



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

**RICARDO DE OLIVEIRA LIMA**

**CICATRIZAÇÃO DA ÚLCERA POR PRESSÃO EXPERIMENTAL COM FUMAÇA  
DE MOXA PALITO DE *Artemisia vulgaris* EM CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA  
2013**

RICARDO DE OLIVEIRA LIMA

CICATRIZAÇÃO DA ÚLCERA POR PRESSÃO EXPERIMENTAL COM FUMAÇA DE  
MOXA PALITO DE *Artemisia vulgaris* EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obter o título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Ciências Biológicas II.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Lima Vale.

FORTALEZA  
2013

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

- 
- L71c Lima, Ricardo de Oliveira.  
Cicatrização da úlcera por pressão experimental com fumaça de moxa palito de *Artemisia vulgaris* em camundongos / Ricardo de Oliveira Lima. – 2013.  
149 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2013.  
Área de Concentração: Ciências Biológicas II.  
Orientação: Profa. Dra. Mariana Lima Vale.
1. Cicatrização. 2. Úlcera por Pressão. 3. Artemísia. I. Título.

RICARDO DE OLIVEIRA LIMA

CICATRIZAÇÃO DA ÚLCERA POR PRESSÃO EXPERIMENTAL COM FUMAÇA DE  
MOXA PALITO DE *Artemisia vulgaris* EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obter o título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Ciências Biológicas II.

Aprovado em: 29/04/2013.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Mariana Lima Vale (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, que através do nada me fez em todo, e através do nada me guio pelo Tudo.

Aos meus pais, Francisco Ferreira Lima e Francisca de Oliveira Lima, que exemplos espontâneos e verdadeiros de caráter e altruísmos, formaram a maior parte do que sou hoje.

A meus irmãos Carlos Gilson e Sheila Stephanie, grande amigos que posso contar em todos os momentos da vida.

As minhas sobrinhas Maria Beatriz e Maria Laís, bálsamos e oásis na aridez do caminho da vida.

Dedico!

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Mariana Lima Vale que mais que orientadora foi uma amiga, sempre tratando a todos com paciência, respeito, carinho e bom humor. Agradeço além da orientação, o exemplo de professora e ser humano que me passou durante esta caminhada.

Aos antigos e atuais mestres da Medicina Tradicional Chinesa, em especial ao Professor Evaldo Martins Leite, pelo conhecimento repassado e pelas dicas valiosas para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. *Prof. Edilberto* Rocha Silveira, pela contribuição no fracionamento do precipitado, assim como as ideias que enriqueceram esta pesquisa.

A meu amigo Felipe Almeida que me ajudou tanto neste trabalho, tanto nos experimentos como na parte escrita.

Ao Fernando Klein, Vanessa Veras, Isabela e Bárbara meus queridos estudantes de iniciação científica, que foram essenciais para a realização desta conquista.

Aos meus amigos Rafael Brito e Cícero Cruz pela contribuição fundamental nos experimentos. Assim como meus amigos Raissa, Renato Guimarães e Norberto Eloi, que mesmo não fazendo parte deste grupo de pesquisa contribuíram durante os experimentos.

À Nayara que contribuiu, primeiramente, como estudante de iniciação científica e no decorrer do trabalho como mestranda da química.

A meus colegas de pós-graduação Fabio Bezerra e Ana Paula pela atenção e presteza durante os experimentos.

À Vanda Pinheiro técnica do LAFICA, pela ajuda profissional prestada com grande competência.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial a Áurea e Márcia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro oferecido.

“Et erit lux lunæ sicut lux solis et lux solis erit septempliciter sicut lux septem dierum in die qua alligaverit Dominus vulnus populi sui et percussuram plagæ ejus sanaverit.” (Isaiás 30:26)

## RESUMO

Úlcera por pressão (UP) é uma lesão comum entre idosos e indivíduos com mobilidade física prejudicada. Ela afeta a qualidade de vida dos indivíduos e gera custos consideráveis, uma vez que está se tornando um problema mundial crescente, devido ao envelhecimento da população. Ciclos de isquemia e reperfusão têm sido identificados como fatores causais primários, mas existem outros fatores que influenciam a intensidade dos danos. Atualmente, não existe um método eficaz e de baixo custo para tratar esta condição. O uso clínico da fumaça de *Artemisia vulgaris* (FAV) para o tratamento de lesões na pele de diversas origens está descrito na literatura. Entretanto é pouco documentado e atualmente nada foi descrito em modelos experimentais de úlcera por pressão a respeito da sua atividade cicatrizante, bem como o seu efeito tóxico. Dessa forma objetivou-se investigar o perfil toxicológico e o efeito cicatrizante da aplicação tópica da fumaça de *Artemisia vulgaris* em modelo de úlcera por pressão em camundongos. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética (89/2011). Foi utilizado um modelo não-invasivo de UP em camundongos Swiss machos, que consiste em 4 ciclos de isquemia e reperfusão através da colocação de dois ímãs na superfície da pele dorsal. Cinco grupos experimentais foram testados: (1): com úlcera e sem tratamento, (2): com úlcera e FAV tópico, (3): com úlcera, FAV tópica e filme de poliuretano, (4): com úlcera e tratado com hidrogel e filme de poliuretano e (5) sem úlcera, e sem tratamento. A análise foi realizada nos dias 5, 7, 14 e 21 após a indução da úlcera. Foram avaliados parâmetros macroscópicos de cicatrização através da escala EWAT (Experimental Wound Assessment Tool – Instrumento de avaliação de ferida experimental), área da ferida e porcentagem de contração. Nos parâmetros microscópicos foram avaliados: a análise histopatológica, a espessura da camada de colágeno e densidade de colágeno na derme, a contagem de fibroblastos e fibrócitos e a medição da espessura da epiderme. Avaliação da imunomarcagem para NOSi e nitrotirosina e ensaio de malondialdeído (MDA) foi realizado para investigar o stress oxidativo. Testes toxicológicos com parâmetros hematológicos, bioquímicos, histopatológicos e comportamentais foram realizados em animais tratados com FAV. Resultados: a FAV não mostrou toxicidade nos parâmetros avaliados. Em todos os resultados a FAV + filme transparente foi melhor do que a FAV. EWAT macroscópica e escores inflamatórios mostraram diferenças significativas entre o grupo tratado,

FAV + filme de poliuretano e grupo controle ( $p < 0,01$ ). Área contração da ferida foi aumentada em no grupo FAV grupo + filme de poliuretano, por 99,62% (84,65% vs, controle), bem como a contagem de fibroblastos ( $112,7 \pm 7,9$  vs  $80,0 \pm 6,4$ ; controle,  $p < 0,01$ ) e densidade de colágeno ( $33,9\% \pm 6,6$  vs  $20,9 \pm 8,6\%$ , controle,  $p < 0,01$ ). FAV + filme de poliuretano aumentou a espessura da epiderme ( $113,2 \pm 18,1$  vs  $52,1 \pm 8,9$ , controle  $p < 0,01$ ) e também a contagem do número de vasos sanguíneo no tecido conjuntivo ( $142,3 \pm 15,1$  vs  $68,5 \pm 8,6$ ; controle,  $p < 0,01$ ). O número de células marcadas para NOSi e nitrotirosina, foi reduzido no grupo FAV + filme de poliuretano ( $601,5 \pm 94,0$  vs  $95,7 \pm 2005,0$ , controle, NOSi e  $666,0 \pm 142,4$  vs  $1877,2 \pm 133,8$ ; controle, nitrotirosina,  $p < 0,01$ ). O MDA também foi reduzido pelo tratamento com FAV + filme de poliuretano ( $0,08 \pm 0,03$  vs  $0,3 \pm 0,05$ ; controle,  $p < 0,05$ ). Concluimos que a aplicação tópica da FAV não produziu efeito tóxico e acelerou a cicatrização de feridas possivelmente por propriedades antioxidantes. O uso do filme de poliuretano intensificou a ação da FAV.

**Palavras-chave:** Cicatrização. Úlcera por Pressão. Artemísia.

## ABSTRACT

Pressure ulcer (PU) is a common injury among elderly and subjects with impaired physical mobility. It affects the quality of life of individuals and generates considerable costs, since it is becoming a worldwide growing problem due to the aging of the population. Cycles of ischemia and reperfusion from pressure have been identified as primary causal factor but other factors influence the intensity of damage. Currently, there is no effective and inexpensive method to treat this condition. For this reason, we aimed to check whether the traditional indication of smoke from *Artemisia vulgaris* (SAV) really contributes to the wound healing process of the PU. This work was approved by Ethics Committee (89/2011). It was used a non-invasive model of PU in mice which consists of 4 cycles of ischemia and reperfusion by the placement of two magnets on the dorsal skin surface of mice. Five experimental groups were tested: negative control, with ulcer and without treatment; positive control, with ulcer and treated with hydrogel and transparent film; treated group 1, with ulcer and topical SAV, treated group 2, with ulcer and topical SAV and transparent film, and a group without ulcer and without treatment. The analysis was conducted on days 5, 7, 14 and 21 after ulcer induction. Macroscopic parameters of healing were assessed through the EWAT (Experimental Wound Assessment Tool). Wound area, percentage of contraction, histopathological analysis, collagen layer thickness and collagen density in the dermis, counting of fibroblasts and fibrocytes, measurement of epidermis thickness were also assessed. Evaluation of the immunostaining for iNOS and nitrotyrosine and malondialdehyde assay (MDA) was performed to investigate oxidative stress. Toxicological tests were conducted in treated animals and SAV showed no toxic effect. In all the results SAV+film treatment was better than SAV. Results: Macroscopic EWAT and inflammatory scores showed significant differences between SAV+film treated group and control group ( $p < 0,01$ ). Wound contraction area was enhanced in SAV+film group by 99,62% (vs 84,65%, control) as well as fibroblast count ( $112,7 \pm 7,9$  vs  $80,0 \pm 6,4$ ; control,  $p < 0,01$ ) and collagen density ( $33,9\% \pm 6,6$  vs  $20,9\% \pm 8,6$ ; control,  $p < 0,01$ ). Epidermal width was increased by SAV+film ( $113,2 \pm 18,1$  vs  $52,1 \pm 8,9$ ; control  $p < 0,01$ ) and also the blood vessel counting in the conjunctive tissue ( $142,3 \pm 15,1$  vs  $68,5 \pm 8,6$ ; control,  $p < 0,01$ ). The counting of iNOS and nitrotyrosine immunostained cells showed a reduction by SAV+film ( $601,5 \pm 94,0$  vs  $2005,0 \pm 95,7$ ; control, iNOS and  $666,0 \pm 142,4$  vs  $1877,2$

$\pm 133,8$ ; control, nitrotyrosine,  $p < 0.01$ ). MDA assay showed also a reduction by SAV+film treatment ( $0,08 \pm 0,03$  vs  $0,3 \pm 0,05$ ; control,  $p < 0.05$ ). In conclusion, SAV topical application promoted wound healing by anti-oxidant properties and by modulating the inflammatory process. The effect of SAV was enhanced when the wound area was covered by the transparent film after smoke application. In addition, this method showed no toxic effect and may be an effective and low cost alternative for PU healing treatment.

**Keywords:** Wound healing. Pressure Ulcer. Artemisia.

## LISTA DE FIGURAS

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1  | - Formação da úlcera por pressão.....  | 27 |
| Figura 2  | - Danos teciduais na úlcera por pressão.....   | 29 |
| Figura 3  | - Fase inflamatória do processo de cicatrização.....   | 30 |
| Figura 4  | - Fase proliferativa do processo de cicatrização.....  | 37 |
| Figura 5  | - Modelo de compressão com peso.....   | 50 |
| Figura 6  | - Modelo de pressão magnética.....   | 51 |
| Figura 7  | - Modelo de câmara de compressão.....  | 52 |
| Figura 8  | - Modelo não invasivo de úlcera por pressão.....   | 53 |
| Figura 9  | - <i>Artemisia vulgaris</i> .....  | 54 |
| Figura 10 | - Fumigação com moxa de <i>Artemisia vulgaris</i> .....  | 56 |
| Figura 11 | - Moxa palito e base de sustentação.....   | 62 |
| Figura 12 | - Filme transparente de poliuretano.....   | 63 |
| Figura 13 | - Hidrogel com alginato.....   | 64 |
| Figura 14 | - Representação do posicionamento dos imãs para o ciclo de isquemia.....   | 67 |
| Figura 15 | - Animais durante a fase de isquemia.....  | 67 |
| Figura 16 | - Aplicação da fumaça de artemísia.....  | 68 |
| Figura 17 | - Fotomicrografia evidenciando fibroblastos (FB) e fibrócitos (FC).....  | 81 |
| Figura 18 | - Fotomicrografia representativa da medida da camada de colágeno na derme na área da cicatrização da ferida.....                                   | 82 |
| Figura 19 | - Fotomicrografia representativa da avaliação da densidade de colágeno na derme na área da cicatrização da ferida.....                             | 83 |
| Figura 20 | - Fotomicrografia representativa da medida da epiderme na área da cicatrização da ferida.....  | 84 |
| Figura 21 | - Fotomicrografia representativa contagem do número de vasos na derme na área da lesão.....  | 85 |
| Figura 22 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre as dosagens de eletrólitos no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos..... | 89 |
| Figura 23 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre os testes de ureia, creatinina, Alanina transaminase (ALT), Aspartato                        |    |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
|           | transaminase (AST) no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos.....  | 90  |
| Figura 24 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre as dosagens de bilirrubina total no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos.....        | 91  |
| Figura 25 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre as dosagens de PCR (proteína C reativa) no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos..... | 92  |
| Figura 26 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre a dosagem de glicemia no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos.....                   | 93  |
| Figura 27 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre os parâmetros do eritrograma no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos.....            | 94  |
| Figura 28 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre o contagem do número total de plaquetas no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos..... | 95  |
| Figura 29 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre os parâmetros do leucograma no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos.....             | 96  |
| Figura 30 | - Fotomicrografia dos rins, fígado e baço mostrando os aspectos histopatológicos.....   | 97  |
| Figura 31 | - Fotografias das feridas dos grupos em dias diferentes.....  | 99  |
| Figura 32 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre a área da ferida (cm <sup>2</sup> ) no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos.....     | 102 |
| Figura 33 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre percentagem de contração da ferida no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos.....       | 103 |
| Figura 34 | - Fotomicrografia da pele mostrando os aspectos histopatológicos.....   | 104 |
| Figura 35 | - Ampliação da fotomicrografia mostrando aspectos histopatológicos do grupo controle.....   | 105 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| Figura 36 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre o número de fibroblastos e fibrócitos presentes no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos.....    | 107 |
| Figura 37 | - Fotomicrografias da cicatriz evidenciando a presença de fibroblastos e fibrócitos na derme.....   | 108 |
| Figura 38 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre a síntese de colágeno no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos.....                               | 110 |
| Figura 39 | - Fotomicrografia mostrando a camada de colágeno na derme....   | 111 |
| Figura 40 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre a espessura da epiderme no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos.....                             | 112 |
| Figura 41 | - Fotomicrografias mostrando a espessura da epiderme.....   | 113 |
| Figura 42 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre o número de vasos sanguíneos e área dos vasos no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos.....       | 114 |
| Figura 43 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre a imunexpressão de NOSi no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos.....                            | 116 |
| Figura 44 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre a imunexpressão de nitrotirosina no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos.....                   | 117 |
| Figura 45 | - Fotomicrografia da imunexpressão de NOSi e nitrotirosina em pele do dorso de camundongo submetidos ao modelo de úlcera por pressão.....   | 118 |
| Figura 46 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre o teste TBARS que quantifica o malondialdeído (MDA) no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos..... | 120 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| Quadro 1 - Classificação da Úlcera por pressão aceitas pela NPUAP e EPUAP..... | 46 |
| Quadro 2 - Estágios/Categorias adicionais, aceitas pela NPUAP.....             | 47 |
| Quadro 3 - Detalhamento do fluxograma do desenho experimental.....             | 70 |
| Quadro 4 - Escores constituintes da escala EWAT.....                           | 79 |

## LISTA DE TABELAS

|          |  |     |
|----------|--|-----|
| Tabela 1 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre os aspectos macroscópicos (escores EWAT, somatória total) no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos.....                               | 100 |
| Tabela 2 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre os aspectos macroscópicos (escores EWAT, somatória dos itens que compõe os parâmetros inflamatórios) no modelo experimental de úlcera por pressão.....   | 100 |
| Tabela 3 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre os aspectos macroscópicos (escores EWAT, somatória dos itens que compõe os parâmetros de debridamento) no modelo experimental de úlcera por pressão..... | 101 |
| Tabela 4 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre os escores histopatológicos de infiltrado de celular inflamatório no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos.....                       | 106 |
| Tabela 5 | - Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre os escores histopatológicos de hemorragia no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos.....   | 106 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                |   |
|----------------|---|
| µm             | Micrômetro  |
| 4-AF           | 4-aminofenazona   |
| A              | Grupo artemísia   |
| A+F            | Grupo artemísia e filme de poliuretano                  |
| ADAM           | Adamalisina - proteína desintegrina e metaloproteinase) |
| ADP            | Adenosina difosfato                                     |
| ALT            | Alanina aminotransferase                                |
| ANOVA          | Análise de variância                                    |
| AP-1           | Proteína ativada  |
| AP-1           | Proteína adaptadora um                                  |
| AST            | Aspartato aminotransferase                              |
| bFGF (FGF2)    | Fator de crescimento fibroblástico básico               |
| BMT            | <i>Barber Measuring Tool</i>                            |
| C              | Grupo controle  |
| CCR5           | Receptor cinco de quimiocina CXC                        |
| CD11d/CD18     | Integrina alfa D beta dois                              |
| CEPA           | Comitê de Ética em Pesquisa Animal                      |
| CK2            | Caseína quinase dois                                    |
| CONCEA         | Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal  |
| CTAP-III       | Peptídeo Ativador do Tecido Conjuntivo três             |
| CXCR1          | Receptor um de quimiocina CXC                           |
| CXCR2          | Receptor dois de quimiocina CXC                         |
| D              | Dia   |
| DAB            | Diaminobenzidina  |
| DNA            | Ácido Desoxirribonucleico                               |
| DP             | Desvio padrão   |
| EDTA           | Ácido etilendiamino tetra-acético                       |
| EGF            | Fator de crescimento epidérmico                         |
| ENA-78 (CXCL5) | Proteína epitelial ativadora de neutrófilo              |
| EPM            | Erro Padrão da Média                                    |
| EPUAP          | European Pressure Ulcer Advisory Panel                  |

|                        |  |
|------------------------|--|
| ERK                    | Quinase regulada por sinal extracelular  |
| EUA                    | Estados Unidos da América  |
| EWAT                   | Experimental Wound Assessment Tool – Instrumento de avaliação de ferida experimental |
| f.e.m                  | Força Eletromotriz   |
| FB                     | Fibroblastos   |
| FC                     | Fibrócitos   |
| fMLP                   | <i>N-formil metionil</i> -leucil-fenilalanina  |
| FS                     | Grupo ferida sem tratamento  |
| FT                     | Grupo ferida tratada   |
| GAPDH                  | Glicerol-3-fosfato desidrogenase   |
| GM-CSF                 | Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos                           |
| GMPc                   | Monofosfato cíclico de guanosina   |
| GOD                    | Glicose Oxidase  |
| gp150, 95 (CD11c/CD18) | Proteína p150,95 de Adesão Leucocitária  |
| GRO- $\alpha$ (CXCL1)  | <i>Oncogene-alfa relacionado ao crescimento</i>                                      |
| h                      | Hora   |
| H+F                    | Grupo hidrogel e filme de poliuretano  |
| HB-EGF                 | Fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina                             |
| HB-EGF                 | Fator de crescimento do tipo epidermal e ligante de heparina                         |
| HCM                    | Hemoglobina corpuscular média  |
| HE                     | Hematoxilina e eosina  |
| HGF                    | Fator de crescimento de hepatócitos  |
| HIV                    | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida   |
| I/R                    | Isquemia - reperfusão  |
| ICAM-1                 | Molécula de adesão intercelular um   |
| ICAM-2                 | Molécula de adesão intercelular dois   |
| IFN- $\gamma$          | Interferon gama  |
| IGF                    | Fator de crescimento semelhante à insulina   |
| <i>IL-1</i>            | Interleucina um  |

|                    |  |
|--------------------|--|
| IL-12              | Interleucina doze  |
| <i>IL-1Ra</i>      | Interleucina um Ra   |
| IL-1 $\beta$       | Interleucina 1 beta  |
| IL-4               | Interleucina quatro  |
| IL-6               | Interleucina seis  |
| IL-8               | Interleucina oito  |
| IT                 | Grupo pele íntegra tratada   |
| KFG                | Fator de crescimento de queratinócitos   |
| KGF                | Fator de crescimento de queratinócitos   |
| LAFICA             | Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer                            |
| LDH                | Lactato desidrogenase  |
| LFA-1 (CD11a/CD18) | Antígeno associado à função dos linfócitos                                       |
| LOX                | Lisil-oxidase  |
| LPS                | Lipopolissacarídeo   |
| LUMT               | <i>Leg Ulcer Measurement Tool</i>  |
| MAC-1 (CD11b/CD18) | Antígeno do macrófago um   |
| MAPK               | Proteína cinase ativada por mitógeno   |
| MCP-1 (CCL2)       | Proteína tipo um quimiotática de monócitos (Ligante 2 de quimiocina C-C motif)   |
| MCP-3 (CCL7)       | Proteína tipo três quimiotática de monócitos (Ligante 2 de quimiocina C-C motif) |
| MDA                | Malondialdeído   |
| MDH                | Malato desidrogenase   |
| MDP                | <i>N-acetilmuramil-L-alanil-disoglutamina</i>                                    |
| MEC                | Matriz extracelular  |
| MIP-1 (CCL3)       | Proteína-1 Inflamatória de Macrófagos (Ligante 3 de quimiocina C-C motif)        |
| mL                 | Mililitro  |
| MMP-1              | Metaloproteínase de matriz um  |
| MMP-10             | Metaloproteínase de matriz dez   |
| MMP-13             | Metaloproteínase de matriz treze   |
| MMP-14             | Metaloproteínase de matriz quatorze  |
| MMP-15             | Metaloproteínase de matriz quinze  |

|               |   |
|---------------|---|
| MMP-8         | Metaloproteinase de matriz oito   |
| MMP-9         | Metaloproteinase de matriz nove   |
| MMPs          | Metaloproteinases de matriz   |
| MTC           | Medicina Tradicional Chinesa  |
| N             | Grupo normal  |
| NAD           | Nicotinamida adenina dinucleotídeo  |
| NADH          | Dinucleótido de nicotinamida e adenina  |
| NAP-2 (CXCL7) | Peptídeo Ativador de Neutrófilos dois   |
| NE            | Elastase neutrofilica   |
| NEMPI         | Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens   |
| NET           | Armadilhas extracelulares neutrofilicas   |
| NF-κB         | Fator Nuclear Kappa B   |
| NGF           | Fator de crescimento neural   |
| NO            | Óxido Nítrico   |
| NOSi          | Oxido Nítrico Sintase Induzível   |
| NPUAP         | National Pressure Ulcer Advisory Panel  |
| PAR2          | Receptor tipo 2 <i>ativado por protease</i>   |
| PCR           | Proteína C reativa sérica   |
| PDGF          | Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas   |
| PDGF          | Fator de crescimento derivado de plaquetas  |
| PDGF-BB       | Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas - BB  |
| PKC           | Proteína quinase C  |
| POD           | Peroxidase  |
| PR3           | Proteinase três   |
| PSST          | <i>Pressure Sore Status Tool</i>  |
| PUSH          | <i>Pressure Ulcer Scale for Healing</i>   |
| PWAT          | <i>Photographic Wound Assessment Tool</i>   |
| RANTES (CCL5) | Regulado na ativação expresso e secretado pela célula T ou eotaxina (Ligante 5 de quimiocina C-C motif) |
| RECK          | Proteína indutora de reversão rica em cisteína com domínios Kazal                                       |
| RNS           | Espécies Reativas de Nitrogênio   |

|               |  |
|---------------|--|
| ROS           | Espécies Reativas de Oxigênio  |
| SBCAL-COBEA   | Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal |
| SPARC         | Proteína secretada ácida rica em cisteína  |
| SS            | <i>Sessing Scale</i>   |
| SWHT          | <i>Sussman Wound Healing Tool</i>  |
| TBARS         | Ácido tiobarbitúrico   |
| TGF- $\alpha$ | Fator de crescimento transformante alfa  |
| TGF- $\beta$  | Fator de Crescimento Transformante beta  |
| TGF- $\beta$  | Fator de crescimento transformante beta  |
| TIMP-1        | Inibidor tecidual de metaloproteinase um   |
| TIMP-2        | Inibidor tecidual de metaloproteinase dois   |
| TIMP-2        | Inibidor tecidual de metaloproteinase três   |
| TIMPs         | Inibidores teciduais de metaloproteinases  |
| TNF- $\alpha$ | Fator de necrose tumoral alfa  |
| TRL           | Receptores do tipo Toll  |
| TSP1          | Trombospondina 1   |
| T $\beta$ 4   | Timosina $\beta$ 4   |
| UP            | Úlcera por pressão   |
| u-PA          | Ativador do plasminogénio tipo uroquinase  |
| UV            | Ultravioleta   |
| UVC           | Ultravioleta – C   |
| VCM           | Volume corpuscular médio   |
| VEGF          | Fator de Crescimento Endotelial Vascular   |
| WHS           | <i>Wound Healing Scale</i>   |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                                |                           |
|--------------------------------|---------------------------|
| %                              | Porcentagem               |
| °C                             | Graus centígrados         |
| Cl                             | Cloro                     |
| g/dL                           | Gramas por decilitro      |
| g/L                            | Gramas por litro          |
| H <sub>2</sub> O               | Água                      |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | Peróxido de hidrogênio    |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | Ácido fosfórico           |
| HO <sup>•</sup>                | Radicais hidroxil         |
| K                              | Potássio                  |
| mEq/L                          | Miliequivalente por litro |
| mg/dL                          | Miligramas por decilitro  |
| Na                             | Sódio                     |
| nm                             | Nanômetro                 |
| N <sup>o</sup>                 | Número                    |
| O <sub>2</sub>                 | Oxigênio                  |
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>   | Ânion superóxido          |
| ONOO <sup>-</sup>              | Peroxinitrito             |
| Zn <sup>2+</sup>               | Íon zinco                 |
| μL                             | Microlitros               |

## SUMÁRIO

|                |  |           |
|----------------|--|-----------|
| <b>1</b>       | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>26</b> |
| <b>1.1</b>     | <b>Úlcera por Pressão</b> .....  | <b>26</b> |
| <b>1.1.1</b>   | <b><i>Definição</i></b> .....  | <b>26</b> |
| <b>1.1.2</b>   | <b><i>Epidemiologia</i></b> .....                                      | <b>26</b> |
| <b>1.1.3</b>   | <b><i>Etiopatogenia</i></b> .....                                      | <b>27</b> |
| <b>1.1.4</b>   | <b><i>Fisiopatologia</i></b> .....                                     | <b>28</b> |
| <b>1.1.5</b>   | <b><i>Cicatrização</i></b> .....                                       | <b>29</b> |
| <b>1.1.5.1</b> | <b><i>Fase Inflamatória</i></b> .....                                  | <b>30</b> |
| <b>1.1.5.2</b> | <b><i>Fase proliferativa</i></b> .....                                 | <b>37</b> |
| <b>1.1.5.3</b> | <b><i>Fase de remodelamento</i></b> .....                              | <b>41</b> |
| <b>1.1.6</b>   | <b><i>Classificação da úlcera por pressão (estagiamento)</i></b> ..... | <b>46</b> |
| <b>1.1.7</b>   | <b><i>Tratamento</i></b> .....   | <b>48</b> |
| <b>1.1.8</b>   | <b><i>Avaliação das intervenções</i></b> .....                         | <b>49</b> |
| <b>1.2</b>     | <b>Modelos experimentais de úlcera por pressão</b> .....               | <b>50</b> |
| <b>1.3</b>     | <b>Artemísia</b> .....   | <b>53</b> |
| <b>1.3.1</b>   | <b><i>Características botânicas</i></b> .....                          | <b>53</b> |
| <b>1.3.2</b>   | <b><i>Etnofarmacologia</i></b> .....                                   | <b>54</b> |
| <b>1.3.3</b>   | <b><i>Caracterização fitoquímica</i></b> .....                         | <b>55</b> |
| <b>1.3.4</b>   | <b><i>Propriedades farmacológicas</i></b> .....                        | <b>55</b> |
| <b>1.3.5</b>   | <b><i>Fumaça de artemísia</i></b> .....                                | <b>56</b> |
| <b>1.3.6</b>   | <b><i>Caracterização fitoquímica da fumaça de artemísia</i></b> .....  | <b>58</b> |
| <b>1.4</b>     | <b>Justificativa</b> .....   | <b>59</b> |
| <b>2</b>       | <b>OBJETIVOS</b> .....   | <b>61</b> |
| <b>2.1</b>     | <b>Objetivos Gerais</b> .....  | <b>61</b> |
| <b>2.2</b>     | <b>Objetivos específicos</b> .....                                     | <b>61</b> |
| <b>3</b>       | <b>MATERIAIS E MÉTODO</b> .....  | <b>62</b> |
| <b>3.1</b>     | <b>Bastão de Artemísia</b> .....                                       | <b>62</b> |
| <b>3.2</b>     | <b>Filme transparente de poliuretano</b> .....                         | <b>62</b> |
| <b>3.3</b>     | <b>Hidrogel com alginato</b> .....                                     | <b>63</b> |
| <b>3.4</b>     | <b>Animais</b> .....   | <b>64</b> |
| <b>3.5</b>     | <b>Local de realização do estudo</b> .....                             | <b>64</b> |
| <b>3.6</b>     | <b>Aspectos Éticos</b> .....   | <b>65</b> |

|               |   |           |
|---------------|---|-----------|
| <b>3.7</b>    | <b>Modelo de indução da úlcera por pressão (modelo de úlcera por isquemia/reperfusão não invasiva).....</b> | <b>65</b> |
| <b>3.8</b>    | <b>Aplicação da fumaça de artemísia.....</b>  | <b>68</b> |
| <b>3.9</b>    | <b>Desenho e protocolo experimental.....</b>  | <b>68</b> |
| <b>3.10</b>   | <b>Grupos experimentais.....</b>  | <b>69</b> |
| <b>3.11</b>   | <b>Análise toxicológica da aplicação tópica da fumaça de artemísia.....</b>                                 | <b>70</b> |
| <b>3.11.1</b> | <b><i>Protocolo experimental.....</i></b>   | <b>70</b> |
| <b>3.11.2</b> | <b><i>Testes toxicológicos.....</i></b>   | <b>71</b> |
| 3.11.2.1      | <i>Observação diária dos animais.....</i>   | 71        |
| 3.11.2.2      | <i>Análise dos eletrólitos: Cloro, potássio e sódio séricos.....</i>  | 72        |
| 3.11.2.3      | <i>Dosagem de cálcio sérico.....</i>  | 72        |
| 3.11.2.4      | <i>Quantificação do fósforo sérico.....</i>   | 72        |
| 3.11.2.5      | <i>Análise da albumina sérica.....</i>  | 73        |
| 3.11.2.6      | <i>Análise de bilirrubina total sérica.....</i>   | 73        |
| 3.11.2.7      | <i>Dosagem de <math>\gamma</math>(gama)-glutamil transferase sérica.....</i>                                | 74        |
| 3.11.2.8      | <i>Análise da PCR – proteína C reativa sérica.....</i>  | 74        |
| 3.11.2.9      | <i>Dosagem da glicemia sérica.....</i>  | 74        |
| 3.11.2.10     | <i>Quantificação do ALT e AST séricos.....</i>  | 75        |
| 3.11.2.11     | <i>Determinação dos níveis séricos de ureia e creatinina.....</i>   | 76        |
| 3.11.2.12     | <i>Análise do hemograma.....</i>  | 77        |
| 3.11.2.13     | <i>Análise histopatológica do fígado, rins, baço e pele.....</i>  | 78        |
| <b>3.12</b>   | <b>Avaliação do efeito cicatrizante da fumaça de <i>Artemísia vulgaris</i> na úlcera por pressão.....</b>   | <b>78</b> |
| <b>3.12.1</b> | <b><i>Análise Macroscópica.....</i></b>   | <b>79</b> |
| 3.12.1.1      | <i>EWAT (Experimental Wound Assessment Tool – Instrumento de avaliação de ferida experimental).....</i>     | 79        |
| 3.12.1.2      | <i>Determinação da área da úlcera através de planimetria.....</i>   | 80        |
| 3.12.1.3      | <i>Contração da área da lesão.....</i>  | 80        |
| <b>3.12.2</b> | <b><i>Análise histopatológica.....</i></b>  | <b>81</b> |
| <b>3.12.3</b> | <b><i>Avaliação da fibroplasia.....</i></b>   | <b>81</b> |
| <b>3.12.4</b> | <b><i>Avaliação da colagênese.....</i></b>  | <b>82</b> |
| 3.12.4.1      | <i>Medida da derme.....</i>   | 82        |

|               |   |           |
|---------------|---|-----------|
| 3.12.4.2      | <i>Quantificação do percentual de colágeno .....</i>  | 83        |
| <b>3.12.5</b> | <b><i>Avaliação da espessura da epiderme.....</i></b>   | <b>84</b> |
| <b>3.12.6</b> | <b><i>Contagem do número de vasos na área da lesão.....</i></b>   | <b>85</b> |
| <b>3.12.7</b> | <b><i>Avaliação do estresse tecidual por espécies reativas de nitrogênio e oxigênio.....</i></b>  | <b>85</b> |
| 3.12.7.1      | <i>Análise por imuno-histoquímica para expressão de NOSi e nitrotirosina.....</i>   | 85        |
| 3.12.7.2      | <i>Determinação da peroxidação lipídica – Ensaio de malondialdeído (MDA).....</i>   | 87        |
| <b>3.13</b>   | <b><i>Análise Estatística.....</i></b>  | <b>87</b> |
| <b>4</b>      | <b><i>RESULTADOS.....</i></b>   | <b>88</b> |
| <b>4.1</b>    | <b><i>Avaliação da toxicidade do uso da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos.....</i></b>   | <b>88</b> |
| <b>4.1.1</b>  | <b><i>Efeito da aplicação da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> sobre o comportamento e mortalidade dos animais.....</i></b>   | <b>88</b> |
| <b>4.1.2</b>  | <b><i>Avaliação das dosagens dos eletrólitos.....</i></b>   | <b>88</b> |
| <b>4.1.3</b>  | <b><i>Análise da quantificação de ureia, creatinina, AST e ALT no modelo de úlcera por pressão em camundongos.....</i></b>  | <b>89</b> |
| <b>4.1.4</b>  | <b><i>Efeito da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> na dosagem de albumina, bilirrubina total <math>\gamma</math>(gama)-glutamil transferase no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos.....</i></b> | <b>91</b> |
| <b>4.1.5</b>  | <b><i>Análise das dosagens de PCR e glicemia no modelo de úlcera por pressão em camundongos.....</i></b>  | <b>92</b> |
| <b>4.1.6</b>  | <b><i>Avaliação do hemograma nos camundongos submetidos ao modelo de úlcera por pressão.....</i></b>  | <b>93</b> |
| <b>4.1.7</b>  | <b><i>Análise histológica dos rins, fígado, baço e pele.....</i></b>  | <b>96</b> |
| <b>4.2</b>    | <b><i>Avaliação da fumaça de <i>Artemisia vulgaris</i> no processo cicatricial no modelo de úlcera por pressão em camundongos.....</i></b>  | <b>98</b> |
| <b>4.2.1</b>  | <b><i>Avaliação dos escores EWAT - EWAT total no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos.....</i></b>  | <b>98</b> |

