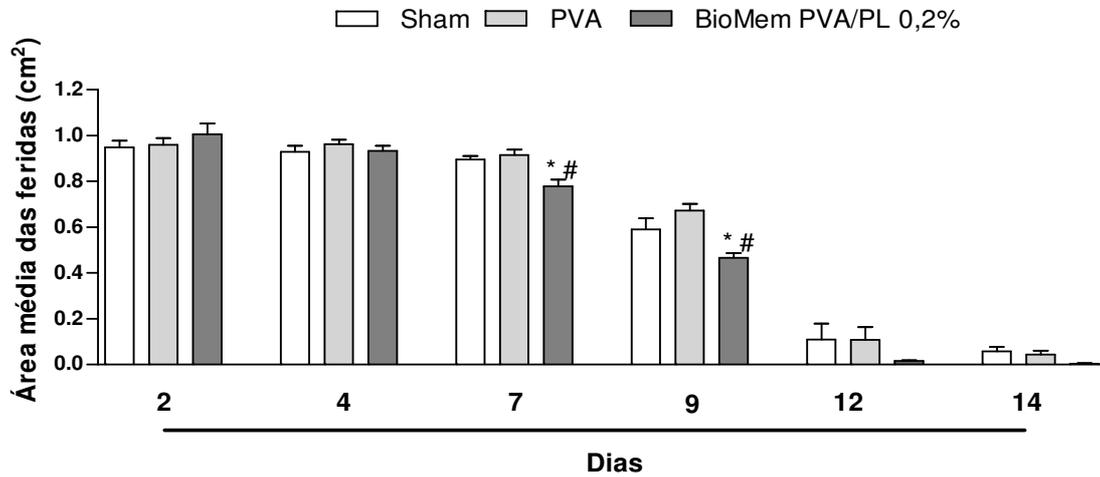
Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. Os aspectos macroscópicos representativos foram registrados (A) e os sinais flogísticos edema e hiperemia foram observados no dia 2 quanto à frequência (%) e intensidade (0-ausente, 1-leve, 2-moderado e 3-intenso) e expressos como percentual e mediana, respectivamente (B). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e # $p < 0,05$ ao grupo PVA (n=5 animais/grupo; Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn).

5.4.2 A implantação da BioMem PVA/PL diminui a área e favorece reepitelização de feridas excisionais

No intuito de investigar o efeito das proteínas do látex na contração de feridas excisionais, a área das feridas foi estimada nos dias 2, 4, 7, 9 e 14 após a cirurgia. As diferenças foram significativas a partir do dia 7. Neste dia, nenhuma diferença foi observada entre os grupos Sham ($0,90 \pm 0,01 \text{ cm}^2$) e PVA ($0,91 \pm 0,02 \text{ cm}^2$), enquanto que a implantação de uma membrana com PL 0,2% favoreceu de forma significativa ($p < 0,05$) a redução na área das lesões ($0,77 \pm 0,03 \text{ cm}^2$), quando comparado aos grupos controles. As diferenças mantiveram-se no dia 9 após a cirurgia e não mais a partir do dia 12 (Figura 16).

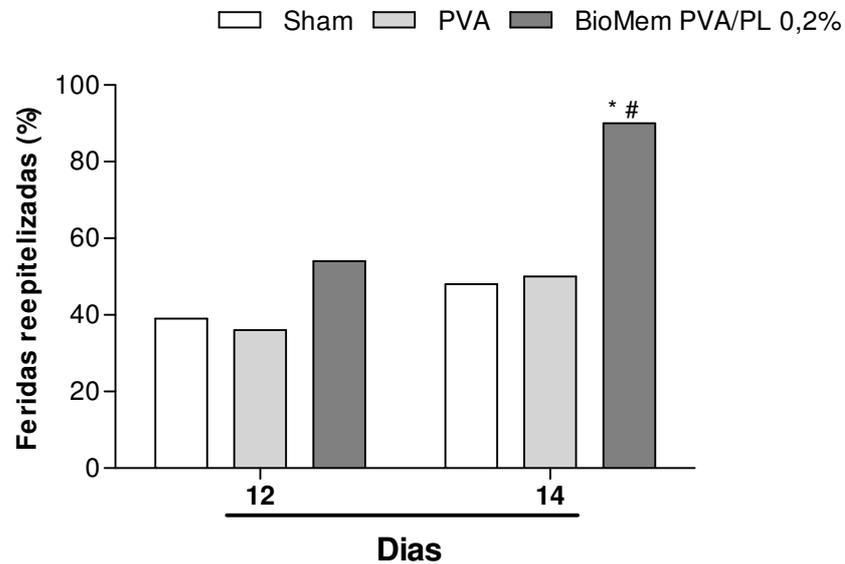
As feridas que macroscopicamente não apresentavam crosta aderida ao tecido cicatricial foram consideradas reepitelizadas. No dia 14 após a cirurgia, o percentual de reepitelização foi semelhante para os controles Sham (48%) e PVA (50%). Neste mesmo período o grupo PL 0,2% apresentava-se com 90% das feridas reepitelizadas e, de forma significativa em relação aos grupos controles (Figura 17).

Figura 16 - Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a redução da área de feridas excisionais.



Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. Os animais do grupo Sham foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, não sofrendo, contudo, implantação de membranas. A área das feridas foi determinada planimetricamente nos dias 2, 4, 7, 9, 12 e 14 após a cirurgia. Resultados estão expressos como a média \pm E.P.M. da área média das feridas. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e # $p < 0,05$ ao grupo PVA; (n=15, ANOVA - teste de Bonferroni).

Figura 17 - Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a reepitelização de feridas excisionais.



Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. A análise macroscópica da reepitelização foi avaliada nos dias 12 e 14 após procedimento cirúrgico. Resultados estão expressos como o percentual de feridas reepitelizadas. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e # $p < 0,05$ ao grupo PVA; (n=15, Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn).

5.4.3 A implantação da BioMem PVA/PL intensifica o edema, infiltrado de leucócitos e a degranulação de mastócitos em feridas excisionais

O efeito da BioMem PVA/PL 0,2% nas diferentes etapas do processo cicatricial de feridas excisionais foi analisado microscopicamente e estão representados na figura 21.

Os parâmetros inflamatórios de edema e infiltrado de leucócitos foram analisados de forma semi-quantitativa por microscopia em lâminas histológicas provenientes dos dias 2, 7 e 14 após a cirurgia (Tabela 5). O edema entremeado às fibras colágenas foi observado na derme superficial e profunda de todos os grupos experimentais no dia 2 após a cirurgia. Este parâmetro ocorreu de forma leve nos tecidos de animais do grupo Sham e moderado para o grupo PVA, com medianas e variações de 1 (1-2) e 2 (2-3), respectivamente. Neste mesmo período, um intenso edema foi verificado nos tecidos de animais que recebem o implante com a BioMem PVA/PL 0,2% com mediana e variações de 3 (2-3) e, significativamente diferente ($p < 0,05$) do grupo Sham. Nos dias 7 e 14 após a cirurgia, o edema não foi visualizado de forma consistente em nenhum grupo experimental.

A análise histológica evidenciou um infiltrado de leucócitos, basicamente neutrofílico, em feridas excisionais de todos os grupos experimentais do dia 2 após a cirurgia. Vale ressaltar que das três regiões analisadas (crosta, derme superficial e profunda), uma maior densidade de leucócitos foi conferida na crosta das lesões. A análise semi-quantitativa demonstrou que este parâmetro ocorreu de forma leve para o grupo Sham e moderada para PVA, com mediana e variações de 1,5 (1-2) e 2 (2-2), respectivamente. As diferenças entre os grupos controles e BioMem PVA/PL 0,2% foram significativas ($p < 0,05$), o que pode ser visto pelo intenso infiltrado, com mediana e variações de 3 (2-3) (tabela 5).

A infiltração de leucócitos persistiu em feridas excisionais de todos os grupos experimentais no dia 7 após a cirurgia. A análise demonstrou que o perfil celular era predominantemente mononuclear e, diferente do dia 2, localizava-se basicamente na derme superior e inferior. No que diz respeito às intensidades, o infiltrado ocorreu de forma moderada para os grupos Sham, PVA e intensa para o grupo PL 0,2%, com medianas e variações de 2 (1-2), 2(2-3) e 3 (1-3), respectivamente. As diferenças

foram significativas ($p < 0,05$) entre o grupo BioMem PVA/PL 0,2% e o controles Sham e PVA.

A redução do infiltrado de leucócitos foi observada no dia 14, quando comparado ao dia 7 em todos os grupos experimentais. Este parâmetro ocorreu de forma leve para o grupo controles e moderada para o grupo BioMem PVA/PL 0,2%, com mediana e variações de 1 (1-2) e 2 (1-2), respectivamente. As diferenças foram significativas ($p < 0,05$) entre BioMem PVA/PL 0,2% e os grupos controles (Tabela 5).

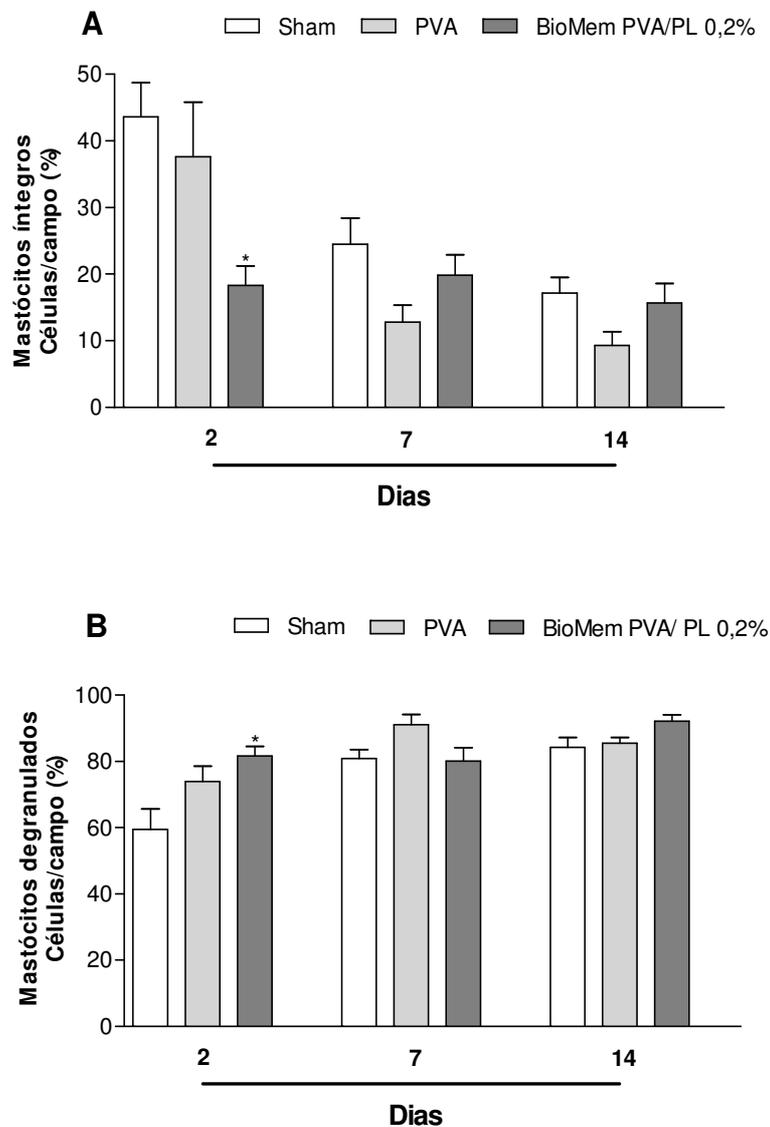
A análise realizada em lâminas provenientes do dia 2 após a cirurgia demonstrou a presença de mastócitos íntegros e degranulados em todos os grupos experimentais (figura 18). O percentual de mastócitos degranulados foi semelhante entre os grupos controles Sham ($59,47\% \pm 6,1$) e PVA ($73,9\% \pm 4,5$). Por outro lado, a BioMem PVA/PL 0,2% conferiu um maior estímulo aos mastócitos, com a média do percentual de células degranuladas em $81,63\% \pm 3,0$, sendo a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle Sham. A análise realizada em lâminas provenientes do dia 7 e 14 após a cirurgia também demonstrou a presença de mastócitos íntegros e degranulados, embora não houvesse diferença significativa entre os grupos analisados.

Tabela 5 – Avaliação microscópica do efeito das membranas (PVA e PVA/PL 0,2%) sobre o edema e infiltrado de leucócitos (neutrófilos e mononucleares) em feridas excisionais.

GRUPOS EXPERIMENTAIS			
DIAS	Sham	PVA	BioMem PVA/PL 0,2%
Edema			
2	1 (1 - 2)	2 (2 - 3)	3 (2 - 3) [*]
Infiltrado de leucócitos			
2	1.5 (1 - 2)	2 (2 - 2)	3 (2 - 3) ^{* #}
7	2 (1 - 2)	2 (2 - 3)	3 (1 - 3) ^{* #}
14	1 (1 - 2)	1 (1 - 2)	2 (1 - 2) ^{* #}

Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. Nos dias 2, 7 e 14 após a cirurgia os fragmentos de pele foram removidos para confecção de lâminas histológicas H&E. Os dados representam mediana e variação dos escores: (0) ausente; (1) leve; (2) moderado e (3) intenso em 15 campos/lâmina para edema (aumento de 400X). ^{*}p<0,05 indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e [#]p<0,05 ao grupo PVA (n=15 animais/grupo; Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn).

Figura 18 – Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL0,2 %) sobre a degranulação de mastócitos em feridas excisionais.



Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. Nos dias 2, 7 e 14 após a cirurgia as feridas foram removidas e utilizadas para confecção de lâminas histológicas coradas com azul de toluidina. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) do percentual de mastócitos íntegros (**A**) ou degranulados (**B**) em 15 campos/lâmina (aumento de 400x). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e # $p < 0,05$ ao grupo PVA (n=5 animais/grupo/dia; ANOVA - teste de Bonferroni).

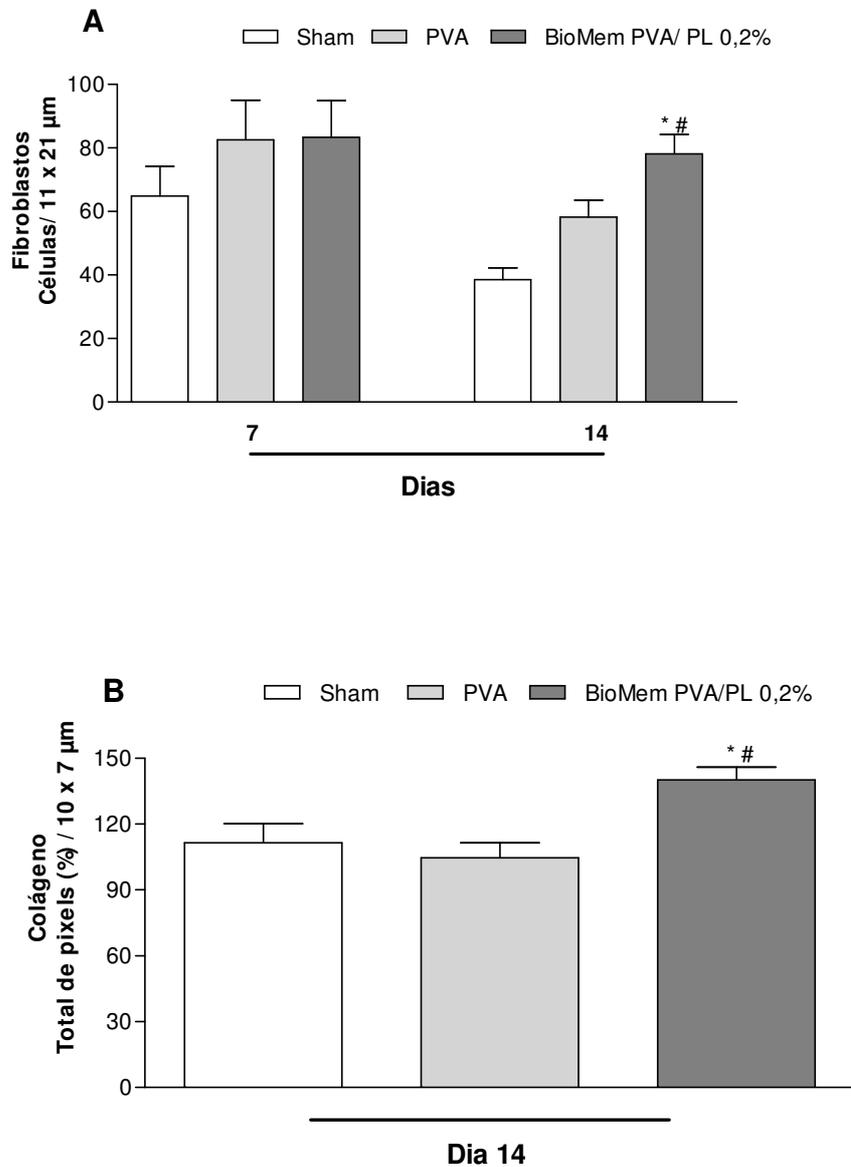
5.4.4 A implantação da BioMem PVA/PL aumenta a população de fibroblastos, produção de colágeno e a espessura do novo epitélio de feridas excisionais.