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 4.2.2  | <i>Análise dos escores EWAT - itens dos parâmetros inflamatórios e debridante no modelo experimental de úlceras por pressão.....</i>                       | 98  |
| 4.2.3  | Análise do tamanho da ferida área e percentagem de contração da ferida no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos.....                    | 101 |
| 4.2.4  | Avaliação histopatológica no modelo de úlcera por pressão em camundongos.....  | 103 |
| 4.2.5  | Avaliação da fibroplasia no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos.....   | 106 |
| 4.2.6  | Análise da colagênese no modelo de úlcera por pressão em camundongos.....  | 109 |
| 4.2.7  | Avaliação da espessura da epiderme no modelo de úlcera por pressão em camundongos.....   | 111 |
| 4.2.8  | Quantificação do número de vasos no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos.....                       | 113 |
| 4.2.9  | Avaliação da imunoexpressão de NOSi e de nitrotirosina no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos..... | 115 |
| 4.2.10 | Quantificação do MDA no leito da ferida no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos.....   | 119 |
| 5      | <b>DISCUSSÃO.....</b>  | 121 |
| 6      | <b>CONCLUSÕES.....</b>   | 135 |
|        | <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | 136 |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Úlcera por Pressão

### 1.1.1 Definição

De acordo com EPUAP e NPUAP (2009) a úlcera por pressão (UP) é definida como uma lesão localizada na pele e/ou tecido subjacente geralmente sobre uma proeminência óssea, resultante da pressão, ou a pressão associada com o cisalhamento. Outros fatores contribuintes, também conhecidos como fatores de complicação, podem ser considerados desencadeadores deste surgimento. Contudo, a relevância dos mesmos ainda não foi totalmente elucidada.

### 1.1.2 Epidemiologia

A presença de UP constitui uma condição grave, comum em idosos e pessoas com restrições de mobilidade, acarretando perda de produtividade econômica, interferindo seriamente na qualidade de vida do paciente, gerando desconforto, dor, risco para infecções graves e óbito (BOUTEN *et al.*, 2003; BREM; LYDER, 2004; NIEDERHAUSER *et al.*, 2012).

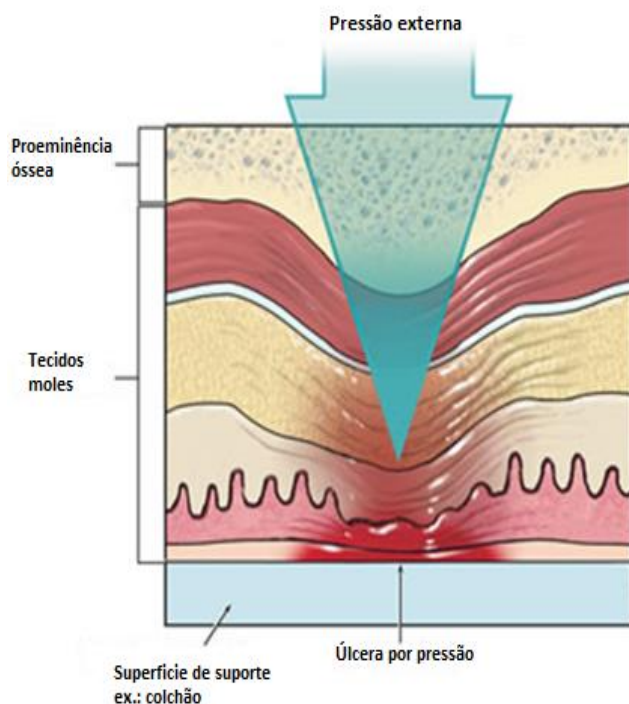
A prevalência de UP nos Estados Unidos da América (EUA) foi estimada entre 10% a 18% em cuidados agudos, 2,3% a 28% em cuidados de longa duração, e de 0% a 29% no atendimento domiciliar. Já a incidência, varia de 2,3% a 23,9% em cuidados de longa duração, de 0,4% a 38% em cuidados intensivos, de 0% a 17% na assistência domiciliar e de 0% a 6% em cuidados de reabilitação. Estima-se que nos Estados Unidos de 2007 a 2009 foram gastos 1,99 bilhões de dólares no tratamento deste tipo de ferida, somente no âmbito hospitalar. Entre 1990 e 2001, dos 27 milhões de óbitos nos Estados Unidos, 114.380 (0,4%) foram induzidos por úlceras de pressão, sendo em 21.365 destes casos registrados, a úlcera o motivo principal dessas mortes (CATANIA *et al.*, 2007; DORNER; POSTHAUER; THOMAS, 2009; REED *et al.*, 2011; REDELINGS; LEE; SORVILLO, 2005).

### 1.1.3 Etiopatogenia

Ciclos de isquemia por pressão e reperfusão têm sido identificados como principal fator causal (fig.1). Porém existem outros fatores auxiliares que influenciam na intensidade do dano, sendo eles: a presença de cisalhamento e fricção, umidade, idade, nutrição, estado psicossocial, perda sensorial, mobilidade, temperatura corporal elevada, tolerância tecidual à pressão, pressão arterial diastólica baixa, tabagismo, fluxo de líquido intersticial, contraturas, espasticidade, *diabetes mellitus*, doença vascular periférica, alguns medicamentos, raça, mobilidade, a intensidade da pressão e a duração da pressão (HASHIMOTO; KUROSE; KAWAMATA, 2008; KOKATE *et al.*, 1995; PIEPER, 2007).

Inserido no referido ciclo de isquemia e reperfusão, o tempo é um fator a ser considerado, visto que o período em que o tecido é submetido à pressão apresenta uma relação inversa com a intensidade. A alta intensidade de pressão num curto espaço de tempo ou baixa intensidade durante um longo período acarreta o surgimento da úlcera por pressão (KOSIAK, 1961; PIEPER, 2007).

Figura 1 - Formação da úlcera por pressão



Fonte: Nucleus Medical Media (2013).

### 1.1.4 Fisiopatologia

Quando um capilar é submetido a uma pressão externa maior que 32 mmHg, pode-se desencadear oclusão e trombose vascular. Neste processo, o líquido intersticial que amortece a tensão entre as células se desloca para outras áreas, e as células entram em contato direto umas com as outras, provocando rompimento de suas membranas. As células que permanecem íntegras, devido à falta de oxigênio e nutrientes, usam metabolismo anaeróbico, produzindo lactato e, conseqüentemente, desenvolvendo acidose tecidual. Com a acidez tecidual, ocorre hiperemia local, ativação de proteases intracelulares, culminando em mais morte celular (KOSIAK, 1961; KROUSKOP *et al.*, 1978; REDDY; COCHRAN, 1981).

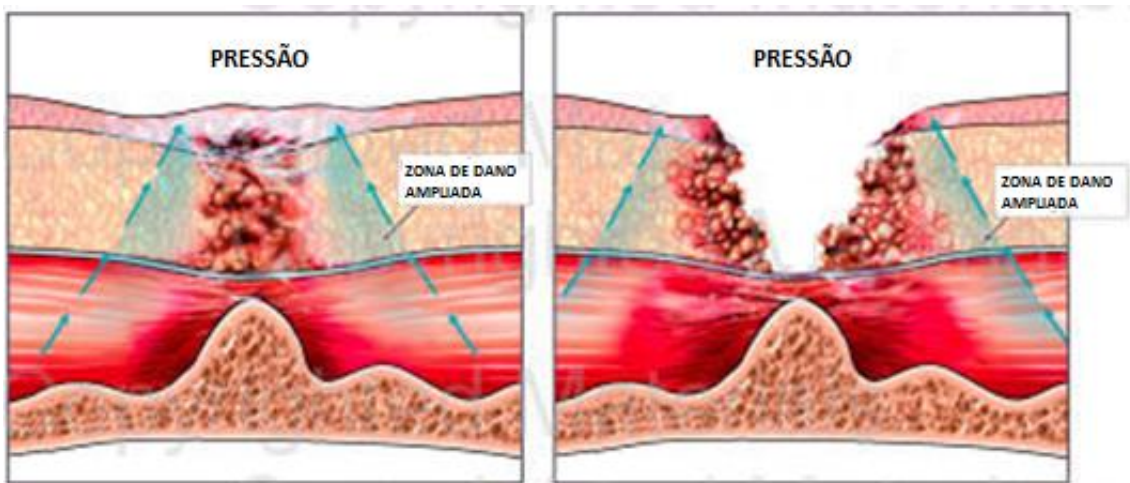
Quando a compressão é removida, a pressão do líquido intersticial ainda se mantém baixa, causando o rompimento capilar na área afetada devido à reperfusão. Quanto ao sistema linfático, devido a sua alta sensibilidade à anóxia, danifica-se, tornando-se ineficaz na remoção de produtos tóxicos intracelulares e intersticiais que se acumulam no local, danificando as células que resistiram à isquemia. Concomitante ao processo descrito anteriormente, o fluxo sanguíneo da reperfusão aumenta o infiltrado inflamatório leucocitário, com predomínio inicial de neutrófilos e, posteriormente, os monócitos se diferenciando em macrófagos. Estes secretam elevados níveis de enzimas proteolíticas e também radicais livres e agentes oxidantes como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radicais hidroxil ( $HO^{\cdot}$ ), peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que em grande quantidade são citotóxicos para as células, por esgotamento dos mecanismos intrínsecos antioxidantes. Dessa forma, somados aos danos desenvolvidos na isquemia, a reperfusão gera ainda mais destruição tecidual, através tanto de necrose quanto apoptose (BARRICK; CAMPBELL; OWEN, 1999; CALS-GRIERSON; ORMEROD, 2004; FANTONE; WARD, 1982; JIANG *et al.*, 2011; KOSIAK, 1961; KROUSKOP *et al.*, 1978; REDDY; COCHRAN, 1981; TSUJI *et al.*, 2005).

Além de destruição tecidual, os radicais livres são especialmente prejudiciais ao tecido de granulação interferindo assim na cicatrização (TRABUCCHI *et al.*, 2002).

A tensão de compressão no músculo é três vezes maior que a interface epiderme e superfície de contato e 2,4 maior que a tensão do tecido adiposo. Somado a este fator, devido à alta sensibilidade do tecido muscular à falta de

oxigênio, as alterações iniciam-se primeiro no músculo, avançando, em seguida, para a pele. A área de isquemia, e posterior necrose, é maior na interface osso-músculo que na superfície epitelial, ou seja, o que é visível constitui apenas a ponta do iceberg (fig.2). O resultado é uma lesão nos tecidos subjacentes, a qual não é visualizada por ser profunda e muitas vezes bem maior que a lesão superficial (BOUTEN *et al.*, 2003; LINDER-GANZ *et al.*, 2007; PIEPER, 2007).

Figura 2 - Danos teciduais na úlcera por pressão



Fonte: Nucleus Medical Media (2013).

### 1.1.5 Cicatrização

Após cessar a ação dos fatores desencadeantes da UP, o organismo tenta reaver a homeostasia anterior ao dano, através da recuperação da integridade e função da pele. Para isso, é requerido dele um processo intrincado denominado cicatrização, onde dentro desse processo existem muitos mecanismos ainda desconhecidos (GURTNER *et al.*, 2008).

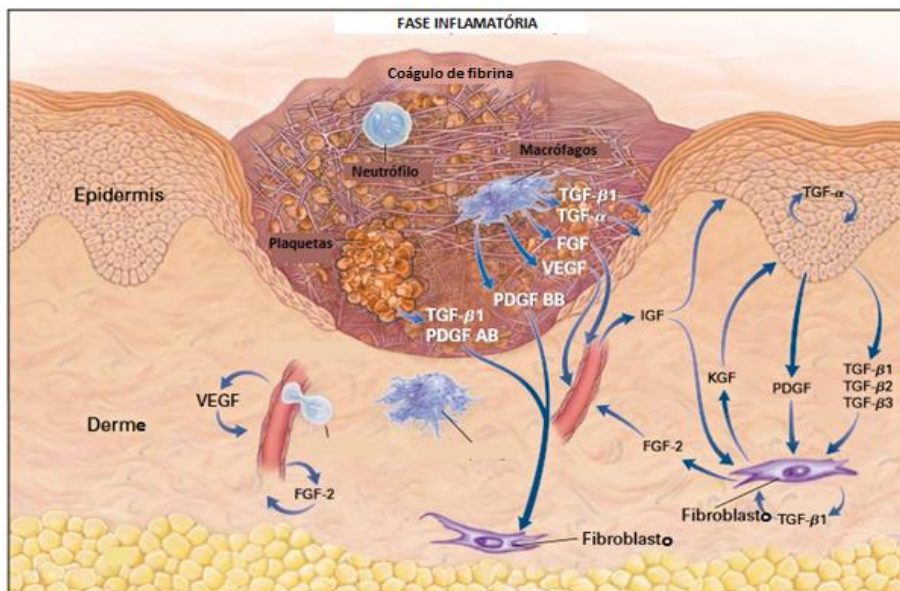
A cicatrização é um processo dinâmico e complexo, envolvendo interações entre a matriz extracelular, mecanismos celulares e moleculares. Desencadeia: proliferação celular, modelação do coágulo sanguíneo, deposição e remodelamento de matriz extracelular, migração e/ou diferenciação celular, formação de novos vasos sanguíneos, e apoptose celular na fase final em células que desempenharam o seu papel nas fases iniciais (DAUER *et al.*, 2005). Os eventos da cicatrização iniciam-se imediatamente após o dano, e são divididos em três

principais fases, sendo elas: inflamatória, proliferativa e de remodelamento (LI *et al.*, 2007).

### 1.1.5.1 Fase Inflamatória

A fase inflamatória ocorre imediatamente após o dano, com duração de aproximadamente 24 a 48 h após a lesão. Inicia-se com o rompimento e/ou dano aos vasos sanguíneos, possibilitando uma passagem passiva de plasma, plaquetas e uma pequena quantidade de neutrófilos para o local da ferida. Com o extravasamento de constituintes sanguíneos, dá-se a formação do coágulo, também denominado matriz provisória. Este é constituído por uma malha de fibrina com ligações cruzadas, derivadas da trombina clivada pelo fibrinogênio; somado a uma pequena quantidade de fibronectina plasmática, vitronectina e trombospondina. Também fazem parte do coágulo: plaquetas, neutrófilos e bactérias. Esta matriz provisória (fig.3) inicial facilita a migração celular nas fases posteriores do processo cicatricial (GILLITZER; GOEBELER, 2001; GURTNER *et al.*, 2008; MARTIN, 1997).

Figura 3 - Fase inflamatória do processo de cicatrização



Fonte: Singer; Clark (1999).

Durante o extravasamento, as plaquetas entram em contato com o colágeno exposto e outros elementos da matriz extracelular, liberando fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF); fator de crescimento transformante beta

(TGF- $\beta$ ); peptídeo ativador do tecido conjuntivo III (CTAP-III), que se converte em peptídeo ativador de neutrófilos-2 (NAP-2; CXCL7) pelos neutrófilos ligados ao trombo (DIEGELMANN; EVANS, 2004; GILLITZER; GOEBELER, 2001).

A primeira linha na quimiotaxia de neutrófilos é exercida através de baixas concentrações de NAP-2 (CXCL7), atuando no receptor-2 de quimiocina CXC (CXCR2), que associado com o oncogene-alfa relacionado ao crescimento (GRO- $\alpha$ ; CXCL1) liberados por células endoteliais e pericitos. A proteína epitelial ativadora de neutrófilo - ENA-78 (CXCL5) intensifica o processo de diapedese neutrofílica, e posteriormente de células mononucleares para a matriz provisória da ferida, agindo também no receptor CXCR2. Já a interleucina oito (IL-8) se liga ao receptor CXCR1 nos neutrófilos, induzindo a migração dentro da lesão, fazendo com que os neutrófilos migrem para regiões mais profundas da ferida. Com relação aos produtos bacterianos como lipopolissacárideos (LPS), N-formil metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e N-acetilmuramil-L-alanil-disoglutamina (MDP), eles aceleram a locomoção de neutrófilos. O recrutamento de neutrófilos e de monócitos é reforçado pelo C5a, produzido através das vias clássica e alternativa da cascata do complemento (GILLITZER; GOEBELER, 2001).

Em resumo, a migração de neutrófilos é determinada pelos receptores de CXC: CXCR1 e CXCR2. Onde CXCR1 é estimulado por IL-8 e altas concentrações de NAP-2 (CXCL7). E o NAP-2 (CXCL7), em baixas concentrações se liga ao receptor CXCR2, onde esta interação pode ser particularmente importante em vasos sanguíneos obstruídos, que são observados, principalmente, nas fases iniciais da úlcera por pressão (EDSBERG, 2007; GILLITZER; GOEBELER, 2001).

Em relação à diapedese neutrofílica, as moléculas de adesão, P-selectina e E-selectinas endoteliais, bem como as moléculas de adesão intercelular, ICAM-1 e ICAM-2, são cruciais na diapedese. Elas 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, fazendo com que os neutrófilos migrem para o leito da ferida (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007).

Até 24h os neutrófilos representam aproximadamente 50% de todas as células do leito da ferida. Tem como função principal a destruição de microrganismo e o debridamento do tecido desvitalizado. Para executar estas tarefas, os neutrófilos liberam uma grande variedade de substâncias antimicrobianas altamente ativas como, as espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*), peptídeos

catiônicos, eicosanóides e proteases, elastase neutrofílica (NE), mieloperoxidase, catepsina G, proteinase 3 (PR3), ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA). Eles também produzem uma série de citocinas, incluindo as IL-1, IL-8, GM-CSF, TNF- $\alpha$  e IL-1Ra. Onde as citocinas IL-1 e TNF- $\alpha$  induzem NF- $\kappa$ B, e fatores de crescimento como o TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (fig.3), que amplificamos sinais proliferativos da ferida. Produzidos inicialmente pelos neutrófilos e plaquetas, ativam os fibroblastos e queratinócitos locais. Além disso, as citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , além de induzir liberação de IL-8, também podem suprimir a expressão CXCR2 em neutrófilos, controlando assim o grau de infiltrado neutrofílico no leito da ferida (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; GILLITZER; GOEBELER, 2001; HENG, 2011; MCCOLL *et al.*, 1992).

Os neutrófilos também podem até mesmo liberar "armadilhas extracelulares neutrofílicas" (NETs - *neutrophilic extracellular traps*), que são estruturas compostas de histonas e DNA. Estas estruturas são liberadas pelos neutrófilos ao morrerem, como última tática para aprisionar e neutralizar as bactérias quando em grande quantidade. Possibilitando a morte destes microrganismos invasores por outros leucócitos (BRINKMANN *et al.*, 2004; MENEGAZZI; DECLEVA; DRI, 2012). Após terem cumprido suas funções biológicas, os neutrófilos que já não são mais necessários, entram em apoptose (MENEGAZZI; DECLEVA; DRI, 2012).

Embora os neutrófilos proporcionem uma proteção contra infecção, em grande quantidade sua atuação é prejudicial à cicatrização. Um infiltrado neutrofílico intenso, libera grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), e enzimas proteolíticas, tais produtos estão associados a condições patológicas, como úlceras por pressão, que permanecem presas a um estado de inflamação crônica, não progredindo a reepitelização (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

Além do controlar a inflamação os neutrófilos têm outras funções regulatórias benéficas para a cicatrização de feridas. Onde através das citocinas, quimiocinas e enzimas, proporcionam a repartição de coágulos de fibrina e de degradação da matriz extracelular, promovem a angiogênese, migração e proliferação de queratinócitos e fibroblastos, adesão de queratinócitos na camada dérmica e indução de expressão de genes de anticorpos antimicrobianos nos queratinócitos. Porém essas funções citadas podem ser exercidas por outras células, e nesse caso os neutrófilos assumem um papel coadjuvante no processo de

cicatrização, quando não houver grande quantidade de micro-organismos infecciosos no leito da ferida (DIEGELMANN; EVANS, 2004; DOVI; HE; DIPIETRO, 2003; THEILGAARD-MÖNCH *et al.*, 2004).

Contudo atualmente, a visão sobre a função dos neutrófilos tem mudado, e estes, têm emergido como um importante componente na regulação da resposta imune inata e adaptativa. Em contraste com a visão tradicional de células efetoras de curta duração, atualmente as evidências indicam que semelhante aos macrófagos, os neutrófilos também podem se diferenciar em dois fenótipos, os neutrófilos tipo N1 e os tipo N2. O fenótipo N1 está associado com o aumento da atividade citotóxica, maior capacidade de gerar peróxido de hidrogênio, e expressão do fator de necrose tumoral (TNF), molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e, menor expressão de arginase. Com a polarização para o fenótipo N2 realizada, principalmente, pelo fator de crescimento TGF- $\beta$ , esses neutrófilos N2 são capazes de expressar níveis elevados de arginase, e assim como os macrófagos M2, também se tornam menos citotóxicos, liberando fatores de crescimento como o VEGF que promove a angiogênese (FRIDLENDER *et al.*, 2009; MANTOVANI *et al.*, 2011).

Os neutrófilos também estão envolvidos na resolução da fase inflamatória através de diferentes mecanismos, incluindo quimiocinas e/ou citocinas anti-inflamatórias e a formação de mediadores lipídicos (tais como lipoxinas, resolvinas e protectinas). Esses mediadores lipídicos diminuem a infiltração de neutrófilos e aumentam a captação de neutrófilos apoptóticos por macrófagos. Eles também amplificam a expressão do receptor CCR5 por neutrófilos apoptóticos, que, por sua vez, promove o sequestro de quimiocina CCL3 e CCL5 (MANTOVANI *et al.*, 2011). Tudo que se conhece sobre os fenótipos dos neutrófilos estão relacionados ao câncer, mas de acordo com Schäfer e Werner (2008) quase a totalidade dos mecanismos celulares e moleculares que são ativos no câncer também estão ativos na ferida.

Após 24 horas da lesão, os mastócitos são atraídos e acumulam-se na ferida. Por ação da quimiocina MCP-1, os mastócitos aumentam cinco vezes em número de células durante a cicatrização de feridas, esse aumento é resultado do recrutamento e não de proliferação (GILLITZER; GOEBELER, 2001).

Também exercem efeitos biológicos através da liberação de histamina, uma amina vasoativa, como também por liberação de interleucinas como IL-6, IL-8,

IL-4. A IL-4 liberada pelos mastócitos estimula a proliferação de fibroblastos, e liberação de fatores de crescimento, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O VEGF por sua vez estimula a expressão de metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9). Também níveis elevados de IL-4 podem regular negativamente a expressão das quimiocinas, MCP-1 e IL-8, limitando a reação inflamatória (NG, 2010; OSKERITZIAN, 2012; GILLITZER; GOEBELER, 2001).

Outras funções dos mastócitos são: proporcionar aumento da permeabilidade vascular através da ativação de receptor tipo 2 ativado por protease (PAR2) por serina endopeptidase, quimase e triptase; aminas como a histamina; e cininas que são libertadas nos estágios iniciais de inflamação. A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular facilitam a diapedese de neutrófilos e o acúmulo de outros mediadores inflamatórios no tecido lesionado (NG, 2010).

Com relação aos monócitos, estes são atraídos pelas quimiocinas RANTES (CCL5), MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4), I-309 (CCL1), MCP-1 (CCL2), MCP-3 (CCL7), fibronectina, elastina, C5a, C3a, fator de crescimento neural (NGF) e componentes da matriz extracelular (GILLITZER; GOEBELER, 2001; GURTNER *et al.*, 2008; MAHDAVIAN *et al.*, 2011; SAITO *et al.*, 2008). Além das quimiocinas, os fatores de crescimento PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas) e o TGF- $\beta$  também atraem os macrófagos (fig.3) (SINGER; CLARK, 1999), as principais fontes destas quimiocinas e fatores de crescimento são as plaquetas no coágulo, os queratinócitos da borda da ferida, células endoteliais e os leucócitos presentes na ferida (GILLITZER; GOEBELER, 2001; EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007). Dentre todas as quimiocinas, a MCP-1 tem um papel principal na quimiotaxia dos monócitos, sendo produzida, principalmente, pelos queratinócitos adjacentes. A produção e liberação de MCP-1 tem pico concomitante com o infiltrado de macrófagos no 2º dia após a lesão, confirmando sua importância na quimiotaxia (MAHDAVIAN *et al.*, 2011).

Uma vez recrutados os monócitos, após a diapedese, modificam-se em macrófagos, inicialmente em um fenótipo inflamatório e debridante M1 (ativação clássica). A ativação clássica é estimulada por produtos provenientes de bactérias como lipopolissacarídeo (LPS), além de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  (interferon gama) e TNF- $\alpha$ . Este fenótipo clássico está presente, predominantemente, na fase inflamatória da cicatrização, sua função é, basicamente, antimicrobiana e debridante. Os macrófagos tipo M1 liberam enzimas

proteolíticas que degradam a matriz extracelular, facilitando a migração no tecido lesionado. Os mediadores inflamatórios induzem a liberação de TNF- $\alpha$ , óxido nítrico (NO), enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). As interleucinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 e IL-12 liberadas pelos macrófagos, estimulam os neutrófilos a entrarem em apoptose. E quando os macrófagos fagocitam esses neutrófilos, sua polarização se modifica para M2, que é ativação alternativa (LASKIN *et al.*, 2011; MAHDAVIAN *et al.*, 2011; KOH; DIPIETRO, 2011; ENFIELD; LEIBOVICH, 2011; STOUT, 2010).

As principais funções dos macrófagos na ferida são como célula apresentadora de antígenos, fagocitose e fonte importante de citocinas e fatores de crescimento, produzindo inflamação e reparo tecidual (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; GILLITZER; GOEBELER, 2001).

Outro estímulo para a migração de macrófagos é a trombina. A trombina induz a vasodilatação responsável por extravasamento plasmático e edema; aumenta a expressão de moléculas de adesão endotelial; além de estimular a liberação de citocinas pro-inflamatórias, como CCL2 (MCP-1), IL-6 e IL-8 por células endoteliais. As citocinas por sua vez induzem a quimiotaxia de monócitos, intensificando a liberação de citocinas inflamatórias por monócitos do sangue periférico, como IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1 e TNF- $\alpha$ . E as citocinas pró-inflamatórias induzem a diferenciação de monócitos em macrófagos M1 (MILLS *et al.*, 2000; MAHDAVIAN *et al.*, 2011; ENFIELD; LEIBOVICH, 2011).

Posteriormente, quando os macrófagos fagocitam os neutrófilos, e também por influência de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4, IL-10 e IL-13, os macrófagos mudam sua polarização de M1 para macrófagos reparadores tipo M2. Com a mudança do fenótipo para M2, inicia-se a resolução da inflamação, através da diminuição da expressão de IL-12 e TNF- $\alpha$ , assim como aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, e fatores de crescimento como TGF- $\beta$  e VEGF, promovendo a formação de tecido de granulação e angiogênese (MAHDAVIAN *et al.*, 2011; ENFIELD; LEIBOVICH, 2011).

Além das citocinas anti-inflamatórias, a mudança de fenótipo para macrófagos M2, também são estimulados por lipídios bioativos como 15d-PGJ2, lipoxinas, resolvina, fatores de crescimento como TGF- $\beta$  e VEGF, assim como ativação de receptores de adenosina A<sub>2A</sub> e TLR (receptores do tipo Toll) (KOH; DIPIETRO, 2011; RAMANATHAN *et al.*, 2009; MACEDO *et al.*, 2007).

A diversidade de funções exercida pela ativação alternativa faz com que sejam classificados em subgrupos denominados: M2a, ativados por citocinas IL-4 e IL-13; M2b ativados por complexos imune em combinação com IL-1 $\beta$  ou LPS; M2c ativados por IL-10, TGF- $\beta$  ou glicocorticóides; e M2d ativado por agonista TRL associado com adenosina, e último subgrupo é especialmente importante na cicatrização (LASKIN *et al.*, 2011; ENFIELD; LEIBOVICH, 2011).

As atividades dos macrófagos M1 são equilibradas com a dos M2. Primeiramente, a fase inflamatória de fagocitose e debridamento e posteriormente com a fase reparadora. O equilíbrio entre os fenótipos é que mantém o processo cicatricial de forma fisiológica, com cada fenótipo agindo na fase adequada da cicatrização (LASKIN *et al.*, 2011).

A permanência predominante de macrófagos M1, além da primeira fase de inflamação, está implicada na lesão tecidual crônica. Os macrófagos M1 liberam grande quantidade de enzimas proteolíticas, mediadores lipídicos como prostaglandinas e leucotrienos, assim como citocinas pró-inflamatórias, ROS e RNS. Os radicais livres geram lesão tecidual através de danos em lipídios, proteínas e DNA, levando a necrose e apoptose. Além disso, o estresse oxidativo induz a transcrição de NF- $\kappa$ B (fator nuclear Kappa B) e de AP-1 (proteína adaptadora), que amplificam a resposta inflamatória e o dano tecidual (LASKIN *et al.*, 2011).

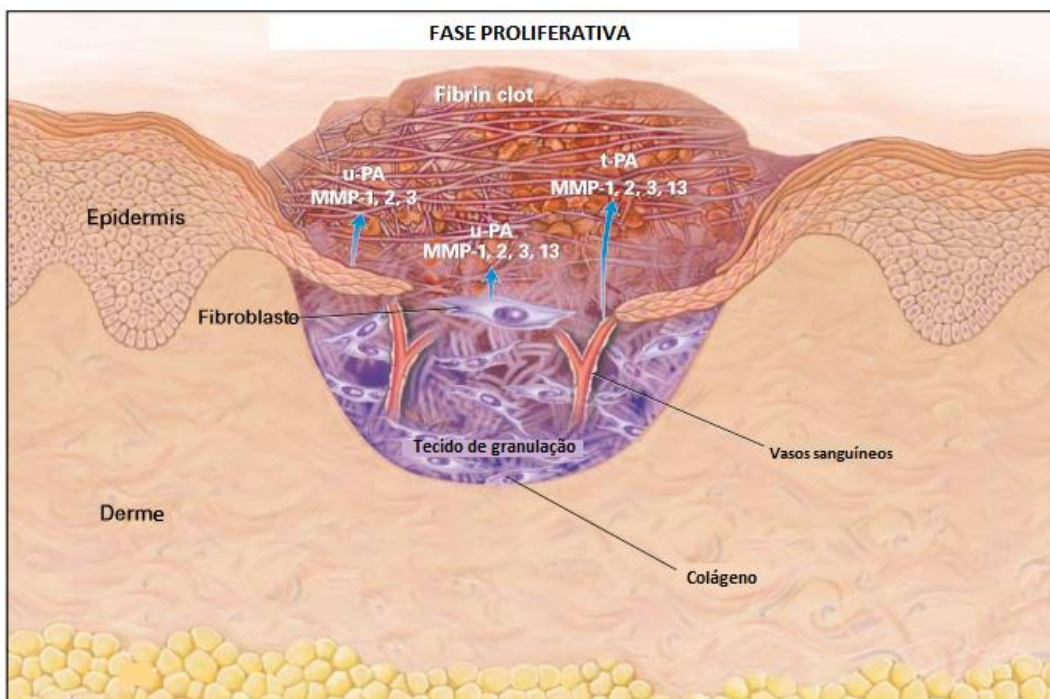
A quantidade de macrófagos aumenta durante a fase de inflamação, com pico durante a fase de formação de tecido de granulação e declina na fase de remodelamento (MARTIN; LEIBOVICH, 2005). Entre 48 e 72 h após a lesão, os macrófagos começam a dominar a população de células no local da lesão. Estas células são, predominantemente, de um fenótipo pró-inflamatório (M1) e secretam citocinas e quimiocinas que promovem o recrutamento adicional de leucócitos para o local da lesão. Quando os macrófagos removem os neutrófilos apoptóticos, através de fagocitose, isto pode conduzir a uma mudança em direção a um fenótipo de macrófagos reparadores (M2). Nesse momento ocorre a resolução da fase inflamatória da cicatrização de feridas, iniciando assim, a fase proliferativa (BROWN *et al.*, 2012).

### 1.1.5.2 Fase proliferativa

A fase proliferativa ocorre de 2 a 10 dias após a lesão (GURTNER *et al.*, 2008). Os principais eventos na fase proliferativa são: a criação de uma barreira de permeabilidade, reepitelização; o fornecimento adequado de sangue por formação de novos vasos, angiogênese; e aumento no número de fibroblastos, fibroplasia, para reforçar o tecido dérmico lesado através de síntese de colágeno, colagênese; e a aproximação das extremidades da ferida realizada por ação dos miofibroblastos, contração da ferida (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; WITTE; BARBUL, 1997).

A reepitelização inicia-se horas após o dano, onde em 12 horas ocorre uma série de eventos com o queratinócito como: o achatamento e alongamento, desenvolvimento de projeções semelhantes à pseudópode denominadas lamelipódios, perda das interações célula-célula e célula-matriz extracelular, a retração dos tonofilamentos intracelulares, e a formação de filamentos de actina na borda do citoplasma. Em 24h os queratinócitos respondem a um defeito da epiderme, migrando a partir dos bordos livres da ferida, as células tronco presente nos folículos pilosos também auxiliam no processo de reepitelização (RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; SINGER; CLARK, 1999).

Figura 4 - Fase proliferativa do processo de cicatrização



Fonte: Singer; Clark (1999).

A proliferação de queratinócitos ocorre provavelmente devido a perda do contato entre as células, formando uma camada de células estratificada que migra em direção ao centro da ferida. (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Durante a cicatrização os queratinócitos das bordas da ferida sofrem alterações fenotípicas marcantes como: dissolução dos desmossomas intercelulares; expressão de integrinas, principalmente, receptor de fibronectina  $\alpha 5\beta 1$ , receptores de fibronectina/tenascina  $\alpha v\beta 6$ , receptores de vitronectina  $\alpha v\beta 5$ , e receptores de colágeno  $\alpha 2\beta 1$ ; contração dos filamentos de actinmiosina intracelular promovendo migração, sob o coágulo da ferida e na derme subjacente (SINGER; CLARK, 1999; MARTIN, 1997).

A dissolução das ligações hemidesmossoma entre a epiderme e a membrana basal, possibilita o movimento lateral das células epidérmicas. Também durante a migração, os queratinócitos produzem MMP-9 para degradar o colágeno tipo IV e lamininas na membrana basal, permitindo sua locomoção para a ferida. No leito da ferida os queratinócitos que entram em contato com o colágeno, por ação dos receptores de integrina são estimulados a liberar MMP-1, que age degradando o colágeno fibrilar tipo I, assim como também pode degradar o tipo II e III (fig.4). Com a dissecação da úlcera, os queratinócitos separando a crosta desidratado a partir do tecido viável, facilitando a interação dos receptores de integrina de superfície expressos e a matriz provisória, que guia a direção de migração dessas células no leito da ferida, (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; VAALAMO et al., 1997; MARTIN, 1997).

Um a dois dias após a lesão, células epidérmicas na margem da ferida começam a proliferar ativamente atrás das células que migram (SINGER; CLARK, 1999)

A formação da zona da membrana basal intacta entre a epiderme e a derme é de fundamental importância para a integridade da pele e desempenho de suas funções. Essa zona é uma estrutura de aderência, que, na parte superior, liga-se aos queratinócitos basais através de um complexo de filamentos de ancoragem hemidesmossoma e na porção inferior adere à derme subjacente por meio de fibrilas de ancoragem. Essa zona é formada entre 7 e 9 dias após a reepitelização. A importância da zona da membrana basal é evidenciada por um grupo de doenças envolvendo mutações de genes responsáveis pela arquitetura da pele como é o caso de doenças como epidermólise bolhosa e o pênfigo (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Uma vez que a superfície da ferida foi recoberta por uma camada de queratinócitos, a migração epidérmica para de ocorrer e uma nova epiderme estratificada com lâmina basal subjacente é restabelecida a partir da margem da ferida. Células suprabasais cessam de expressar integrinas, passando a realizar a diferenciação normal de células da epiderme intacta. Esse sinal de "parar" nos queratinócitos é, provavelmente, por inibição devido ao contato mecânico entre as células. Os queratinócitos deixam de produzir MMPs e novas adesões do hemidesmossoma para a lâmina basal são restabelecidas (MARTIN, 1997).

Todo o processo de reepitelização é influenciado fortemente por fatores de crescimento como o EGF (Fator de Crescimento Epidérmico), TGF- $\alpha$  e KGF (fator de crescimento de queratinócitos), além do HB-EGF (fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina), TGF- $\beta$ 1, FGF-2, PDGF. Além disso, TGF- $\beta$ 1 e citocinas pró-inflamatórias, como: IL-1, IL-6 e o TNF- $\alpha$ , parecem estimular a expressão de algumas das subunidades de integrinas de forma a facilitar a migração de queratinócitos para recobrir a ferida (BARRIENTOS *et al.*, 2008; MARTIN, 1997).

A angiogênese inicia-se de 1 a 2 dias após o dano tecidual e torna-se bem evidente após o 4º dia da lesão. Inicialmente a partir de 1 a 2 dias após o dano tecidual, brotos angiogênicos de capilares sanguíneos da borda da ferida invadem a matriz provisória e, através da migração celular, formam os novos vasos. (TELLER; WHITE, 2009; TONNESEN; FENG; CLARK, 2000).

Essa nova vascularização se torna bem evidente no quarto dia e, juntamente com os fibroblastos e os macrófagos presentes na matriz provisória, formam o tecido de granulação. O nome granulação se dá pelo aspecto granular do tecido quando cortado e visualizado a olho nu. Tem como principal característica elevada quantidade de componentes celulares (REINKE; SORG, 2012; TONNESEN; FENG; CLARK, 2000).

Os macrófagos são uma fonte contínua de citoquinas necessárias para estimular a fibroplasia e angiogênese. Onde os fibroblastos sintetizam uma nova matriz extracelular, necessária para suportar o crescimento interno das células. A angiogênese refere-se a formação de novos os vasos sanguíneos, que são responsáveis pelo transporte de oxigênio e nutrientes necessários para sustentar o metabolismo celular (TONNESEN; FENG; CLARK, 2000).

Os eventos angiogênicos são comandados pelos fatores de crescimento; FGF, bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico, também denominado FGF2), VEGF, TGF- $\beta$ , angiopoietina, triptanos de mastócitos, assim como a matriz extracelular através de receptores de integrinas (TONNESEN; FENG; CLARK, 2000). Além dos fatores de crescimento, o óxido nítrico (NO) também participa da angiogênese através da inibição de trombospondina 1 (TSP1) via fosforilação da ERK por ação do GMPc (KOTTAKIS *et al.*, 2011; RIDNOUR *et al.*, 2005). Ademais o lactato aumentado, reduz o pH e a tensão de oxigênio, contribuindo para uma redução de NAD<sup>+</sup>, um inibidor da angiogênese (TELLER; WHITE, 2009).

Quando se inicia a deposição de colágeno pelos fibroblastos o número de vasos que haviam sido formados diminui, por ação apoptótica nas células endoteliais (TELLER; WHITE, 2009; TONNESEN; FENG; CLARK, 2000).

A síntese de colágeno pelos fibroblastos começa horas após a lesão, mas só se tornam significativas cerca de uma semana após o dano. Esta nova matriz é necessária para apoiar o crescimento interno das células do leito da ferida e influencia significativamente na resistência da cicatriz (MONACO; LAWRENCE, 2003; TELLER; WHITE, 2009; SINGER; CLARK, 1999).

Os fatores de crescimento PDGF e TGF- $\beta$ , em conjunto com as moléculas da matriz extracelular, estimulam os fibroblastos do tecido em torno da ferida a proliferar e expressar receptores de integrina para migrar em direção ao interior da ferida (SINGER; CLARK, 1999).

O TGF-  $\beta$  liberado/produzido pelas plaquetas, macrófagos e linfócitos T é o fator de crescimento principal para a colagênese. Age de três formas, favorecendo a deposição de colágeno: em primeiro lugar, aumenta a transcrição dos genes para o colágeno, proteoglicanos e fibronectina, aumentando assim a produção total de proteínas da matriz; diminui a secreção de proteases responsáveis pela degradação da matriz; e estimula inibidores teciduais de metaloproteases - 1 (TIMP-1) (DIEGELMANN; EVANS, 2004; PILCHER *et al.*, 1998).

Após migrar para dentro da ferida, os fibroblastos começam a secretar colágeno, fibronectina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e ácido hialurônico. Essa substituição a matriz provisória pela matriz extracelular ocorre em resposta ao TGF- $\beta$ 1. (SINGER; CLARK, 1999; REINKE; SORG, 2012).

A síntese de colágenos continua a uma taxa máxima durante 2 a 4 semanas, e em seguida começa a diminuir. O colágeno constitui mais de 50% da

proteína em tecido cicatricial, e a sua produção é essencial para o processo de cura. Na cicatrização o colágeno tipo III é predominante, diferente da pele normal que tem de 10 a 20% de colágeno tipo III e o colágeno do tipo I em torno de 80% a 90% (MONACO; LAWRENCE, 2003; TELLER; WHITE, 2009).

Quando a cicatriz ocorre de forma fisiológica, o colágeno fornece integridade, força e estrutura. Mas se muito colágeno é depositado no local da ferida, a estrutura anatômica normal é perdida, a função é comprometida, formando fibrose. Inversamente, se uma quantidade insuficiente de colágeno é depositado, a resistência da ferida torna-se baixa e pode entreabrir-se (DIEGELMANN; EVANS, 2004; SINGER; CLARK, 1999).

Uma vez que a matriz colagênica foi depositada na ferida, os fibroblastos cessam suas atividades sintetizadoras e se diferenciam em miofibroblastos para realizar a contração da ferida. Por fim entram em apoptose por um mecanismo ainda desconhecido (SINGER; CLARK, 1999; REINKE; SORG, 2012).

O trabalho de reepitelização é facilitado pela contração que diminui o tamanho da lesão por aproximar os bordos da ferida, representa 40% da redução do tamanho da ferida (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; MARTIN, 1997).

Ocorre devido à interação dos miofibroblastos com a matriz de colágeno através de receptores de integrina, interagindo com a fibronectina e as ligações cruzadas entre os feixes de colágeno (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; MARTIN, 1997; SINGER; CLARK, 1999).

O pico de contração ocorre duas semanas após a lesão e todo o processo é realizado através da estimulação dos miofibroblastos por fatores de crescimento como: TGF- $\beta$ 1 ou TGF- $\beta$ 2 e PGDF (SINGER; CLARK, 1999; MONTESANO; ORCI, 1988). Outros mediadores também contribuem para a contração do miofibroblastos como: 5-hidroxitriptamina, angiotensina, vasopressina, bradicinina, epinefrina e norepinefrina (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Após exercer a atividade de contração da ferida os miofibroblastos entram em apoptose por um mecanismo ainda desconhecido (REINKE; SORG, 2012).

#### *1.1.5.3 Fase de remodelamento*

Durante as fases iniciais de cicatrização o colágeno do tipo III é sintetizado pelos fibroblastos nos tecidos de granulação. Essa síntese é iniciada em

pequenas quantidades a partir de 48 a 72 horas, aumentando entre 5 e 7 dias, e atinge seu pico máximo de produção entre 2 e 3 semanas após a lesão (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

O tecido restante é então composto principalmente de proteínas da matriz extracelular, essencialmente, o colágeno do tipo III, esta matriz formada será remodelada pela metaloproteína produzida pelas células epidérmicas, células endoteliais, fibroblastos e os macrófagos remanescentes na cicatriz. O colágeno tipo III será substituído por colágeno do tipo I na matriz extracelular cicatricial (TELLER; WHITE, 2009; MONACO; LAWRENCE, 2003; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; SINGER; CLARK, 1999).

Na fase de remodelamento ocorre a apoptose dos fibroblastos e miofibroblastos, células endoteliais e macrófagos (RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010). É o evento mais longo da cicatrização, iniciando cerca de uma semana após a lesão, predomina por volta do 21º dia após a lesão e se estende por 12 ou 18 meses (REINKE; SORG, 2012; MONACO; LAWRENCE, 2003; TELLER; WHITE, 2009). Durante este período de tempo, a matriz de colágeno é submetida continuamente à reabsorção e deposição para remodelar e fortalecer a ferida. O tecido de granulação rico em colágeno tipo III é substituído por uma cicatriz contendo predominantemente colágeno tipo I (RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010; LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Gradualmente o tecido vai voltando ao fenótipo anterior a lesão, com predominância de colágeno tipo I (TELLER; WHITE, 2009; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Após uma semana, a resistência da matriz é de 3% do tecido antes da lesão. Com três semanas, a resistência do tecido aumenta para 30%, no terceiro mês para 40%, até atingir um máximo de 70% a 80% da sua resistência original. A organização e a resistência do colágeno da cicatriz nunca mais atingirão as características anteriores à lesão (REINKE; SORG, 2012; TELLER; WHITE, 2009; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; SINGER; CLARK, 1999).

O conteúdo e a organização do tecido conjuntivo não lesado é composto por 80% a 90% de colágeno do tipo I e de 10% a 20% de colágeno do tipo III. Em contraste, a matriz de colágeno no início da cicatrização é de 30% de colágeno do tipo III, quanto maior for a proporção de colágeno tipo III mais fraca é a ferida. Além disso, as fibras no leito da ferida são mais glicosiladas e finas que o tecido intacto (TELLER; WHITE, 2009).

O processo de mudança do tecido inicia-se com endopeptidases que clivam e degradam as fibrilas de colágeno tipo III, ao mesmo tempo em que ocorre mais deposição de colágeno tipo I, que aumenta a espessura, a organização e a força tensil na cicatriz. A lisil-oxidase (LOX) promove a reticulação entre fibrilas. Desta forma, a proporção de colágeno tipo I e o tipo III vai se aproximando a do tecido conjuntivo anterior ao dano, bem como a quantidade de água e proteoglicanos vão diminuindo (REINKE; SORG, 2012; TELLER; WHITE, 2009).

O processo de conversão da derme é conseguido através de uma síntese altamente controlada de colágeno novo e lise do colágeno velho, principalmente efetuada pela ação de MMPs (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

As MMPs constituem uma família de pelo menos 25 enzimas, das quais 24 são encontradas em mamíferos. Elas estão incluídas na família de enzimas metzincina que é composta, além das matrixinas (MMPs), as serralisinas, astacinas, adamalisinas também conhecida como ADAM (um acrônimo de *a Disintegrin and Metalloproteinase Domain*) (GILL; PARKS, 2008; REINKE; SORG, 2012). São endopeptidases que utilizam íons de  $Zn^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$  em seu sítio ativo.

Além da MEC (matriz extracelular) as MMPs clivam uma vasta gama de substratos extracelulares bioativos, e regulam a atividade de tais proteínas. As funções estabelecidas para MMPs incluem a liberação de fatores de crescimento a partir da membrana celular ou MEC, clivagem dos receptores do fator de crescimento a partir da superfície da célula, o desprendimento de moléculas de adesão celular e ativação de outras MMPs (GILL; PARKS, 2008). Elas são produzidas e secretadas por macrófagos, células epidérmicas e células endoteliais, bem como fibroblastos. Cada célula produz proteinases diferentes com funções diferentes (REINKE; SORG, 2012; SINGER; CLARK, 1999).

A colagenase-1 (MMP-1), colagenase-2 (MMP-8) e colagenase 3 (MMP-13) são as enzimas encontradas apenas em mamíferos, com a capacidade para clivar a tripla hélice do colágeno fibrilar tipo I, II, III, V e XI. Embora todas as três colagenases tenham a capacidade de clivar colágeno fibrilar, elas também agem em outros componentes da matriz extracelular (AMĂLINEI; CĂRUNTU; BĂLAN, 2007; ARMSTRONG; JUDE, 2002).

MMP-1 (colagenase intersticial ou fibroblastos ou colagenase-1) é a principal colagenase, capaz de degradar colágenos fibrilares do tipo I, II, III. Mas parece ter atividade preferencial para o colágeno tipo III, degrada o colágeno de um

sítio específico do domínio N-terminal. MMP-1 é produzida por vários tipos de células, como: fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, hepatócitos, condrócitos e osteoblastos. Seu pico de produção é por volta do décimo dia pós-lesão (AMĂLINEI; CĂRUNTU; BĂLAN, 2007; ARMSTRONG; JUDE, 2002).

A MMP-8 (colagenase-2) degrada o colágeno tipo I, tipo II (o colágeno predominante da cartilagem), com afinidade maior para o colágeno tipo I. Degradam também proteínas como a serpinas, bradicinina, angiotensina I e substância P. MMP-8 é sintetizado por leucócitos polimorfonucleares (PMN), durante a sua maturação na medula óssea, em fase mielócito, armazenados nos grânulos intracelulares específicos, na forma de pró-MMP-8, e secretados em resposta a estímulos externos. Pro-MMP-8 é rapidamente liberado da desgranulação de PMN, através do mecanismo de interruptor de cisteína para induzir a forma ativa da enzima. Atinge seu pico máximo em 4 dias e persiste durante cerca de 1 semana. (AMĂLINEI; CĂRUNTU; BĂLAN, 2007; ARMSTRONG; JUDE, 2002).

MMP-13 (colagenase-3) cliva o colágeno do tipo II de forma mais eficaz do que os colágenos tipo I e III, com uma atividade mais forte do que MMP-1 e MMP-8 (AMĂLINEI; CĂRUNTU; BĂLAN, 2007).

Além de colágenos fibrilares e gelatina, a MMP-13 degrada também o colágeno tipo IV, IX, X e XIV, tenascina C, fibronectina, laminina, proteína do núcleo do agrecano, fibrilina-1 e inibidores de serina protease. MMP-13 latente é ativado por estromelisina-1 (MMP-3), estromelisina-2 (MMP-10), gelatinase A (MMP-2), MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), tripsina, plasmina. Sua atividade é inibida pelos inibidores tecidual de metaloproteinases, TIMP-1 e TIMP-3 (inibidores teciduais de metaloproteinases 1 e 3), e menos intensamente por TIMP-2 (AMĂLINEI; CĂRUNTU; BĂLAN, 2007).

Embora a MMP-1, MMP-8 e MMP-13 tenham diferentes afinidades para os tipos de colágeno I, II e III, as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) clivam outros tipos de colágeno (IV, V, VII e X), elastina e colágeno desnaturado (ARMSTRONG; JUDE, 2002).

Gelatinases MMP-2 e MMP-9 incorporam três módulos de fibronectina e colágeno tipo II. Possuem um domínio de ligação ao colágeno compacto e degradam colágeno tipo IV, V, VII, X, XI, XIV, gelatina, elastina, proteína núcleo do proteoglicano, proteína básica de mielina, fibronectina, fibrilina-1 e os precursores de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (AMĂLINEI; CĂRUNTU; BĂLAN, 2007).

MMP-2 é segregada por fibroblastos e a MMP-9, molecularmente maior, é produzida predominantemente pelos leucócitos e também por queratinócitos. MMP-2 e MMP-9 mantêm-se em níveis elevados mesmo após o fechamento da ferida, o que sugere que estas metaloproteinases de matriz provavelmente desempenham um papel importante na remodelação da matriz tecidual (ARMSTRONG; JUDE, 2002). MMP-2 (gelatinase A) cliva o colágeno tipo IV e algumas glicoproteínas da MEC não colagênica. TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  estimulam e IFN- $\gamma$  inibe a produção de MMP-2. A MMP-2 é expressa por vários tipos celulares, incluindo fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, condrócitos, osteoblastos e monócitos (AMĂLINEI; CĂRUNTU; BĂLAN, 2007).

MMP-9 (gelatinase-B) cliva telopeptídeo N-terminal de colágeno tipo I, em um meio ácido, com um papel na remodelação da MEC colagênica. A MMP-9 é produzida pelos macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, osteoclastos, queratinócitos e trofoblastos invasores (AMĂLINEI; CĂRUNTU; BĂLAN, 2007).

Estromelisin (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11 e MMP-12) desempenham um papel variado na degradação da matriz extracelular. Esta classe de metaloproteinases de matriz tem sido associada com a degradação do colágeno tipo IV, V, IX e X, elastina; fibronectina, proteoglicanos entre outros (ARMSTRONG; JUDE, 2002; AMĂLINEI; CĂRUNTU; BĂLAN, 2007).

A expressão das MMPs é rigorosamente controlada nos níveis de transcrição, secreção, ativação e inibição dessas enzimas, em que pro-enzimas e formas ativas de MMPs são controladas pela ligação estequiométrica de inibidores específicos, produzidos localmente no tecido (AMĂLINEI; CĂRUNTU; BĂLAN, 2007).

Entre os inibidores endógenos de MMPs estão os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs – *tissue inhibitors of metalloproteinases*), dos quais existem quatro membros da família, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Os TIMPs inibem as MMPs através da interação do domínio N-terminal da molécula de TIMP, coordenar o sítio catalítico  $Zn^{2+}$  e se ligando ao sítio ativo de uma forma semelhante a um substrato de MMP, neutralizando-o. Outras proteínas e mecanismos podem inibir a atividade da metaloproteinase, incluem  $\alpha$ 2-macroglobulina, um inibidor primário das metaloproteinases em fluidos corporais, tais como fluido sinovial, e RECK (proteína indutora de reversão rica em cisteína com domínios Kazal), a única proteína inibidora de MMP conhecida que é ligada à membrana. A modificação do

perfil de espécies reativas de oxigênio no meio também pode inibir a atividade das MMPs (GILL; PARKS, 2008).

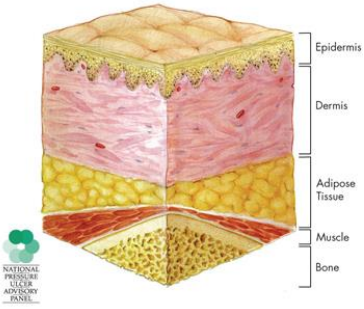
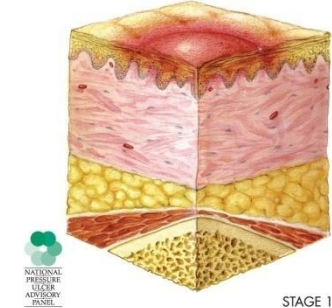
O equilíbrio entre as atividades das MMPs e dos inibidores de tecido de metaloproteinases são importantes para a fase de reparação e de remodelação da ferida. Esse equilíbrio é conseguido através de mediadores que comandam o processo, como: TGF- $\beta$ , PDGF, e IL-1 (REINKE; SORG, 2012; MONACO; LAWRENCE, 2003; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; SINGER; CLARK, 1999).

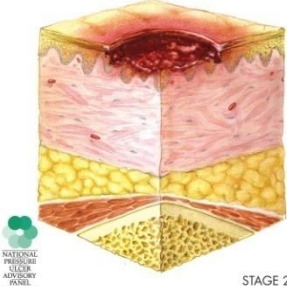
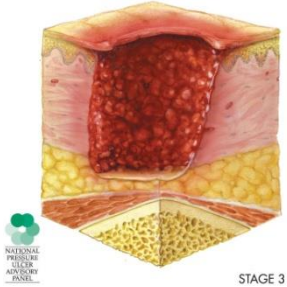
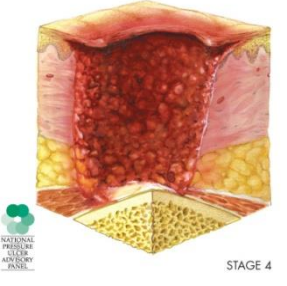
Além dos fatores oxidantes, o aumento de citocinas pró-inflamatórias e radicais livres de oxigênio podem diminuir a síntese das TIMPs e aumentar a produção de MMPs, fazendo que a ferida se cronifique (ARMSTRONG; JUDE, 2002)

### 1.1.6 Classificação da úlcera por pressão (estagiamento)

De acordo com estudos de revisão realizados por Stausberg e Kierfer (2009) existem 31 classificações diferentes para a UP. A mais utilizada atualmente é o NPUAP/EPUAP (2009). Com quatro estágios/categorias básicos e dois estágios adicionais aceitos somente pela NPUAP, essa classificação leva em conta o grau de comprometimento tecidual (Quad. 1 e 2).


Quadro 1 – Classificação da Úlcera por pressão aceitas pela NPUAP e EPUAP

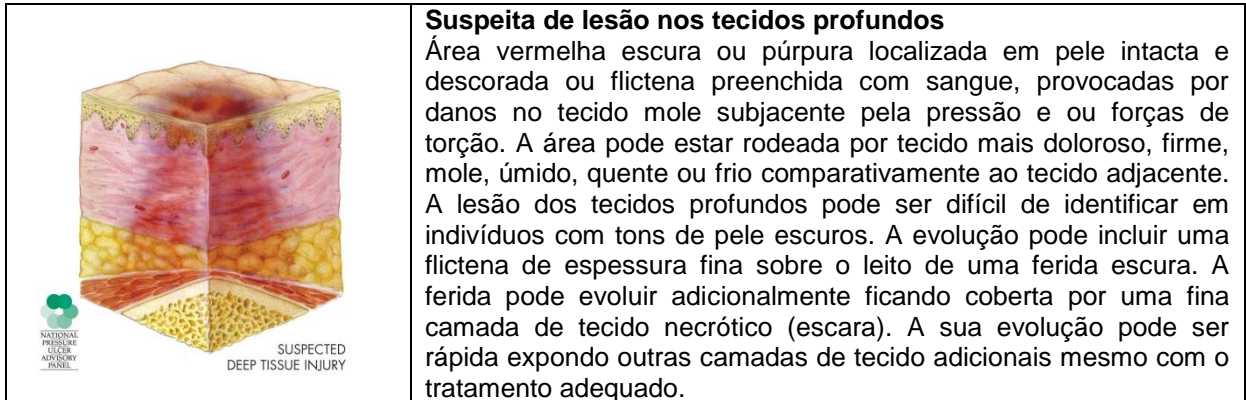
|   |   |
|---|---|
|  | <p><b>Pele sem lesão</b></p>  |
|  | <p><b>Estágio/Categoria I: Eritema não branqueável</b><br/>         Pele intacta com rubor não branqueável numa área localizada, normalmente sobre uma proeminência óssea. Em pele de pigmentação escura pode não ser visível o branqueamento; a sua cor pode ser diferente da pele em redor. A área pode estar dolorosa, dura, mole, mais quente ou mais fria comparativamente ao tecido adjacente. O estágio I pode ser difícil de identificar em indivíduos com tons de pele escuros. Pode ser indicativo de pessoas “em risco”.</p> |

|  |   |
|--|---|
|  <p>NATIONAL PRESSURE ULCER ADVISORY PANEL</p> <p>STAGE 2</p>   | <p><b>Estágio/Categoria II: perda parcial da espessura da pele</b><br/> Perda parcial da espessura da derme, que se apresenta como uma ferida superficial (rasa) com leito vermelho – rosa sem esfacelo. Pode também apresentar-se como flictena fechada ou aberta, preenchida por líquido seroso ou sero-sanguinolento. Apresenta-se como uma úlcera brilhante ou seca, sem crosta ou equimose*. Esta categoria não deve ser usada para descrever fissuras da pele, queimaduras por abrasão, dermatite associada à incontinência, maceração ou escoriações.<br/> *Equimose é indicador de lesão profunda.</p>  |
|  <p>NATIONAL PRESSURE ULCER ADVISORY PANEL</p> <p>STAGE 3</p>   | <p><b>Estágio/Categoria III: Perda total da espessura da pele</b><br/> Perda total da espessura tecidual. Pode ser visível o tecido adiposo subcutâneo, mas não estão expostos os ossos, tendões ou músculos. Pode estar presente algum tecido desvitalizado (fibrina úmida), mas não oculta à profundidade dos tecidos lesados. Pode incluir lesão cavitária e encapsulamento. A profundidade de uma úlcera de categoria III varia com a localização anatômica. A asa do nariz, orelhas, região occipital e maléolos não têm tecido subcutâneo (adiposo) e uma úlcera de categoria III pode ser superficial. Em contrapartida, em zonas com tecido adiposo abundante podem desenvolver-se úlceras de pressão de categoria III extremamente profundas. O osso/tendão não são visíveis ou diretamente palpáveis.</p> |
|  <p>NATIONAL PRESSURE ULCER ADVISORY PANEL</p> <p>STAGE 4</p> | <p><b>Estágio/ Categoria IV: Perda total da espessura dos tecidos</b><br/> Perda total da espessura dos tecidos com exposição óssea, dos tendões ou músculos. Pode estar presente tecido desvitalizado (fibrina úmida) e ou tecido necrótico. Frequentemente são cavidadas e fistulizadas. A profundidade de uma úlcera de pressão de categoria IV varia com a localização anatômica. A asa do nariz, orelhas, região occipital e maléolos não têm tecido subcutâneo (adiposo) e estas úlceras podem ser superficiais. Uma úlcera de categoria IV pode atingir músculo e/ou estruturas de suporte (i.e. fáscia, tendão ou cápsula articular) tornando a osteomielite e a osteíte provável de acontecer. Existe osso/músculo exposto visível ou diretamente palpável.</p>  |

Fonte: European Pressure Ulcer Advisory Panel and National Pressure Ulcer Advisory Panel – EPUAP & NPUAP (2009).