A fibroplasia foi avaliada em feridas excisionais em lâminas correspondentes aos dias 7 e 14 após a cirurgia (Figura 19 - A). Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi obtida no dia 7 após a cirurgia. No dia 14, não houve diferença entre os grupos Sham ($38,5 \pm 3,6$) e PVA ($58,2 \pm 5,3$), enquanto que um maior estímulo à fibroplasia foi conferido nas lesões cicatrizadas de animais do grupo BioMem PVA/PL 0,2% ($78,1 \pm 6,1$), comparado aos grupos controles ($p < 0,05$).

Os dados obtidos demonstram que a colagênese foi evidenciada no tecido cicatricial de todos os grupos experimentais no dia 14 após a cirurgia (Figura 19 – B). Nenhuma diferença foi observada entre os controles Sham e PVA. O maior estímulo foi conferido aos animais que receberam o implante com a BioMem PVA/PL 0,2%, ($140,2\% \pm 5,7$), sendo significativa ($p < 0,05$), quando comparado aos controles Sham ($111,4\% \pm 8,7$) e PVA ($104,7\% \pm 8,7$).

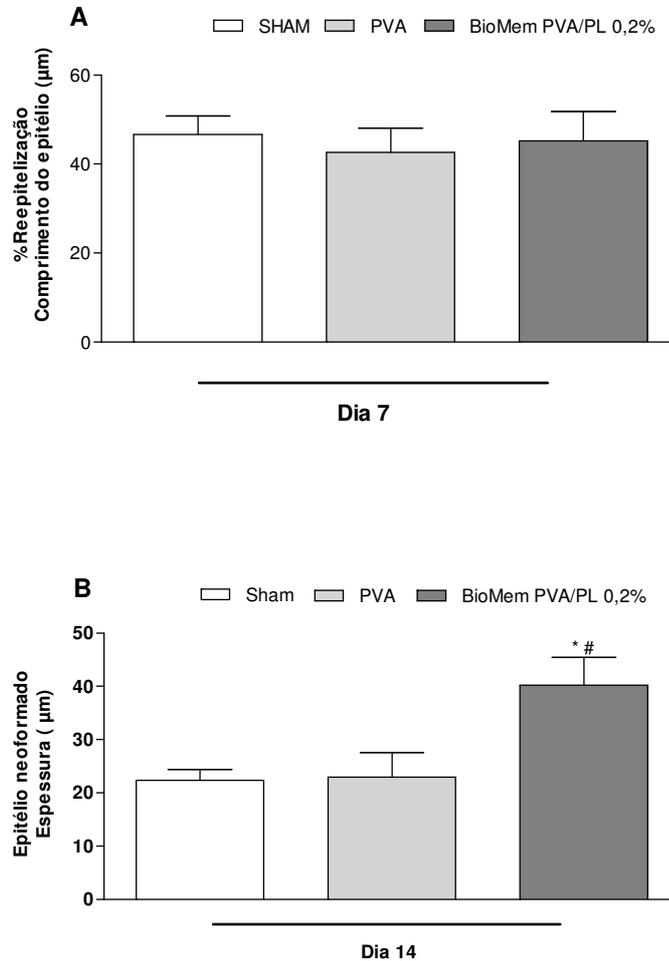
A medida do comprimento de um novo epitélio no dia 7 após a cirurgia não evidenciou nenhuma diferença significativa entre os grupos (Figura 20 - A). O epitélio neoformado no tecido cicatricial foi avaliado quanto à espessura no dia 14 após a cirurgia (Figura 20 – B). Esta análise foi realizada em feridas com reepitelização parcial ou total. Nenhuma diferença na espessura do epitélio foi observada entre os grupos Sham ($22,4 \pm 2$) e PVA ($22,9 \pm 4,6$). Entretanto, os dados obtidos demonstram que a implantação da BioMem PVA/PL 0,2 % favoreceu o surgimento de um novo epitélio com maior espessura ($40,2 \pm 5,2$), de forma significativa ($p < 0,05$), quando comparado aos grupos controles.

Figura 19 - Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a fibroplasia e colagênese de feridas excisionais.



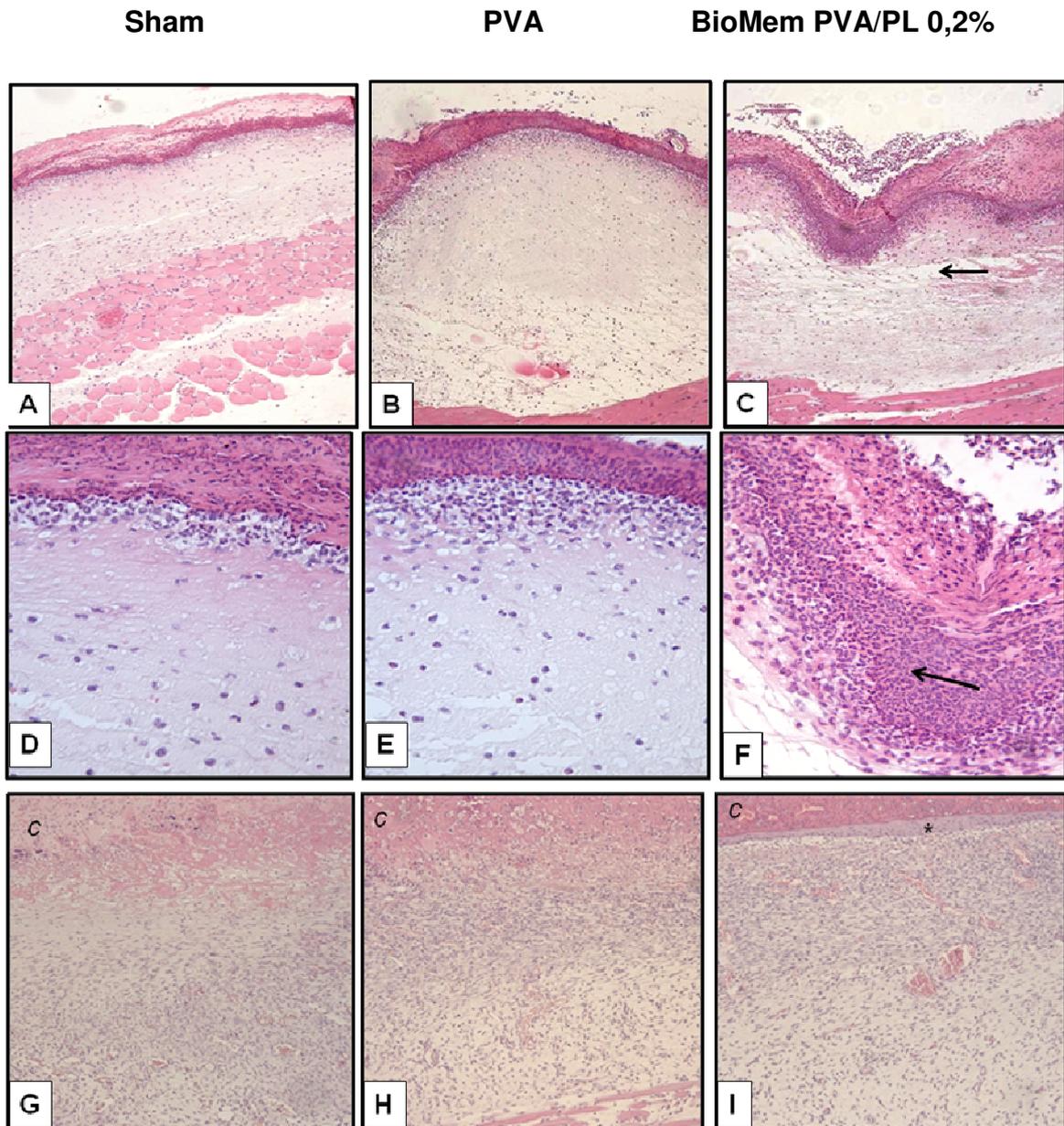
Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. Nos dias 7 e 14 após a cirurgia as feridas foram removidas e utilizadas para confecção de lâminas histológicas pelos métodos de H&E ou tricrômio de Mallory. A contagem de fibroblastos foi realizada em regiões de 11 x 21 μm pelo *Plugin "Cell counter"* do *software ImageJ*®1.46. Resultados estão expressos como a média \pm E.P.M do número de fibroblastos (**A**). A densidade de colágeno foi determinada em regiões de 10 x 7 μm pelo *Plugin "Deconvolution"* do *software ImageJ*®. Resultados estão expressos como a média \pm E.P.M da porcentagem do número total de pixels (**B**) * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e # $p < 0,05$ ao grupo PVA (n=5 animais/grupo/dia; ANOVA - teste de Bonferroni).

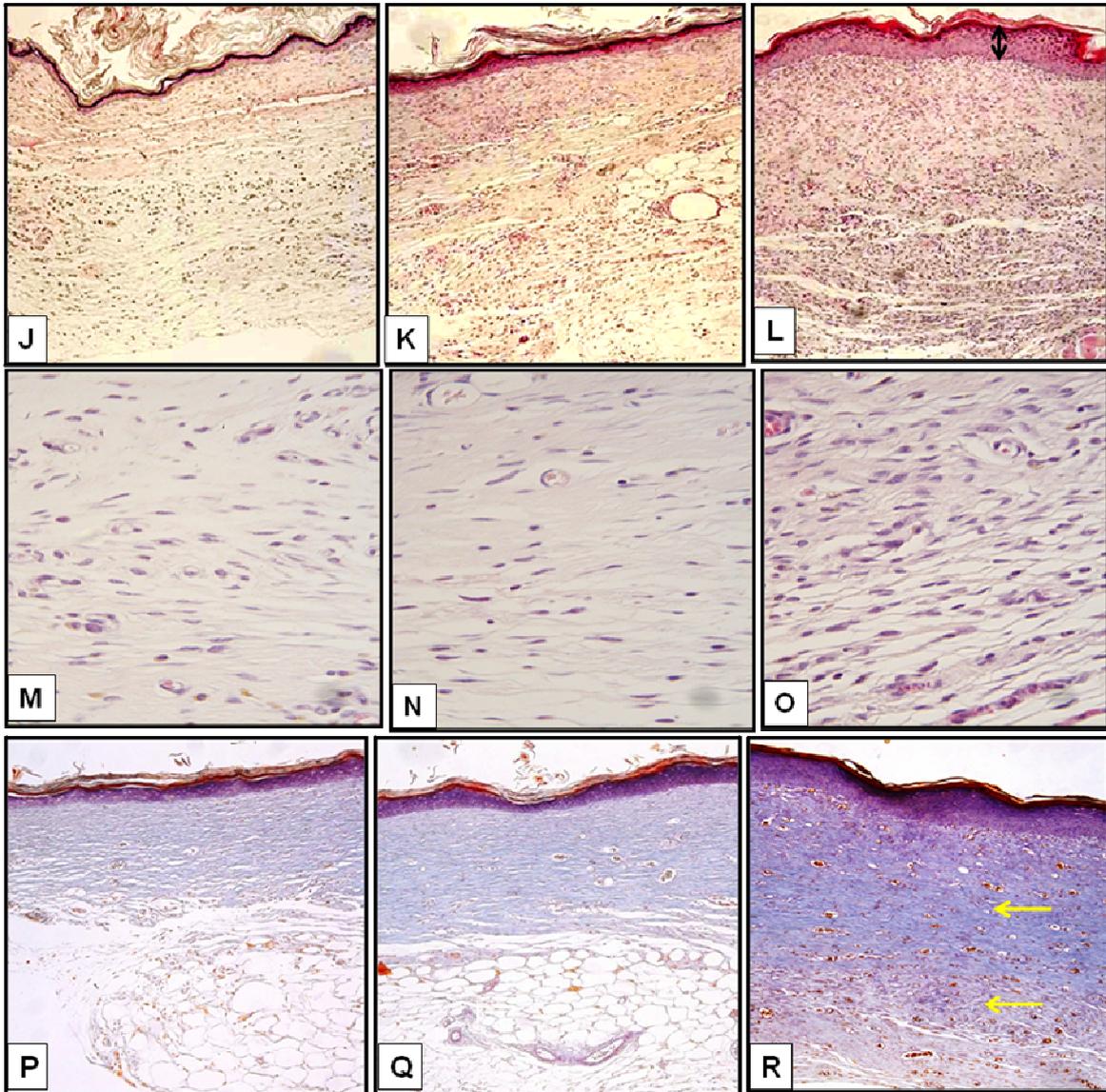
Figura 20- Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a reepitelização de feridas excisionais.



Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. Nos dia 7 e 14 após a cirurgia as feridas e o tecido cicatricial, respectivamente, foram removidos e utilizado para confecção de lâminas histológicas coradas com H&E. O comprimento do novo epitélio foi determinado e 6 imagens de 655 x 492 µm. Os resultados foram expressos como o percentual de reepitelização (**A**). A espessura do epitélio foi determinada através de 18 medidas em imagens de 655 x 492 µm. Resultados foram expressos como a média ± E.P.M da espessura do epitélio neoformado (**B**). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e # $p < 0,05$ ao grupo PVA (n=5; ANOVA - teste de Bonferroni).

Figura 21 - Fotomicrografias de feridas excisionais.





Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. Nos dias 2, 7 e 14 após a cirurgia as feridas excisionais foram removidas e utilizadas para confecção de lâminas histológicas pelos métodos de H&E ou tricrômio de Mallory. **Dia 2** - Sham (A), PVA (B), BioMem PVA/PL 0,2% (C). Seta evidencia edema; aumento de 100x- H&E. - Sham (D), PVA (E), BioMem PVA/PL 0,2% (F). Seta evidencia crosta com infiltrado de leucócitos; aumento de 400x- H&E. **Dia 7** - Sham (G), PVA (H), BioMem PVA/PL 0,2% (I). Asterisco evidencia início de reepitelização sob a crosta (c); aumento de 400x- H&E. **Dia 14**- Sham (J), PVA (K), BioMem PVA/PL 0,2% (L). Seta evidencia espessura do novo epitélio; aumento de 100x- H&E. Sham (M), PVA (N), BioMem PVA/PL 0,2% (O), evidenciando fibroplasia; aumento de 400x – H&E. Sham (P), PVA (Q), BioMem PVA/PL 0,2% (R). Seta evidencia colagênese; aumento de 100x - tricrômio de Mallory.

5.4.5 A implantação da BioMem PVA/PL aumenta os níveis de marcadores e mediadores da resposta inflamatória em feridas excisionais

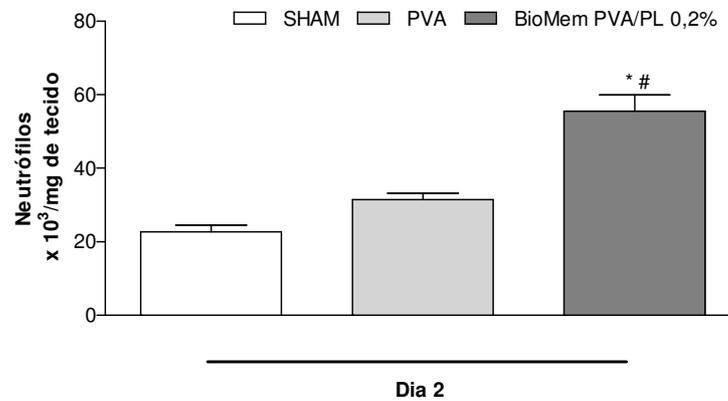
BioMem PVA/PL aumenta a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em feridas excisionais

Considerando as diferenças que foram obtidas no tecido neoformado de feridas incisionais, a atividade de MPO foi determinada em feridas excisionais somente no dia 2 após a cirurgia (Figura 22). Neste modelo de cicatrização, nenhuma diferença foi observada entre os controles Sham ($22,7 \pm 1,7$) e PVA ($31,4 \pm 1,8$). A maior atividade da enzima também foi obtida em feridas de animais que receberam o implante da BioMem PVA/PL 0,2% ($55,5 \pm 4,4$), sendo as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos grupos controles.

BioMem PVA/PL aumenta os níveis de TNF- α , mas não de IL-1 β em feridas excisionais

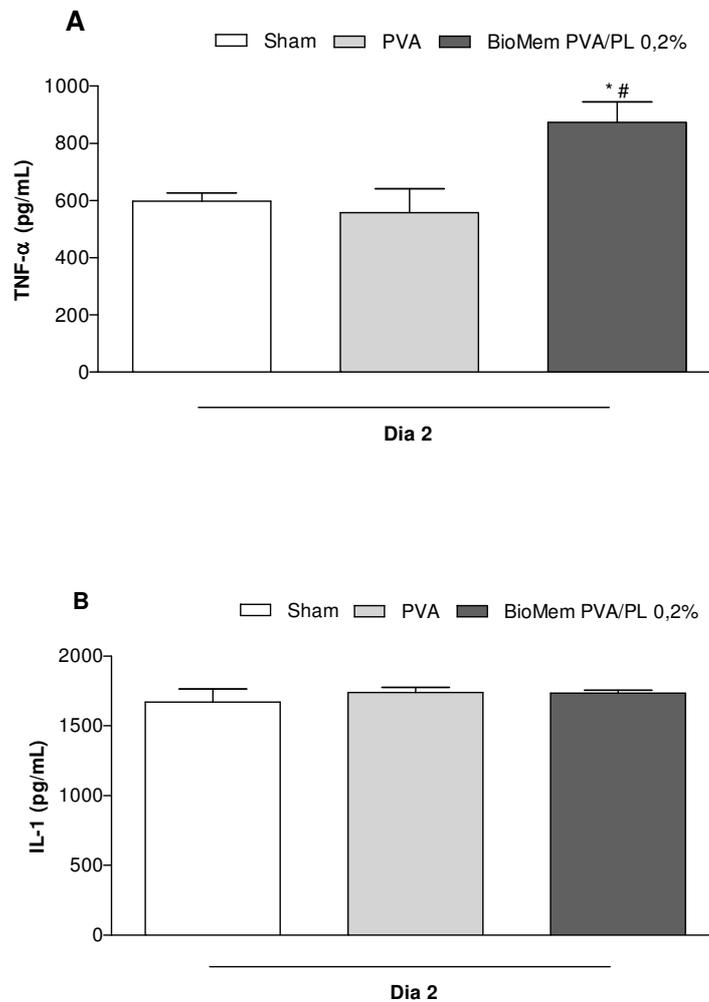
Amostras de feridas excisionais provenientes do dia 2 após a cirurgia foram utilizadas para determinação dos níveis de TNF- α e IL-1 β (Figura 23). As diferenças nos níveis de TNF- α não foram significativas nas amostras de feridas entre os grupos Sham ($598 \text{ pg/mL} \pm 28,6$) e PVA ($558 \text{ pg/mL} \pm 83,3$), enquanto que a implantação da BioMem PVA/PL 0,2% ($874 \text{ pg/mL} \pm 71,6$) induziram aumento dos níveis de TNF- α ($p < 0,05$). Por outro lado, os níveis de IL-1 β não diferiu entre os grupos experimentais.

Figura 22 – Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase em feridas excisionais.



Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. No dia 2 após a cirurgia as feridas foram removidas para determinação da atividade da enzima mieloperoxidase como um indicador do influxo de neutrófilos. Resultados estão expressos como a média \pm E.P.M. do número de neutrófilos $\times 10^3/\text{mg}$ de tecido. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e # $p < 0,05$ ao grupo PVA (n=5; ANOVA - teste de Bonferroni).

Figura 23 - Efeito das membranas (PVA e BioMem PVA/PL) sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β em feridas excisionais.

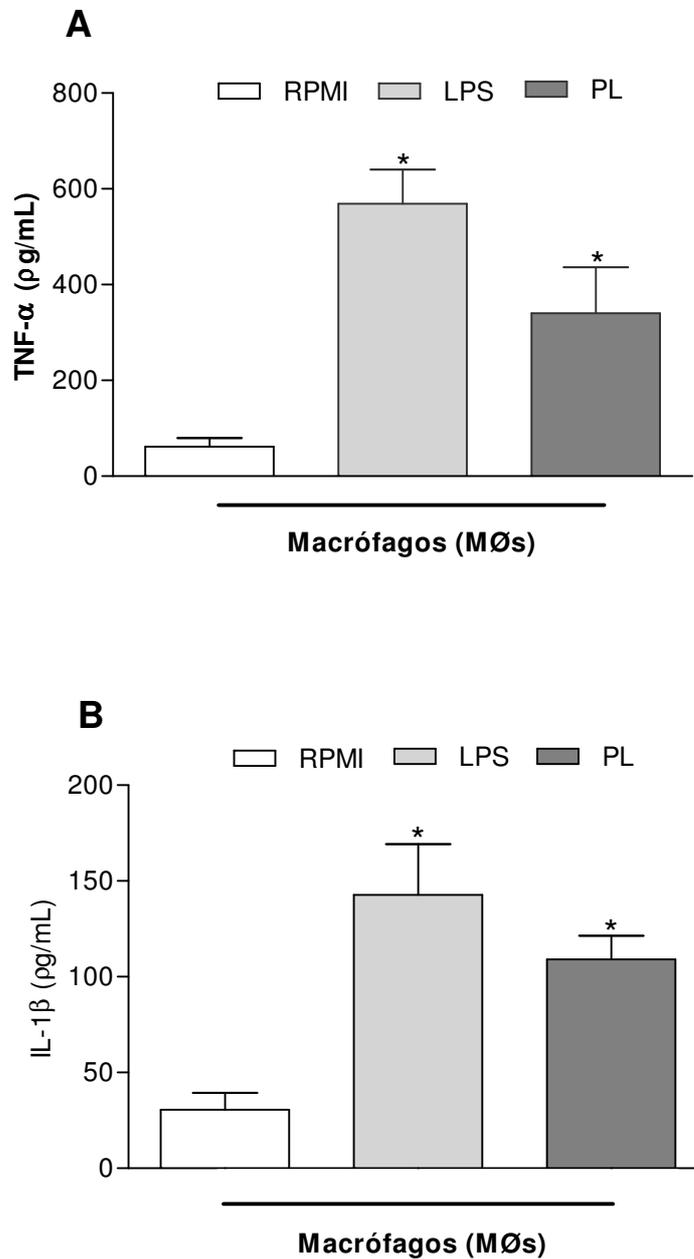


Camundongos foram submetidos à cirurgia para implantação de membranas contendo 1% de PVA (grupo PVA) ou 1% de PVA associado à PL (BioMem PVA/PL 0,2%). O grupo Sham sofreu cirurgia sem implantação de membranas. No dia 2 após a cirurgia as feridas foram removidas para determinação dos níveis de TNF- α (A) e IL-1 β (B). Resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de sobrenadante/mg de tecido. *p < 0,05 indica diferença estatística comparado com o grupo Sham e #p < 0,05 ao grupo PVA (n=5; ANOVA - teste de Bonferroni).

5.4.6 As proteínas do látex de *C.procera* (PL) induzem a liberação de TNF- α e IL-1 β por macrófagos cultivados de camundongos

O possível efeito das proteínas do látex (PL) em estimular diretamente macrófagos foi investigado em uma cultura de células (Figura 24). O sobrenadante da cultura foi utilizado para determinação dos níveis de TNF- α e IL-1 β . A estimulação de macrófagos com LPS induziu um aumento significativo dos níveis de TNF- α ($569 \pm 71,5$) e IL-1 β ($142,8 \pm 26,5$), quando comparado aos níveis do controle negativo RPMI ($p < 0,05$). PL também conferiu um estímulo aos macrófagos à liberação de TNF- α ($340,6 \pm 95,6$) e IL-1 β ($109 \pm 12,4$), semelhante ao LPS e significativamente diferente do controle negativo RPMI ($p < 0,05$).

Figura 24 - Efeito das proteínas do látex de *Calotropis procera* (PL) sobre a liberação de TNF- α e IL-1 β por macrófagos peritoneais de camundongos.



As barras representam a média \pm EPM dos valores de TNF- α e IL-1 β no sobrenadante de macrófagos incubados com RPMI (controle negativo), LPS (1 μ g/mL; controle positivo) ou PL (500 μ g/mL). * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o controle negativo (ANOVA - teste de Bonferroni).

6 DISCUSSÃO

As feridas cutâneas constituem um importante problema de saúde pública que afeta milhões de pacientes em todo o mundo, devido a sua cronicidade e alta morbidade (RANZATO *et al.*, 2011). Na tentativa de reduzir esta problemática, muitos esforços têm-se centrado na compreensão da fisiologia e tratamento de feridas com ênfase em novas abordagens terapêuticas e no contínuo desenvolvimento de tecnologias para os cuidados de feridas cutâneas (VELNAR *et al.*, 2009).

Em vista disso, o tratamento de feridas vem sendo tema destacado em diversos setores profissionais da área de saúde no mundo todo. Por isso, vêm-se buscando alternativas terapêuticas eficazes, de fácil aplicação e baixo custo, levando assim a um interesse por medicações fitoterápicas e homeopáticas.

Muitos produtos naturais de origem vegetal são conhecidos popularmente e cientificamente por apresentarem propriedades cicatrizantes (PAIVA *et al.*, 2002; MARQUES *et al.*, 2004; AKKOL *et al.*, 2009; GURUNG *et al.*, 2009; NAYAK *et al.*, 2009; DESHMUKH *et al.*, 2009; KOKANE *et al.*, 2009). Entretanto, na maioria das vezes, o potencial cicatricial destas plantas é atribuído ao uso de um extrato aquoso e/ou orgânico obtido a partir das raízes, folhas ou frutos, ou seja, uma mistura muito complexa de pequenos compostos e macromoléculas onde pouca ou nenhuma caracterização das moléculas bioativas envolvidas nos eventos farmacológicos são descritos.

A planta de *C. procera* produz constitutivamente látex e esta secreção é descrita por possuir propriedades bacteriolíticas, inseticida, cicatrizante e anti-diarréica (SHUKLA *et al.*, 1961; MORSY *et al.*, 2001; DEWAN *et al.*, 2000; RASIK *et al.*, 1999; KUMAR *et al.*, 2001). O látex é um produto químico complexo, constituído de uma grande diversidade de moléculas, e os compostos derivados do metabolismo secundário vegetal são amplamente descritos neste fluido (AGRAWAL; KONNO, 2009). Entretanto, proteínas estão presentes em muitos fluidos laticíferos e, embora o estudo funcional destas moléculas tenha avançado e o número de publicações a este respeito venha crescendo, há um enorme descompasso entre a descrição das atividades medicinais do látex e o envolvimento de proteínas laticíferas nestes efeitos.

Associado aos relatos do uso popular do látex da planta *C. procera* para o tratamento de doenças na pele como infecções e impinges, o potencial cicatrizante deste látex é também corroborado cientificamente pelos resultados do estudo de Rasik *et al.* (1999). Estes autores demonstraram que este fluído quando aplicado em feridas induzidas experimentalmente, reduz o tamanho da área agredida. Entretanto, estes resultados foram obtidos a partir de um extrato aquoso do látex bruto e não de uma molécula ou fração específica e, até o momento, não existem relatos na literatura que associem o efeito cicatrizante do látex de *C. procera* às proteínas bioativas existentes na fração protéica. Desta forma, no presente trabalho, as proteínas extraídas do látex de *C. procera* foram utilizadas na confecção de uma membrana, tendo como matriz o poli (álcool vinílico) (PVA). Esta membrana foi denominada como BioMem PVA/PL e testada nos modelos de cicatrização por primeira e segunda intenção.

Os biomateriais têm sido desenvolvidos para gerarem respostas químicas e biológicas específicas (BRANDL *et al.*, 2007). De acordo com a literatura, na última década, muitos avanços têm sido alcançados na área de regeneração de tecidos. Estes suportes para crescimento de tecidos podem ser produzidos de uma maneira geral na forma de espumas, hidrogéis, e membranas, como acontece com a pele artificial (WEIGUEL *et al.*, 2006; WEINAND *et al.*, 2006).

Vários tipos de materiais podem ser usados na produção de suportes para o crescimento de tecidos. A escolha de um ou mais polímeros como componentes de um biomaterial é importante, levando-se em consideração principalmente, as propriedades finais requeridas. O poli (álcool vinílico) (PVA) é a resina sintética de maior produção no mundo. Possui boas características mecânicas, como maleabilidade, podendo ser moldado de diversas formas, é solúvel em água e de preparo fácil. Considerando que não apresenta citotoxicidade e não é carcinogênico e mutagênico, tem sido bastante utilizado em biomateriais. O PVA possui excelente transparência, consistência macia, quando na forma de uma membrana, é biocompatível e biologicamente inerte (ISENBERG; WONG, 2006; COSTA JR; MANSUR, 2008).

A análise físico-química da BioMem PVA/PL 1% demonstrou através da espectroscopia de absorção na região do infravermelho que nas proporções utilizadas não ocorreram interações fortes do PVA com as proteínas, já que não foi

observada a formação de novas bandas ou o deslocamento destas. Portanto, há um indicativo de que o PVA além de formar uma dispersão estável preveniu a coagulação das proteínas conservando a cristalinidade. Através da análise termogravimétrica foi possível observar que a solubilização da proteína no PVA tornou a membrana termicamente mais estável. Além disso, demonstramos claramente que o PVA não conferiu nenhum estímulo ao processo cicatricial, visto que não houve diferença nos resultados obtidos entre os animais controle Sham e aqueles do grupo PVA. Desta forma, o PVA representou uma escolha adequada como matriz à elaboração da biomembrana com as proteínas do látex.

A despeito das propriedades medicinais do látex de *C. procera* íntegro, toxicidade, injúria endotelial permanente e efeitos letais também têm sido observados em modelos animais (BIEDNER *et al.*, 1977; HANDA *et al.*, 1984; BADWI *et al.*, 1998; PADHY; KUMAR, 2005; AL-MEZAINI *et al.*, 2005). Entretanto, apesar dos nossos estudos serem realizados com uma fração protéica de *C. procera* livre de borracha (PL), antes de iniciarmos os protocolos experimentais propostos para este estudo, decidimos investigar possíveis efeitos citotóxicos de PL. Para tanto, avaliamos o efeito *in vitro* de PL em culturas de neutrófilos humanos através dos testes clássicos de viabilidade celular: MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) e LDH (lactato desidrogenase) que permitem a detecção de alterações na atividade metabólica mitocondrial e danos ao nível da membrana celular, respectivamente (MOSMANN, 1983).