## Quadro 2 – Estágios/Categorias adicionais, aceitas pela NPUAP

|  |  |
|--|--|
|  <p>NATIONAL PRESSURE ULCER ADVISORY PANEL</p> <p>UNSTAGEABLE</p> | <p><b>Inclassificáveis/Não estageáveis: Perda total da espessura da pele ou de tecidos – profundidade indeterminada</b><br/> Perda total da espessura dos tecidos, na qual a profundidade atual da úlcera está bloqueada pela presença de tecido necrótico (amarelo, acastanhado, cinzento, verde ou castanho) e/ou escara (tecido necrótico amarelo escuro, castanho ou preto) no leito da ferida. Até que seja removido tecido necrótico suficiente para expor a base da ferida, a verdadeira profundidade não pode ser determinada; é, no entanto uma úlcera de categoria III ou IV. Uma escara estável (seca, aderente, intacta e sem eritema ou flutuação) nos calcâneos, serve como penso biológico natural e não deve ser removida.</p> |
|--|--|



Fonte: European Pressure Ulcer Advisory Panel and National Pressure Ulcer Advisory Panel – EPUAP & NPUAP (2009).

### 1.1.7 Tratamento

O tratamento de úlcera por pressão é feito através da avaliação diária da pele, especialmente em locais susceptíveis ao desenvolvimento de uma nova lesão como a região isquiática, sacral, trocantérica, e áreas de calcâneo. Medição e documentação da evolução da ferida com periodicidade mínima de uma semana. Desbridamento de todo o tecido não viável, podendo ser: cirúrgico, autolítico, enzimático, mecânico ou larvas de moscas não contaminadas (BREM; LYDER, 2004; EPUAP/NPUAP, 2009).

É de grande importância para a cicatrização a preparação do leito de feridas de forma eficaz e segura, com estabelecimento de um ambiente úmido adequada e limpo livre de debris e infecção. Para esta finalidade existem no mercado vários produtos e curativos apropriados para cada caso e com várias finalidades. Suplementação nutricional para todos os pacientes desnutridos/subnutridos. Alívio de pressão e/ou dos outros fatores contribuintes para o desenvolvimento de UP, estes mesmo também não permitem um ambiente propício para que haja a cicatrização. Eliminar ou neutralizar toda forma de drenagem ou celulite. Além de terapias biológicas, para todos os pacientes com feridas que não se consolidam rapidamente após o tratamento inicial, tendo como exemplo deste tipo de terapia a PDGF-BB (Platelet-derived growth factor–BB), o GM-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos) e a matriz de regeneração dérmica, entre outros meios disponíveis (BREM; LYDER, 2004; ICHIOKA, 2008).

Com relação à diversidade de curativos existentes, eles foram categorizados por função e devido a muitos exercerem mais de uma função, eles foram agrupados com base no seu principal objetivo, onde temos os de absorção

de exsudato como asespumas, os de debridamento como colagenase, hidratante no caso dos hidrocolóides, antimicrobianos tendo como exemplo a prata e a iodopovidona, e outros que não se encaixam em nenhuma das classificações anteriores. Já as terapias adjuvantes foram definidas como as modalidades que não abordam diretamente os fatores adjacentes nem os principais do tratamento local, são exemplos deste tipo de tratamento a terapia de vácuo, a corrente elétrica, o laser, ultrassom, terapia eletromagnética e fototerapia com luz monocromática (REDDY *et al.*, 2008).

Entre outros tratamentos promissores em estudo podemos citar ácido hipocloroso a 0,01%, o raio UVC e a timosina  $\beta 4$  ( $T\beta 4$ ) isolada ou em associação a sulfadiazina de prata (CREW *et al.*, 2012; NUSSBAUM *et al.*, 2013; TREADWELL *et al.*, 2012; SUMAN *et al.*, 2012).

### **1.1.8 Avaliação das intervenções**

Existem vários instrumentos de avaliação e acompanhamento da cicatrização, entre os quais se citam: *Photographic Wound Assessment Tool* (PWAT) *Sessing Scale* (SS), *Sussman Wound Healing Tool* (SWHT), *Wound Healing Scale* (WHS), *Leg Ulcer Measurement Tool* (LUMT), *Barber Measuring Tool* (BMT), ASEPSIS, *Granulometer*, DESIGN, *Pressure Ulcer Scale for Healing* (PUSH) e *Pressure Sore Status Tool* (PSST), todos seguem um princípio comum que é gerar escores para itens relacionados as características da ferida em evolução a ser analisada (HOUGHTON *et al.*, 2000; PILLEN *et al.*, 2009).

O PUSH é o mais usado e em segundo lugar ficando o PSST, ambos são ideais para o acompanhamento clínico por serem específicos para UP, além de terem sido validados através de artigos publicados (EPUAP e NPUAP, 2009; PILLEN *et al.*, 2009).

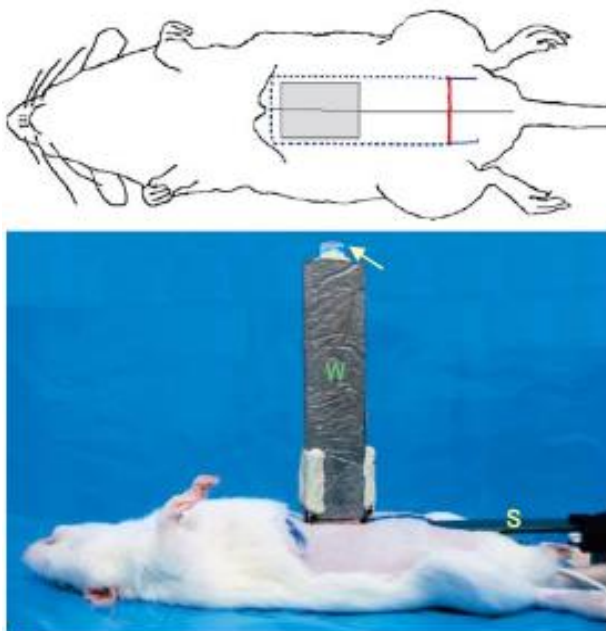
Porém nenhum deles ou qualquer outro instrumento de avaliação e acompanhamento são capazes de contemplar o detalhamento que a pesquisa experimental requer, dessa forma necessitando de um instrumento voltado a esse propósito, foi desenvolvida para este trabalho a EWAT (*Experimental Wound Assessment Tool – Instrumento de avaliação de ferida experimental*), com o objetivo de avaliar a cicatrização no modelo experimental proposto.

## 1.2 Modelos experimentais de úlcera por pressão

De acordo com Salcido, Popescu e Ahn (2007) existem vários modelos experimentais de úlcera por pressão utilizando animais como porco, coelho, rato e camundongos. A grande maioria dos estudos mais recentes envolve modelos que submetem o tecido a mais de um ciclo de isquemia e reperfusão e variam nos métodos de obtenção desses ciclos.

O modelo de pressão por peso usado por Hashimoto, Kurose e Kawamata (2008), em ratos wistar, consiste na utilização de lingotes de chumbo (25 mm de comprimento por 20 mm de largura e 60 ou 120 mm de altura, compreendendo a 50 e 100 mmHg de pressão, respectivamente) onde cada peso possui uma base plana e lisa e no topo um medidor de nível para indicar o plano horizontal. Nesse modelo é feito uma incisão cirúrgica na pele onde é inserida uma placa de aço esterilizada na cavidade peritoneal, com finalidade de contenção, mantendo a pressão somente na parede abdominal, protegendo as vísceras. Na incisão cirúrgica é colocada uma gaze embebida em solução salina, para proteção da área. Acima da placa subcutânea é colocado um peso com um apoio de quatro hastes nos quatro cantos para evitar sua queda, protegendo o animal. É feito um único ciclo de isquemia/reperfusão (fig.5).

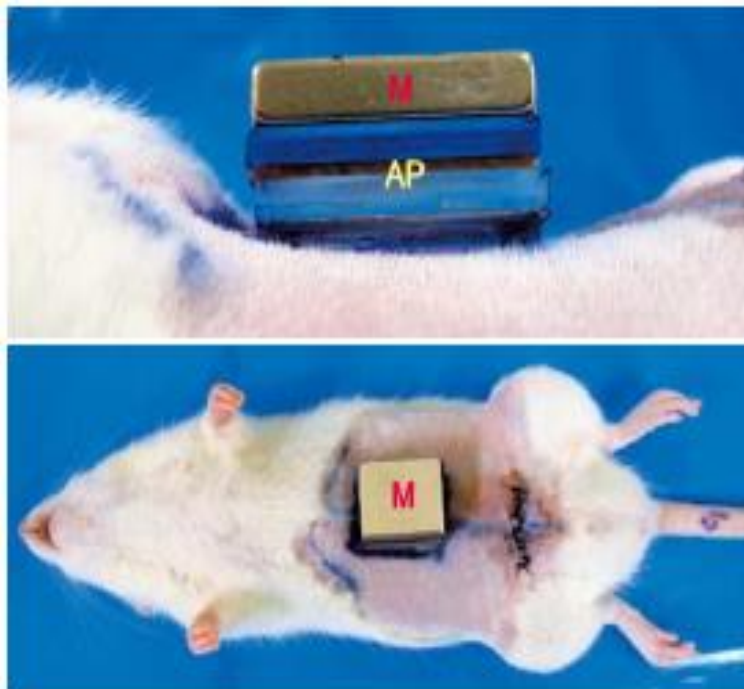
Figura 5 – Modelo de compressão com peso



Fonte: Hashimoto, Kurose e Kawamata (2008).

Outro modelo empregado também por Hashimoto, Kurose e Kawamata (2008) consiste na pressão magnética. Uma incisão transversal é feita na parte inferior do abdômen, onde é inserido um ímã de neodímio desinfetado nas medidas de 25x20x2 mm, com campo magnético de 2,000 Gauss, com cerca de 7,5g. Então outro ímã também de neodímio de 25 x 20 x 5 mm com campo magnético de 3,000 Gauss com cerca de 18,8g é colocado sobre a pele, de modo que os dois ímãs se atraiam. A parede abdominal do rato é comprimida por estes dois objetos. É feito um ciclo de isquemia/reperfusão utilizando três diferentes graus de pressão (fig.6).

Figura 6 – Modelo de pressão magnética

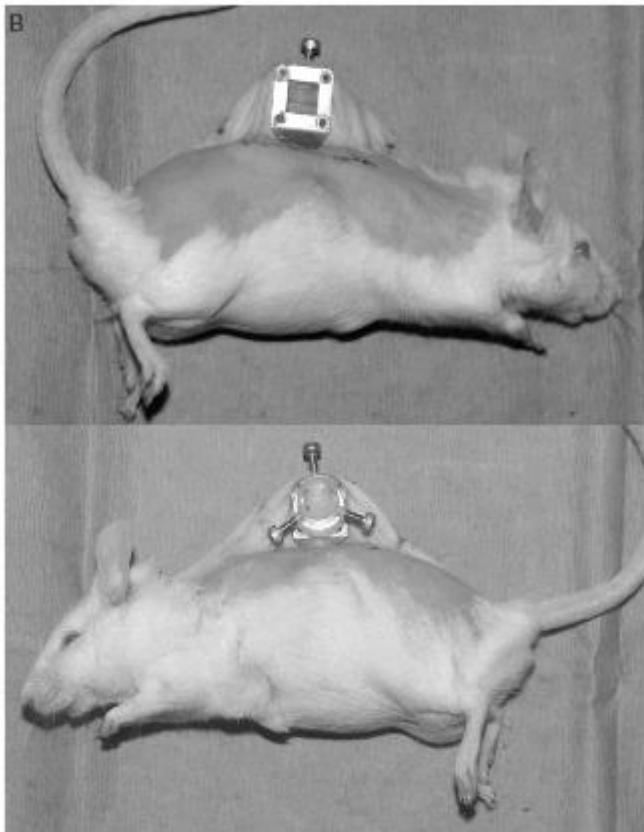


Fonte: Hashimoto, Kurose e Kawamata (2008).

Tsuji *et al.* (2005) desenvolveram o modelo utilizando uma câmara de compressão para visualizar em confocal a microcirculação da área da úlcera por pressão, além de permitir visualização também exercia pressão. A câmara constituída por um invólucro de plástico (diâmetro interno = 8,0 mm), uma ponta de pressão (diâmetro externo = 7,5 milímetros), e três parafusos de fixação para a parte anterior. A área de compressão da ponta é uma secção transversal circular de 2 mm de diâmetro. A câmara de dobras cutâneas é inserido, com o animal sob anestesia. A pele dorsal é puxada para cima e fixada de modo a formar uma dobra de pele. Uma área quadrada de uma camada de pele (cerca de 7 mm de um lado) é

removida, e a camada remanescente, coberta com uma tampa de vidro incorporada em um dos quadros da câmara. A duração total da compactação é de 8 horas, com pressão de 500 mmHg, com quatro ciclos de 2 horas de compressão e 1 hora de liberação em cada ciclo, com água, alimentação à vontade e movimentação livre (fig.7).

Figura 7 – Modelo de câmara de compressão



Fonte: Tsuji *et al.* (2005).

Dentre os modelos pesquisados e avaliados optamos por um que utiliza pressão exercida por dois ímãs externos. Nesse modelo com camundongos, Stadler *et al.* (2004) usa dois ímãs colocados na pele do dorso do animal, gerando uma pressão de 50mmHg, onde um único ciclo de isquemia/reperfusão (I/R) é constituído por um período de ímãs posicionados com duração de 12h seguido por uma liberação ou período de repouso de 12h, onde o ciclo completo totaliza 24h. Três ciclos de I/R são necessários para iniciar uma úlcera por pressão. Esse modelo permite uma maior sobrevivência do animal, pois não o submete a nenhum tipo de

intervenção cirúrgica, nem contenção, além de ser de mais fácil execução e permitir que os animais permaneçam livres para executarem suas atividades (fig.8).

Figura 8 – Modelo não invasivo de úlcera por pressão



(B)



Fonte: Stadler *et al.* (2004).

### **1.3 *Artemisia vulgaris***

#### **1.3.4 Características botânicas**

A *Artemisia vulgaris* L. ou simplesmente artemísia como é conhecida, é uma espécie botânico da família das Asteraceae, subfamília *Asteroideae* tribo

*Anthemideae*, é uma erva daninha perene que cresce selvagem e abundante em zonas temperadas e frias do mundo (HAYAT *et al.*, 2009; LEE, 1998).

Figura 9 – *Artemisia vulgaris*



Fonte: Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries (2009).

### **1.3.2 Etnofarmacologia**

O conhecimento popular no Ocidente atribui à planta propriedade anti-convulsivas, analgésica, antiespasmódica e anti-parasitária. Está indicada para dor reumática, dispepsia, astenia, epilepsia, distúrbios e cólicas menstruais, hepatite, febre, anemia. Seu uso externo está descrito no tratamento de úlceras por pressão por seu efeito cicatrizante (TERRA *et al.*, 2007).

Ela é usada para chá e pratos de arroz na Ásia e como uma erva culinária para aves e suínos em culturas ocidentais, mas também é usada como um recurso de medicina popular. Na medicina oriental, artemísia tem sido utilizada como um agente analgésico e em conjunto com a terapia de acupuntura (HAYAT *et al.*, 2009; LEE, 1998).

Na Medicina Tradicional Chinesa (MTC) é usada para o tratamento de úlcera gástrica, náuseas e diarreia, nas crises convulsivas e sangramentos nasais,

também como anti-hipertensivo e anti-inflamatório. Está indicada no tratamento da irregularidade menstrual, amenorreia e demais problemas menstruais, cólicas, indução do parto e aborto, gonorreia, leucorreia. O suco das folhas é utilizado topicamente como cicatrizante, enquanto a decocção das folhas e flores é considerada como expectorante, as folhas são consideradas carminativa e emenagoga, além de servir como substrato para confecção de bastão de moxa para moxabustão (ABAD *et al.*, 2012; KIM, 2008; CARDINI; WEIXIN, 1998).

### **1.3.3 Caracterização fitoquímica**

A artemísia é composta de 1,8-cineol,  $\alpha$ -tujona, cânfora e isoborneol, elemol, limoneno,  $\alpha$ -eudesmol e patulenol, lactonas, ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico e ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico,  $\alpha$ -felandreno,  $\Delta^3$ -careno, canfeno, trans-isoelemicina,  $\gamma$ -elemeno e liratol, flavanóides estrogênicos,  $\beta$ -cariofileno e  $\beta$ -cubebeno, ácidos eudesmano,  $\alpha$  e  $\beta$ -pinenos,  $\beta$ -tujona,  $\delta$ -limoneno, 1,8-cineol, linalol, citral, 8-metoxi-7,8 metilenodioxycumarina, monoterpénos, artemisil, poliacetilenos, fernenol,  $\alpha$ -amirina e seu acetato, óxido de cariofileno, ésteres de ácidos graxos contendo fitil, esqualeno, estigmasterol e sitosterol, sabineno, trans-carveol. (RAGASA *et al.*, 2008; MENESES *et al.*, 2009).

De acordo com Lee (1998) são identificados vinte flavonóides: tricina, jaceosidina, eupafolina, crisoeriol, diosmetina, homoeriodictiol, isoramnetina, apigenina, eriodictiol, luteolina, luteolina-7-glucosídeo, canferol-3-glucosídeo, kaempferol-7-glucosídeo, canferol-3-ramnosídeo, canferol-3-rutinosídeo, quercetina 3-glucosídeo, quercetina 3-galactosídeos, quercetrina, rutina e vitexina.

### **1.3.4 Propriedades farmacológicas**

Atualmente confirmaram-se alguns usos populares da Artemísia, como no tratamento de hepatite, dismenorréia, age em fungos e bactérias, repelente de insetos. Têm sido discutidos os efeitos notáveis como antioxidante, analgésico, hepatoprotetor, anti-hiperglicemiante, na fertilização, e efeito no sistema cardiovascular e imune (TERRA *et al.*, 2007).

Estudo realizado por Temraz e El-Tantawoy (2008) comprovam efeito antioxidante da Artemísia, *in vitro* através do teste DPPH, com resultado bem

semelhante ao padrão rotina, e in vivo que resultou num aumento significativo no nível de glutathione no sangue, da atividade da superóxido dismutase e teor de ácido ascórbico do soro quando comparados com os controles correspondentes. Os resultados obtidos no estudo indicaram que o extrato aquoso de *Artemisia vulgaris* é uma potencial fonte de antioxidantes naturais.

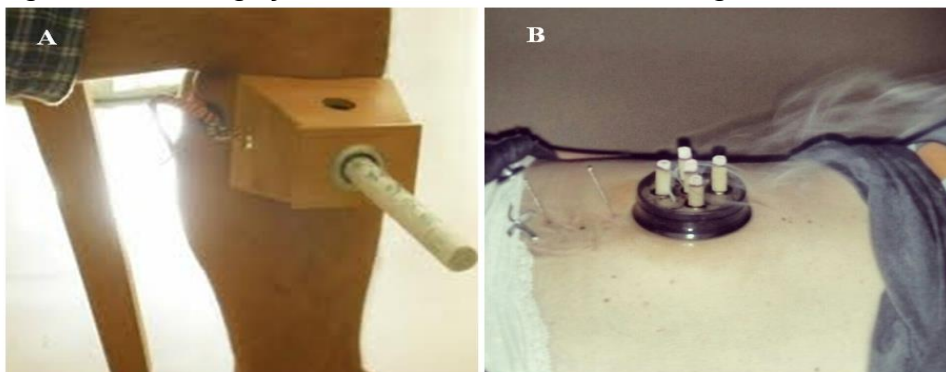
Dentre as propriedades exibidas pela artemisina, Krishna *et al.* (2008) destacam o tratamento da malária resistente, propriedades anti-cancerígenas, antiviral para hepatite B e C, assim como vírus da herpes, influenza A e HIV. Os mesmos autores citam que a artemisina é eficiente no tratamento de esquistossomose.

Efferth *et al.* (2008) conclui em seu trabalho que além do uso já documentado, tem atuação em células cancerosas, doenças virais como hepatite B e C, citomegalovírus, herpes simples tipo 1, Epstein – Bar, inibindo a replicação dos vírus e no caso do HIV-1 esta inibição foi somente parcial em duas cepas.

### 1.3.5 Fumaça de artemísia

A fumaça da Artemísia é utilizada na medicina tradicional chinesa no método de fumigação. De acordo com Auteroche e Auteroche (1996), é um método, dentre as várias técnicas da moxabustão existentes, e consiste em produzir vapores e/ou fumaça para aplicação terapêutica (fig. 10). Para a aplicação desta forma terapêutica é utilizada a moxa, que é feita a partir da parte aérea da planta *Artemisia vulgaris* (fig.9).

Figura 10 - Fumigação com moxa de *Artemisia vulgaris*



Fonte: Best Health Option (2013).

Legenda: Figura ilustrativa mostrando as formas de aplicação da fumaça de moxa de *Artemisia vulgaris*, (A) Aplicação de fumaça de moxa bastão e (B) aplicação de fumaça de moxa palito.

Existem quatro métodos de fumigação, dentre eles a fumigação com bastão de Artemísia, que consiste em cortar o bastão em aproximadamente uma polegada, fazendo um furo central de modo que o cilindro fique vazado. Acende-se uma extremidade e coloca a outra no ponto a ser tratado de modo que a fumaça desça pelo furo central impregnando o ponto (AUTEROCHE; AUTEROCHE, 1996).

De acordo com Wheeler, Coppock e Chen (2009) a fumaça da moxa se mostrou inofensiva no quesito de substâncias voláteis seguras para o ser humano, e concluem o estudo dizendo não haver preocupação decorrente do uso contínuo da moxa como uma modalidade terapêutica.

Os autores clássicos da MTC referem que o bastão de Artemísia contém princípios estimulantes, porém desconhecidos, que, quando projetado com os gases da combustão, penetram na pele (MORANT, 1990). Já Cao *et al.* (2008) referem que os óleos essenciais voláteis da moxa penetram facilmente na pele.

Existem poucos trabalhos na literatura demonstrando o efeito da fumaça de Artemísia e seu uso em geral, porém alguns trabalhos evidenciam a sua atividade anti-tumoral, anti-inflamatória e anti-microbiana, todos *in vitro*. Não até a data trabalhos evidenciando sua atividade anti-inflamatória e cicatrizante *in vivo*.

Sakagami *et al* (2005) descrevem propriedades antitumorais da fumaça de Artemísia. Esses autores demonstraram que a fumaça da moxa é ligeiramente mais citotóxica em linhagens de células tumorais humanas (carcinoma escamoso oral HSC-2, HSC-3, leucemia promielocítica HL-6) do que em células normais orais (fibroblasto gengival HGF, polpa de células HPC, fibroblasto de ligamento periodontal HPLF), induzindo a fragmentação internucleossômica do DNA, ativando as caspases 3, 8,9 e modificando a expressão de proteínas relacionadas a apoptose (Bcl-2, Bad, Bax) em células HL-60. Mostraram também que a fumaça da moxa gera radicais tipo semiquinonas em condições alcalinas e elimina O<sub>2</sub>(-), radical hidroxila, oxigênio simples e NO, porém não apresentou nenhuma atividade contra HIV.

Matsumoto *et al.* (2005) concluíram que a fumaça da moxa inibe a expressão de NOSi, além de ter atividade de eliminação de radicais livres, sugerindo uma possível ação anti-inflamatória.

Hitosugi *et al.* (2001) realizaram experimento tanto com o extrato aquoso da moxa quanto com a fumaça e concluíram que o extrato reduziu os efeitos letais da infecção por *E. coli* em ratos e possuem atividade sequestradora de radicais O<sub>2</sub>(-). Já a fumaça da moxa além da atividade sequestradora de radicais livre, induz

a citotoxicidade em promielócitos leucêmicos HL-60 por fragmentação do DNA internucleossômico, e atividade citotóxica contra células tumorais orais (HSC-2, HSG), sem atividade anti-HIV. Hitosugi *et al* (2002) verificaram que a fumaça de moxa induz a fragmentação internucleossômica do DNA de células promielocítica leucêmicas humana HL-60, através de atividade antioxidativa, que não foi verificada em outras linhagens de células.

Hatsukari *et al* (2002) mostraram que houve toxicidade em seis linhagens de células tumorais (duas do carcinoma epidermóide oral, uma de tumor de glândula salivar, um de melanoma e duas de leucemia) e não proporcionou efeito protetor contra a ação do vírus HIV.

Sarath *et al.* (2007) concluíram que tanto o extrato aquoso como o da fumaça da artemísia, usada na moxabustão, inibiram o crescimento de células de câncer de mama de maneira dose-dependente. A indução de apoptose foi associada com a ativação das caspases 3, 8 e 9, a despolarização do potencial de membrana mitocondrial e diminuição da expressão de BCL-2. Além disso, a fumaça da artemísia mostrou efeito sinérgico citotóxico com doxorrubicina.

Outros autores descrevem um efeito relaxante sobre o corpo. Zhao *et al.* (2011) revelaram que os voluntários saudáveis expostos à fumaça de moxa tiveram reduções na frequência cardíaca, e efeito calmante sobre o sistema nervoso central.

Estudo realizado por Braithwaite, Van Vuuren e Viljoen (2008) mostrou que o processo de combustão de algumas plantas, entre elas a *Artemisia afra*, produz atividade antimicrobiana eficiente, validando o uso desde método tradicional de tratamento entre os africanos.

### 1.3.6 Caracterização fitoquímica da fumaça de Artemísia

Em um trabalho de revisão Cili *et al* (2011) descrevem que a fumaça de moxa consiste principalmente de componentes voláteis do óleo da folha de artemísia e seus produtos oxidantes, bem como produtos de combustão de outros componentes. Estes compostos podem ser divididos em duas categorias: componentes voláteis, também conhecidos como componentes de fácil volatilização com um baixo ponto de ebulição; e os componentes com alto peso molecular, componentes de difícil volatilização e com um ponto de ebulição elevado.

Os componentes voláteis encontrados foram: 1,8-eucaliptol, absintol, borneol, terpineol, carveol, betacariofileno, germacreno, óxido de cariofileno, espatulenol, ácido hexadecanóico, fitol, limoneno e tujona. Foram encontradas também outras substâncias voláteis que não provém diretamente da Artemísia, mas que estão presentes na moxa: naftalina, água de amônia, butiramida, ácido acético, ciclo-hexeno, ácido tetrônico, 2-hexanol S, 3-metil-butilamida, hexil-amina, ácido propiônico, acetamida, brom-azetidina, metil-oxole e beta-lactam, ácido 4-metoxibenzeno fenole hexadecanóico. Com relação às substâncias pesadas foram encontrados: compostos de hidrocarbonetos, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; nitreto, como metilanilina, acetazolamida e acetofenona; e os óxidos, como fenol e xilenol. Também foram encontrados compostos da serralha (*Sonchus oleraceus*) óleo de alcatrão de árvores de folha larga, creosoto, carbolineum e mistura do óleo de bagaço de cipreste (CILI *et al.*, 2011).

Wheeler, Coppock e Chen (2009) num estudo de caracterização químicas de componentes potencialmente prejudiciais da fumaça de moxa, concluíram que as substâncias, possivelmente prejudiciais aos humanos, na fumaça de moxa de artemísia estão bem abaixo dos níveis aceitáveis pela OMS (Organização Mundial de Saúde), desta forma a não causar danos à saúde. Estão descritas as seguintes substâncias: alcatrão; monóxido de carbono; carbonilas: formaldeído, acetaldeído, acetona, acroleína, propionaldeído, crotonaldeído, metiletilcetona, butiraldeído; fenólicos: hidroquinona, resorcinol, catecol, fenol, mp-Cresol, o-Cresol; compostos voláteis: 1,3-butadieno, isopreno, acrilonitrila, benzeno, tolueno, estireno. Compostos semi-voláteis: piridina, quinolina; amônia; hidrocarbonetos aromáticos policíclicos: Benzo (a) antraceno, Benzo (a) pireno; cianeto de hidrogênio; aminas aromáticas: 1-naftilamina, 2-naftilamina, 3-aminobifenil, 4-Aminobifenil.

#### **1.4 Justificativa**

Mesmo com o desenvolvimento tecnológico atual, ainda não temos um meio seguro de prevenção e tratamento totalmente eficaz e de baixo custo para úlcera por pressão. É um problema que atinge principalmente idosos e pessoas com problemas de locomoção como acamadas ou cadeirantes. Gera transtornos para os pacientes e familiares, nas políticas públicas, além do mais grave que são os óbitos

decorrentes desta lesão (BOUTEN *et al.* 2003; BREM; LYDER, 2004; NIEDERHAUSER *et al.*, 2012).

O uso clínico da fumaça de *Artemísia vulgaris* para o tratamento de lesões na pele é comum em vários povos, tanto do Ocidente como do Oriente e está descrito na literatura. Entretanto uso em úlcera por pressão é pouco documentada (ABAD *et al.*, 2012; CILI *et al.*, 2011; CARDINI; WEIXIN, 1998). E nada ainda foi descrito em modelos experimentais de úlcera por pressão a respeito da sua atividade cicatrizante, bem como o seu efeito tóxico. Dessa forma, torna-se válido um estudo para avaliar o seu efeito cicatrizante em úlcera por pressão em modelo experimental, associando a verificação da sua toxicidade, no sentido de avaliar sua segurança para uso tópico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Investigar o perfil toxicológico e o efeito cicatrizante da aplicação tópica da fumaça de *Artemisia vulgaris L.* em modelo de úlcera por pressão em camundongos.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Realizar testes toxicológicos bioquímicos, hematológicos, histopatológicos e comportamentais da aplicação tópica da fumaça de *Artemisia vulgaris* em camundongos submetidos ao modelo de úlcera por pressão;
- b) Avaliar o efeito da aplicação tópica da fumaça de *Artemisia vulgaris* sobre a cicatrização de úlceras por pressão em camundongos:
  - Avaliar parâmetros macroscópicos de cicatrização por meio da escala EWAT (Experimental Wound Assessment Tool), tamanho da área da ferida e percentual de contração da área da úlcera;
  - Analisar a fibroplasia e parâmetros histopatológicos de infiltrado inflamatório, hemorragia, fibrose e reepitelização em cortes histológicos;
  - Investigar a colagênese, reepitelização e neoangiogênese em cortes histológicos;
  - Avaliar o potencial anti-oxidante;
  - Analisar a expressão de NOSi e nitrotirosina no leito da ferida.

### 3 MATERIAIS E MÉTODO

#### 3.1 Bastão de Artemísia

Foi usado um pequeno cilindro com lúmen interno, denominado moxa palito, feito de folhas secas de *Artemísia vulgaris L.*, que são trituradas e peneiradas e posteriormente prensadas para formar um cilindro de 25mm de comprimento por 7mm de diâmetro total e com um orifício central de 2mm de diâmetro (Dong Bang Acupuncture INC., Chungnam, Coréia do Sul) (fig. 11A).

Como anteparo foi utilizado uma base de sustentação para moxa palito com anel de borracha (Dong Bang Acupuncture INC., Chungnam, Coréia do Sul) (fig. 11B), que consiste em um anel de borracha de 30 mm de diâmetro, onde na parte superior contem uma placa metálica com diâmetro de 28 mm e um orifício central da placa com 7mm, a altura do anteparo é de 12mm, de modo a acomodar a moxa palito (fig. 11C).

Figura 11 - Moxa palito e base de sustentação



Fonte: IBVMedical (2013).

Legenda: Dimensões da base de sustentação para moxa palito (A), base de sustentação (B) e moxa montada em base de sustentação (C).

#### 3.2 Filme transparente de poliuretano

O filme transparente de poliuretano usado foi o Curativo Bioclusive<sup>®</sup> (Johnson&Johnson do Brasil, SP, Brasil) (Fig.12), que como todo filme de poliuretano transparente fino, permite a vaporização do exsudato para evitar a maceração do tecido epitelial nas bordas da ferida, mantendo um meio úmido ideal para a cicatrização. Fornece também uma barreira de proteção contra bactérias e

vírus e permite a visualização do processo de cicatrização sem a necessidade de exposição da ferida. Indicado para tratamento da pele com vermelhidão ou bolhas, feridas fechadas limpas, feridas abertas limpas em granulação sem exsudação, para a proteção ao redor de estomas, fixação de cateteres curtos e longos e como cobertura secundária para outros produtos.