Nossos resultados demonstraram que PL, mesmo em concentrações crescente (1 – 100 µg/mL), não conferiu nenhum estímulo nocivo à integridade dos neutrófilos, visto pela baixa atividade de LDH e a alta viabilidade dos neutrófilos pelo teste do MTT, quando comparado ao composto triton X-100, cuja atividade citotóxica é bem caracterizada. Oliveira *et al.* (2007), avaliaram a citotoxicidade de PL contra diferentes linhagem de células tumorais e relataram a alta toxicidade nas concentrações entre 0,42 à 1,36 µg/mL. Entretanto, nestas mesmas concentrações, não foram observados efeitos visíveis sobre a viabilidade ou morfologia de células mononucleares saudáveis expostas a PL, o que em conjunto parece sugerir uma seletividade destas proteínas no reconhecimento de moléculas na superfície de células tumorais ou normais.

Quanto ao estudo do efeito da BioMem PVA/PL em feridas cutâneas, primeiramente utilizou-se o modelo de cicatrização de feridas incisionais em camundongos. Este modelo é ideal para avaliação das modificações teciduais devido a implantes com propriedades cicatrizantes. Além disso, Kyriakides *et al.* (2001) relatam que esse método é preferido quando é desnecessária a influência de fatores adicionais, como por exemplo microorganismos em modelos de úlcera aberta, que de alguma forma modificariam o processo cicatricial. Através deste modelo avaliamos o possível efeito das proteínas em induzir a neoformação tecidual, assim como os principais mediadores e células envolvidas.

Nossos resultados demonstraram que a biomembrana com PL induziu desde o 2º dia do processo cicatricial uma maior neoformação tecidual macroscópica quando implantada no tecido subcutâneo de camundongos, comparada aos que receberam implante de PVA ou apenas submetidos à cirurgia (animais Sham). Neste período de seguimento, importante para avaliação da fase inflamatória da cicatrização, os leucócitos são recrutados até o local da lesão. Dentre estes, os neutrófilos são os primeiros a alcançar o local da injúria e permanecem predominando por até três dias. Sua importância pode ser descrita pela capacidade de debridamento do local, principalmente à custa de radicais do oxigênio (H_2O_2) e nitrogênio (NO) e também enzimas azurofílicas (mieloperoxidase) (SWAIN *et al.*, 2002; ABBAS; LICHTMAN, 2003; KUMAR *et al.*, 2005). Em adição, os neutrófilos também liberam citocinas e quimiocinas que promovem sua auto-ativação, além do recrutamento de outras células do sistema imunológico (YAMASHIRO *et al.*, 2001). Sabe-se que uma disfunção na ação dos neutrófilos resulta em processos infecciosos e complicações nas lesões. Além disso, outros estudos propõem que em situações de estresse, devido ao efeito imunossupressor dos glicocorticóides e norepinefrina ocorre uma significativa redução na resposta inflamatória, resultando no retardo da cicatrização de feridas (GOSAIN *et al.*, 2007; ROMANA-SOUZA *et al.*, 2009).

Neste trabalho, a BioMem PVA/PL nas duas concentrações testadas conferiu um maior estímulo à fase inflamatória, como demonstrado pela maior intensidade do edema e infiltrado de leucócitos. A observação deste infiltrado, basicamente neutrofílico, foi confirmada pela maior atividade da enzima mieloperoxidase nos tecidos de animais dos grupos BioMem PVA/PL 0,2% e 1%. Nos animais dos grupos

controles Sham e PVA a ocorrência destes parâmetros flogísticos não foi evidenciado de forma expressiva. A infiltração de neutrófilos ao ferimento normalmente dura poucos dias (24 à 48h), mas em uma ferida infectada ocorre um prolongamento da fase inflamatória que pode retardar a cicatrização (Li *et al.*, 2007). Neste sentido, nossos resultados sugerem que as feridas de todos os grupos experimentais não foram sujeitas a um processo infeccioso e que o efeito pró-inflamatório favorecido pela implantação da BioMem PVA/PL em feridas incisionais ocorreu de forma controlada, visto pela redução da atividade de MPO nos dias 7 e 14 do curso experimental. Considerando os dados que descrevem PL como uma fração detentora de potente atividade antiinflamatória quando administrada por via endovenosa (ALENCAR *et al.*, 2004; ALENCAR *et al.*, 2006), é sugerido a partir deste modelo de cicatrização que o efeito pró-inflamatório exercido por PL depende da via de administração utilizada.

No processo cicatricial, outro tipo celular envolvido é o mastócito (STRAMER *et al.*, 2007). Esta célula secretora e especializada que, em estado de repouso, contém grande quantidade de grânulos compostos por um complexo de moléculas bioativas, tais como TNF- α , IL-1, MCP-1, histamina, proteases, leucotrienos e interleucinas dispersas pelo citoplasma. Esta célula quando ativada, em um processo conhecido como degranulação, libera o conteúdo dos seus grânulos, que por sua vez deflagram diferentes respostas na cicatrização, tal como o recrutamento de neutrófilos e monócitos ao ferimento, dilatação arterial e o aumento da permeabilidade vascular como conseqüências em especial do efeito da histamina sobre os receptores H1 (EL SAYED e DYSON, 1996; TANG *et al.*, 1998; NOLI *et al.*, 2001; BRIGHTLING *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2010). Desta forma, considerando os efeitos de BioMem PVA/PL sobre a degranulação dos mastócitos na fase inflamatória, o intenso infiltrado neutrofílico e edema no tecido neoformado de animais submetido aos implantes com esta membrana podem estar relacionados à ativação dos mastócitos por essa biomembrana.

Estudos conduzidos por Ramos e colaboradores (2007) demonstraram que a mesma fração protéica utilizada neste trabalho para o desenvolvimento da biomembrana, quando associada à um adjuvante e administrada em três doses por via subcutânea em camundongos induz um aumento dos níveis de IgE plasmáticos, resultando em uma hipersensibilidade do tipo I ao tecido. Apesar do nosso estudo

não ter determinado os níveis de IgE plasmáticos no curso do processo cicatricial, sugerimos que o estímulo conferido aos mastócitos em animais que receberam implante de membrana com PL neste modelo foi de maneira direta e apenas na fase inflamatória, o que pode ser justificado pela semelhança nos percentuais entre mastócitos íntegros e degranulados entre os grupos BioMem PVA/PL (0,2% e 1%), Sham e PVA nos dias 7 e 14 após a cirurgia.

Estudos demonstram que o óxido nítrico (NO) desempenha um importante papel em todas as fases da cicatrização, o que inclui sua influência na inflamação, proliferação celular, deposição da matriz extracelular e remodelação (SCHWENTER *et al.*, 2002). As três isoformas da enzima óxido nítrico sintase, iNOS, eNOS e nNOS estão presentes em diferentes tipos celulares da pele e são expressas durante o reparo de feridas (ABD-EL-ALEEM *et al.*, 2000; LUO *et al.*, 2005). No processo inflamatório NO favorece a vasodilatação, atividade microbicida, previne a agregação plaquetária e aumenta a permeabilidade vascular (SCHWENTER *et al.*, 2002).

Neste trabalho, foi evidenciado na fase inflamatória do processo cicatricial um aumento dos níveis de nitrito no tecido neoformado de animais que receberam implante de membrana contendo PL na menor concentração testada (0,2%).

Após a injúria, além dos neutrófilos, os monócitos são atraídos ao leito da lesão mediante a liberação de vários fatores quimiotáticos produzidos pelas plaquetas e neutrófilos, como o fator plaquetário-4 (PF-4), fatores de crescimento (TGF- β 1 e PDGF), quimiocinas (MCP-1, 2, 3 e MIP-1 α , β) e citocinas como IL-1 e TNF- α (CHETTIBI; FERGUSON, 1999). Após o recrutamento dos monócitos, estes aderem à matriz e transformam-se em macrófagos. Assim, neutrófilos e macrófagos liberam diversos fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-1 e IL-6, que por sua vez estimulam a formação de um novo tecido na lesão (LI *et al.*, 2007). Neste trabalho, foram determinados os níveis de TNF- α e IL-1 β no tecido neoformado dos grupos controles Sham e PVA e de BioMem PVA/PL na menor concentração que apresentou atividade farmacológica. Nossos resultados demonstraram que PL induziu um aumento significativo nos níveis destas citocinas pró-inflamatórias no tecido neoformado em relação aos controles Sham e PVA. Pelo fato da BioMem PVA/PL estimular fortemente o recrutamento neutrofílico para o local da lesão, pode-se sugerir que os altos níveis de TNF- α e IL-1 β detectados no

2º dia de seguimento possam advir não apenas da população de neutrófilos, mas também de macrófagos. Essa hipótese foi então confirmada através dos resultados obtidos em uma abordagem *in vitro* com cultura de macrófagos de camundongos. Altos níveis de TNF- α e IL-1 β foram detectados no sobrenadante de cultura estimulados com PL, de forma semelhante ao controle positivo LPS. Neste sentido, sugerimos que a implantação de uma membrana com PL possa conferir um estímulo aos macrófagos com conseqüente liberação destas citocinas pró-inflamatórias, o que resulta no aumento tecidual do infiltrado neutrofílico. Está bem descrito na literatura a participação do TNF- α e IL-1 no recrutamento de neutrófilos (WAGNER, 2000; CANETTI *et al.*, 2001; SAUNDERS *et al.*, 2005). Estas citocinas favorecem um aumento da expressão das moléculas de adesão, selectina e ICAM-1, nas células endoteliais, induzindo a migração de neutrófilos ao espaço extravascular.

Além disso, acreditamos que a observação de um infiltrado de leucócitos, predominantemente mononuclear nos dias 7 e 14 e, de forma mais expressiva nos grupos de animais implantados com BioMem PVA/PL seja decorrente do estímulo conferido somente na fase inflamatória do processo cicatricial (dia 2) e não por um estímulo permanente. Os dados de MPO corroboram tais evidências, visto não apenas pela redução na atividade desta enzima nos dias 7 e 14, como também pela semelhança nestes períodos entre os grupos BioMem PVA/PL e os controles Sham e PVA. Estes dados em conjunto reforçam que o estímulo pró-inflamatório conferido pela membrana com PL no tecido neoformado ocorreu de forma controlada.

Em um estudo recente, Andrade *et al.* (2011) demonstraram neste mesmo modelo de ferida incisional, que a implantação de uma biomembrana com o látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*, macroscopicamente indutora da neoformação tecidual, participa ativamente da fase inflamatória do processo cicatricial, com intenso recrutamento de neutrófilos seguido de altas concentrações de IL-1 β .

Chester, (1987); Williams, (1987) relataram que o material biocompatível ideal, utilizado como indutor da cicatrização de feridas deveria ser bioativo, induzindo o estímulo a todas as fases da cicatrização e cessando sua atividade após o término do processo. Em relação à membrana elaborada neste estudo, tal comportamento foi observado de forma similiar aos estudos com a biomembrana feita com látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* ao conferir um estímulo na

fase inflamatória, seguida da diminuição da resposta após esse período, podendo indicar também sua bioatividade e autocontrole (MASSUDA, OLIVEIRA., 2005; ANDRADE *et al.*, 2011).

Quando os níveis de células imunes e citocinas pró-inflamatórias decaem, os fibroblastos são atraídos à ferida e proliferam para iniciar a segunda fase da cicatrização (SINGER; CLARK,1999). Estudos demonstram uma relação positiva entre a ativação de macrófagos, recrutamento e proliferação de fibroblastos (PAN *et al.*, 2008; ZENG; CHEN, 2010; FENGMEI *et al.*, 2011; JUNIANTITO *et al.*, 2011). Sisco *et al.* (2007) relatam que a deposição de um novo tecido em uma lesão é particularmente dependente da função macrofágica que desempenha um papel de orquestrador na migração e proliferação de fibroblastos. Em modelos experimentais de estresse ocorre um declínio na proliferação de fibroblastos devido à redução na liberação de IL-1 β , TNF α e PDGF por macrófagos (SHERIDAN *et al.*, 2004; HORAN *et al.*, 2005; HEAD *et al.*, 2006). Em outros estudos foi comprovado que o polissacarídeo β -glucan, considerado um composto imunoestimulante, quando administrado por via tópica ou intraperitoneal em ratos favorece em feridas excisionais a contração, reepitelização e deposição de colágeno (BROWDER *et al.*, 1988). Estudos posteriores demonstraram que o β -glucan em uma cultura de macrófagos favorece a ativação destas células com aumento dos níveis de TNF- α , sugerindo que como consequência deste efeito pró-inflamatório, β -glucan favoreceu a migração de fibroblastos *in vitro* (SON *et al.*, 2007).

Neste trabalho foi demonstrado que a implantação da BioMem PVA/PL (0,2% e 1%) mostrou-se estimulador à proliferação de fibroblastos, visto pela maior população destas células no tecido neoformado na última etapa do processo cicatricial. Como consequência do estímulo à fibroplasia, a colagênese foi evidenciada de forma mais intensa nos tecidos de animais que receberam BioMem PVA/PL 0,2%. Assim, também demonstramos neste trabalho uma relação positiva entre a fase inflamatória e proliferativa do processo cicatricial, provavelmente favorecido pelo efeito imunomodulador de PL sobre a ativação de macrófagos e migração de neutrófilos.

No contexto da fibroplasia e colagênese, vale ressaltar a influência exercida pela ativação dos mastócitos com consequente liberação das moléculas bioativas existentes nos grânulos citoplasmáticos. Estudos demonstram uma efetiva

comunicação intercelular entre mastócitos e fibroblastos (MEYER *et al.*, 2011; MARQUIS *et al.*, 2008) mediada por junções gap (AU *et al.*, 2007) e que estímulos físicos ou químicos que venham a conferir a degranulação dos mastócitos favorecem a fibroplasia e colagênese (CARVALHO *et al.*, 2006; MATSUMURA *et al.*, 2007; CONEELY *et al.*, 2010; TEVENOT *et al.*, 2011). Importante destacar que a ativação mastocitária prolongada tem sido apontada como causa de eventos fibróticos como aqueles em torno de implantes utilizados rotineiramente na medicina, tais como implantes mamários e oftálmicos, sistema de liberação prolongada de drogas e eletrodos neurais (BUCALA *et al.*, 1994; CHEGINI *et al.*, 2002; POLIKOV *et al.*, 2005; BELLINI *et al.*, 2007). Os mecanismos que governam a migração e proliferação de fibroblastos em resposta a um biomaterial ainda não estão completamente esclarecidos, o que de fato tem sido compreendido é que mediadores inflamatórios conferem um sinal essencial a este evento (QUAN *et al.*, 2004; PHILLIPS *et al.*, 2004). Uma vez que a migração de fibroblastos é mediada por sinais inflamatórios (QUAN *et al.*, 2004; PHILLIPS *et al.*, 2004; CHESNEY *et al.*, 1998) e que a ativação de mastócitos influencia no contexto de uma resposta inflamatória (TANG *et al.*, 1998), supomos que o estímulo conferido por PL à degranulação de mastócitos na fase inflamatória também possa ser apontado como um dos fatores relacionados à fibroplasia e colagênese neste modelo. Além disso, nossos dados são alicerçados por estudos que demonstram em camundongos deficientes de mastócitos uma falha na fibroplasia e colagênese em resposta a um biomaterial e que o reestabelecimento da população de mastócitos e sua ativação restauram a resposta fibrótica na cicatrização (MORI *et al.*, 1991; AYAKO *et al.*, 1999; MASUDA *et al.*, 2003).