Figura 12 - Filme transparente de poliuretano



Fonte: Cirúrgica São Paulo (2013).

### 3.3 Hidrogel com alginato

Foi usado do hidrogel com alginato, Nu-Gel® (Systagenix, Gargrave, North Yorkshire, Reino Unido) (Fig.13), que é um gel amorfo, transparente, hidroativo, contendo propilenoglicol alginato de sódio, que tem como propriedade a hidratação delicada e eficaz do tecido necrótico. Feito para criar um ambiente úmido ideal para a granulação e reepitelização do tecido lesionado, onde a presença de alginato de sódio aumenta sua absorção e a consistência, desse modo também aumenta o tempo de permanência do hidrogel na ferida, de 24h do hidrogel simples, para até 72h. De acordo com Rolstad e Ovington (2007) o hidrogel é indicado para ferida seca ou com exsudação mínima, não infectada com ou sem granulação, tem como principal característica doar umidade a ferida, por isso é comumente usado para facilitar o debridamento de necrose presente no leito da ferida. O hidrogel com alginato foi escolhido por ser indicado as características das feridas, no modelo

experimental escolhido de úlcera por pressão em camundongos, onde foi observado tecido necrótico seco tipo esfacelo ou escara e ausência sinais de infecção.

Figura 13 – Hidrogel com alginato



Fonte: Systagenix (2013).

### 3.4 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss machos pesando entre 25-30g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – UFC.

Os animais foram mantidos em uma sala climatizada com exaustão de gases em gaiola de polipropileno, autoclaváveis nas medidas de 30x20x13cm ou 41x34x16cm. Com tampas em arame de ferro com tratamento de zincagem nas medidas aproximadas de 30x20 cm ou 41x34cm. Nas caixas menores foram acomodados no máximo cinco animais por gaiola e nas maiores no máximo 20 animais por caixa. Foram acomodados em salas com o horário controlado 12/12ciclo claro/escuro a 25 ° C ± 2°C, umidade relativa do ar de 55% ± 10%, com alimentos e água ad libitum.

### 3.5 Local de realização do estudo

Este trabalho foi realizado na estrutura física do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer - LAFICA, situado no Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina, que possui projetos

financiados pelo CNPq que contemplam a referida linha de pesquisa. O LAFICA também conta com biotério adequado onde foi realizado parte dos procedimentos do trabalho, com exaustor apropriado para a retirada do excesso de fumaça que fica no ar após a aplicação da moxa. Além disso, possui estante apropriada para a permanência de animais com fluxo laminar e temperatura controlada e os demais equipamentos necessários à realização dos experimentos.

A etapa de confecção de lâminas histológicas, análise histopatológica e fotomicrografias foram realizadas no Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de imagens (NEMPI) do Departamento de Morfologia da UFC.

### **3.6 Aspectos Éticos**

Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes de uso de animais experimentais, normatizados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL-COBEA) e Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa animal (CEPA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC, com processo nº 89/2011. Todos os esforços foram empregados para reduzir o número de animais, o estresse, o sofrimento e dor dos camundongos. Todos os procedimentos que envolveram imobilização para aplicação de tratamento houve anestesia, Para a eutanásia dos animais foram anestesiados com dose máxima de cetamina 5% 200mg/kg e xilazina 2% 16mg/kg i.p.(dose máxima). Uma vez anestesiados, foram submetidos à eutanásia com overdose de hidrato de cloral 10% na dose de 1,5ml/100g de peso (3x a dose de anestesia), de forma a evitar respiração ofegante, espasmo muscular e vocalização. Somente após eutanasiados foram submetidos ao procedimento cirúrgico de retirada de órgãos e tecidos para análise.

### **3.7 Modelo de indução da úlcera por pressão (modelo de úlcera por isquemia/reperfusão não invasiva)**

O modelo escolhido para este estudo foi o de Stadler *et al.* (2004), modificado, por ser menos invasivo e gerar menos transtornos aos animais. Esse modelo consiste na geração de ciclos de isquemia-reperfusão pelo posicionamento

de dois imãs na pele do dorso de camundongos. O procedimento gera uma pressão de 50 mmHg entre os dois imãs, onde um único ciclo de isquemia/reperfusão (I/R) é constituído por um período de imãs posicionados com duração de 12h seguido por uma liberação ou período de repouso de 12h, o ciclo completo totaliza 24h. Quatro ciclos de I/R são necessários para iniciar uma úlcera por pressão.

Os imãs usados são placas cerâmicas magnéticas ferritine, isotrópico (Imãtec Produtos Magnéticos, Pedreira, São Paulo, Brasil) com medidas de 12 mm de diâmetro por 5 mm de espessura, com peso médio de 2,4g e 1 Gauss de campo magnético.

Através de experimentos prévios do modelo realizados no laboratório, houve a necessidade de modificação do protocolo proposto inicialmente por Stadler *et al.*(2004). Foram formadas úlceras mais características quando os camundongos Swiss foram expostos a 4 ciclos de I/R, ao invés de 3 ciclos do modelo original, provavelmente devido a diferença de espécies de animais usados, onde o original foram utilizados camundongo BALB/c.

Após a tricotomia do dorso do animal, os animais foram anestesiados com cetamina 5% e xilazina 2% (dose mínima) i.p., respectivamente. Depois de anestesiados realizou-se a limpeza da pele com álcool isopropílico 70%. Para o posicionamento dos imãs, a pele é suavemente puxada para cima e os dois imãs são posicionados. Bem posicionados exercem compressão na pele (fig. 14).

Para indução da UP os animais foram previamente anestesiados com cetamina 5% e xilazina 2% nas doses de 50mg/Kg e 10mg/Kg i.p (dose mínima)e em seguida colocados os imãs externos, durante o período de indução de UP, nos ciclos de I/R, foram mantidos separados individualmente em gaiolas (gaiola em polipropileno, autoclavável nas medidas de 30x20x13cm com tampas em arame de ferro com tratamento de zincagem nas medidas aproximadas de 30x20 cm) com divisórias de madeira. Durante a fase de tratamento foram separados por grupos de estudos, onde as mesmas gaiolas foram usadas nas mesmas condições ambientais, porém acomodando 5 animais em cada gaiola.

Figura 14 - Representação do posicionamento dos imãs para o ciclo de isquemia



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os animais não são imobilizados, anestesiados ou qualquer outra restrição durante o período de I/R. Depois de colocados os imãs, dentro de alguns minutos os camundongos retornam as atividades normais, sendo permitido alimento e água *ad libitum*, os animais toleram o peso adicional sem dificuldades.

Para um melhor controle da indução e manutenção do posicionamento dos imãs, os animais são mantidos separados uns dos outros, por divisórias de madeira, dentro das gaiolas (fig.15).

Figura 15 - Animais durante a fase de isquemia



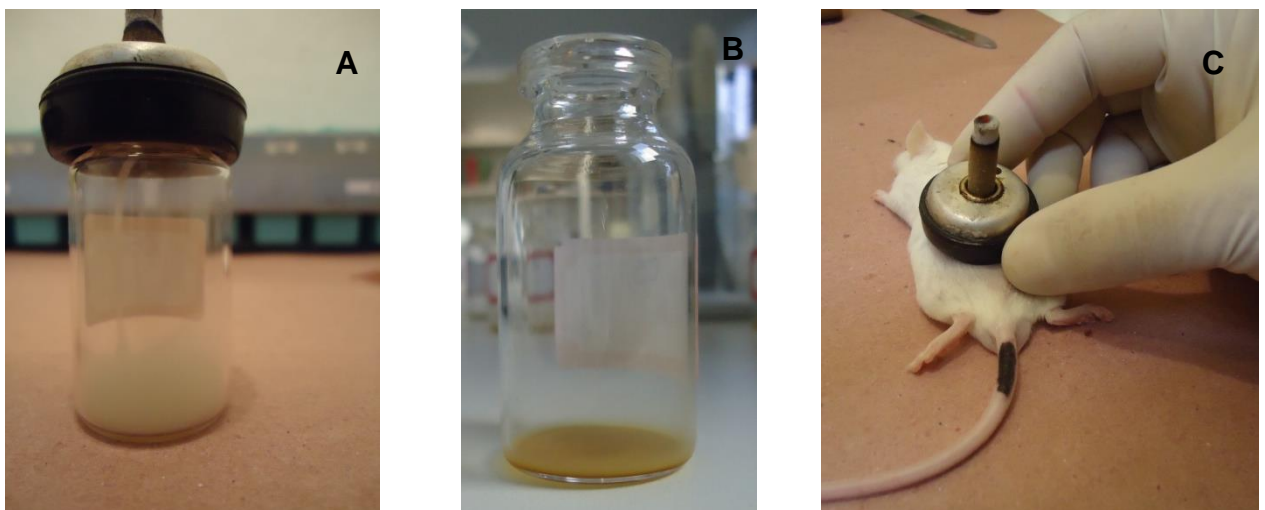
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Os camundongos são mantidos separados na gaiola por uma divisória de madeira, para a melhor manutenção dos ímãs posicionados.

### 3.8 Aplicação da fumaça de artemísia

A fumaça de *Artemisia vulgaris L* foi aplicada na UP através da moxa palito vazada, onde uma das pontas é acesa e a outra colocada no suporte para moxa. A fumaça densa descia pelo orifício central da moxa e se condensava dentro do suporte (fig.16A) formando uma fina camada de substância pastosa e viscosa na superfície da ferida (fig.16B), o suporte foi posicionado de modo a cobrir a ferida e concentrar esta fumaça densa na UP (fig.16C). Durante a aplicação do tratamento os camundongos foram anestesiados com cetamina 5% e xilazina 2% i.p (dose mínima), aplicada em todos os animais do estudo, mesmo nos que não receberam o tratamento.

Figura 16 – Aplicação da fumaça de moxa de artemísia



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Moxa palito montada sobre base de sustentação e acesa. Fumaça densa precipitando (A), camada de material pastoso e viscoso formado após a aplicação da fumaça de artemísia (B) e aplicação na região da úlcera onde a fumaça densa se concentra na ferida formando a fina camada de material pastoso (B).

### 3.9 Desenho e protocolo experimental

A úlcera por pressão foi induzida como descrito acima. No 5º dia os grupos foram submetidos aos esquemas de tratamento (ver adiante). O sacrifício para a retirada da pele do dorso, no local da lesão foi feito nos dias 5, 7, 14, 21 após o início de indução da úlcera. Em cada animal formou-se 2 feridas.

Foi retirada a área da lesão ou da cicatriz com uma margem de pele íntegra (aproximadamente 2 mm), sendo que uma parte da pele retirada foi congelada a -70°C para posterior realização de ensaio bioquímico e outra parte foi fixada em formaldeído 10% tamponado pH 7,4, após 24h colocado em álcool 70% até ser parafinado para a realização de cortes histológicos de 4µm de espessura.

### 3.10 Grupos experimentais

Os camundongos foram separados nos seguintes grupos:

- a) Grupo Controle: Grupo onde a úlcera foi induzida, mas o animal não recebeu nenhum tratamento;
- b) Grupo Artemísia: Neste grupo, com a indução da úlcera, a partir do 5º dia os camundongos receberam 1 aplicação diária com fumaça da artemísia (ver quadro 3), direcionada ao leito da ferida de modo a impregná-la com auxílio de um aplicador com anel de borracha, especial para este procedimento. O tempo de aplicação foi de aproximadamente 7 minutos, tempo médio de consumação da moxa palito, mas não o bastante para consumir toda a moxa, de modo a não alterar a temperatura da ferida por mais de 2°C. Após a aplicação do tratamento o ferimento foi mantido sem cobertura. Em conformidade com a tradição do uso da fumaça de Artemísia na MTC foi escolhida a aplicação diária;
- c) Grupo Artemísia e filme de poliuretano: Após a úlcera formada, a partir do 5º dia os animais receberam tratamento em dias alternados com fumaça da Artemísia, de forma semelhante ao grupo Artemísia. Porém no fim do procedimento, foi colocado filme de poliuretano como cobertura, sendo substituída em dias alternados, mimetizando outra forma de tratamento na MTC;
- d) Grupo Hidrogel e filme de poliuretano: Neste grupo com a formação da úlcera, a partir do 5º dia os animais receberam tratamento com hidrogel como cobertura primária e filme de poliuretano como cobertura secundária, que eram trocadas a cada 72h conforme instruções do fabricante. Esse tratamento é o mais indicado para o tipo de ferida que se formou de acordo com Rolstad e Ovington (2007).

Quadro 3 - Detalhamento do fluxograma do desenho experimental

| Dia  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |   |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|
| Indução da úlcera                                      | X | X | X | X |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| Aplicação da Artemísia                                 |   |   |   |   | X | X | X | X | X | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X |
| Aplicação da artemísia e troca do filme de poliuretano |   |   |   |   | X |   | X |   | X |    | X  |    | X  |    | X  |    | X  |    | X  |    | X  |   |
| Aplicação do hidrogel e troca do filme de poliuretano  |   |   |   |   | X |   | X |   | X |    | X  |    | X  |    | X  |    | X  |    | X  |    | X  |   |
| Fotografia   |   |   |   |   | X |   | X |   |   |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    | X |
| Retirada do tecido para análise                        |   |   |   |   | X |   | X |   |   |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    | X |
| Eutanásias   |   |   |   |   | X |   | X |   |   |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    | X |

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.11 Análise toxicológica da aplicação tópica da fumaça de artemísia

#### 3.11.1 Protocolo experimental

A indução da UP foi realizada de acordo com protocolos descritos anteriormente, onde a aplicação da fumaça de Artemísia, assim como o anestésico (cetamina 50mg/Kg e xilazina 10mg/Kg i.p), foram realizados em todos os animais do estudo, independente do grupo ao qual pertenciam. O período de tratamento foi de 31 dias de aplicação da fumaça de artemísia nos animais, que foram distribuídos em 3 grupos:

- Grupo ferida sem tratamento (FS): Neste grupo é induzida a úlcera, porém não foi aplicada nenhuma forma de tratamento;
- Grupo ferida tratada (FT): Este grupo teve indução da úlcera e aplicação da fumaça de Artemísia;
- Grupo pele íntegra tratada (IT): Não foi induzida úlcera, mas foi realizada a aplicação da fumaça de Artemísia na pele íntegra.

Após os 31 dias da aplicação dos tratamentos todos os animais foram anestesiados com cetamina 5% e xilazina 2% (dose máxima) para retirar o sangue pelo plexo orbital e após a retirada, com os animais ainda anestesiados, foram eutanasiados com overdose de hidrato de cloral. Com o animal morto foram colhidas a pele, o rim, o fígado e o baço para análise histopatológica.

Para obtenção do plasma, o sangue foi coletado por punção retro-orbital, nos animais anestesiados, colhido aproximadamente 800µl de sangue total por animal. As amostras foram acondicionadas em microtubos plásticos de 2ml contendo heparina saturada na concentração de 0,2 ml/ml de sangue. Para o hemograma foi utilizado EDTA tri-potássico 1% na concentração de 0,1 ml/ml de sangue, sendo colhido em média 600µl de sangue total. Realizada homogeneização e posterior centrifugação a 2.500rpm/15 minutos, a 25° C, obtendo-se plasma livre de hemólise, onde o soro, sobrenadantes, foi recolhido em tubo plástico com capacidade de 2ml e acondicionado em freezer a -70°C até a realização dos testes.

O experimento foi dividido em duas partes, devido a pouca quantidade de sangue disponível para a realização dos testes laboratoriais. No primeiro momento foram utilizados 8 animais por grupo, totalizando 24 animais na primeira parte do experimento. Na segunda, como foi constituída da mesma quantidade de animais por grupo, o total geral, juntando os dois momentos correspondeu a 48 animais.

Na primeira etapa foram retirados os órgãos dos animais e colhido sangue para realizar os testes bioquímicos de ureia, creatinina, AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase). Na segunda etapa foi colhido somente o sangue para completar a quantidade de testes necessários para a avaliação toxicológica.

### **3.11.2 Testes toxicológicos**

Os testes toxicológicos utilizados neste trabalho foram baseados nos testes empregados por Kodippili *et al.* (2011) e alguns testes indicados pela OECD (1981).

#### **3.11.2.1 Observação diária dos animais**

Os animais foram cuidadosamente observados durante o tratamento quanto à mortalidade, sinais evidentes de toxicidade (salivação, diarreia, amarelamento da pele e pelos, perda de pelo, alterações posturais, e mudança de comportamento), estresse (ereção do pelo), e comportamento aversivo (agressividade de morder e arranhar; lambe as patas, cauda e pênis, limpeza intensa, vocalização).

#### *3.11.2.2 Análise dos eletrólitos: Cloro, potássio e sódio séricos*

A análise foi realizada utilizando 10 $\mu$ L de soro da amostra pelo equipamento automático Konelab 60(Wiener lab, Rosario, Argentina) que utiliza potenciometria direta. Através da medida da f.e.m. (força eletromotriz) de uma célula galvânica que contém um eletrodo indicador ou eletrodo de trabalho (eletrodo seletivo) e um eletrodo de referência, medindo a variação do potencial do eletrodo indicador em relação ao eletrodo de referência em função do volume do titulante adicionado na solução, quantificando os eletrólitos em questão. O cálculo do resultado foi realizado automaticamente pelo equipamento em mEq/L para o Cl, K e Na.

#### *3.11.2.3 Dosagem de cálcio sérico*

A quantificação foi realizada pela aspiração de 2  $\mu$ L de soro da amostra pelo equipamento automático Konelab 60(Wiener lab, Rosario, Argentina) que determinou a quantidade de cálcio com o kit Ca-Color Arsenazo III AA (Wiener lab, Rosário, Argentina), através de método colorimétrico direto, onde o cálcio reage com o arsenazol III presente no reagente A (arsenazol III 100mg e 8-hidroxiquinolina sulfanato 1,4 g/L em tampão Tris 100mM, pH 8,5) produzindo um complexo de cor azul que se mede em fotocolorímetro a 650nm, o cálculo do resultado é realizado automaticamente pelo aparelho em mg/dL.

#### *3.11.2.4 Quantificação do fósforo sérico*

A dosagem foi realizada mediante aspiração de 20 $\mu$ L de soro da amostra pelo equipamento automático Konelab 60(Wiener lab, Rosario, Argentina) que

determinou a quantidade de fósforo, através do método UV para a determinação de fósforo inorgânico no soro com uso do kit Fosfatemia UV AA (Wiener lab, Rosario, Argentina). Onde o fósforo inorgânico reage em meio ácido com o molibdato presente do reagente A (solução de molibdato de amônio 2 mmol/l e mácido sulfúrico a 1%) para dar um complexo fosfomolibdico que foi medido espectrofotometricamente a 340 nm. O cálculo do resultado foi realizado automaticamente pelo aparelho em mg/dL.

#### *3.11.2.5 Análise da albumina sérica*

A quantificação sérica da albumina foi realizada através da adição de 20µL de soro da amostra pelo próprio equipamento automático Konelab 60(Wiener lab, Rosario, Argentina). A albumina foi medida pelo método colorimétrico com uso do kit Albumina AA (Wiener lab, Rosario, Argentina). Onde a albumina reagiu especificamente, sem separação prévia, com a forma aniônica da a 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfonftaleína (BCF) presente no reagente A(solução de BCF 0,3 mmol/l, tampão acetato0,1 mol/l y polioxietileno lauril éter 0,9 g/l). O aumento de absorbância a 625 nm em referência do Branco de reagente foi proporcional à quantidade de albumina presente na amostra e o cálculo do resultado foi realizado automaticamente pelo aparelho em g/dL.

#### *3.11.2.6 Análise de bilirrubina total sérica*

A determinação da bilirrubina total foi realizada pelo método DPD por fotolorimetria, com adição de 10µL de soro pelo próprio equipamento automático Konelab 60(Wiener lab, Rosario, Argentina) que mediu a bilirrubina total através do kit Bilirrubina Total AA líquida (Wiener lab, Rosario, Argentina). Onde a bilirrubina indireta, unida à albumina, é liberada por um tensoativo do reagente B (solução aquosa contendo 90 mmol/l de ácido clorídrico e tensoativo). Com a bilirrubina total (conjugada e livre), esta reage com o sal de diclorofenildiazonio (DPD), presente no Reagente A (frascos contendo sal de diclorofenildiazonio), produzindo um azocomposto cor vermelho em solução ácida. Através de fotolorímetro com filtro verde (520-550 nm) levando o aparelho a zero com o reagente C (reagente para Branco de Amostra: solução aquosa contendo ácido clorídrico 90 mmol/l e

tensoativo) obtém-se o resultado e o cálculo deste resultado foi realizado automaticamente pelo aparelho em mg/dL.

#### *3.11.2.7 Dosagem de $\gamma$ (gama)-glutamil transferase sérica*

A dosagem foi realizada pela aspiração de 20 $\mu$ L de soro da amostra pelo equipamento automático Konelab 60.

(Wiener lab, Rosario, Argentina) que determinou a quantidade de cálcio, através de método Szasz modificado para a determinação de gama-glutamil transferase em soro, com uso do kit  $\gamma$ -G-test cinética AA líquida (Wiener lab, Rosario, Argentina). Onde a  $\gamma$ -glutamil transferase é uma carboxipeptidase que catalisa reação com L- $\gamma$ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida + glicilglicina (reagente A), em L- $\gamma$ -glutamilglicilglicina e 5-amino-2-nitrobenzoato, que foi medido em espectrofotômetro a 405nm, o cálculo do resultado foi realizado automaticamente pelo aparelho em U/L.

#### *3.11.2.8 Análise da PCR – proteína C reativa sérica*

A quantificação da PCR foi realizada mediante o método imunoturbidimétrico com látex, onde 10 $\mu$ L foi obtido da amostra pelo equipamento automático Konelab 60(Wiener lab, Rosario, Argentina), realizando todas as fases do processo de forma automática, incluindo calibração, diluições e homogeneizações com uso do kit PCR Ultrasensible Turbitest AA (Wiener lab, Rosario, Argentina). A PCR presente na amostra foi capaz de aglutinar as partículas de látex recobertas com anticorpo anti-PCR, onde a turbidez causada pela aglutinação das partículas de látex é proporcional à concentração de PCR na amostra possibilitando o equipamento medir através de espectrofotometria a 570nm para quantificação da PCR, o cálculo do resultado foi realizado automaticamente pelo aparelho em mg/L.

#### *3.11.2.9 Dosagem da glicemia sérica*

A quantificação sérica de glicemia foi realizada através da adição de 30 $\mu$ L de soro da amostra pelo próprio equipamento automático Konelab 60 (Wiener lab, Rosario, Argentina). A glicemia foi medida pelo método colorimétrico com uso do kit

Glicemia enzimática AA (Wiener lab, Rosario, Argentina). Onde ocorre a seguinte reação:

glicose + O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O  $\xrightarrow{\text{GOD}}$  ácido glucônico + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-AF + 4-hidroxibenzoato  $\xrightarrow{\text{POD}}$  coloração vermelha. 505 nm para quantificação da glicemia, o cálculo do resultado foi realizado automaticamente pelo aparelho em mg/dL.

### 3.11.2.10 Quantificação do ALT e AST séricos

Para quantificação sérica da aspartato aminotransferase (AST) foi utilizado o kit (labtest Diagnóstica S.A., Belo Horizonte, Brasil). AST catalisa especificamente a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD. A redução da absorbância em 340nm, conseqüente à oxidação da coenzima NADH, é monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da AST na amostra. Para a determinação nos níveis de AST foram realizados os seguintes procedimentos Em um tubo rotulado Calibrador, foi pipetado 0,800 mL da mistura Reagente 1 + Reagente 3. Adicionado 0,100 mL de amostra ou calibrador de enzimas, homogeneizada e incubada em banho-maria a 37 ± 0,2 °C por 5 minutos. Após essa incubação, esperou-se até 30 minutos para iniciar a medição cinética com a adição do reagente 2. Ajustado o zero do fotômetro em 340 nm com água destilada ou deionizada, foi adicionado 0,200 mL do Reagente 2, homogeneizado e transferido imediatamente para a cubeta termostatizada a 37 ± 0,2 °C. Esperar 1 minuto.

Após todo o protocolo de preparação das amostras, estas foram colocadas no analisador semiautomático Labquest (labtest Diagnóstica S.A., Belo Horizonte, Brasil), que determinou o AST presente na amostra a 340nm, e o cálculo do resultado foi realizado automaticamente pelo aparelho em U/L.

Para determinação sérica dos níveis da alanina aminotransferase (AST) foi utilizado o kit (labtest Diagnóstica S.A., Belo Horizonte, Brasil).

Os níveis de ALT catalisa especificamente a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato, onde o piruvato é reduzido à lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto

que, a coenzima NADH é oxidada a NAD. A redução da absorvância em 340 nm, consequente à oxidação da coenzima NADH, é monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra.

Para a determinação nos níveis de ALT foram colocados em um tubo rotulado Calibrador 0,800 mL da mistura Reagente 1 + Reagente 3, adicionado 0,100 mL de amostra ou calibrador de enzimas, homogeneizado e incubado em banho-maria a  $37 \pm 0,2$  °C por 5 minutos. Após essa incubação, aguardaram-se 30 minutos para iniciar a medição cinética com a adição do reagente 2. Onde foi ajustado o zero do fotômetro em 340 nm com água destilada ou deionizada. Adicionado 0,200 mL do Reagente 2, homogeneizar e transferir imediatamente para a cubeta termostatizada a  $37 \pm 0,2$  °C. Esperar 1 minuto.

Após o procedimento as amostra foram colocadas no analisador semiautomático Labquest (labtest Diagnóstica S.A., Belo Horizonte, Brasil), que determinou o ALT presente na amostra a 340nm, sendo o cálculo do resultado realizado automaticamente pelo aparelho em U/L.

### 3.11.2.11 Determinação dos níveis séricos de ureia e creatinina

A ureia é hidrolisada pela urease a íons amônia e CO<sub>2</sub>, esses íons reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar azul de indofenol. A formação de cor é proporcional à quantidade de ureia na amostra.

Para a determinação da quantidade de ureia na amostra, foi utilizado o kit Ureia CE (labtest Diagnóstica S.A., Belo Horizonte, Brasil), Realizando o seguinte procedimento Para a dosagem de ureia sérica, foi diluída a amostra 1:50 (0,1 mL de urina + 4,9 mL de água destilada ou deionizada). Multiplicar o resultado obtido por 50. Tomou-se 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

|                  | Branco | Teste   | Padrão  |
|------------------|--------|---------|---------|
| Amostra          | -----  | 0,01 mL | -----   |
| Padrão (nº 2)    | -----  | -----   | 0,01 mL |
| Urease tamponada | 1,0 mL | 1,0 mL  | 1,0 mL  |

Misturar e incubar a 37 °C durante 5 minutos.

|                 |        |        |        |
|-----------------|--------|--------|--------|
| Oxidante de uso | 1,0 mL | 1,0 mL | 1,0 mL |
|-----------------|--------|--------|--------|

Misturar e incubar a 37 °C durante 5 minutos.

Após todo o protocolo de preparação das amostras, estas foram colocadas no analisador semiautomático Labquest (labtest Diagnóstica S.A., Belo Horizonte, Brasil), Determinando-se as absorvâncias do teste e padrão em 600 nm (580 a 610 nm), acertando o zero com o branco, e o cálculo do resultado foi realizado automaticamente pelo aparelho em mg/dL.

Para dosar a creatinina sérica utilizou-se o método que se baseou na observação de que a reação da creatinina com o picrato alcalino é muito rápida, enquanto a reação do picrato com os cromogênios é mais lenta. A medida da reação nos primeiros minutos permite a determinação da creatinina. A creatinina e outros componentes do soro reagem com a solução de picrato em meio alcalino, onde a creatinina mais ácido pícrico produz Picrato de creatinina, formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente.

Misturar 4 volumes de NaOH (nº 1) com 1 volume de Ácido Pícrico (nº 2) estável 15 dias entre 2 - 8 °C. O CO<sub>2</sub> atmosférico altera significativamente a estabilidade do NaOH (Nº 1) e do Picrato Alcalino, quando os reagentes são mantidos em recipientes abertos. A modificação da estabilidade é influenciada pelo tempo de exposição e condições ambientais. Sugerimos manter na bandeja do analisador somente o volume suficiente para a realização de uma corrida analítica ou usar as informações do controle da qualidade como indicador da necessidade de realizar nova calibração.

Ajustar o fotômetro a zero em 510 nm com água destilada. Adicionar 0,1 mL de padrão plasma 1,0 mL do Picrato Alcalino. Misturar e aspirado pelo analisador semiautomático Labquest (labtest Diagnóstica S.A., Belo Horizonte, Brasil), e o cálculo do resultado foi realizado automaticamente pelo aparelho em mg/dL.

### 3.11.2.12 Análise do hemograma

Para análise do hemograma utilizou-se um contador automatizado Sysmex KX21N (TOA Medical Electronics, Kobe, Japan) que realizou a contagem total de células. A contagem diferencial foi realizada em lâminas de esfregaço

sanguíneo coradas com o corante rápido *instant prov*<sup>®</sup> (Newprov, Paraná, Brasil) composto por ciclohexadieno a 0,1%, azobenzeno sulfônicos a 0,1% e fenotiazinas a 0,1%, seguindo as instruções do fabricante. Com este processo foi possível realizar a contagem diferencial/ e análise de atípicascelulares. A contagem foi feita por campo, realizando movimentos zigzague ao longo do esfregão de sangue, até totalizar 100 leucócitos. O resultado foi expresso em porcentagem de cada tipo de leucócito contado.

### 3.11.2.13 Análise histopatológica do fígado, rins, baço e pele

Após eutanásia dos animais, foram retirados rim, fígado, baço e a área da cicatriz ou pele íntegra tratada, foram colocados em formaldeído 10% tamponado pH 7,4, após 24h colocado em álcool 70% até ser parafinizados para a realização de cortes histológicos de 4µm de espessura, e a posterior coloração das lâminas através do método HE.

As lâminas foram examinadas por um investigador que era cego ao tratamento, avaliado sinais de possível toxicidade do tratamento aplicado nos tecidos estudados.

No rim foi analisada a presença de infiltrado inflamatório, alterações tubulo-intersticiais, existência de cilindros hialinos nos túbulos distais e fibrose intersticial. No fígado foi observadas alterações na arquitetura histológica da veia central, ramo da veia porta, ramo da artéria hepática e ducto biliar; degeneração balonzante; infiltrado inflamatório; células apoptóticas, presença de hemossiderina, lipidose e fibrose. No baço foi analisado infiltrado inflamatório, atrofia, hemossiderina (exceto no macrófago), fibrose, vacuolização de histiócitos, hiperplasia, células apoptóticas, lipidose e fibrose. Na pele foi observado edema, hemorragia e congestão dos vasos, infiltrado inflamatório e células necróticas/apoptóticas.

## 3.12 Avaliação do efeito cicatrizante da fumaça de *Artemisia vulgaris* na úlcera por pressão

O efeito cicatrizante da aplicação tópica da fumaça de *Artemisia vulgaris* na úlcera por pressão foi avaliado através de parâmetros macroscópicos e

microscópicos. Em adição foi verificado o ensaio de MDA e imuno-histoquímica para detecção de NOSi e nitrotirosina.

### 3.12.1 Análise Macroscópica

#### 3.12.1.1 EWAT (*Experimental Wound Assessment Tool*)

Vendo a ausência de um instrumento que fosse voltado a análise da cicatrização em modelos experimentais, resolveu-se desenvolver um método para esta finalidade, com o nome EWAT (*Experimental Wound Assessment Tool – Instrumento de avaliação de ferida experimental*), tendo como referência o *Pressure Ulcer Scale for Healing (PUSH)*, o *Pressure Sore Status Tool (PSST)* e *Photographic Wound Assessment Tool (PWAT)*.

A escala foi composta por parâmetros: área, parâmetros inflamatórios e parâmetros de debridamento como mostra o quadro 4.