As diferenças vistas na colagênese entre animais do grupo BioMem PVA/PL 0,2% e 1% podem estar relacionadas com níveis de óxido nítrico no tecido neoformado. Como descrito anteriormente, somente BioMem PVA/PL 0,2% conferiu de forma significativa um aumento tissular dos níveis de nitrito, enquanto que PL 1% foi semelhante aos controles Sham e PVA. Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que NO confere um estímulo aos fibroblastos para síntese e deposição da matriz extracelular, resultando no aumento da colagênese em tecidos (WITTE *et al.*, 2000; RIZK *et al.*, 2004; OBAYASHI *et al.*, 2006; SCHWENTER *et al.*, 2007; DEBATS *et al.*, 2009; LAING *et al.*, 2010; MORETTI *et al.*, 2011; MADIGAN *et al.*,

2011). Amadeu e colaboradores (2008) demonstraram um aumento na deposição de colágeno em lesões através da aplicação tópica de doadores de NO nas fases inflamatória e proliferativa do processo cicatricial. Outros estudos evidenciaram um estímulo à colagênese a partir de sistema de liberação de NO, tendo a droga naproxeno como doador. Este complexo quando aplicado em feridas incisionais favoreceram um aumento de 62% na deposição de colágeno (MUSCARA *et al.*, 2000). A síntese reduzida de NO, como nas feridas em diabéticos tem sido apontada como causa do retardo na cicatrização (SCHAFFER *et al.*, 1997; LAING *et al.*, 2010). Em estudos com camundongos *Knock out* para iNOS e eNOS um retardo na cicatrização de feridas excisionais também foi observado (YAMASAKI *et al.*, 1998). Curativos de hidrogel feitos à base de poli (álcool vinílico) (PVA) associado à doadores de óxido nítrico também tem sido utilizado para liberação de NO em feridas. Este mesmo hidrogel quando utilizado em um meio de cultura de fibroblastos favorece a deposição de uma matriz extracelular por estas células e quando aplicado em feridas favorece um aumento na espessura do tecido de granulação e cicatricial (MASTERS *et al.*, 2002). Assim, a biodisponibilidade de NO em feridas é importante no processo da cicatrização. Desta forma, justifica-se o maior estímulo à colagênese em animais do grupo BioMem PVA/PL 0,2% considerando a relação positiva entre o aumento dos níveis de óxido nítrico no tecido em neoformação e a deposição de colágeno por fibroblastos. Ademais, justifica-se também a colagênese mais pronunciada no dia 7 em animais do grupo BioMem PVA/PL 0,2% apesar das diferenças não significativas na contagem de fibroblastos, pois como descrito na literatura a síntese aumentada de colágeno durante a cicatrização não se deve apenas ao número aumentado de fibroblastos, mas também ao aumento da produção de colágeno por célula (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006b).

Apesar da observação de uma densa vascularização nas adjacências do tecido neoformado, nenhuma diferença significativa foi conferida pelo implante BioMem PVA/PL 0,2%. A indução da angiogênese pode ser melhor avaliada através de sistemas *in vivo*, como os modelos na córnea de coelho e o da membrana corioalantóide em ovo embrionado (RIBATTI *et al.*, 1996). Desta forma, os resultados obtidos na avaliação da resposta angiogênica para PL permanecem

inconclusivos, o que nos motiva avaliar posteriormente esta reposta em um dos modelos acima citados.

Neste trabalho também avaliamos a cicatrização por segunda intenção a partir da indução cirúrgica de feridas excisionais. Este modelo envolve a completa remoção da epiderme, derme e tecido subcutâneo em uma extensão significativa. As vantagens desta abordagem podem ser ditadas pela possibilidade de monitorização da taxa de cicatrização, com base no volume da área da ferida, a organização histológica do tecido conjuntivo e os aspectos inerentes à reepitelização (DAVIDSON, 1998). Neste modelo utilizamos a BioMem PVA/PL somente na concentração de 0,2%, considerando os melhores resultados obtidos no modelo de cicatrização por primeira intenção.

Os parâmetros flogísticos, edema e hiperemia foram observados macroscopicamente nas feridas de todos os grupos experimentais no dia 2 após a cirurgia. Somente o edema ocorreu de forma mais expressiva no grupo BioMem PVA/PL em relação aos grupos controles, o que justifica o discreto aumento no volume das lesões neste período através da planimetria. No que diz respeito ao infiltrado neutrofílico, a determinação da atividade de MPO demonstrou que a BioMem PVA/PL, assim como no modelo de ferida por incisão, também induziu ativamente a fase inflamatória de feridas excisionais, quando comparado aos controles Sham e PVA. Em relação à degranulação de mastócitos, BioMem PVA/PL também conferiu um maior estímulo no dia 2, sendo as diferenças significativas somente em relação ao grupo Sham. Em feridas excisionais tem sido descrito uma redução significativa da população de mastócitos no leito da lesão e que o reaparecimento seja devido à migração destas células a partir do tecido íntegro adjacente, o que representa uma reatividade celular nas bordas de uma lesão (WELLER *et al.*, 2006; OEHMICHEN *et al.*, 2009). De acordo com estas evidências, sugerimos que as diferenças não significativas entre PL e PVA ocorreram pelo fato do modelo de ferida excisional resultar na perda de uma maior área de tecido, o que conseqüentemente reduziu a população de mastócitos ao estímulo de PL.

Na fase proliferativa do processo cicatricial, um melhor perfil resolutivo foi observado nos animais do grupo BioMem PVA/PL, visto pela redução mais pronunciada da área das lesões nos dias 7 e 9 quando comparado aos controles Sham e PVA. Apesar das feridas do grupo PL apresentarem-se nitidamente mais

reduzidas no dia 7, não foi evidenciado diferença entre os grupos através da contagem de fibroblastos e na medida do comprimento do novo epitélio pelo padrão histológico. O que pode estar relacionado neste aspecto é o grau de diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos e não a diferença no número de células. Já é descrito na literatura que o fechamento de uma ferida depende de dois processos, contração mediada pelos miofibroblastos e migração de células epiteliais a partir da borda da lesão (PATHER *et al.*, 2011). Miofibroblastos são morfologicamente semelhantes aos fibroblastos, sendo a diferença funcional, pois como o próprio nome diz, o miofibroblasto é dotado de proteínas contráteis. A transformação fenotípica de fibroblastos em miofibroblastos é regulada principalmente por IL-1 β , TNF- α , PDGF, TGF- β , FGF, advindos principalmente da ativação de células na fase inflamatória, tais como neutrófilos, macrófagos e mastócitos (MATSUMURA *et al.*, 2007; STRAMER *et al.*, 2007; CHAN *et al.*, 2008; OEHMICHEN *et al.*, 2009; ROMANA-SOUZA *et al.*, 2009). Os miofibroblastos são caracterizados por possuírem um sistema actina e miosina que gera força contrátil, similar aquela encontrada em células de músculo liso, o que os tornam capazes de conduzir a contração do leito aproximando as margens da úlcera, ou seja, reduzindo a área exposta da úlcera para que ocorra a formação da cicatriz (BROUGHTON *et al.*, 2006a; GURTNER *et al.*, 2008; SCHMIDT *et al.*, 2009; STOJADINOVIC *et al.*, 2008). Nossos dados corroboram com outros estudos que demonstram o elo entre a ativação de macrófagos, via liberação de mediadores pró-inflamatórios, aumento da contração de feridas e síntese de colágeno.

Subramanian *et al.* (2006) demonstraram em um modelo de feridas excisionais em coelhos que o tratamento tópico com o extrato das folhas de *Aloe vera* favorece a contração de feridas e a deposição de colágeno. Este efeito foi atribuído à manose-6-fostato presente nas folhas de *Aloe vera*, pois tem sido demonstrado (TIZARD *et al.*, 1989; DAVIS *et al.*, 1994) que produtos contendo manose conferem um estímulo à ativação de macrófagos e portanto estimulam a atividade de fibroblastos.

Desta forma, considerando o efeito modulador da BioMem PVA/PL na fase inflamatória de feridas cutâneas, possivelmente *via* ativação de mastócitos, macrófagos e aumento dos níveis de mediadores inflamatórios sugerimos que estes estímulos possam ter exercido influência na transformação fenotípica de fibroblastos

em miofibroblastos, favorecendo assim uma maior contração da lesão a partir dia 7, além da marcante fibroplasia e proliferação de queratinócitos alcançadas no dia 14 por BioMem PVA/PL, visto pela análise macroscópica do percentual de feridas reepitelizadas, maior número de fibroblastos e espessura do epitélio no tecido cicatricial de animais do grupo BioMem PVA/PL pelo padrão histológico. No que diz respeito à reepitelização, sabe-se que citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α estimulam fibroblastos a sintetizar e secretar KGF-1, KGF-2 e IL-6, os quais estimulam a migração, proliferação e diferenciação de queratinócitos (BAUM; ARPEY, 2005; BROUGHTON *et al.*, 2006b; MONACO; LAWRENCE, 2003; STOJADINOVIC *et al.*, 2008). Assim, a migração dos queratinócitos juntamente com a contração da ferida, resulta em reepitelização e fechamento da úlcera (HARDING; PATEL, 2002).

Deste modo, sugerimos que o efeito positivo exercido por BioMem PVA/PL na última etapa do processo cicatricial de feridas excisionais, também possa ser consequência do seu papel modulador na fase inflamatória, corroborando com as evidências de que através de interações parácrinas com células inflamatórias os fibroblastos são estimulados a produzir colágeno, se diferenciar em miofibroblastos, sintetizar e secretar KGF-1, KGF-2 e IL-6, os quais estimularam a migração, proliferação e diferenciação de queratinócitos (BAUM; ARPEY, 2005; BROUGHTON *et al.*, 2006b; MONACO; LAWRENCE, 2003; STOJADINOVIC *et al.*, 2008; THEVENOT *et al.*, 2011).

Apesar de muitos esforços terem sido aplicados na tentativa de delinear a cascata de fatores envolvendo a reparação de tecidos normais e patológicos, os achados ainda não levaram a avanços substanciais no tratamento de pacientes. Sabe-se, porém que a utilização de um único produto produz impacto moderado nos fatores clínicos da cicatrização, provavelmente pela plasticidade e redundância dos componentes do processo de reparo tecidual.

As plantas laticíferas são uma interessante fonte de moléculas com atividade biológica e sua eficiência é freqüentemente suportada pelo uso na medicina popular (OLIVEIRA *et al.*, 2007). O látex de *C. procera* constitui-se de uma excelente fonte de proteínas com elevado potencial farmacológico (ALENCAR *et al.*, 2004; ALENCAR *et al.*, 2006; RAMOS *et al.*, 2009). Além do látex de *C. procera*, outras plantas laticíferas são detentoras de atividade cicatrizante. *Carica candamarcensis*,

um membro da família *Caricaceae* libera a partir do seu fruto um fluido laticífero, cuja fração protéica detentora de proteases cisteínas atua de forma benéfica no processo cicatricial de feridas por queimadura, reduzindo o tempo de fechamento das lesões (GOMES *et al.*, 2010). A principal hipótese para este efeito pró-cicatricial foi relacionada ao efeito mitogênico desta fração protéica, anteriormente descrita em uma cultura de fibroblastos (SILVA *et al.*, 2003). O efeito pró-cicatricial também tem sido atribuído a outro membro da família *Caricaceae*, *Carica papaya*, cujo fruto secretor de um fluido laticífero também desempenha propriedades cicatriciais, visto pelos parâmetros avaliados no último dia de segmento experimental, tais como aumento do conteúdo de colágeno, rápida contração das feridas e redução no tempo de reepitelização (GURUNG *et al.*, 2009).

Diversos tipos de curativos estão disponíveis no mercado para o tratamento de feridas, os quais podem ser encontrados nas mais variadas formas, desde a simples cobertura com gazes até os mais complexos, os chamados curativos bioativos (MANDELBAUM, 2003; SHAI; MAIBACH, 2005). Tendo em vista as características próprias do que é considerado o “curativo ideal” para feridas e a diversidade de opções existente no mercado, torna-se desafiadora a decisão entre os profissionais de saúde e instituições quanto à melhor escolha, considerando que a maioria dos produtos disponíveis é de alto custo, o que torna inviável nos países subdesenvolvidos. Neste sentido, torna-se necessário a busca de novos recursos, com menor custo, eficácia e acessíveis à população.

Finalmente, os resultados do presente estudo indicam que PL quando incorporadas a uma membrana com PVA conferem um forte estímulo à fase inflamatória o que parece favorecer a progressão de feridas incisionais e excisionais para as fases subsequentes do processo cicatricial. Isso se traduz que o efeito cicatrizante anteriormente atribuído ao látex bruto de *C. procera* parece ser exercido de fato pelas proteínas existentes neste fluido. Desta forma, assim, como a biomembrana do látex da seringueira *Hevea brasiliensis*, a qual vem sendo utilizada como uma alternativa promissora em pacientes com feridas crônicas, acreditamos que este estudo possa sugerir uma nova aplicação biotecnológica, de baixo custo, para as proteínas do látex de *C. procera* como substâncias úteis no tratamento de feridas cutâneas. Entretanto, estudos complementares são importantes e necessários para credenciar PL como uma potente ferramenta de origem natural na

elaboração de biomembrana que possa vir a ser utilizada no tratamento de feridas em humanos.

7 CONCLUSÃO

BioMem PVA/PL se mostrou indutora da neoformação tecidual como implante e favoreceu a contração de feridas excisionais. Participou ativamente da fase inflamatória da cicatrização, promovendo degranulação de mastócitos, ativação de macrófagos, recrutamento de neutrófilos e liberação de mediadores inflamatórios (óxido nítrico, TNF- α e IL-1 β). O potencial pró-inflamatório da BioMem PVA/PL parece influenciar diretamente as fases subseqüentes do processo cicatricial, confirmada pela sua capacidade estimuladora da fibroplasia e colagênese.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A. **Cellular and Molecular Immunology**. 5th. Philadelphia: Saunders, 2003. 562 p.
- ABD-EL-ALEEM, S. A.; FERGUSON, M. W. J.; APPLETON I. Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers. **J. Pathol.**, v.191, p.434–442, 2000.
- ABRAHAMS, P.H.; CRAVEN, J.L.; LUMLEY, J.S.P. The structure of the body – the systems and organs. In: _____. **Illustrated clinical anatomy**. New York: Oxford University Press, 2005. p.2-20.
- ABREU, E. S.; MARQUES, M. E. A. Histologia da pele normal. In: JORGE, S. A; DANTAS, S. R. P. E. **Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 17-29.
- AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology and evolution plant defense against herbivory. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 40, p. 311-331, 2009.
- AKKOL, E.K.; KOCA, U.; PESIN, I.; YILMAZER, D.; TOKER, G.; YESILADA, E. Exploring the wound healing activity of *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. by *in vivo* models. **J. Ethnopharmacol.**, v.124, p.137-141, 2009.
- ALENCAR, N. M. N.; FIGUEREDO, I. S. T.; VALE, M. R.; BITENCURT, F. S.; OLIVEIRA, J. S.; RIBEIRO, R. A; RAMOS, M. V. Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in: Three different experimental models: Peritonitis, Paw edema and Hemorrhagic cystitis. **Plant. Med.**, v.7, p.1144-1149, 2004.
- ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, J. S.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; VALE, M. R.; ETHELLES, J. P.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V. Pro- and anti-inflammatory 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.
- AMADEU, T.P.; SEABRA, A.B.; DE OLIVEIRA, M.G. Nitric oxide donor improves healing if applied on inflammatory and proliferative phase. **J. Surg. Res.**, v.149, p.84–93, 2008.
- ANDRADE, T.A.M.; LYER, A.; DAS, P.K.; FOSS, N.T.; GARCIA, S.B.; COUTINHO-NETO, J.; JORDÃO-JR, A.A.; FRADE, M.A.C. The inflammatory stimulus of a natural látex biomembrane improve healing in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.44, 2011.
- ARCHER, B. An alkaline protease inhibitor from *Hevea brasiliensis* latex. **Phytochemistry**, v.23, p.633-639, 1983.
- ARMANI, A., COUTINHO-NETTO, J. Aceleração do reparo tissular em modelo experimental de úlcera dérmica induzida por biomembrana de látex natural extraído

da seringueira *Hevea brasiliensis*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 9., 2001, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: IICUSP, 2001. CD-ROM.

ARNOLD Jr, H.L.; ODOM, R.B.; JAMES, W.D. A pele: estrutura básica e função. In: **Doenças básicas da pele de Andrews**: Dermatologia clínica. Cidade: editora, 1994. p.1-14.