Quadro 4 – Escores constituintes da escala *Experimental Wound Assessment Tool – EWAT*

|  |  |   |
|--|--|---|
| <b>1. AREA (cm<sup>2</sup>)</b>  | 0 – 0<br>1 – <0,01 cm <sup>2</sup><br>2 – 0,01 to 0,1 cm <sup>2</sup><br>3 – 0,1 to 0,2 cm <sup>2</sup><br>4 – 0,3 to 0,6 cm <sup>2</sup><br>5 – 0,7 to 1,0 cm <sup>2</sup><br>6 – 1,1 to 2,0 cm <sup>2</sup><br>7 – 2,1 to 3,0 cm <sup>2</sup><br>8 – 3,1 to 4,0 cm <sup>2</sup><br>9 – 4,1 to 8,0 cm <sup>2</sup><br>10 – 8,1 to 12,0 cm <sup>2</sup><br>11 – > 12 cm <sup>2</sup> |   |
| <b>2.EXUDATE AMOUNT (QUANTIDADE DE EXSUDATO)</b>                       | 0 – none<br>1 – light<br>2 – moderate<br>3 – heavy   | <b>PARÂMETROS INFLAMATORIOS (avaliação do efeito anti-inflamatório)</b> |
| <b>3.EXUDATE TYPE (TIPO DE EXSUDATO)</b>                               | 0 – none<br>1 – bloody<br>2 – serosanguineous<br>3 – serous<br>4 – purulent  |   |
| <b>8.SKIN COLOR SURROUNDING WOUND (COR DA PELE AO REDOR DA FERIDA)</b> | 0 = Normal for animal<br>1 = Bright red<br>2 = White or gray pallor or hypopigmented<br>3 = Dark red or purple<br>4 = Black or hyperpigmented  |   |
| <b>4.TISSUE TYPE</b>   | 0 – epithelial tissue  |   |

|   |  |   |
|---|--|---|
| (TIPO DE TECIDO)  | 2 – granulation tissue<br>3 – slough<br>4 – eschar   | <b>PARÂMETROS DE NECROSE (avaliação da ação debridante)</b> |
| <b>5.NECROTIC TISSUE TYPE</b><br>(TIPO DE TECIDO NECRÓTICO)         | 0 – none visible<br>1 – white/gray/yellow non adherent slough<br>2 – white/gray/yellow firmly adherent slough<br>3 – adherent, soft, black or brown eschar<br>4 – firmly adherent, hard, black or brown eschar |   |
| <b>6.NECROTIC TISSUE AMOUNT</b><br>(QUANTIDADE DE TECIDO NECRÓTICO) | 0 – None visible<br>1 – < 25% of wound bed covered<br>2 – 25% to 50% of wound bed covered<br>3 – > 50% and < 75% of wound bed covered<br>4 – 75% to 100% of wound bed covered                                  |   |
| <b>7.GRANULATION TISSUE</b><br>(TECIDO DE GRANULAÇÃO)               | 0 – epithelial tissue<br>1 – 50% to 100%<br>2 – < 50% of wound<br>4 – obscured by necrosis   |   |

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.12.1.2 Determinação da área da úlcera através de planimetria

Para a determinação da área em  $\text{cm}^2$ , os animais foram fotografados nos dias 5, 7, 14 e 21, com Câmera *Digital Cyber-shot* DSC-W610 14.1 Megapixels (Sony Corporation, Tóquio, Japão). Em ângulo de  $90^\circ$  da ferida, a distância de 10 cm da objetiva da máquina fotográfica, e ao lado do animal foi colocado papel milimetrado ( $1 \text{ cm}^2$ ) como referência na determinação da área da ferida com auxílio do programa ImageJ 1.46r(National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), que proporciona a área em pixel e dividindo-se a área da ferida em pixel e a área do papel milimetrado, obteve-se a área da ferida em  $\text{cm}^2$ .

### 3.12.1.3 Contração da área da lesão

A contração da ferida é um importante fator contribuidor para o processo de cicatrização, pois consiste na aproximação das extremidades da ferida (WITTE; BARBUL, 1997).

A contração da área foi calculada como percentual do tamanho inicial da ferida de cada animal dos grupos nos dias 5 (inicial e equivalente a 100%), 7, 14 e 21, utilizando fotografia da lesão. Através da equação descrita por Shenoy *et al* (2011):

$$\text{Contração da ferida \%} = \left[ \frac{\text{área inicial da ferida} - \text{área da ferida no dia específico}}{\text{área inicial da ferida}} \right] \times 100$$

### 3.12.2 Análise histopatológica

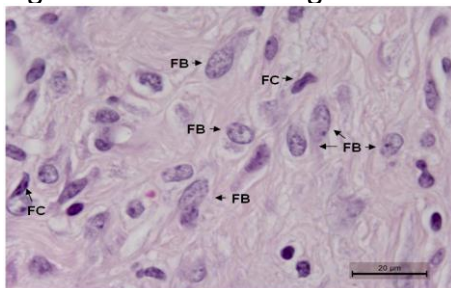
As lamínas foram coradas pelo método de hematoxilina-eosina (HE), obtidas de úlceras nos dias 5, 7, 14 e 21, e foram analisadas mediante microscópio leica (Leica, Wetzlar, Germany), em toda a área da ferida ou cicatriz. A análise foi realizada de forma semi-quantitativa, conforme a intensidade dos parâmetros observados, de acordo com os escores: infiltrado inflamatório (0: normal sem infiltrado; 1: infiltrado leve; 2: infiltrado moderado; 3: infiltrado intenso); hemorragia (0: ausente; 1: discreta; 2: moderada; 3: intensa); fibrose (0: ausente; 1: leve; 2: moderada; 3: intensa), de acordo com Vidisnk *et al.* (2006). A análise foi realizada por um investigador que era cego ao tratamento.

### 3.12.3 Avaliação da fibroplasia

A contagem de fibroblastos e fibrócitos foram realizadas em lâminas coradas com o método HE, proveniente das úlceras no 5º, 7º, 14º e 21º dia, nas lâminas coradas foram contados o número de fibroblastos e fibrócitos.

Os fibroblastos (FB) foram caracterizados por células núcleos claros, grandes e ovóides de nucléolo evidente e cromatina fina indicando intensa transcrição de informação genética. Já os fibrócitos (FC) por núcleos com cromatina densa, com baixa ou nenhuma transcrição de informação genética, alongados e escuros (fig.17).

Figura 17 - Fotomicrografia evidenciando fibroblastos (FB) e fibrócitos (FC)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Hematoxilina e eosina (1000x).

Foram contados 10 campos por lâmina em um aumento de 1000x, na derme na parte mais superficial possível. A análise foi realizada por um investigador que era cego ao tratamento, com a utilização de microscópio Leica DM2000 (Leica, Wetzlar, Germany).

### 3.12.4 Avaliação da colagênese

#### 3.12.4.1 Medida da derme

De acordo com Parapuram et al. (2011) a espessura da derme é uma forma segura de estimar a produção de colágeno. Dessa forma foram avaliadas fotomicrografias no aumento de 100X da área de cicatrização das lâminas do 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias, capturadas pelo microscópio Leica DM2000 com câmera Leica DFC 295 (Leica, Wetzlar, Germany). A espessura da derme foi mensurada através do programa LAS - Leica Application Suite (Leica, Wetzlar, Germany). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 10 mensurações da derme, em no mínimo 5 lâminas por grupo (fig 18).

Figura 18 - Fotomicrografia representativa da medida da camada de colágeno na derme na área da cicatrização da ferida



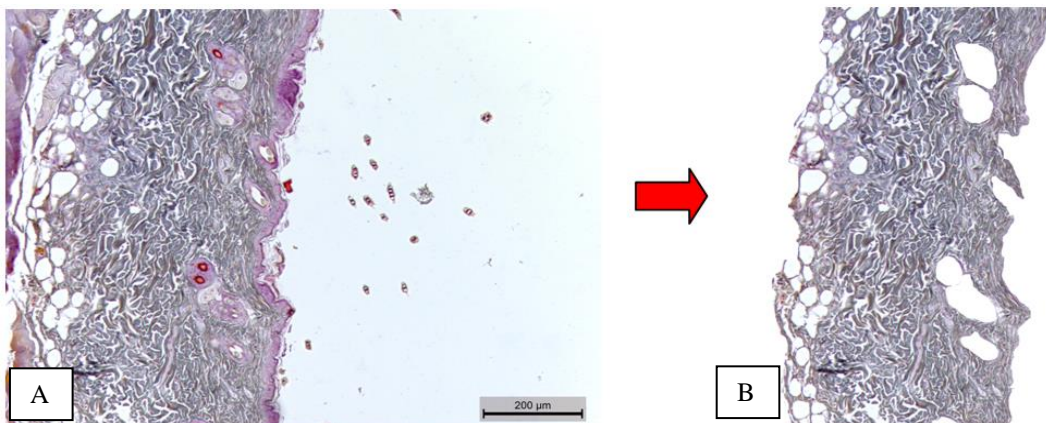
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Coloração por Tricrômio de Mallory, evidenciando o colágeno pela cor azul. 100x.

### 3.12.4.2 Quantificação do percentual de colágeno

Para a avaliação da densidade de colágeno na derme foi usado um protocolo adaptado de Andrade et al. (2011), onde foram feitas fotomicrografias no aumento de 100x com auxílio do microscópio Leica DM2000 com câmera Leica DFC 295 (Leica, Wetzlar, Germany). Após isto as fotomicrografias foram editadas no programa Photoshop, versão 12.1 (Adobe Systems; Mountain View, CA) foi usada à opção “*magnetic lasso tool*” para selecionar as demais camadas (estruturas anexas da pele, músculo, camada córnea, epiderme, tecido adiposo) preenchendo essa seleção com a cor branca utilizando a ferramenta “*brush tool*”, mantendo somente a camada de colágeno na derme em seu formato original (fig 19). Com a imagem isolada da derme foi quantificada a distribuição da cor azul, que se refere à deposição do colágeno, através do programa ImageJ 1.46r (National Institute Health, Bethesda, Maryland, USA) com o *plugin* “*Colour Deconvolution*”, que decompõe a imagem nas três cores do Tricrômio de Mallory (“Azan-Mallory”), no caso somente a imagem azul formada foi selecionada, as demais foram descartadas. Em seguida foi utilizada a ferramenta “*Threshold*”, que marca as áreas em azul. O programa quantificou o percentual do número total de pixels azuis selecionados da fotomicrografia. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem dos pixels dessas fotos de no mínimo 5 lâminas por grupo.

Figura 19 - Fotomicrografia representativa da avaliação da densidade de colágeno na derme na área da cicatrização da ferida.



Fonte: Elaborada pelo autor.

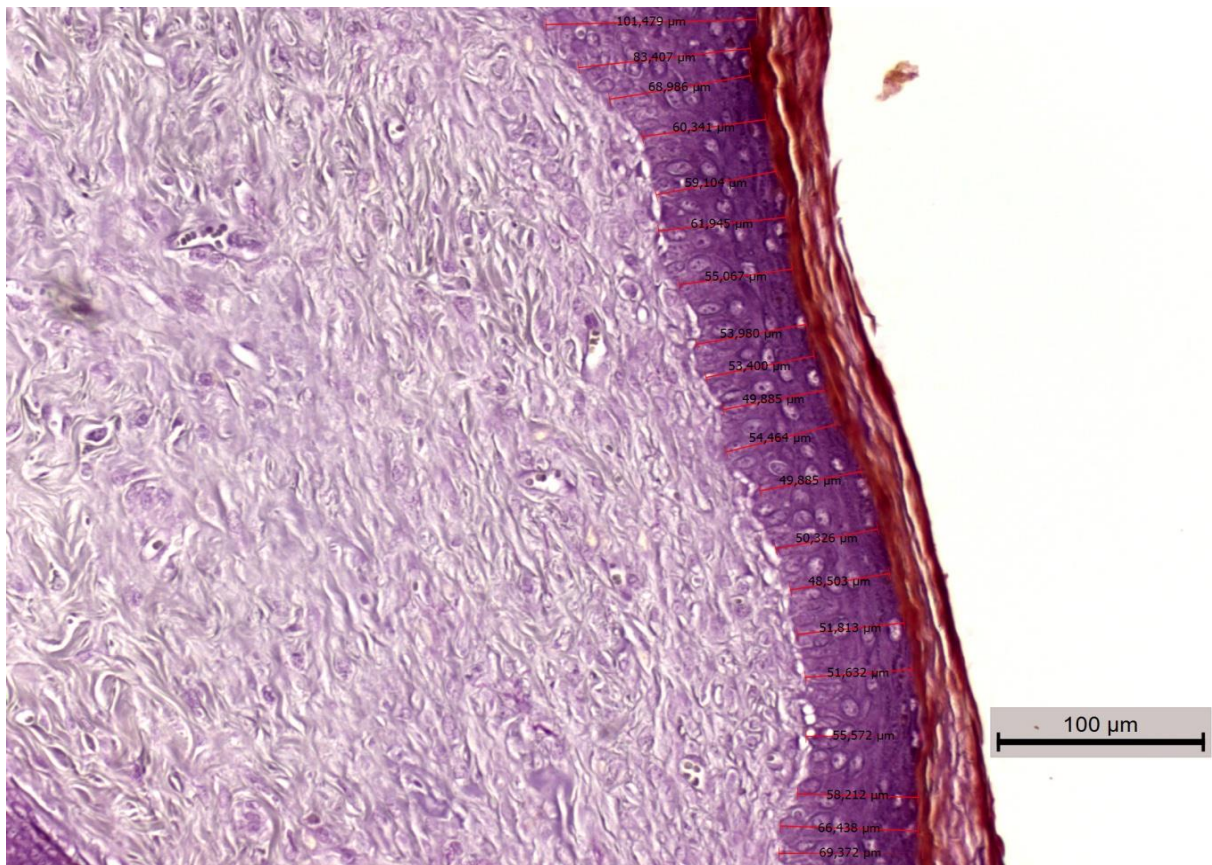
Legenda: Imagem original (A); imagem após edição pelo programa Photoshop (B). Coloração por Tricrômio de Mallory, evidenciando o colágeno pela cor azul. 100x.

### 3.12.5 Avaliação da espessura da epiderme

A morfometria da espessura da epiderme foi realizada nas lâminas coradas com tricrômio de Mallory, a partir de feridas dos dias 14 e 21, nas feridas cicatrizadas, onde foram realizadas fotomicrografias das lâminas, utilizado o microscópio Leica DM2000 com câmera Leica DFC 295 (Leica, Wetzlar, Germany) e do programa LAS - Leica Application Suite (Leica, Wetzlar, Germany).

Para realizar a mensuração da espessura da epiderme a fotomicrografia foi feito no centro da cicatriz com aumento de 200x. Realizou-se 20 medidas em cada foto, da própria epiderme, referente à área da cicatriz (fig 20). Após obter as 20 medidas, foi calculada a média para cada lâmina para comparação dos grupos, com no mínimo 5 lâminas avaliadas por grupo.

Figura 20 - Fotomicrografia representativa da medida da epiderme na área da cicatrização da ferida.



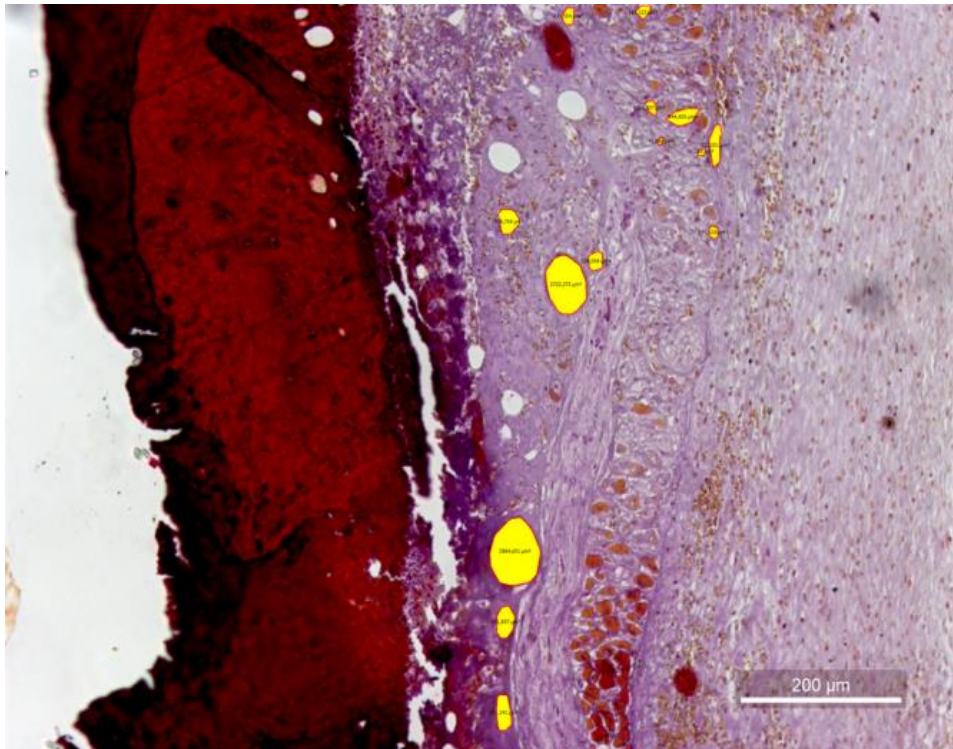
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Coloração por Tricrômio de Mallory. 200x.

### 3.12.6 Contagem do número de vasos na área da lesão

Foram analisadas as lâminas coradas com Tricrômio de Mallory, a partir de feridas nos dias 7, 14 e 21 dias. A contagem do número de vasos foi realizada através de três fotomicrografias no aumento de 100x para cada lâmina, no mínimo 5 lâminas por grupo (fig. 11), utilizando o microscópio Leica DM2000 com câmera Leica DFC 295 (Leica, Wetzlar, Germany) e o programa LAS - Leica Application Suite (Leica, Wetzlar, Germany). Foram considerados os vasos sanguíneos presentes entre o *paniculus carnosus* até a epiderme/superfície da lesão (fig. 21).

Figura 21 - Fotomicrografia representativa da contagem do número de vasos na derme na área da lesão.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Os círculos em amarelo representam os vasos sanguíneos identificados. Coloração por Tricrômio de Mallory. 400x.

### 3.12.7 Avaliação do estresse tecidual por espécies reativas de nitrogênio e oxigênio

#### 3.12.7.1 Análise por imuno-histoquímica para expressão de NOSi e nitrotirosina

Para a realização da imuno-histoquímica, os animais foram sacrificados nos dias 5, 7, 14 e 21 após o início de indução da UP, no 5º dia seis horas após o tratamento. Após sacrifício dos animais por overdose de anestésico, foram usados cortes histológicos das lesões ulcerosas. Os cortes histológicos foram colocados em lâminas especiais as quais são recobertas com poli-L-lisina ou gelatina.

Inicialmente, as lâminas foram deixadas em estufa a 66-88°C durante 3 horas. Após este tempo, estas foram desparafinizadas e hidratadas em xilol, álcool e água, respectivamente. Logo em seguida, as lâminas foram mergulhadas em tampão citrato 10mM pH 6,0 e aquecidas em micro-ondas a 95°C por 15 min. Após o esfriamento das mesmas, foi feita o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% durante 15 min. Após lavagem com PBS as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-NOSi feito em coelho (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) ou anti-nitrotirosina feito em coelho (Upstate, New York, USA) em câmara úmida, a 4°C por toda a noite.

Decorrido este tempo, fez-se 3 lavagens das lâminas em PBS por 5 minutos para depois serem incubadas com o anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho feito em cabra (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) durante 30 min em temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se a lavagem, como no passo anterior e então se faz a incubação com um reagente enzimático AB (Streptavidina, reagente A – Avidina; reagente B – peroxidase horse radish biotinilada, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) por 30 minutos. Após mais uma lavagem, incuba-se com uma solução contendo cromógeno diaminobenzidina (DAB líquido + Sistema Chromogen Substrato, Dako North American, Carpinteria, CA, USA) por dois minutos e enxaguado em água destilada por 2 vezes durante 5 minutos cada, para em seguida, fazer uma contracoloração com hematoxilina de Mayer. Os cortes foram desidratados e montados em meio de montagem rápida (Entellan, Merck, Germany).

Após as lâminas confeccionadas, células que expressaram NOSi e nitrotirosina foram visualizadas em microscópio e contadas em 10 campos/lâmina com aumento de 1000x, na parte mais superficial da derme. A análise foi realizada por um investigador que era cego ao tratamento.

### 3.12.7.2 Determinação da peroxidação lipídica – Ensaio de malondialdeído (MDA)

Os animais foram sacrificados nos dias 5, 7, 14 e 21 após o início de indução da UP, no 5º dia seis horas após o tratamento. Após sacrifício dos animais por overdose de hidrato cloral, a UP foi retirada e congelada em *freezer* a 70°C negativos e depois macerada em tampões adequados. O homogenato foi centrifugado e o sobrenadante, utilizado para a realização do teste bioquímico.

A peroxidação lipídica foi determinada pela mensuração do malondialdeído produzido, utilizando o teste de concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), através dos métodos descritos em Fraga, Leibovitz, Toppel (1988), Mihara e Uchiyama (1978). Realizado a homogeneização de 10% de tecido em KCl 0,15M, retirado 250µL desse homogenato e colocado em tubo de ensaio. Adicionado 1,5mL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 1% + 500µL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Após isso colocaram-se os tubos de ensaio com as misturas em banho-maria a 100°C por 45 minutos. Depois resfriado em água corrente, já resfriado adicionam-se 2mL de n-butanol, agitado em instrumento misturador (Vortex) por 1 minuto, centrifugar a 1200rpm/15min. Retirada à fase butanólica e realizada a leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 520nm (A<sub>1</sub>) e 535nm(A<sub>2</sub>). Onde o valor de MDA foi calculado automaticamente pelo aparelho, subtraindo A<sub>2</sub> por A<sub>1</sub>, expressos em nanomoles/g de tecido.

### 3.13 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± EPM ou média ±DP no percentual de pixel do teste de densidade do colágeno, hemoglobina, concentração de hemoglobina globular média e contagem diferencial dos leucócitos. Para comparações entre os grupos foram utilizados: Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni, Teste t para análise do percentual de contração da área.

Nas análises dos escores histopatológicas e dos escores EWAT os dados obtidos foram expressos como mediana e o teste estatístico aplicado foi o de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's para dados não-paramétricos. Em todas as situações, foi adotado o nível de significância p<0,05.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Avaliação da toxicidade do uso da fumaça de *Artemísia vulgaris* no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos**

#### **4.1.1 Efeito da aplicação da fumaça de *Artemísia vulgaris* sobre o comportamento e mortalidade dos animais**

Com relação à mortalidade, durante a observação diária dos animais foi registrada a perda de 8 animais no total de animais utilizados nos experimentos. No grupo ferida sem tratamento houve a morte de um animal por causa desconhecida; no grupo de pele íntegra tratada houve perda de 2 animais por excesso de anestésico ou erro na aplicação e 1 perda por causa não determinada. No grupo com ferida tratada, houve perda de 2 animais por excesso de anestésico ou erro na aplicação e perda de 2 animais por causas não determinadas.

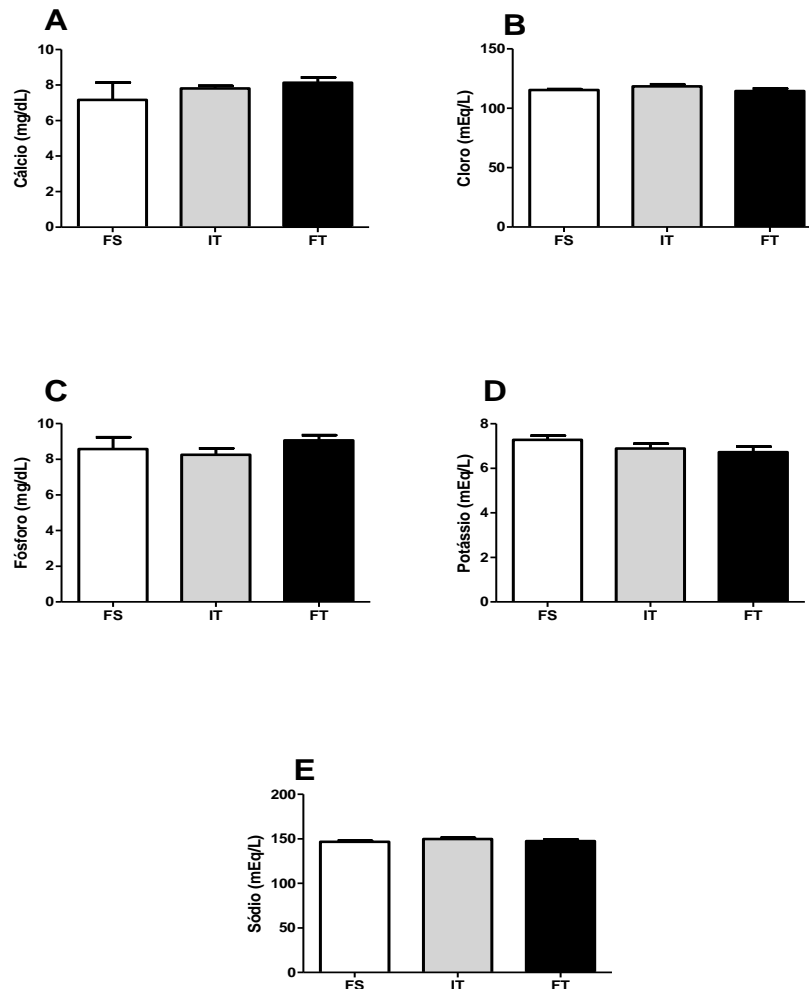
Com relação à observação do estado geral 2 animais apresentaram pelos eriçados na última semana de experimento, sendo 1 animal do grupo ferida não tratada e 1 animal do grupo ferida tratada.

Com relação à observação do comportamento, 2 animais mostraram comportamento agressivo, sendo um do grupo ferida sem tratamento e o outro do grupo ferida com tratamento. Entretanto, esse comportamento já havia sido observado antes do início do tratamento. Outros comportamentos relevantes não foram detectados.

#### **4.1.2 Avaliação das dosagens dos eletrólitos**

Foram avaliados os eletrólitos séricos como cálcio, cloro, fósforo, potássio e sódio. Essa análise foi feita em todos os grupos do estudo toxicológico, porém não foi encontrada diferença significativa entre os grupos do estudo, ficando os mesmo em níveis semelhantes (fig. 22).

Figura 22 - Efeito da fumaça de *Artemísia vulgaris* sobre as dosagens de eletrólitos no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos



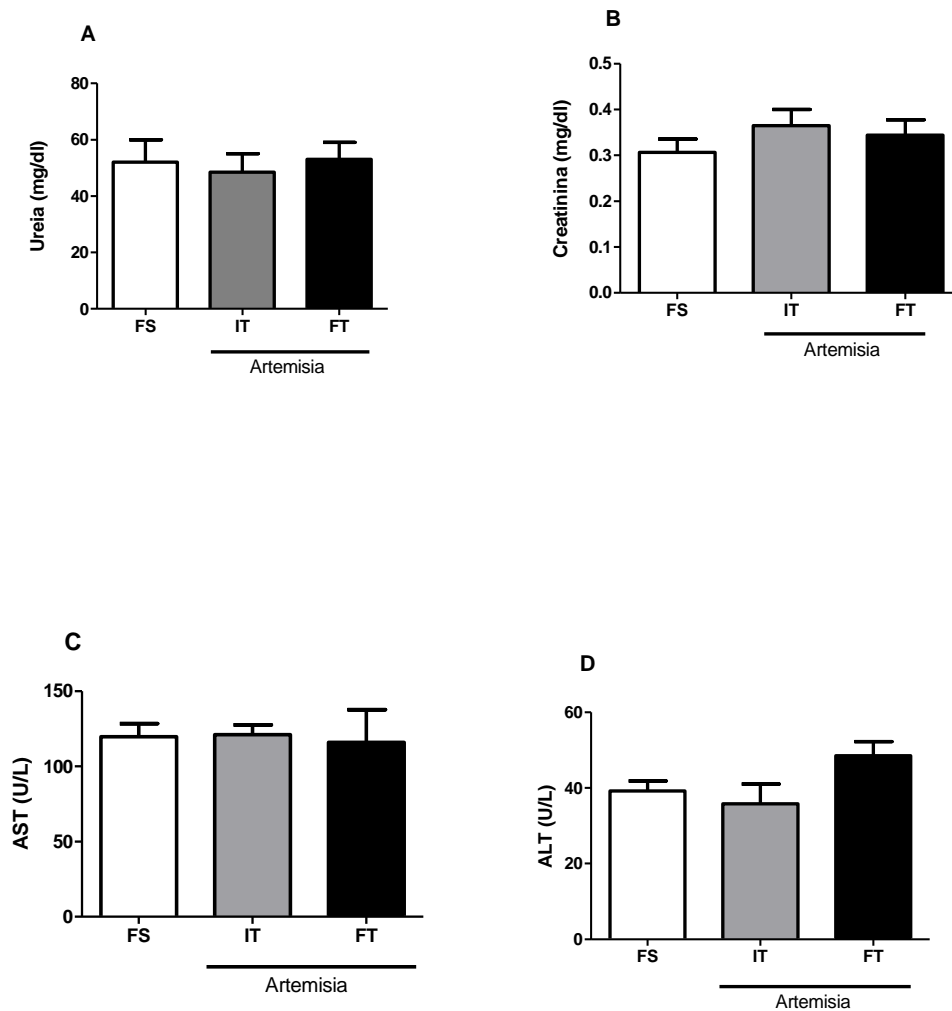
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: No grupo FS (ferida sem tratamento) foi induzida a úlcera, porém não recebeu nenhuma forma de intervenção; o grupo IT (íntegra tratada) não teve indução da úlcera, mas foi realizado tratamento durante 31 dias com fumaça de *Artemísia*; e o grupo FT (ferida tratada) foi induzida a úlcera e foi feito tratamento por 31 dias com fumaça de *Artemísia*. Em todos os grupos foi colhido o sangue para a análise de eletrólitos como: cálcio (painel A), cloro (painel B), fósforo (painel C), potássio (painel D) e sódio (painel E). Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM da concentração das dosagens dos eletrólitos em grupos de no mínimo 7 animais. Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA seguido de Bonferroni.

#### 4.1.3 Análise da quantificação de ureia, creatinina, AST e ALT no modelo de úlcera por pressão em camundongos.

Para as análises realizadas, avaliando as dosagens de ureia e a creatinina (fig 23A e 23B), AST e ALT (fig 23C e 23D) em nenhum desses marcadores foram observados diferença significativa entre os grupos

Figura 23 - Efeito da fumaça de *Artemísia vulgaris* sobre os testes de ureia, creatinina, Alanina transaminase (ALT), Aspartato transaminase (AST) no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: No grupo FS (ferida sem tratamento) foi induzida a úlcera, porém não recebeu nenhuma forma de intervenção; o grupo IT (íntegra tratada) não teve indução da úlcera, mas foi realizado tratamento durante 31 dias com fumaça de *Artemísia*; e o grupo FT (ferida tratada) foi induzida a úlcera e foi feito tratamento por 31 dias com fumaça de *Artemísia*. Em todos os grupos foi colhido o sangue para a análise de ureia (painel A), creatinina (painel B), Alanina transaminase (AST) (painel C), Aspartato transaminase (ALT) (painel D). Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPMda concentração das dosagens bioquímicas em grupos de no mínimo 7 animais. Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA seguido de Bonferroni.

#### 4.1.4 Efeito da fumaça de *Artemisia vulgaris* na dosagem de albumina, bilirrubina total $\gamma$ (gama)-glutamil transferase no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos

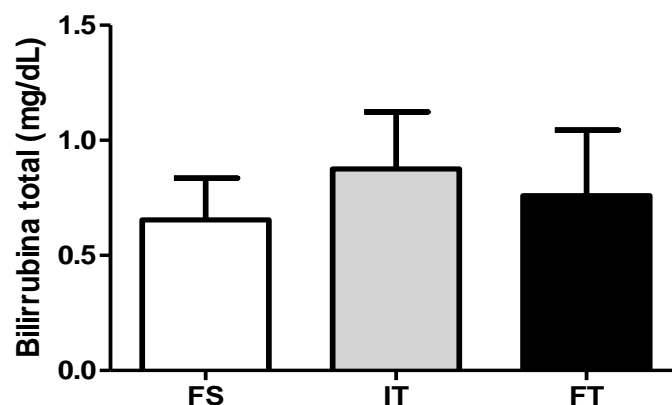
Ainda, para a avaliação da hepatotoxicidade, foi realizada a dosagem de albumina, bilirrubina e (gama)-glutamil transferase.

No estudo a concentração de albumina não pode ser realizada os testes estatísticos, pois somente três animais apresentaram níveis superiores a 2,0g/dL, todos os demais animais mostraram resultados inferiores a 2,0g/dL e dessa forma não foram detectados pela técnica de análise (resultados não mostrados).

A bilirrubina total teve um aumento discreto no grupo de animais com pele íntegra tratada com fumaça de artemísia, porém não foi verificada uma diferença significativa entre os grupos analisados (fig. 24).

A  $\gamma$ (gama)-glutamil transferase não foi detectada no estudo em nenhum dos animais analisados neste teste (resultados não mostrados).

Figura 24 - Efeito da fumaça de *Artemisia vulgaris* sobre as dosagens de bilirrubina total no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos



Fonte: Elaborada pelo autor.

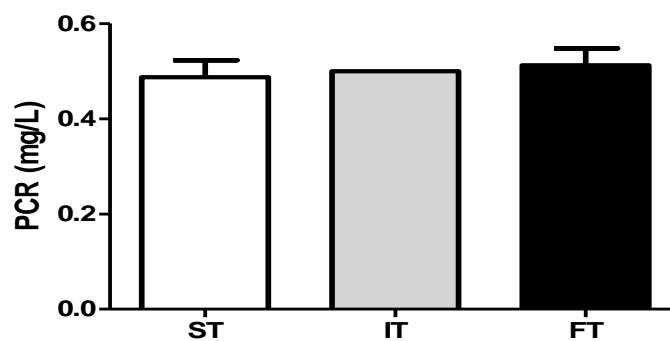
Legenda: No grupo FS (ferida sem tratamento) foi induzida a úlcera, porém não recebeu nenhuma forma de intervenção; o grupo IT (íntegra tratada) não teve indução da úlcera, mas foi realizado tratamento durante 31 dias com fumaça de Artemísia; e o grupo FT (ferida tratada) foi induzida a úlcera e foi feito tratamento por 31 dias com fumaça de Artemísia. Em todos os grupos foi colhido o sangue para a análise de bilirrubina total. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM da concentração de bilirrubina sérica em grupos de 7 animais. Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA seguido de Bonferroni.

#### 4.1.5 Análise das dosagens de PCR e glicemia no modelo de úlcera por pressão em camundongos

Na dosagem da PCR foi observado que todos os grupos apresentaram os mesmos níveis, não havendo diferença significativa entre os grupos (fig 25).

O teste da glicemia apesar não revelar diferenças estatísticas entre os grupos, mostrou um leve aumento entre os animais do grupo, ferida sem tratamento (fig 26).

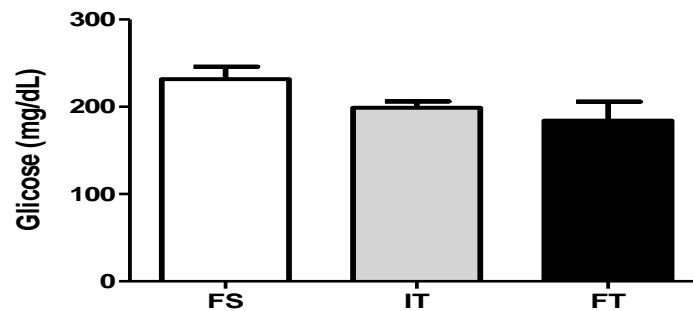
Figura 25 - Efeito da fumaça de *Artemisia vulgaris* sobre as dosagens de PCR (proteína C reativa) no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: No grupo FS (ferida sem tratamento) foi induzida a úlcera, porém não recebeu nenhuma forma de intervenção; o grupo IT (íntegra tratada) não teve indução da úlcera, mas foi realizado tratamento durante 31 dias com fumaça de *Artemisia*; e o grupo FT (ferida tratada) foi induzida a úlcera e foi feito tratamento por 31 dias com fumaça de *Artemisia*. Em todos os grupos foi colhido o sangue para a análise da concentração de PCR no sangue. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM da concentração da PCR sérica de no mínimo 7 animais por grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA seguido de Bonferroni.

Figura 26 - Efeito da fumaça de *Artemísia vulgaris* sobre a dosagem de glicemia no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos



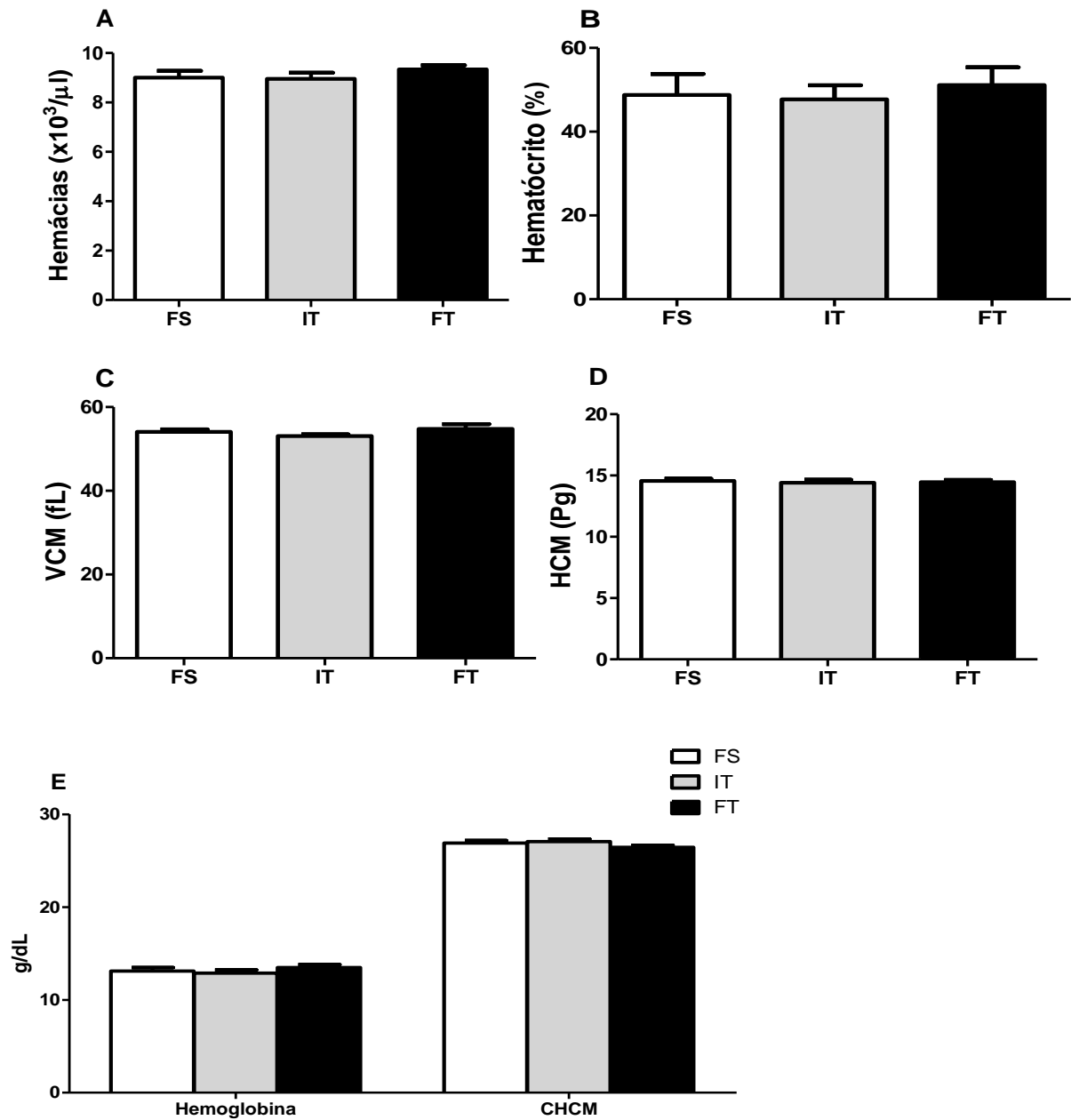
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: No grupo FS (ferida sem tratamento) foi induzida a úlcera, porém não recebeu nenhuma forma de intervenção; o grupo IT (íntegra tratada) não teve indução da úlcera, mas foi realizado tratamento durante 31 dias com fumaça de *Artemísia*; e o grupo FT (ferida tratada) foi induzida a úlcera e foi feito tratamento por 31 dias com fumaça de *Artemísia*. Em todos os grupos foi colhido o sangue para a análise da glicemia. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM da concentração de glicose sérica em grupos de no mínimo 7 animais. Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA seguido de Bonferroni.

#### **4.1.6 Avaliação do hemograma nos camundongos submetidos ao modelo de úlcera por pressão**

Nenhum dos dados que compõem o hemograma apresentou diferença significativa entre os grupos estudados neste teste de toxicidade, todos os grupos mostraram padrões semelhantes no eritrograma (fig. 27), contagem do número total de plaquetas (fig. 28) e no leucograma (fig. 29). Porém foi verificado somente um leve aumento no número de plaquetas e dos leucócitos nos grupos tratados com *artemísia*, mas esses dados não foram estatisticamente diferentes.

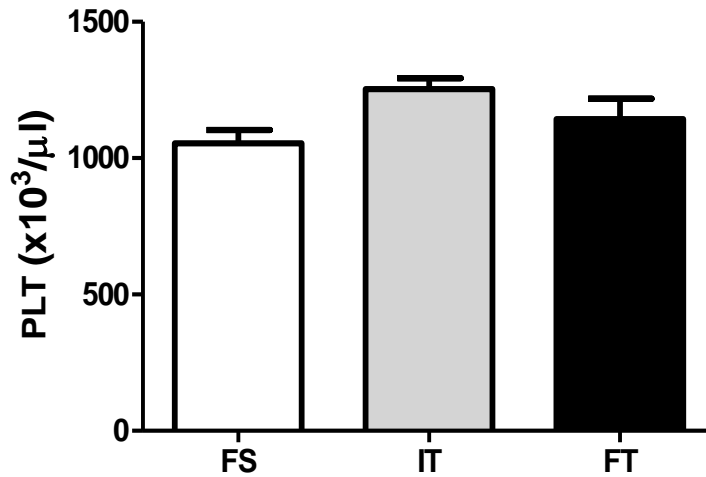
Figura 27 - Efeito da fumaça de *Artemisia vulgaris* sobre os parâmetros do eritrograma no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: No grupo FS (ferida sem tratamento) foi induzida a úlcera, porém não recebeu nenhuma forma de intervenção; o grupo IT (íntegra tratada) não teve indução da úlcera, mas foi realizado tratamento durante 31 dias com fumaça de artemísia; e o grupo FT (ferida tratada) foi induzida a úlcera e foi feito tratamento por 31 dias com fumaça de artemísia. (A) hemácias; (B) hematócrito; (C) VCM (volume corpuscular médio); (D) HCM (hemoglobina corpuscular média); (E) hemoglobina e CHCM (concentração de hemoglobina globular média). Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  DP para o HCT, nos demais resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM dos parâmetros do eritrograma de no mínimo 7 animais. Porém nenhuma diferença significativa entre os grupos foi verificada. ANOVA seguido de Bonferroni.

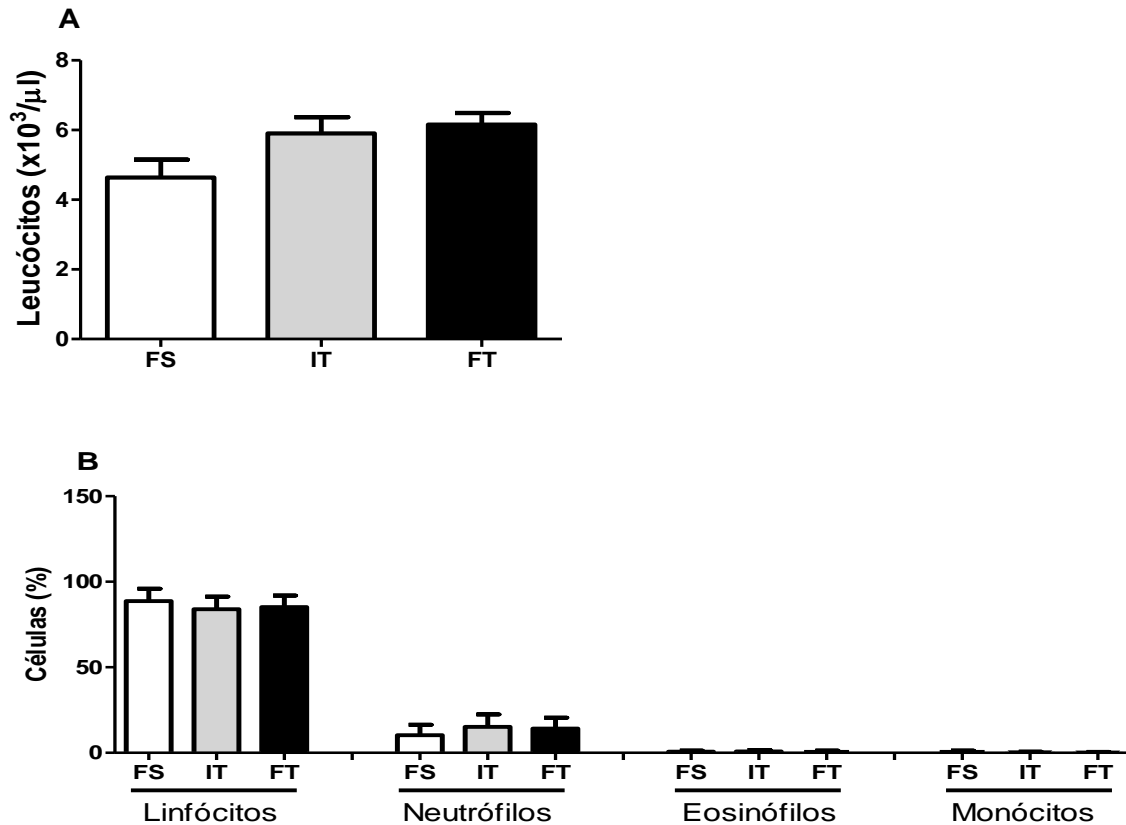
Figura 28 - Efeito da fumaça de *Artemísia vulgaris* sobre a contagem total de plaquetas no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: O grupo FS (ferida sem tratamento) foi induzida a úlcera, porém não recebeu nenhuma forma de intervenção; o grupo IT (íntegra tratada) não teve indução da úlcera, mas foi realizado tratamento durante 31 dias com fumaça de artemísia; e o grupo FT (ferida tratada) foi induzida a úlcera e foi feito tratamento por 31 dias com fumaça de artemísia. PLT (plaquetas). Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM do número de plaquetas em grupos de no mínimo 7 animais. Porém nenhuma diferença significativa entre os grupos foi verificada. ANOVA seguido de Bonferroni.

Figura 29 - Efeito da fumaça de *Artemísia vulgaris* sobre os parâmetros do leucograma no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: No grupo FS (ferida sem tratamento) foi induzida a úlcera, porém não recebeu nenhuma forma de intervenção; o grupo IT (íntegra tratada) não teve indução da úlcera, mas foi realizado tratamento durante 31 dias com fumaça de artemísia; e o grupo FT (ferida tratada) foi induzida a úlcera e foi feito tratamento por 31 dias com fumaça de Artemísia. (A) leucócitos; (B) linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  DP para os linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos. Os resultados de leucócitos foram expressos como média  $\pm$  EPM do número de leucócitos e das porcentagens de cada tipo de leucócito. Porém nenhum mostrou diferença significativa entre os grupos. ANOVA seguido de Bonferroni.

#### 4.1.7 Análise histológica dos rins, fígado, baço e pele

Quanto às análises histopatológicas do rim e do fígado não foi detectado nenhuma alteração morfológica entres os grupos estudados.

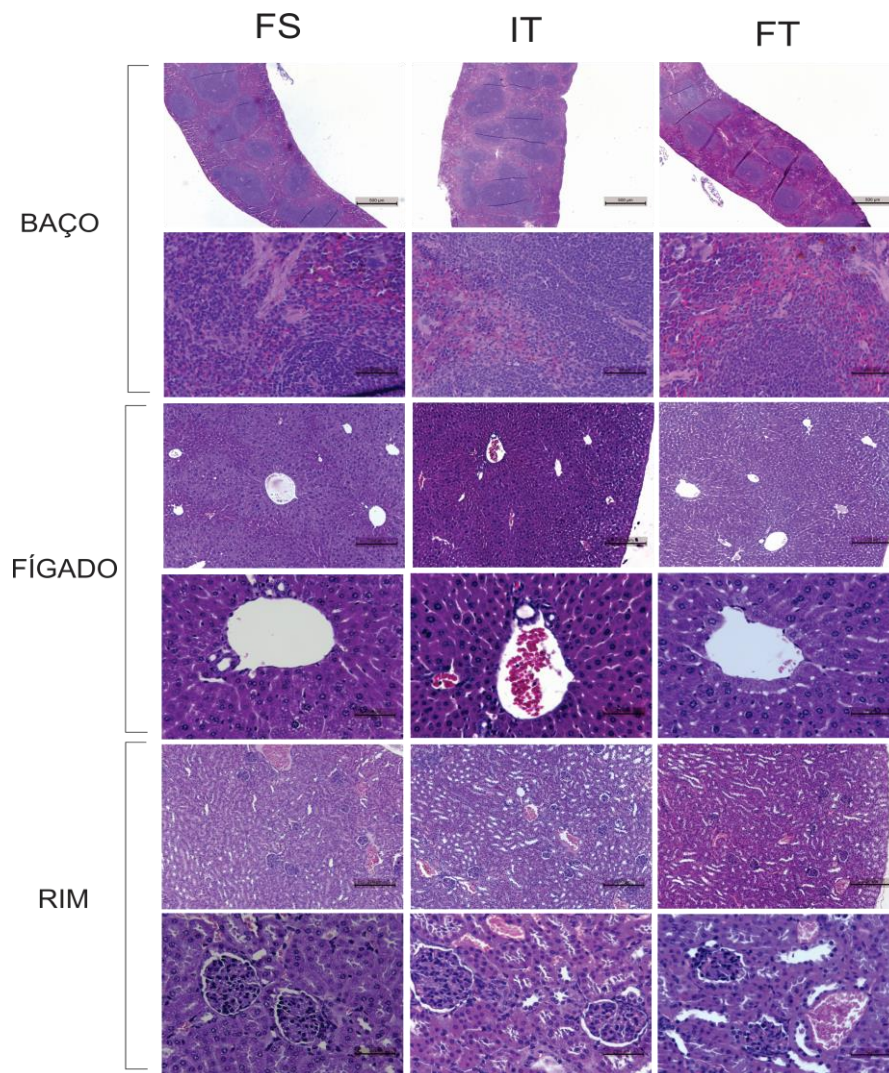
Na análise do baço, a polpa vermelha apresentou-se com seus elementos característicos, como as hemácias, linfócitos, megacariócitos e macrófagos com coloração amarronzada devido à presença de hemossiderina. Na polpa branca, os folículos linfóides apresentaram-se delimitados, com tamanhos variados e alguns com centro germinativo ativo. Observou-se em três animais (de um total de 6) do grupo ferida tratada com fumaça de artemísia, uma redução aparente da polpa

branca. Nesses animais não foi observadas a presença de células apoptóticas ou necróticas.

A análise morfológica da pele não mostrou diferenças entre os grupos do estudo toxicológico, nem quando comparados os grupos do estudo toxicológicos aos grupos de tratamento na avaliação da eficácia de aplicação da fumaça de artemísia.

Não foi verificada a presença de células em apoptose, presença de necrose focal, fibrose ou quaisquer outras alterações significativas na análise histopatológica do fígado, rim, baço (figura 30) e da pele.

Figura 30 – Fotomicrografia dos rins, fígado e baço mostrando os aspectos histopatológicos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: No grupo FS (ferida sem tratamento) foi induzida a úlcera, porém não recebeu nenhuma forma de intervenção; o grupo IT (íntegra tratada) não teve indução da úlcera, mas foi realizado tratamento durante 31 dias com fumaça de artemísia; e o grupo FT (ferida tratada) foi induzida a úlcera e foi feito tratamento por 31 dias com fumaça de Artemísia. Hematoxilina e eosina. Baço 40x e 400x, Fígado 100x e 400x, Rim 100x e 400x.

## **4.2 Avaliação da fumaça de *Artemisia vulgaris* no processo cicatricial no modelo de úlcera por pressão em camundongos**

### **4.2.1 Avaliação dos escores EWAT - EWAT total no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos**

Todos os escores da Escala EWAT foram somados de modo a quantificar a cicatrização de forma geral, avaliando conjuntamente a área, os parâmetros inflamatórios e de debridamento. Os animais foram avaliados no dia 5, 7, 14 e 21 da indução da ferida, nos grupos: Artemísia que recebeu tratamento somente da fumaça de *Artemisia vulgaris* diariamente, artemísia e filme de poliuretano que recebeu além do tratamento da fumaça *Artemisia vulgaris* uma película de filme de poliuretano recobrimo a ferida tratada, com aplicação de ambos em dias alternados, hidrogel e filme de poliuretano neste grupo foi aplicada o hidrogel como curativo primário logo em cima da ferida e como curativo secundário o filme de poliuretano.

No 7º dia pós-indução da UP todos os tratamentos demonstraram diferenças estatísticas dos escores EWAT quando comparados ao grupo controle. Nos dias seguintes de avaliação somente o grupo artemísia recoberto com filme de poliuretano demonstrou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) com relação ao controle, mostrando uma aceleração da cicatrização. No dia 21, foi observada uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) inclusive entre esse grupo e o grupo Hidrogel e filme de poliuretano (tab.1 e fig 31).

### **4.2.2 Análise dos escores EWAT - itens dos parâmetros inflamatórios e debridante no modelo experimental de úlceras por pressão**

Os parâmetros inflamatórios, subgrupo da tabela EWAT, onde são agrupados os itens que indicam inflamação na ferida, juntos mostra, de forma geral e macroscópica, a inflamação presente na ferida.

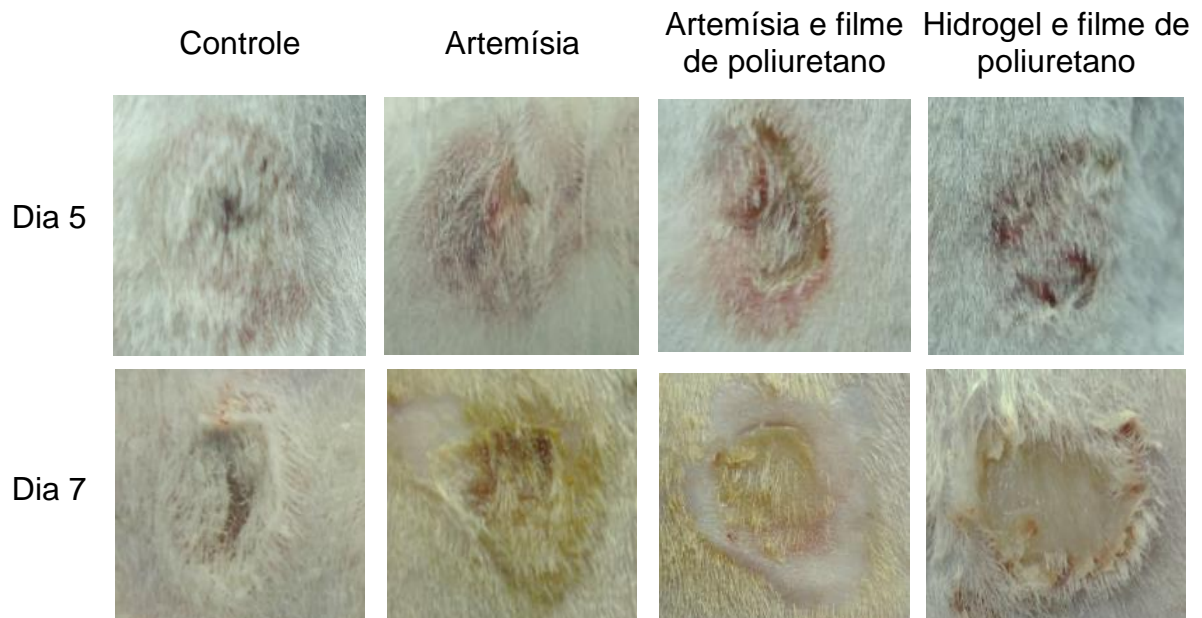
No dia 7 todos os grupos experimentais mostraram uma diferença, em relação ao controle, na diminuição das manifestações inflamatórias presentes na ferida. No 14º dia os grupos tratado com artemísia e artemísia e filme de poliuretano mostraram diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, sendo que o

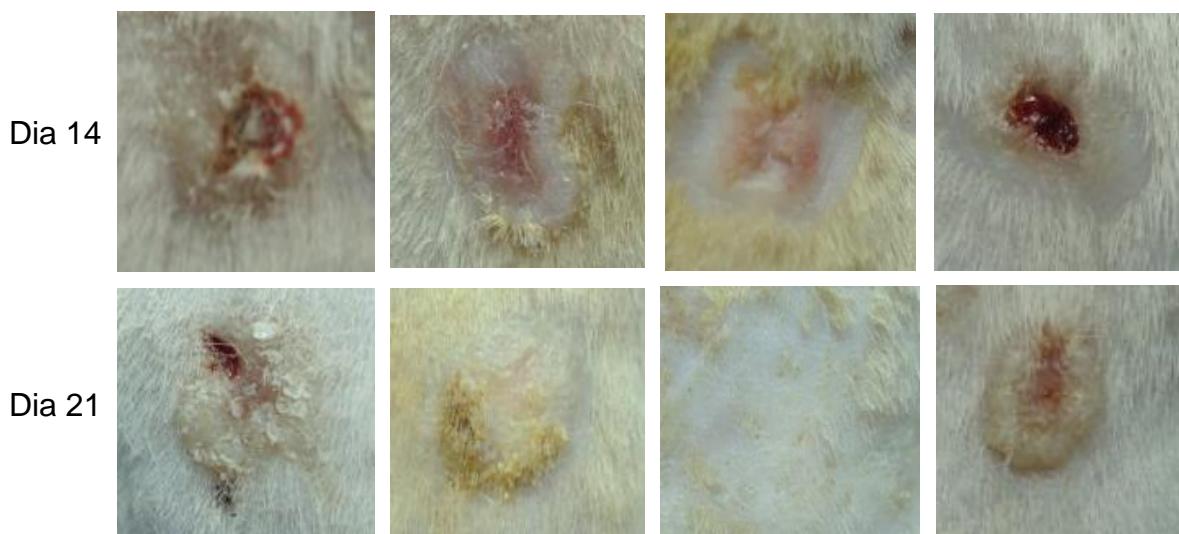
grupo artemísia e filme de poliuretano ainda mostrou diferença estatística quando comparado ao grupo hidrogel e filme de poliuretano. No 21º dia somente o grupo tratado com Artemísia e filme de poliuretano demonstrou diferença significativa ( $p < 0.05$ ) comparada ao controle e ao grupo hidrogel e filme de poliuretano. Sendo assim, foi observado que somente o grupo Artemísia e filme de poliuretano mostraram diferença estatística em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) desde o dia 7 e se estendendo a todos o demais dias até o fim do experimento (tab. 2 e fig 31).

Os parâmetros de debridamento (subgrupo da tabela EWAT) onde são agrupados os itens de tipo de tecido presente na ferida, tipo e quantidade de necrose, quantidade de tecido de granulação, onde os escores gerados indicam sobre a capacidade debridante do produto usado.

Os resultados mostram que apenas o grupo tratado artemísia e filme de poliuretano mostrou capacidade debridante no dia 14 ( $p < 0,05$ ) e superior ao hidrogel que é um debridante autolítico clássico, no dia 21, nos demais dias não apresentou esta propriedade (tab. 3 e fig. 31).

Figura 31 - Fotografias das feridas dos grupos em dias diferentes





Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Fotografias representativas de cada grupo nos dia 5, 7, 14 e 21 dias. As fotos foram retiradas a uma distância de 10 cm entre a objetiva da máquina fotográfica e a ferida.

Tabela 1 - Efeito da fumaça de *Artemisia vulgaris* sobre os aspectos macroscópicos (escores EWAT, somatória total) no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos

| Grupo                            | Dia 5        | Dia 7                      | Dia 14                  | Dia 21                  |
|----------------------------------|--------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Controle                         | 21 (16 – 25) | 20,5 (16 - 23)             | 14 (0 - 19)             | 6 (0 - 18)              |
| Artemísia                        | 21 (15 – 26) | 15,5 (0 - 18) <sup>a</sup> | 6,5 (0 - 19)            | 4 (0 - 17)              |
| Artemísia + Filme de poliuretano | 20 (16 – 25) | 15 (0 - 18) <sup>a</sup>   | 0 (0 - 17) <sup>a</sup> | 0 (0 - 4) <sup>ab</sup> |
| Hidrogel + Filme de poliuretano  | 20 (16 – 26) | 20 (14 – 26) <sup>a</sup>  | 9 (0 - 16)              | 7 (0 - 13)              |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Os números representam a médiana da somatória total dos escores EWAT, com valores máximos e mínimos. Foram avaliadas no mínimo 10 feridas por grupo, ou seja, no mínimo 5 camundongos por grupo.<sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (feridas que não receberam nenhum tratamento); <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com hidrogel e filme de poliuretano (teste de Kruskal-Wallis e teste post hoc de Dunn's).

Tabela 2 - Efeito da fumaça de *Artemisia vulgaris* sobre os aspectos macroscópicos (escores EWAT, somatória dos itens que compõe os parâmetros inflamatórios) no modelo experimental de úlcera por pressão

| Grupo                | Dia 5     | Dia 7                  | Dia 14                  | Dia 21                  |
|----------------------|-----------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Controle             | 6 (2 – 9) | 7 (4 – 8)              | 4 (0 – 7)               | 0,5 (0 – 4)             |
| Artemísia            | 5 (2 – 8) | 2 (0 – 5) <sup>a</sup> | 1 (0 – 5) <sup>a</sup>  | 0 (0 – 2)               |
| Artemísia + Filme de | 5 (3 – 8) | 2 (0 - 4) <sup>a</sup> | 0 (0 – 4) <sup>ab</sup> | 0 (0 – 1) <sup>ab</sup> |

|                                 |           |                        |           |           |
|---------------------------------|-----------|------------------------|-----------|-----------|
| poliuretano                     |           |                        |           |           |
| Hidrogel + Filme de poliuretano | 5 (2 – 7) | 2 (0 – 5) <sup>a</sup> | 2 (0 – 7) | 1 (0 – 5) |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Os números representam a mediana da somatória dos itens que compõem parâmetros inflamatórios da escala (EWAT), com valores máximos e mínimos. Foram avaliadas no mínimo 10 feridas por grupo, ou seja, no mínimo 5 camundongos por grupo.<sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (feridas que não receberam nenhum tratamento); <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com hidrogel e filme de poliuretano (teste de Kruskal-Wallis e teste post hoc de Dunn's).

Tabela 3 - Efeito da fumaça de *Artemisia vulgaris* sobre os aspectos macroscópicos (escores EWAT, somatória dos itens que compõe os parâmetros de debridamento) no modelo experimental de úlcera por pressão

| Grupo                            | Dia 5                    | Dia 7        | Dia 14                  | Dia 21                  |
|----------------------------------|--------------------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| Controle                         | 11 (9 – 13)              | 10 (9 – 12)  | 7 (0 – 13)              | 2 (0 – 10)              |
| Artemísia                        | 10 (9 – 13)              | 9 (0 – 13)   | 3 (0 – 13)              | 2 (0 – 12)              |
| Artemísia + Filme de poliuretano | 11 (9 – 13)              | 9 (0 – 12)   | 0 (0 – 10) <sup>a</sup> | 0 (0 – 2) <sup>ab</sup> |
| Hidrogel + Filme de poliuretano  | 10 (9 – 13) <sup>a</sup> | 8,5 (7 – 14) | 4 (0 – 9)               | 2 (0 – 8)               |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Os números representam a mediana da somatória dos itens que compõem parâmetros de debridamento da escala (EWAT), que são compostos por itens de identificação do tipo de tecido presente (necrótico ou granulação) e a quantidade em relação à área total da ferida, indicando uma possível ação debridante do produto utilizado. Os números entre parênteses indicam os valores máximos e mínimos. Foram avaliados no mínimo 10 feridas por grupo, ou seja no mínimo 5 camundongos por grupo.<sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (feridas que não receberam nenhum tratamento); <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com hidrogel e filme de poliuretano (teste de Kruskal-Wallis e teste post hoc de Dunn's).