ARROYO, A.G.; IRUELA-ARISPE, M. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. **Cardiovasc. Res.**, v.86, p.226-235, 2010.

AU, S.R.; AU, K.; SAGGERS, G.C.; KARNE N.; EHRLICH, H.P. Rat mast cells communicate with fibroblasts via gap junction intercellular communications. **J. Cell Biochem.**, v.100, p.1170–1177, 2007.

AWAD, H.A.; WICKHAM, M.Q.; LEDDY, H.A.; GIMBLE, J.M.; GUILAK, F. Chondrogenic differentiation of adipose derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. **Biomaterials**, v.25, p. 3211-3222, 2004.

AYAKO, S.; TOHRU, T.; YUKIHISA, F.; YASUO, N.; NOBUYUKI, T. Evaluation of role of mast cells in the development of liver fibrosis using mast cell-deficient rats and mice. **J. Hepatol.**, v.30, p.859-867, 1999.

AZEVEDO, M. M. **Nanoesferas e a Liberação Controlada de Fármacos**. 2002. 40f. Monografia (Tópicos Especiais em Química Inorgânica IV - Introdução à Nanotecnologia) - Instituto de Química da UNICAMP, UNICAMP, Campinas, 2002.

BADWI, E. L.; SAMIA, M. A.; ADAM, S. E.; SHIGIDI, M. T.; HAPKE, H. J. Studies on laticiferous plants: toxic effects in goats of *Calotropis procera* latex given by different routes of administration. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, v. 105, p.425-427, 1998.

BARANOSKI, S.; AYELLO, E.A. Wound Care Essentials. In: _____. **Advances in Skin & Wound Care**. 1st ed. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 364-373.

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

BARTHEL, R.; ABERDAM, D. Epidermal stem cells. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Amsterdam, v.19, p. 405-413, 2005.

BAUM, C.L.; ARPEY, C.J. Normal cutaneous wound healing: clinica correlation with cellular and molecular events. **Dermatol. Surg.**, v.31, p.674-686, 2005.

BEANES, S.R.; DANG, C.; SOO, C.; TING, K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . **Expet. Rev. Mol. Med.**, Cambridge, v.5, p.1-11, 2003.

BELLINI, A.; MATTOLI, S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. **Lab. Invest.**, v.87, p.858 – 70, 2007.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hidrogels for biomedical applications. **Eur. J. Pharma. Biopharm.**, v.57, p.19-34, 2004.

BERGSTROM, N.; BRESLOW, R.A.; MELTON, E.; KOBRIGER, A.; ERWIN-TOTH, P. Healing more than wounds. Interview by Yvonne Parsons. **Contemp. Longterm. Care**, v.18, p.66-70,1995.

BISCHOFF, M.; KINZL, L.; SCHMELZ, A. The complicated wound. **Der Unfallchirurg.**, v. 102, p.797-804 German, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual de Condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas.** Brasília, 2002.

BRIGHTLING, C.E.; BRADDING, P.; PAVORD, I.D.; WARDLAW, A.J. New insights into the role of the mast cell in asthma. **Clin. Exp. Allergy**, v.33, p.550 e 6, 2003.

BRITTO, D. **Estudo da obtenção e das propriedades de carboximetilcelulose (CMC) e N, N, N – trimetilquitosana (TMQ) e das interações do complexo polieletrólítico CMC/TMQ com Cu^{2+} , ácido húmico e atrazina.** 2003. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

BROCKBANK, W. J.; LYNN, K. R. Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca* L. (milkweed). **Biochim. Biophys. Acta**, v.578, p.13-22, 1979.

BROD, M. Quality of life issues in patients with diabetes and lower extremity ulcer: patients and care givers. **Qual. Life Res.**, v.7, p.365-372, 1998.

BROUGHTON II, G.; JANIS, J.E; ATTINGER, C.E. A Brief History of Wound Care. **Plastic Reconstructive Surg.**, Baltimore, v.117, p.6-11, 2006a.

BROUGHTON II, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. Wound healing: An overview. **Plastic Reconstructive Surg.**, Baltimore, v.117, p.1-32, 2006b.

BUGALA, R.; SPIEGEL, L.A.; CHESNEY, J.; HOGAN, M.; CERAMI, A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. **Mol. Med.**, v.1, p.71-81, 1994.

CANETTI, C.A.; SILVA, J.S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v.134, p.1619-1628, 2001.

CARDOSO, J.F.; SOUZA, B.R.; AMADEU, T.P., VALENCA, S.S., PORTO, L.C., COSTA, A.M. Effects of cigarette smoke in mice wound healing is strain dependent. **Toxicol. Pathol.**, 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.

CHAHUD, F.; RAMALHO, L.N.Z.; RAMALHO, F. S.; HADDAD, A.; BARREIRA, M. C. R. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits. **Int. J. Exp. Pathol.**, v.9, p.166–173, 2009.

CHAN B. M.; KASSNER P. D.; SCHIRO J. A.; BYERS H. R.; KUPPER T. S.; HEMLER M. E. Distinct cellular functions mediated by different VLA integrin alpha subunit cytoplasmic domains. **Cell**, v.68, p.1051-60, 1992.

CHAN, A.; FILER, A.; PARSONAGE, G.; KOLLNBERGER, S.; GUNDLE, R., BUCKLEY, C.D. Mediation of the proinflammatory cytokine response in rheumatoid arthritis and spondylarthritis by interactions between fibroblast-like synoviocytes and natural killer cells. **Arthritis Rheum.**, v.58, p.707 e 17, 2008.

CHANG, K.; UITTO, J.; ROWOLD, E. A.; GRANT, G. A.; KILO, C., WILLIAMSON, J. R. Increased collagen cross-linkages in experimental diabetes: reversal by betaaminopropionitrile and D-penicillamine. **Diabetes**, v.29, n.10, p.778-781, 1980.

CHEGINI, N. Peritoneal molecular environment, adhesion formation and clinical implication. **Front. Biosci.**, v.7, p.91 e 115, 2002.

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.

CHESNEY, J.; METZ, C.; STAVITSKY, A.B.; BACHER, M.; BUCALA, R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. **J. Immunol.**, v.160, p.419-425, 1998.

CHESTER, U. **Progress in biomedical engineering**. London: Elsevier Science, 1987.

CHEYE, M. L.; CHEUNG, K. Y. Beta-1,3-glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. **Plant. Mol. Biol.**, v.29, p.397-402, 1995.

CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G.B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of Aloe vera on the healing of dermal wounds in diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.** , v.59, p.195–201, 1998.

CHUANG, W.Y.; YOUNG, T.H.; YAO, C.H.; CHIU, W.Y. Properties of the poly(vinyl alcohol)/chitosan blend and its effect on the culture of fibroblast in vitro. **Biomaterials**, v. 20, p. 1479-1487,1999.

CLARK, R.A.F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M.G. Tissue engineering for cutaneous wounds. **J. Invest. Derm.**, Baltimore, v.127, p.1018-1029, 2007.

CONEELY, M.D.J.; KENNELLY, M.C.R.; BOUCHIER-HAYES, M.D.D.; DESMOND, M.D.C.W. Mast Cell Degranulation is Essential for Anastomotic Healing in Well Perfused and Poorly Perfused Rat Colon. **J. Surg. Res.**, v.164, p. 73–76, 2010.

COONEY, R.; IOCONO, J.; MAISH, G. Tumor necrosis factor mediates impaired wound healing in chronic abdominal sepsis. **J. Trauma**, v.42, p.415–420, 1997.

CORSETTI, G.; D'ANTONA, G.; DIOGUARDI, F.S.; REZZANI, R. Topical application of dressing with amino acids improves cutaneous wound healing in aged rats. **Acta Histochem.**, v.112, p.497 – 507, 2009.

COSTA, J.R.; MANSUR, H.S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Quím. Nova**, v. 31, p-1460-1466, 2008.

COUTINHO-NETTO, J.; MRUÉ, F. **Biomembrana**. São Paulo, 2003. Apresentação da Biomebrana à Academia Brasileira de Estudos Avançados Dr. Adolfo B. M. Cavalcanti.

CRAEKER, D.W.; ROSKAMS, N.; BEECK, R.O. **Occupational skin diseases and dermal exposure in the European Union (EU – 25): policy and practice overview**. Luxembourg: Office for Official Publication of The European Communities, 2008.

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.

DAVIDSON, J.M. Animal models for wound repair: **Arch. Dermatol.**, v.290, p.1-11, 1998.

DAVIS, R.H.; DI DONATO, J.J.; HARTMAN, G.M.; HAAS, R.C. Anti-inflammatory & wound healing activity of a growth substance in Aloe vera. **J. Am. Pod. Assoc.**, v.84, p.77–81, 1994.

DEBATS, I.B.J.G.; WOLFS, T.G.A.M.; GOTOH, T.; CLEUTJENS, J.P.M.; PEUTZ-KOOTSTRA, C.J.; VAN DER HULST, R.R.W.J. Role of arginine in superficial wound healing in man. **Nitric Oxide**, v.21, p.175–183, 2009.

DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V. L. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacol.**, v.73, p.307-311, 2000.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front. Biosci.**, Tampa, v.9, p.283-289, 2004.

DOMSALLA, A., MELZIG, M. F. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta Med.**, v.74, p.699-711, 2008.

DOUGHTY, D.B.; SPARKS-DeFRIESE, B. Wound healing physiology. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. **Acute and chronic wounds**. Current management concepts. 4th ed. Missouri: Elsevier Mosby, 2012. cap.4, p.63-82.

DUBEY, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v.62, p.1057-1071, 2003.

EDWARDS, S.L. Innate Defences. In: MONTAGE, S.E.; WATSON, R.; HERBERT, R.A. **Physiology for nursing practice**. 3rd ed. Madrid: Elsevier, 2005. p.635-683.

EGOZI E.I.; FERREIRA A.M.; BURNS A.L.; GAMELLI R.L.; DIPIETRO L.A. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. **Wound Repair Regen**, v.11, p.46 e 54, 2003.

EIN GEDI. **Flowers in Israel**. Disponível em: <http://www.flowersinIsrael.com/Calotropisprocera_page.htm>. Acesso em: 28 Nov. 2011.

EL SAYED, S.O.; DYSON, M. Comparison of the effect of multiwavelength light produced by a cluster of semiconductor diodes and of each individual diode on mast cell number and degranulation in intact and injured skin. **Laser Surg. Med.**, v.19, n.6, p.559-568, 1996.

EL-BADWI, SAMIA, M. A. B., ADAM, S. E. I., SHIGIDI, M. T., HAPKE, H. J. Studies on laticiferous plants: toxic effects in goats of *Calotropis procera* latex giving by different routes of administration. **Dtsch. Tierarztl. Wschr.**, v.105, p.425-427, 1998.

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.

ENGELMAYER, J.; BLEZINGER, Paul B.S.B.; VARADHACHARY, M.D.A. Talactoferrin Stimulates Wound Healing With Modulation of Inflammation. **J. Surg. Res.**, v.149, p.278–286, 2008.

FECHINE-JAMACARU, F. V. **Quantificação de angiogênese corneana in vivo através de processamento de imagens digitais**. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

FERGUSON, M.W.J. Wound Repair: An Overview. In: GALLIN, J. I. (Ed.). **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1999. p. 865-881.

FOSS, N. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrana. **Med. Cutan Iber. Am.**, v.32, n.4, p.157-162, 2004.

FRADE, M.; CURSI, I.; ANDRADE, F.; COUTINHO-NETTO, J.; BARBETTA, F., FRADE, M.; SALATHIEL, A.; MAZZUCATO, E.; COUTINHO-NETTO, J.; FOSS, N. A natural biomembrane as a new proposal for the treatment of pressure ulcers: **Med. Cutan Iber. Lat Am.**, v.34, n.3, p.133-138, 2006.

FRADE, M.A.C. **Úlcera de perna:** caracterização clínica e perfil imunohistopatológico da cicatrização na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. 2003. 164 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

FRADE, M.A.; CURSI, I.B.; ANDRADE, F.F.; COUTINHO-NETO, J.; BARBETTA, F.M.; FOSS, N.T. Management of diabetic skin wounds with a natural látex biomembrane. **Med. Cut Iber. Lat Am.**, v.32, p.157-162, 2004.

FREITAS, C. D. T.; NOGUEIRA, F. C. S.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; DOMONT, G. B.; RAMOS, M. V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiol. Biochem.**, v.49, p.738-743, 2011.

FREITAS, C. D. T.; OLIVEIRA, J. S.; MIRANDA, M. R. A.; MACEDO N. M. R.; SALES M. P.; VILLAS-BOAS L. A.; RAMOS M. V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.45, p.781-789, 2007.

GALLANT-BEHM, C. L.; HILDEBRAND, K. A.; HART, D. A. The mast cell stabilizer ketotifen prevents development of excessive skin wound contraction and fibrosis in red Duroc pigs. **Wound Repair Regen.**, v.16, p.226–233, 2008.

GALLEGOS-OLEA, R. S.; OLIVEIRA, A. V.; SILVEIRA, L. M. S.; SILVEIRA, E. R. Organic carbonate from *Calotropis procera* leaves. **Fitoterapia**, v.73, p.263-265, 2002.

GIORDANI, R.; LAFON, L. Action of *Carica papaya* latex on cell wall glycosidases from *Lactuca sativa*. **Phytochemistry**, v.34, p.1473-1475, 1993.

GOMES, F.S.L.; SPÍNOLA, C.V.; RIBEIRO, H.A.; LOPES, M.T.P.; CASSALI, G.D.; SALAS, C.E. Wound-healing activity of a proteolytic fraction of *Carica candamarcensis* of experimental induced burn. **Burns**, v.36, p.277-283, 2010.

GOSAIN, A.; MUTHU, K.; GAMELLI, R.L.; DIPIETRO, L.A. Norepinephrine suppresses wound macrophage phagocytic efficiency through alpha- and betaadrenoreceptor dependent pathways. **Surgery**, v.142, p.170–179, 2007.

GRIFFITH, L.G. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering, **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 961, p. 83-95, 2002.

GURTNER, G.C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M.T. Wound repair and regeneration. **Nature**, London, v.453, n.15, 314-321, 2008.

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.

HABIF, T.P. Principles of diagnosis and anatomy. In: _____. **Clinical Dermatology: a color guide to diagnosis and therapy**. 3rd ed. Missouri: Von Hoffman Press, 1996. p.1-24.

HAGEL, J. M.; YEUNG, E. C.; FACCHINI, P. J. Got milk? the secret life of laticifers. **Trends in Plant Sci.**, v.13, p.631-639, 2008.

HALL, L.W.; CLARKE, K.W. **Veterinary anaesthesia**, 9. ed, 1991.

HARDING, K.G.; PATEL, M.G.K. Science, medicine and the future: Healing chronic wounds. **Br. Med. J.**, v.324, p.160-163, 2002.

HARDWICK, J.B.J.; TUCKER, A.T.; WILKS, M.; JOHNSTON, A.; BENJAMIN, N. A novel method for delivering nitric oxide therapy to the skin of human subjects. **Clin. Sci.**, v.100, v.395-400, 2001.

HARRISON, N.; LAURENT, G. Diseases of the Heart and Lung. Respiratory Medicine: Recent advantages. **Mechanisms for the pathogenesis of pulmonary fibrosis**. Ed Barnes PJ, 1993. 190-210 p.

HART, J. Inflammation: its role in the healing of acute wounds. **J. Wound Care**, v. 11, p. 205-209, 2002

HEAD, C.C.; FARROW, M.J.; SHERIDAN, J.F.; PADGETT, D.A. Androstenediol reduces the anti-inflammatory effects of restraint stress during wound healing. **Brain Behav. Immun.**, v.20, p.590–596, 2006.

HENSON, P.M. The immunology release of constituents from neutrophils leukocytes. **J. Immunol.**, v.107, p.1535, 1971.

HICKEY, T.; KREUTZER, D.; BURGESS, D.J.; MOUSSY, F. In vivo evaluation of a dexamethasone/ PLGA microsphere system designed to suppress the inflammatory tissue response to implantable medical devices. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.61, p.180-7, 2002.

HORAN, M.P.; QUAN, N.; SUBRAMANIAN, S.V.; STRAUCH, A.R.; GAJENDRAREDDY, P.K.; MARUCHA, P.T. Impaired wound contraction and delayed myofibroblast differentiation in restraint-stressed mice. **Brain Behav. Immunol.**, v.19, p.207–216, 2005.

HSU, S.M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J. Histochem. Cytochem.**, v.29, n.11, p.1349–1353, 1981.

HUNT, T.K. The physiology of wound healing. **Ann. Emerg. Med.**, v.17, 1265- 1273, 1998.

HUSSEIN, H. T.; KAMEL, A.; ABOUT-ZEID, M.; EL-SEBAE, A. K. H.; SALEH, M. A. Uscharin, the most potent molluscicidal compound tested against land snail. **J. Chem. Ecol.**, v.20, p.135-140, 1994.

IBA, Y.; SHIBATA, A.; KATO, M.; MASUKAWA, T. 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.

IRION, G. **Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

ISENBERG, B. C.; WONG, J. Y. Building structure into engineered tissues. **Materials Today**, v.9, p.54-60, 2006.

JAUL, E. Non-healing wounds: The geriatric approach. **Arch. Geront. Geriatr.**, Amsterdam, v.49, p.224-226, 2009.

JEKEL, P. A.; HARTMANN, B. H.; BEINTEMA, J. J. The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. **Eur. J. Biochem.**, v.200, p.123-130, 1991.

JOHNSON, J.G. Biology II: anatomy & physiology. Frederick: anatomy & physiology. Frederick: Frederick High School. Cap. 46, Section 4, 2003.

JUNIANITO, V.; IZAWA, T.; YAMAMOTO, E.; MURAI, F.; KUWAMURA, M.; YAMATE, J. Heterogeneity of Macrophage Populations and Expression of Galectin-3 in Cutaneous Wound Healing in Rats. **J. Comp. Pathol.**, v.145, p.378-389, 2011.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J.C. **Histologia básica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KARU, T. Photobiological of low power laser effects. **Health Physics**, v.56, n. 5, p. 691-704, 1989.

KEKWICK, R. G. O. Latex and Laticifers. In: Encyclopedia of Life Sciences. 2001. p. 1-6.

KERSTIN, M.; MEINEKE, V. Radiation-induced mast cell mediators differentially modulate chemokine release from dermal fibroblasts. **J. Dermatol. Sci.**, v.61, p.199–205, 2011.

KIKUCHI, K.; KADONO, T.; TAKEHARA, K. Effects of various growth factors and histamine on cultured keloid fibroblasts. **Dermatology**, v.190, p.4-8, 1995.

KIMATA, H. Increased incidence of latex allergy in children with allergic diseases in Japan. **Public Health**, v. 119, p. 1145-1149, 2005.

KOKANE, D.D.; MORE, R.Y.; KALE, M.B.; NEHETE, M.N.; MEHENDALE, P.C.; GADGOLI, C.H. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. **J. Ethnopharmacol.**, v.124, p.311–315, 2009.

KUMAR, H. S.; BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacol.**, v.44, p.123-125, 1994.

KUMAR, S.; DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V. L. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacol.**, v.76, p.115-118, 2001.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran: Patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Saunders, 2005. p. 49-124.

KARUKONDA S. R.; FLYNN T. C.; BOH E. E.; MCBURNEY E. I.; RUSSO G. G.; MILLIKAN L. E. The effects of drugs on wound healing: Part 1. **Int. J. Dermatol.**, v. 39, p. 250-257, 2000.

KYARIKIDES, T.R.; ZHU, Y;H.; YANG, Z.; HUYNH, G.; BORNSTEIN, P. Altered extracellular matrix remodeling and angiogenesis in sponge granulomas of thrombospondin 2-null mice. **Am. J. Pathol.**, v.159, p.1255-1262, 2001.

LAING, M.C.T.; HANSON, R.; PLAST, F.R.C.S.; CHAN, M.D.F.; HAYES, D.B. Effect of Pravastatin on Experimental Diabetic Wound Healing. **J. Surg. Res.**, v.161, p.336–340, 2010.

LALOR, P.A.; JONES, L.C. The Innate Response to Biomaterials. **Comprehensive Biomaterials**, v. 4, p. 27-36, 2011.

LAMMERS, G.; TJABRINGA, G.S.; SCHALKWIJK, J.; DAAMEN, W. G.; VAN KUPPEVELT, T.H. A molecularly defined array based on native fibrillar collagen for the assessment of skin tissue engineering biomaterials. **Biomaterials**, v.30, p. 6213–6220, 2009.

LARHSINI, M.; BOUSAID, M.; LAZREK, H. B.; JANA, M.; AMAROUCH, H. Evaluation of antifungal and molluscicidal properties of extracts of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v.4, p.371-373, 1997.

LARHSINI, M.; MARKOUK, M.; JAOUHARI, J. T.; BEKKOUICHE, K.; LAZREK, H. B.; JANA, M. The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants. **Phytother. Res.**, v.16, p.97-98, 2002.

LAWRENCE, W.T. Physiology of the acute wound. **Clin. Plast. Surg.**, v.25, p. 321-340, 1998.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The role of the macrophage in the wound repair: **Am. J. Pathol.**, v.78, p.71-100. 1975.

LI, F.; HUANG, S.; WANG, L.; YANG, J.; ZHANG, H.; QIU, L.; LI, L.; SONG, L. A macrophage migration inhibitory factor like gene from scallop *Chlamys farreri*: Involvement in immune response and wound healing. **Develop. Comparative Immunol.**, v.35, p.62-71, 2011.

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

LIMA E COSTA, M.F.; GUERRA, H.L.; BARRETO, S.M.; GUIMARÃES, R.M. Diagnóstico da situação de saúde da população idosa brasileira: um estudo da mortalidade e das internações hospitalares públicas. **Informe Epidemiológico do SUS**, v.9, n.1, p.23-41, 2000.

LIMA-FILHO, J. V. M.; PATRIOTA, J. M.; SILVA, A. F.; FILHO, N. T.; OLIVEIRA, R. S. B.; ALENCAR, N. M. N.; RAMOS, M. V. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J. Ethnopharmacol.**, v.129, p.327-334, 2010.

LIN, Z.-Q.; KONDO, T.; ISHIDA, Y.; TAKAYASU, T.; MUKAIDA, N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing. **J. Leukocyte Biol.**, v.73, p.713–721, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LUCISANO, Y.M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. **J. Immunol.**, v.132, p.2015-2020, 1984.

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

LUTTIKHUIZEN, D.T.; DANKERS, P.Y.; HARMSSEN, M.C.; VAN LUYN, M.J. Material dependent differences in inflammatory gene expression by giant cells during the foreign body reaction. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v.83, p.879 e 86, 2007.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Acid phosphatases from latices of Euphorbiaceae. **Phytochemistry**, v.26, p.655-657, 1987a.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. **Phytochemistry**, v.26, p.939-944, 1987b.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Hevamins: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, v.25, p.2279-2282, 1986.

MADIGAN, M.; ENTABI, F.; HONG, G.; ZUCKERBRAUN, B.; TZENG. Nitrite Increases Fibroblast Migration and Proliferation and May Represent a Viable Source of Nitric Oxide for Wound Healing. **J. Vasc. Surg.**, v.53, n. 6, Suppl., p. 88S, 2011.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.E.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. Educação Médica Continuada. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.78, p. 525-542, 2003.

MARQUIS, B.J.; HAYNES, C.L.. The effects of co-culture of fibroblasts on mast cell exocytotic release characteristics as evaluated by carbon-fiber microelectrode amperometry. **Biophys. Chem.**, v.137, p.63–69, 2008.

MASATOSHI, A.; MOTOHIRO, K.; OSAMU, I.; YOSHIKI, M. Effect of mast cell-derived mediators and mast cell-related neutral proteases on human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.106, n.1, 2000.

MASSUDA, E. T.; OLIVEIRA, J. A. A new experimental model of acquired Cholesteatoma. **Laryngoscope**, v.115, n.3, p.481-485, 2005.

MASTERS, K.S.B.; LEIBOVICH, S.J.; BELEM, P.; WEST, J.L.; WARREN, L.A.P. Effects of nitric oxide releasing poly (vinyl alcohol) hydrogel dressings on dermal wound healing in diabetic mice. **Wound Rep. Reg.**, v.10, p.286-294, 2002.

MASUDA, T.; TANAKA, H.; KOMAI, M.; NAGAO, K.; ISHIZAKI, M.; KAJIWARA, D. Mast cells play a partial role in allergen-induced subepithelial fibrosis in a murine model of allergic asthma. **Clin. Exp. Allergy**, v.33, p.705-713, 2003.

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.

MELO, C.M.L.; PORTO, S.C.; MELO-JR, M.R.; MENDES, C.M.;CAVALCANTI, C.B.; PORTO, A.L.F.; LEÃO, A.M.A.C.; CORREIA, M.T. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **Int. J. Pharm.**, v. 408, p. 113-119, 2011.

MENDEZ, T.M.T.V.; PINHEIRO, A.L.B.; PACHECO, M.T.T.; NASCIMENTO, P.M.; RAMALHO, L.M.P. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.22, p.19-25, 2004.

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

MENKE, M.N.; MENKE, N.B.; CECELIA H. BOARDMAN, C.H. ROBERT F. DIEGELMANN, R.F. Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing. **Gynecol. Oncol.**, New York, v.111 p.87-91, 2008.

MEYER, M.; MULLER, A.K.; YANG, J.; WENER, S. The Role of Chronic Inflammation in Cutaneous Fibrosis: Fibroblast Growth Factor Receptor Deficiency in Keratinocytes as an Example. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, v.15, p.48-52, 2011.

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

MORCELLE, S. R.; CAFFINI, N. O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funastrom clausum* latex. **Fitoterapia**, v. 75, p.480-493, 2004.

MORETTI, A.I.S.; PINTO, F.J.P.S.; CURY, V.; JURADO, M.; MARCONDES, W.V.; SOUZA H.P. Nitric oxide modulates metalloproteinase-2, collagen deposition and

adhesion rate after polypropylene mesh implantation in the intra-abdominal wall. **Acta Biomater.**, v. 8, n. 1, p. 108-115, 2012.

MORI, H.; KAWADA, K.; ZHANG, P.; UESUGI, Y.; SAKAMOTO, O.; KODA, A. Bleomycin induced pulmonary fibrosis in genetically mast cell-deficient WBB6F1-W/Wv mice and mechanism of the suppressive effect of tranilast, an antiallergic drug inhibiting mediator release from mast cells, on fibrosis. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v.95, p.195-201, 1991.

MOSCATO, S.; MATTII, L.; D'ALESSANDRO, D.; CASCONI, M.G.; LAZZERI, L.; PIO SERINO, L.; DOLFI, A.; BERNARDINI, N. Interaction of human gingival fibroblasts with PVA/gelatine sponges. **Micron**, v.39, p.569-579, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

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

MRUÉ, F.; COUTINHO-NETTO, J.; CONEVIVA, R.; LACHAT, J. J.; THOMAZINI, J.; A., TAMBELINI, H. Evaluation of The Biocompatibility of New Biomembrane: **Materials Res.**, v.7, n.2, p.277-283, 2004.

_____. **Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex com polilisina. Aplicabilidade em neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães.** 2010. 112. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

MUSCARA, M.N.; MCKNIGHT, W.; ASFAHA, S.; WALLACE, J.L. Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor. **Br. J. Pharmacol.**, v.129, p.681-686, 2000.

NAGY, J.A.; BENJAMIN, L.; ZENG, H.; DVORAK, A.M.; DVORAK, H.F. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 11; p.109-119, 2008

NASCIMENTO, A.P.D.; COSTA, A.M.A. Both obesity-prone and obesity-resistant rats present delayed cutaneous wound healing. **Br. J. Nutr.**, v.106, p.603-611, 2011.

NOLI, C.; MIOLO A. The mast cell in wound healing. **Vet. Dermatol.**, v.12, p.303 - 313, 2001

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. Methods**, v.329, p.194-200, 2008.

OBAYASHI, K.; AKAMATSU, H.; OKANO, Y.; MATSUNAGA, K.; MASAKI, H. Exogenous nitric oxide enhances the synthesis of type I collagen and heat shock

protein 47 by normal human dermal fibroblasts. **J. Dermatol. Sci.**, v. 41, p.121-126, 2006.

OEHMICHEN, M.; GRONKI, T.; MEISSNER, C.; ANLAUF, M.; SCHWARK, T. 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, J. A. A.; HYPPOLITO, M. A.; COUTINHO-NETTO, J., MRUÉ, F. Miringoplasia com a utilização de um novo material biossintético. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v.69, n.5, p.649-655, 2003.

OLIVEIRA, J.S.; FREITAS, C.D.T.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; RAMOS, M.V. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. **Toxicol. in Vitro.**, v.21, p.1563-1573, 2007.

OLIVEIRA, R. S. B. **Caracterização bioquímica e mecanismo de ação do efeito protetor *in vivo* de proteínas do látex de *Calotropis procera* (AIT.) R. Br sobre infecção letal induzida por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium.** 2010. 109f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 2010.

PAN, H.; JIANG, H.; CHEN, W. The biodegradability of electrospun Dextran/PLGA scaffold in a fibroblast/macrophage co-culture. **Biomaterials**, v. 29, p.1583-1592, 2008.

PANUTO-CASTELO, A.P.; SOUZA, M.A.; ROQUE, M.C.B.; SILVA, J.S. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, v. 11, p.1035-1042, 2001

PATHER, N.; VILJOEN, A.M.; KRAMER, B. A biochemical comparison of the in vivo effects of *Bulbine frutescens* and *Bulbine natalensis* on cutaneous wound healing. **J. Ethnopharmacol.**, v.133, p.364-370, 2011.

PATIL, S.D.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F.; BURGESS, D.J. Dexamethasone-loaded poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres/poly(vinyl alcohol) hydrogel composite coatings for inflammation control. **Diabetes Technol. Ther.**, v.6, p.887-897, 2004.

PATIL, S.D.; PAPADMITRAKOPOULOS, F.; BURGESS, D.J. Concurrent delivery of dexamethasone and VEGF for localized inflammation control and angiogenesis. **J. Control. Release**, v.117, p.68-79, 2007.

PEREIRA, M.C.M.; PINHO, C.B.; MEDRADO, A.R.P.; ANDRADE, Z.A.; REIS S.R.A. Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology.**, v. 98, p.188-192, 2010.

PETUCO, V.M.; MARTINS, C.M. A experiência da pessoa ostomizada com câncer: uma análise segundo o modelo de trajetória da doença crônica proposto por Morse e Johnson. **Rev. Bras. Enferm.**, v.59, p.134-41, 2006.

PHILLIPS, R.J.; BURDICK, M.D.; HONG, K.; LUTZ, M.A.; MURRAY, L.A.; XUE, Y.Y. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. **J. Clin. Invest.**, v.114, p.438 - 446, 2004.

PICKARD, W. F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New Phytol.**, v.177, p.877-888, 2008.

PINHO, E.C.C.M.; SOUSA, S.J.F.; SCHAUD, F.; LACHAT, J.J.; COUTINHO-NETO, J. Experimental use of látex biomembrane in conjunctival reconstruction. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v.67, p.27-32, 2004.

POLIKOV, V.S.; TRESKO, P.A.; REICHERT, W.M. Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. **J. Neurosci. Methods.**, v.148, p. 1-18, 2005.

POSCH, A.; CHEN, Z.; WHEELER, C.; DUNN, M. J.; RAULF-HEIMSOTH, M.; BAUR, X. (1997) Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.99, p.385-395, 1997.

PRATA, M.B.; HADDAD, C.M.; GOLDENBERG, S. Uso tópico do açúcar em feridas cutâneas, estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v.3, n.2, p. 43-48, 1998.

QUAGLINO, D.J.R.; NANNEY, L.B.; DITESHEIM, J.A.; DAVIDSON, J.M. Transforming growth factor-beta stimulates wound healing and modulates extracellular matrix gene expression in pig skin: incisional wound model. **J. Invest. Dermatol.**, v.97, p.34-42, 1991.

QUAN, T.E.; COWPER, S.; WU, S.P.; BOCKENSTEDT, L.K.; BUCALA, R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. **Int. J. Biochem. Cell B**, v.36, p.598-606, 2004.

RAGHOW, R. The role of extracellular matrix on post-inflammatory wound healing and fibrosis. **Faseb J.**, v.8, p.823-831, 1994.

RAMOS, M. V.; AGUIAR, V. C.; XAVIER A. A. S.; LIMA, M. W.; BANDEIRA, G. P. J.; ETCHHELLS, P.; NOGUEIRA, N. A. P.; ALENCAR, N. M. N. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia**, v.77, p.251-256, 2006.

RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, T. B.; FREIRE, E. A.; SALES, M. P.; SOUZA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; FREITAS, C. D. T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Arthropod Plant Interact.**, v.4, p.57-67, 2010.

RAMOS, M.V.; OLIVEIRA, J.S.; FIGUEIREDO, J.G.; FIGUEIREDO, I.S.T.; KUMAR, V.L.; BITTENCURT, F.S.; CUNHA, F.Q.; OLIVEIRA, R.S.B.; BOMFIM, L.R.; LIMA-FILHO, J.V.; RAMOS, M.V. Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **J. Ethnopharmacol.**, v.125, p.1-10, 2009.

RANZATO, E.; MARTINOTTI, S.; BURLANO, B. Wound healing properties of jojoba liquid wax: an in vitro study. **J. Ethnopharmacol.**, v. 134, p. 443 - 449, 2011.

RASIK, A. M.; RAGHUBIR, R.; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, M. P.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H. K.; KULSHRESTHA, D.K. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **J. Ethnopharmacol.**, v.68, p.261-266, 1999.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. Biomaterial Science., In: RATNER, B.D. **Biological Testing of Biomaterials**. Academic press, 2004. p. 355-396.

REHDER, J.; SOUTO, L.R.M.; BERNARDINO, C.M.; ISSA, M. PUZZI, M.B. Model of human epidermis reconstructed *in vitro* with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. **São Paulo Med. J.**, São Paulo, v.122, n.1, p.22-25, 2004.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FORSTER, R. The evaluation of a multi endpoint citotoxicity assay. **Alt. Lab. Anim.**, v.21, p.86-89, 1993.

RHETT, J.M.; GAUTAM, S.G, JOSEPH, A.P.; MICHAEL, O.; MICHAEL, J.Y.; ROBERT, G.G. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. **Trends Biotechnol.**, v.26, p.173-180, 2008b

RIBATTI, D.; VACCA, A.; RONCALLI, L.; DAMMARCO, F. The chick embryo chorioallantoic as a model for in vivo research on angiogenesis. **Int. J. Dev. Biol.**, v.40, p.1189-1197, 1996.

RICHARDSON, M. Acute wounds: an overview of the physiological healing process. **Nurs. Times**, v. 100, p. 50-53, 2004.

RIZK, M.; WITTE, M.B.; BARBUL, A. Nitric oxide and wound healing. **World J Surg.**, v.28, p.301-306, 2004.

ROBSON, M.C.; STEED, D.L.; FRANZ, M.G: Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. **Curr. Probl. Surg.**, v.38, p.72 - 140, 2001

ROLDÁN-MARÍN, R.; CONTRERA-RUIZ, J.; ARENAS, R.; VAZQUEZ-DELMERCADO, E.; CAIRE-TOUSSANIT; MEMIJE-VEGA, M.E. Fixed sporotrichosis as a cause of a chronic ulcer on the knee. **Int. Wound J.**, Oxford, v.6, n.1, p.63-66, 2009.

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.

SALOMÉ, G.M. Processo de viver do portador com ferida crônica: atividades recreativas, sexuais, vida social e familiar. **Cienc. Saúde Coletiva**, v. 46, n. 7, p. 300-304,. 2010.

SAUNDERS, B.M.; TRANS, S.; RUULS, S.; SEDGWICK, J.D.; BRISCOE, H.; BRITTON, W.J. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. **J. Immunol.**, v.174, p.4852-4859, 2005.

SCHAFFER, M.R.; TANTRY, U.; EFRON, P.A. Diabetes impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: a possible pathophysiologic correlation. **Surgery**, v.121, p.513-519, 1997.

SCHMIDT, C.; FRONZA, M.; GOETTERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E.M.M.; BITTENCOURT, C.F.; ZANETTI, G.D.; HEINZMANN, B.M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **J. Ethnopharmacol.**, v.122, n.3 523-532, 2009.

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

SCHWENTER, A.; VODOVOTZ, Y.; WELLER, R.; BILLIAR, T.R. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? **Nitric Oxide**, v.7, p.1-10, 2002.

SEHGAL, R.; ARYA, S.; KUMAR, V. L. Inhibitory effect of extracts of latex of *Calotropis procera* against *Candida albicans*: A preliminary study. **Indian J. Pharmacol.**, v.37, p.334-335, 2005.

SEIBER, J. N.; NELSON, C. J.; MARK LEE, S. Cardenolides in the latex leaves of seven *Asclepias* species and *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v.21, p.2343-2348, 1982.

SHABANI, M.; PULFER, S.K.; BULGRIN, J.P.; SMITH, D.J. Enhancement of wound repair with a topically applied nitric oxide-releasing polymer. **Wound Repair Regen.**, v.4, p.353-362, 1996.

SHAI, A; MAIBACH, H.I. Antibiotics, antiseptics and cutaneous ulcers. In: _____. **Wound healing and ulcers of the skin**. Diagnosis and Therapy – the practical approach. Berlin: Springer, 2005. p.135-150.

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. In-vitro schizonticidal screening of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v.71, p.77-79, 2000.

SHERIDAN, J.F.; PADGETT, D.A.; AVITSUR, R.; MARUCHA, P.T. Experimental models of stress and wound healing. **World J. Surg.**, v.28, p.327-330, 2004.

SHIN, H.; JO, S.; MIKOS, A.G. Biomimetic materials for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, p.4353-4364, 2003.

SHIVKAR, Y. M.; KUMAR, V. L. Histamine mediates the pro-inflammatory effect of latex of *Calotropis procera* in rats. **Mediators Inflamm.**, v. 12, p.299-302, 2003.

SHOCK, A., LAURENT, G. Lung Biology in Health and Disease. Adhesion molecules and the lung. **Cell adhesion in wound healing and pulmonary fibrosis**. New York: Ward PA and antone, JC, 1996. p. 177-209.

SHOUP, A. Why latex allergy now? **Semin. Perioper Nurs.**, v.7, p.222-225, 1998.

SHUKLA, O. P.; MURTI C. R. K. Properties & partial purification of a bacteriolytic enzyme from the latex of *Calotropis procera* (Madar). **J. Sci. Ind. Res.**, v.20, p.109-112, 1961.

SILVA, C.A.; GOMES, M.T.R.; FERREIRA, R.S.; RODRIGUES, K.C.L.; LOPES, M.T.P. A mitogenic protein fraction in látex from *Carica candamarcensis*. **Planta Med.**, v.69, p.926-32, 2003.

SILVA-PITZ, H. **Caracterização de proteínas provenientes do látex da seringueira *Hevea brasiliensis***: purificação e avaliação do processo cicatricial e angiogênico. 2011. 79f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A. Cutaneous wound healing. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, p.738-746, 1999.

SINGH, A. N.; SHUKLA, A. K.; JAGANNADHAMB, M.V.; DUBEY, V. K. Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. **Process Biochem.**, v. 45, p.399-406, 2010.

SINGH, H.; KUMAR, S.; DEWAN, S.; KUMAR, V. L. Inflammation induced by latex of *Calotropis procera*: a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.43, p.219- 224, 2000.

SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. **Prog. Polym. Sci.**, v. 36, p.1254-1276, 2011.

SISCO, M.; CHAO, J.D.; KIM, I.; MOGFORD, J.E.; MAYADAS, T.N.; MUSTOE, T.A. Delayed wound healing in Mac-1-deficient mice is associated with normal monocyte recruitment. **Wound Repair Regen.**, v.15, n.566-571, 2007.

SOARES P. M.; LIMA S. R.; MATOS S. G.; ANDRADE M. M.; PATROCÍNIO M. C. A.; FREITAS C. D. T.; RAMOS M. V.; CRIDDLE D. N.; CARDI B. A.; CARVALHO K. M.; ASSREUY A. M. S.; VASCONCELOS S. M. M. Anti-nociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 99, p.125-129, 2005.

SON, H.J.; HAN, D.W.; BAEK, H.S.; LIM, H.R.; LEE, M.H.; WOO, Y.I.; PARK, J.C. Stimulated TNF- α release in macrophage and enhanced migration of dermal fibroblast by β -glucan. **Current Applied Physics**, v.7, p.33-36, 2007.

SOUTO, L.R.M.; REHDER, J.; VASSALLO, J.; CINTRA, M.L.; KRAEMER, M.H.S.; PUZZI, M.B. Model for human skin reconstructed *in vitro* composed of associated dermis and epidermis. **São Paulo Med. J.**, São Paulo, v.124, n.2, p.71-76, 2006.

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

SOUZA, T.T. Úlcera por pressão: uma epidemia oculta no ambiente hospitalar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO PARENTERAL E ENTERAL, 16., 2005. **Anais...**Fortaleza, 2005.

SRITANYARAT, W.; PEARCE G.; SIEMS, W. F.; RYAN, C. A.; WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D. Isolation and characterization of iso inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, v.67, p.1644-1650, 2006.

STADELMANN, W.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **Am. Surg. J.**, v.176, p.26-38, 1998.

STOJADINOVIC, A.; CARLSON, J.W.; SCHULTZ, G.S.; DAVIS, T.A.; ELSTER, E.A. Topical advances in wound care. **Gynecol. Oncol.**, New York, v.111, p.70-80, 2008.

STRAMER, B.M.; MORI, R.; MARTIN, P. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. **J. Invest. Dermatol.**, v. 127, p.1009-1017, 2007.

STRIETER, R.M.; KEELEY, E.C.; HUGHES, M.A.; BURDICK, M.D.; MEHRAD, B. The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. **J. Leukoc. Biol.**, v.86, p.1111-1118, 2009.

STRONCEK, J.D.; BELL, N.; REICHERT, W. M. Instructional powerpoint presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures. **J. Biomed. Mater. Res. Part A**, v.90, p.1230-1238, 2009.

SUBRAMANIAN, S.; KUMAR, D.S.; ARULSELVAN, P. Wound healing potential of Aloe vera leaf gel studied in experimental rats. **Asian J. Bioche.**, v.1, p.178-185, 2006.

SUNG, H.W.; HUANG, R.N.; HUANG, L.L.H.; TSAI, C.C.; CHIU, C.T. Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.47, p.116-126, 1999.

SUNGA, J.H.; HWANGA, M.; KibMA, J.O.; LEEA, J.H.; KIMA, Y.; KIMB, J.G.; CHANGB, S.; CHOIA, H. Gel characterisation and *in vivo* evaluation of minocycline-

loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan. **Int. J. Pharm.**, v.392, p. 232-240, 2010.

SUSSMAN, G. L.; BEEZHOLDB, D. H.; LISSC, G. Latex allergy: historical perspective. **Methods**, v.27, p.3-9, 2002.

TANG, L.; JENNINGS, T.A.; EATON, J.W. Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p.8841-8846, 1998.

SWAIN, S. D.; ROHN, T. T., QUINN, M. T. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents: **Antioxid Redox Signal**, v.4, n.1, p.69-83. 2002.

THEVENOT, P.T.; BAKER, D.W.; WENG, H.; SUN, M.W.; TANG, L. The pivotal role of fibrocytes and mast cells in mediating fibrotic reactions to biomaterials. **Biomaterials.**, v.32, p.8394-8403, 2011.

TIZARD, I.R.; CARPENTER, R.H.; MCANALLEY, B.H.; KEMP, M.C. The biological activates of mannans and related complex carbohydrates. **Mol. Biother.**, v.1, p.290-296,1989.

TRENGOVE, N.J.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; STACEY, M.C. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. **Wound Repair Regen.**, v. 8, p. 13-25, 2000.

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.

WAGNER, J.G.; ROTH, R.A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, p.349-374, 2000.

WARRIER, P. K.; NAMBIAR, V. P. K.; RAMANHUTTY, C. *Calotropis gigantea*. **Indian Medicinal Plants**, v.1, p. 341-345, 1994.

WEIDNER, N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in câncer. **Am. J. Pathol.**, v. 147, p.9-19, 1995.

WEIDNER, N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. **Am. J.Pathol.**, v. 147, n. 1, p. 9-19, 1995.

WEIGUEL, T.; SCHINKEL G. AND LEINDLEN A. Design and preparation of polymeric scaffold for tissue engineering. **Expert Rev. Med. Devices.**, p. 3, v. 835-851, 2006.

WEINAND, C.; POMERANTSEVA, I.; NEVILLE, C.M. Hydrogel-b-TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone. **Bone**, v.38, p. 555-563, 2006.

WELLER, K.; FOITZIK, K.; PAUS, R.; SYSKA, W.; MAURER, M. Mast cells are required for normal healing of skin wound mice. **Faseb J.**, v.20, p.1628-1635, 2006.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev.**, v.83, p.835-70, 2003.

WILLIAMS, D. **Definitions in biocompatibility:** Proceedings of a Concensus Conference of the European Society for Biomaterials. London: Elsevier Science, 1987.

WITTE, M.B.; THORNTON, F.J.; EFRON, D.T.; BARBUL, A. Enhancement of Fibroblast Collagen Synthesis by Nitric Oxide. **Nitric Oxide.**, v.4, p.572-582, 2000.

WYSOCKI, A.B. Anatomy and physiology of skin and soft tissue. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. **Acute and chronic wounds:** Current management concepts. 4th ed. Missouri: Elsevier Mosby, 2012. cap.3, p.40-62.

YAMASAKI, K.; EDINGTON, H.D.J.; MCCLOSKEY, C.; TZENG, E.; LIZONOVA, A.; KOVESDI I, BILLIAR, T.R. Reversal of Impaired Wound Repair in iNOS-deficient Mice by Topical Adenoviral-mediated iNOS Gene Transfer. **J. Clin. Invest.**, v.101, p.967-971, 1998.

YANG, X.; YANG, K.; WU, S.; CHEN, X.; FENG, Y.; LI, J.; MINGWANG, M.; ZHU, Z. Cytotoxicity and wound healing properties of PVA/ws-chitosan/glycerol hydrogels made by irradiation followed by freeze–thawing. **Radiation Physics and Chemistry.**, v.79, p.606-611, 2010.

YEANG, H. Y.; ARIF, S. A. M.; YUSOF, F.; SUNDERASAN, E. Allergenic proteins of natural rubber latex. **Methods**, v.27, p.32-45, 2002.

YUO, C. H.; MIYAZAKI, T.; ISHIDA, E.; ASHIZUKA; M.; OHTSUKI, C.; TANIHARA, M. Fabrication of poly(vinyl alcohol)-apatite hybrids through biomimetic process. **J. Eur. Ceram. Soc.**, v.27, n.2, p.1585-88, 2007.

ZDOLSEK, J.; EATON, J.W.; TANG, L. Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans. **J. Transl. Med.**, v.5, p.31, 2007.

ZENG, Q.; CHEN, W. The functional behavior of a macrophage/fibroblast co-culture model derived from normal and diabetic mice with a marine gelatineoxidized alginate hydrogel. **Biomaterials**, v.31, p.5772-5781, 2010.