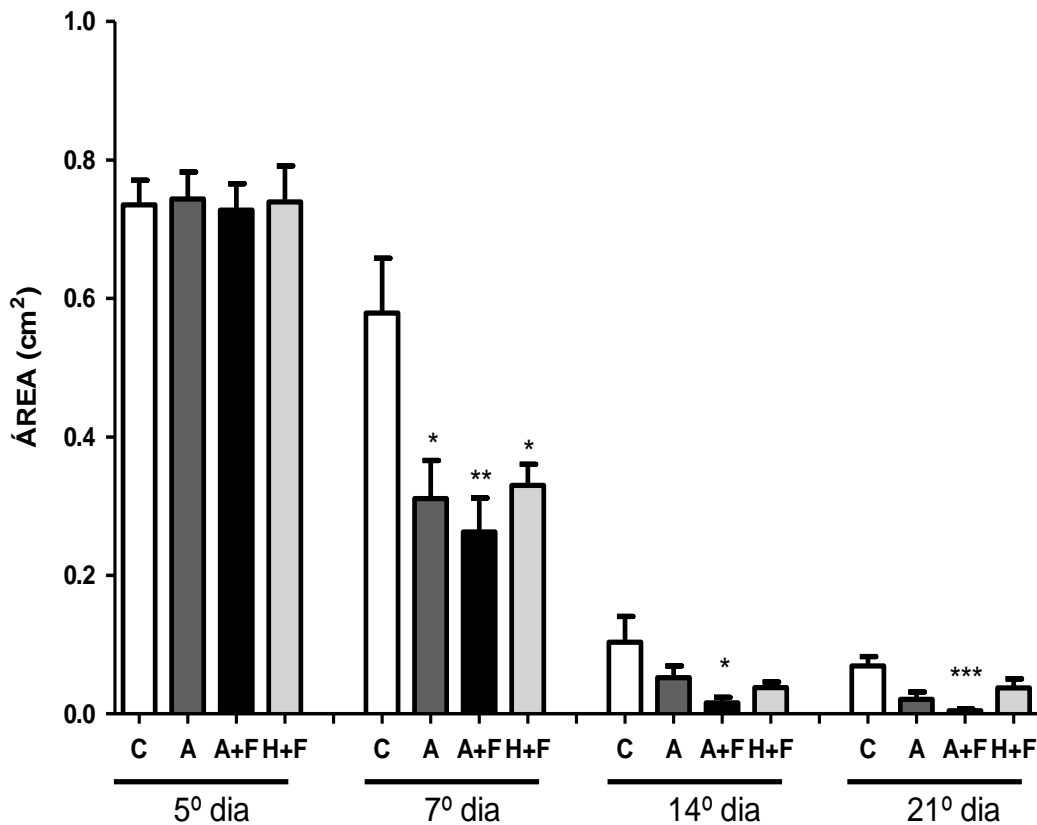
#### 4.2.3 Análise do tamanho da ferida área e percentagem de contração da ferida no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos

A avaliação do tamanho da área da úlcera no dia 5 foi muito homogênea. Porém, a partir do 7º dia todos os grupos experimentais mostraram diferença estatística com relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), que foi mais acentuado no grupo da artemísia e filme de poliuretano, e este grupo, durante os outros dias, mostrou um resultado melhor no quesito de reepitelização do tecido ulcerado, com diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (fig 32).

O percentual de contração da ferida mostra a relação do fechamento de cada ferida em relação ao seu tamanho inicial. O grupo controle e o tratamento com

artemísia mostraram resultados semelhantes até o 14º dia (média - 71,25% vs 72,04%). Concomitantemente, os grupos tratados com artemísia e filme de poliuretano e hidrogel e filme de poliuretano mostraram um percentual maior do que aos demais grupos até o 14º dia porém esse resultado não mostrou diferença significativa. Já no 21º dia o grupo artemísia e filme de poliuretano mostrou um percentual de contração maior que todos os outros grupos, sendo diferente estaticamente do grupo controle ( $p < 0,05$ ) (média - 98,31% vs 84,64%). (fig.33).

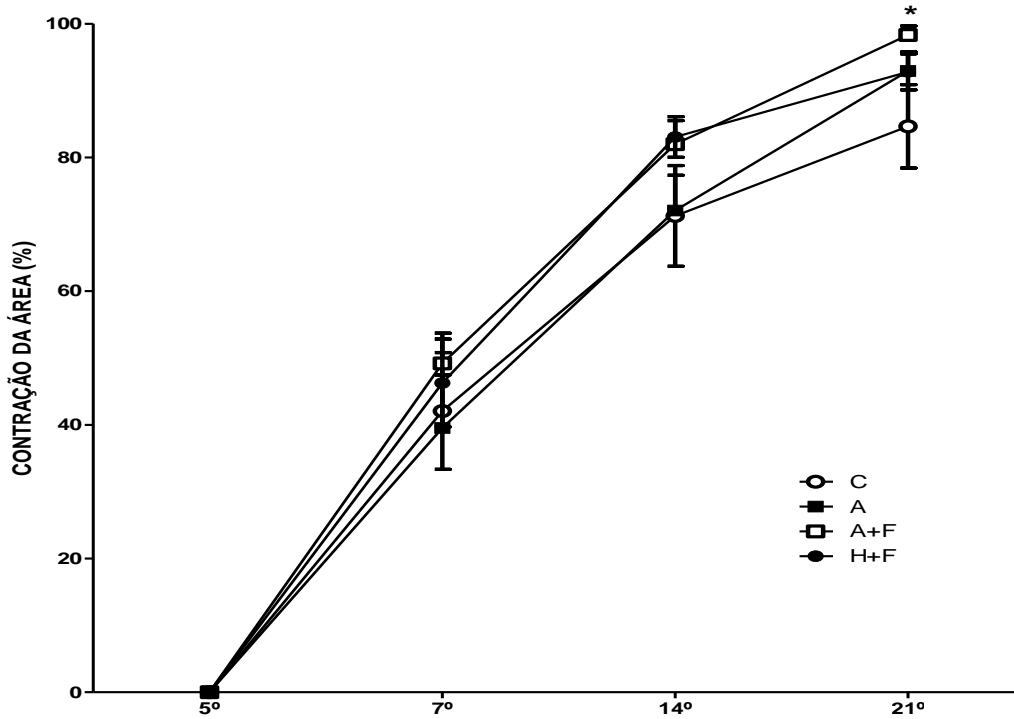
Figura 32 - Efeito da fumaça de *Artemisia vulgaris* sobre a área da ferida ( $\text{cm}^2$ ) no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Foram avaliados os grupos controle (C; com úlcera e sem tratamento); grupo fumaça de artemísia (A; com úlcera e tratado); grupo fumaça de artemísia e filme de poliuretano (A+F; com úlcera e tratado); grupo hidrogel e filme de poliuretano (H+F; com úlcera e tratado). O tamanho da área da ferida foi avaliado nos dias 5, 7, 14 e 21 após o primeiro dia de indução da úlcera por pressão, de no mínimo 10 feridas por grupo. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle (C) (ANOVA seguido de Bonferroni).

Figura 33 - Efeito da fumaça de *Artemisia vulgaris* sobre percentagem de contração da ferida no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Foram avaliados os grupos controle (C; com úlcera e sem tratamento); grupo fumaça de artemísia (A; com úlcera e tratado); grupo fumaça de artemísia e filme de poliuretano (A+F; com úlcera e tratado); grupo hidrogel e filme de poliuretano (H+F; com úlcera e tratado). Foi avaliada a área de contração das feridas nos dias 5, 7, 14 e 21 após o primeiro dia de indução da úlcera por pressão, de no mínimo 10 feridas por grupo. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle (Teste T).

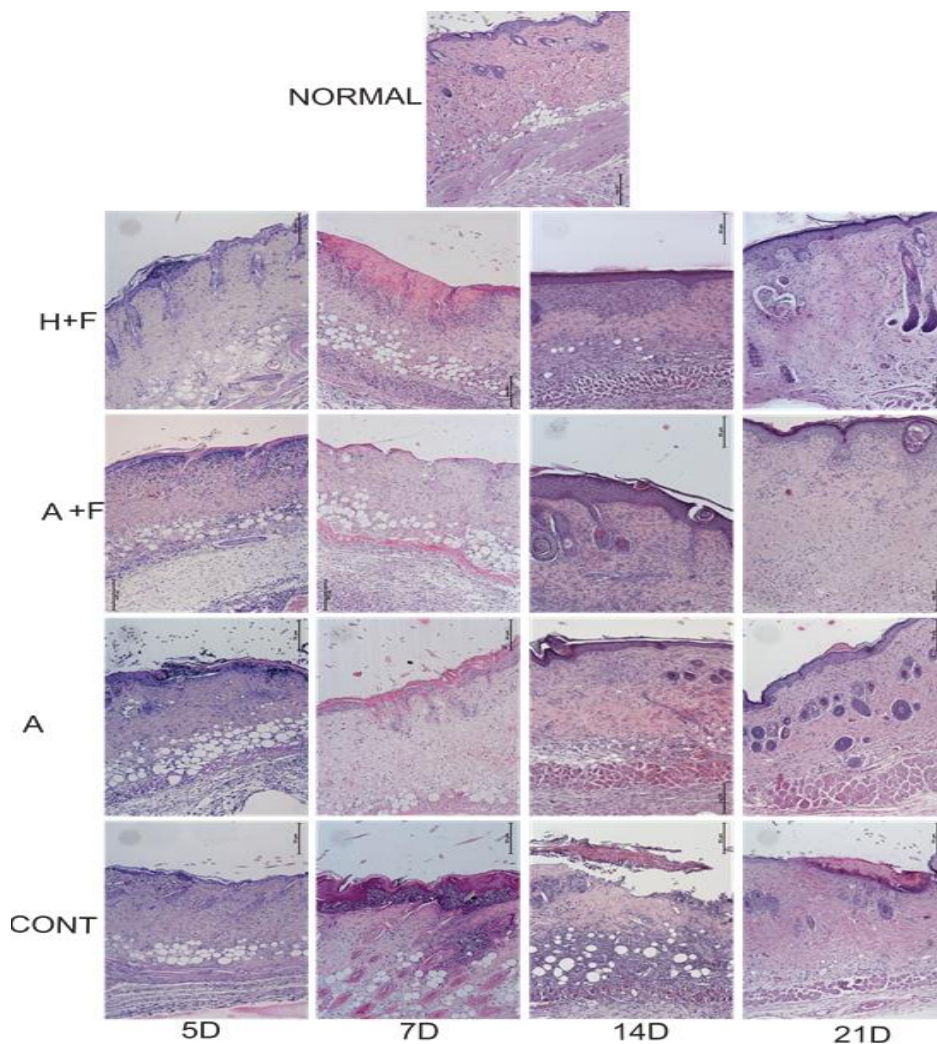
#### 4.2.4 Avaliação histopatológica no modelo de úlcera por pressão em camundongos

O padrão do infiltrado inflamatório mostrou a princípio, uma predominância de polimorfonucleares no 5º e 7º dias em todos os grupos. Passando a um infiltrado misto, tanto de polimorfonucleares como mononuclear ao mesmo tempo presente na ferida, no 14º em todos os grupos. No último dia do experimento, 21º dia, os grupos tratados com fumaça de artemísia e com fumaça de artemísia e filme de poliuretano não apresentaram infiltrado inflamatório, já no grupo controle 3 feridas mostraram infiltrado polimorfonucleares, 1 ferida com infiltrado mononuclear e 1 mista, e no grupo hidrogel e filme de poliuretano foi visto 2 feridas com infiltrado de polimorfonucleares no 21º dia.

Com relação aos escores desse infiltrado, somente no 21º dia foi verificado uma diferença significativa entre os animais do grupo controle e os grupos tratados com fumaça de artemísia ( $p < 0,05$ ). O mesmo resultado foi visto quando comparado o controle com o grupo fumaça de artemísia e filme de poliuretano ( $p < 0,05$ ) (tab. 4 e fig. 34).

Os escores de hemorragia mostraram uma diferença significativa nos grupos de aplicação de fumaça de artemísia ( $p < 0,05$ ) e o grupo de aplicação de fumaça de artemísia e filme de poliuretano ( $p < 0,01$ ), quando comparados ao controle no 14º dia. No 21º dia os grupos tratados com fumaça de artemísia e fumaça de artemísia e filme de poliuretano não apresentaram mais hemorragia, porém nesse dia não apresentaram significância estatística (tab. 5 e fig. 34).

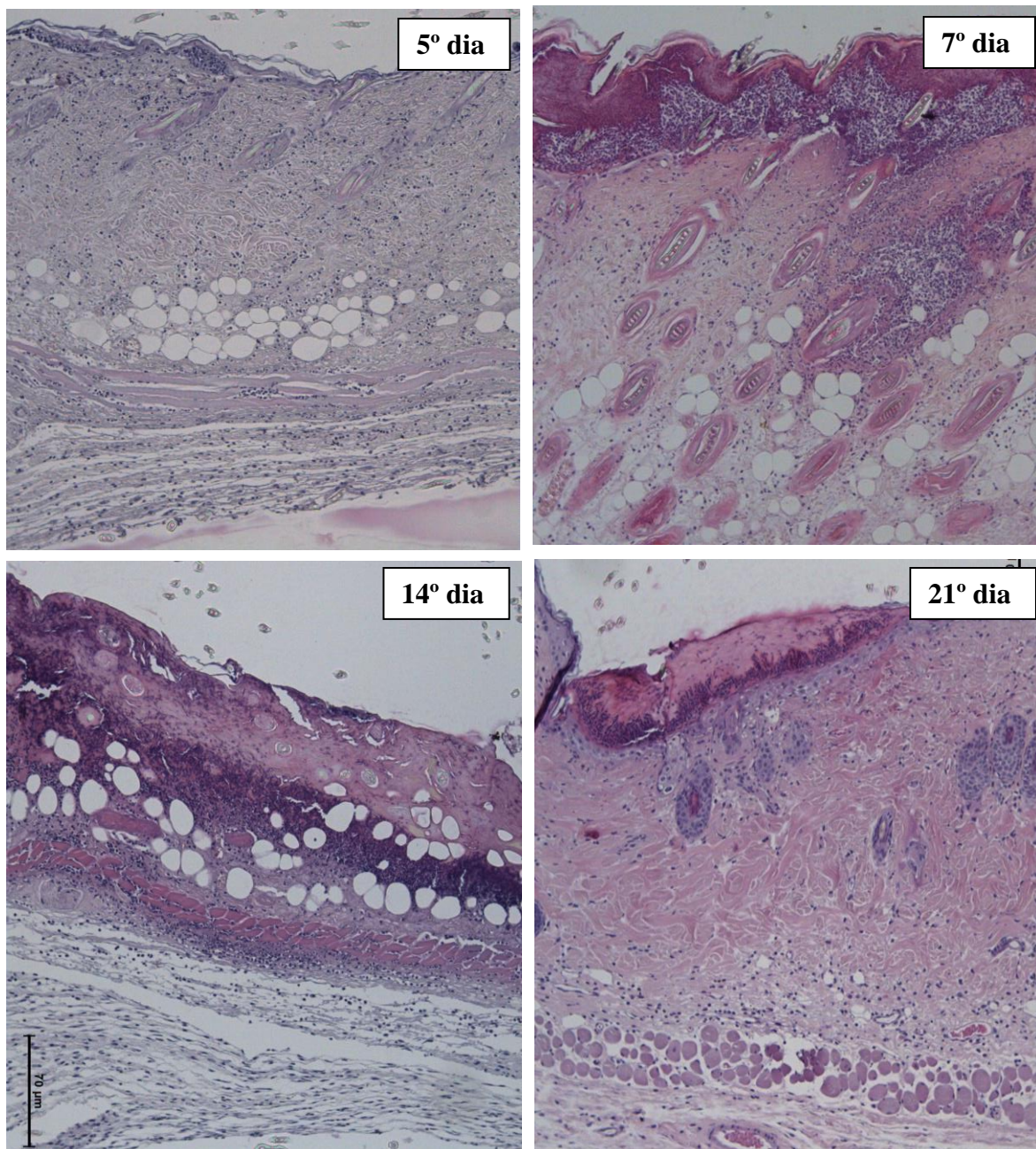
Figura 34 – Fotomicrografia da pele mostrando os aspectos histopatológicos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Coloração por hematoxilina e eosina 100x. H+F (hidrogel e filme de poliuretano), A+F (Artemísia e filme), A (artemisia) e CONT (controle).

Figura 35 - Ampliação da fotomicrografia mostrando aspectos histopatológicos do grupo controle



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Ampliação das fotomicrografias do grupo controle no 5º dia, 7º dia, 14º dia e 21º dia após a indução da úlcera por pressão, mostrando os detalhes histopatológicos em cada fase. Coloração por hematoxilina e eosina 100x. Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 4 – Efeito da fumaça de *Artemisia vulgaris* sobre os escores histopatológicos de infiltrado de celular inflamatório no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos

| Grupo                            | Dia 5     | Dia 7     | Dia 14      | Dia 21     |
|----------------------------------|-----------|-----------|-------------|------------|
| Controle                         | 3 (3 – 3) | 3 (3 - 3) | 1,5 (1 - 3) | 1 (1 - 2)  |
| Artemísia                        | 3 (2 – 3) | 3 (2 - 3) | 1 (1 - 3)   | 0 (0 - 0)* |
| Artemísia + Filme de poliuretano | 3 (3 – 3) | 3 (2 - 3) | 1 (0 - 3)   | 0 (0 - 0)* |
| Hidrogel + Filme de poliuretano  | 3 (2 – 3) | 3 (1 – 3) | 1 (1 - 3)   | 0 (0 - 2)  |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Os números representam a mediana da somatória total dos escores de infiltrado celular inflamatório, onde os com valores máximos e mínimos. Foram avaliados no mínimo 4 feridas por grupo. \*p<0,05 comparado ao grupo controle (feridas que não receberam nenhum tratamento) (teste de Kruskal-Wallis e teste post hoc de Dunn's).

Tabela 5 – Efeito da fumaça de *Artemisia vulgaris* sobre os escores histopatológicos de hemorragia no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos

| Grupo                            | Dia 5     | Dia 7       | Dia 14      | Dia 21    |
|----------------------------------|-----------|-------------|-------------|-----------|
| Controle                         | 1 (0 – 1) | 1 (0 - 1)   | 1 (1 - 2)   | 0 (0 - 1) |
| Artemísia                        | 2 (0 – 2) | 0,5 (0 - 1) | 0 (0 - 1)*  | 0 (0 - 0) |
| Artemísia + Filme de poliuretano | 1 (0 – 1) | 0 (0 - 0)   | 0 (0 - 0)** | 0 (0 - 0) |
| Hidrogel + Filme de poliuretano  | 1 (0 – 1) | 0,5 (0 – 1) | 0,5 (0 - 1) | 0 (0 - 0) |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Os números representam a mediana da somatória total dos escores de hemorragia, onde os com valores máximos e mínimos. Foram avaliados no mínimo 4 feridas por grupo. \*p<0,05, \*\*p<0,01 comparado ao grupo controle (feridas que não receberam nenhum tratamento) (teste de Kruskal-Wallis e teste post hoc de Dunn's).

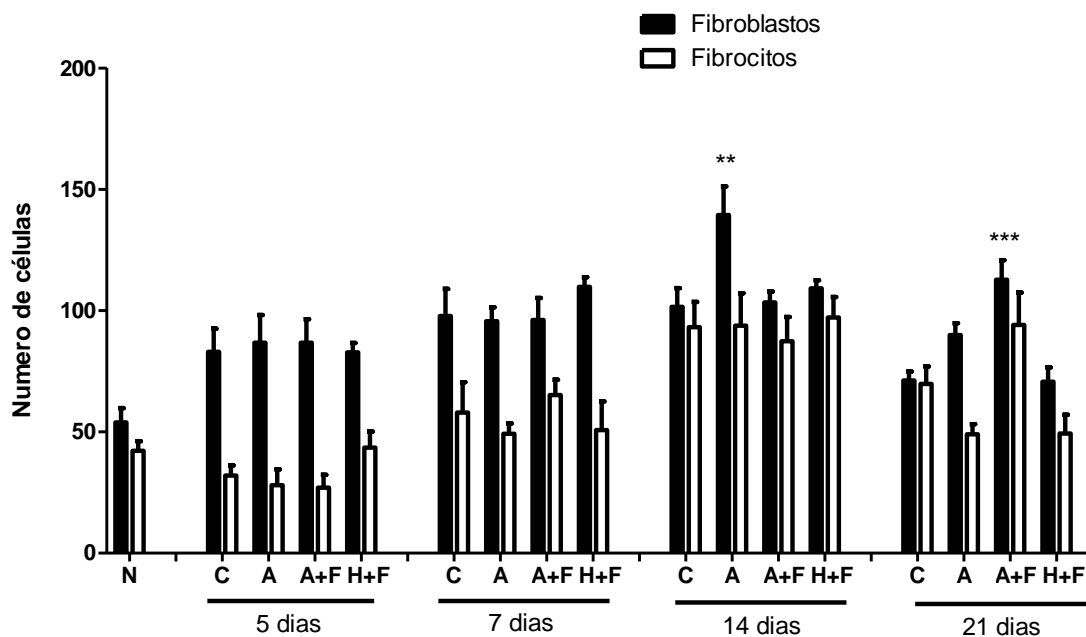
#### 4.2.5 Avaliação da fibroplasia no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos

O número de fibrócitos atingiu um pico no dia 14, diminuindo no 21º dia. Neste estudo foi visto nenhuma alteração significativa no número de fibrócitos entre

os grupos, apesar de que no dia 21 ter havido um aumento na quantidade desta célula no grupo artemísia e filme de poliuretano, mas sem diferença estatística.

Já a contagem de fibroblastos mostrou somente um aumento discreto no dia 7 com pico no dia 14. O tratamento com fumaça de artemísia, no dia 14 (fig 36), aumentou o número de fibroblastos de modo significativo quando comparado ao controle ( $p < 0,01$ ) assim como o tratamento com fumaça de artemísia e filme de poliuretano também aumentou o número dessas células, de modo significativo no 21º dia ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao controle (fig 36 e fig 37).

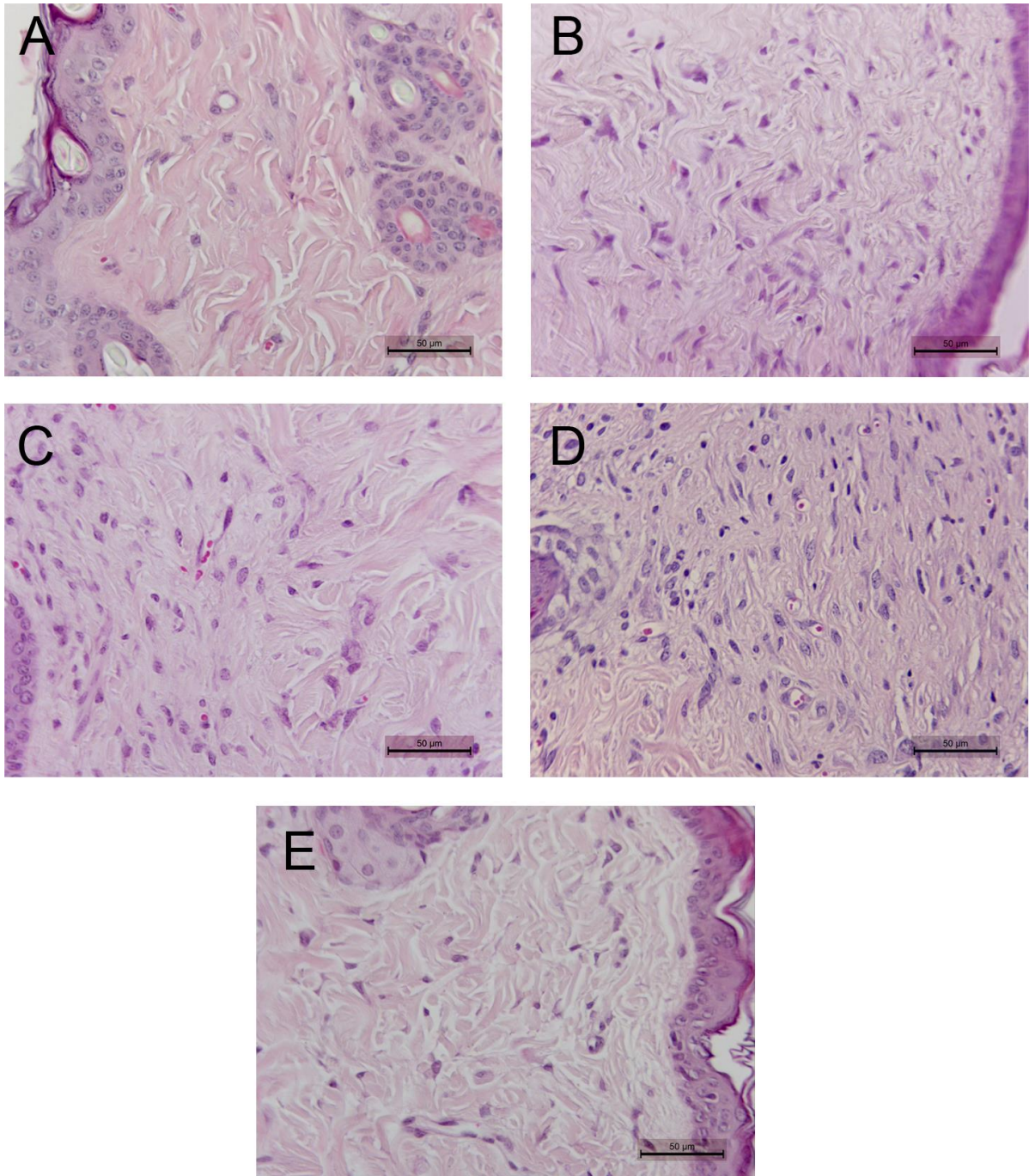
Figura 36 - Efeito da fumaça de *Artemísia vulgaris* sobre o número de fibroblastos e fibrócitos presentes no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Foram avaliados os grupos controle (C; com úlcera e sem tratamento); grupo fumaça de artemísia (A; com úlcera e tratado); grupo fumaça de artemísia e filme de poliuretano (A+F; com úlcera e tratado); grupo hidrogel e filme de poliuretano (H+F; com úlcera e tratado) e um grupo de animais sem úlcera e sem tratamento (N). Foi contado o número de fibroblastos e fibrócitos de cada ferida nos dias 5, 7, 14 e 21 após o primeiro dia de indução da úlcera por pressão de no mínimo 7 feridas por grupo. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao controle (ANOVA seguido de Bonferroni).

Figura 37 - Fotomicrografias da cicatriz evidenciando a presença de fibroblastos e fibrociotona derme



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Pele íntegra na região do dorso de camundongos que não foi induzida úlcera nem tratado (A), animal com indução de úlcera sem tratamento (B), indução de úlcera tratado com artemisia (C), indução da úlcera e tratamento com artemisia e filme de poliuretano (D) e indução de úlcera e tratamento com hidrogel e filme de poliuretano (E). Todas as lâminas são de úlceras no 21º após indução com o modelo não invasivo. Hematoxilina & Eosina – 400x.

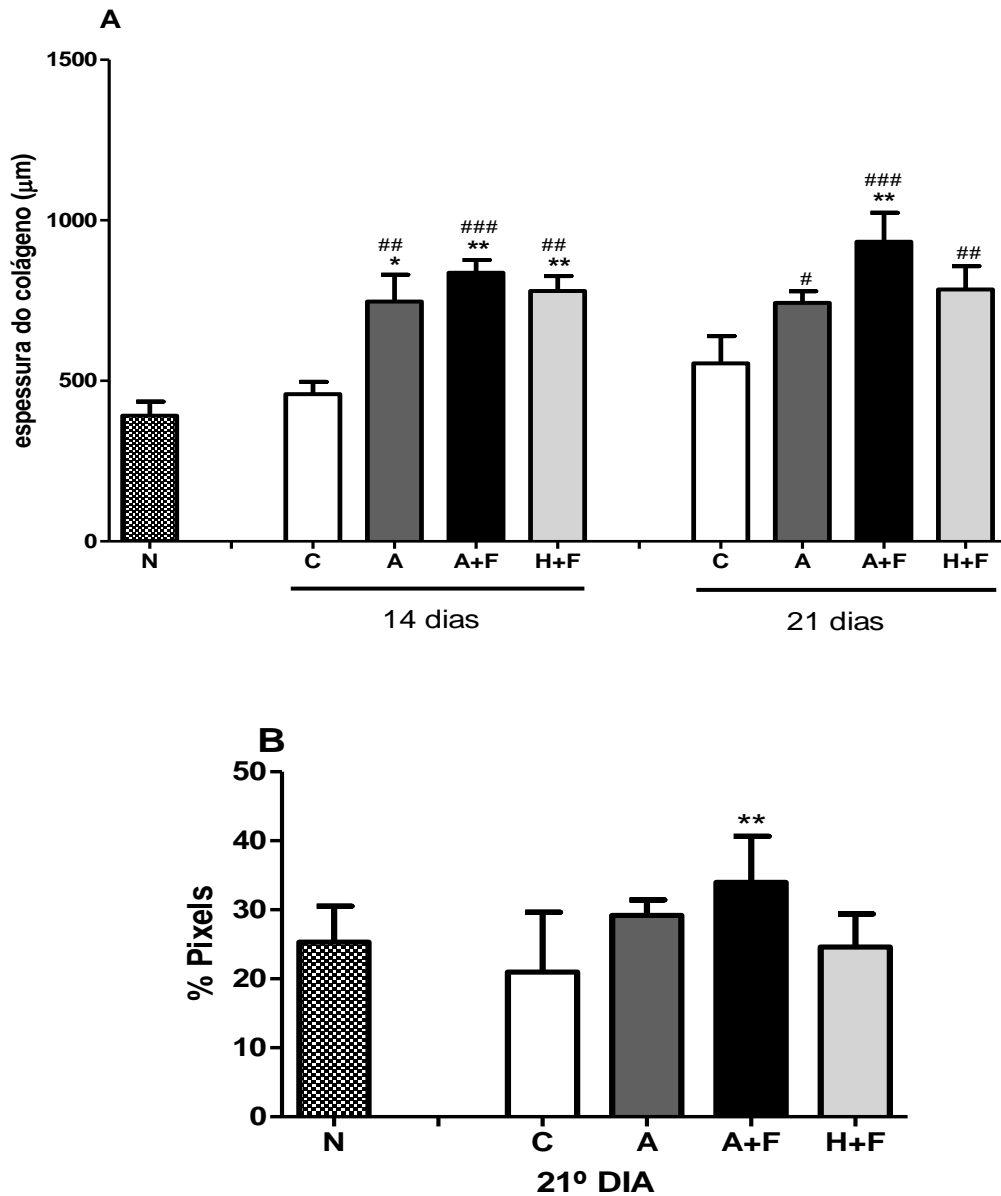
#### **4.2.6 Análise da colagênese no modelo de úlcera por pressão em camundongos**

Foi verificado no dia 14 um aumento significativo na quantidade de colágeno em todos os grupos experimentais em relação ao controle, sendo que nos grupos artemísia e filme de poliuretano e hidrogel e filme de poliuretano este aumento foi mais intenso ( $p < 0,01$ ) que o grupo artemísia ( $p < 0,05$ ) (fig. 38A e fig 39).

No dia 21, nos grupos artemísia e hidrogel, a quantidade de colágeno permaneceu elevada, porém este aumento não foi significativo. Somente o grupo artemísia e filme de poliuretano permaneceu com o aumento significativo na camada de colágeno em relação ao controle. Os demais grupos tratados, fumaça de artemísia e o hidrogel e filme de poliuretano, apresentaram diferença significativa somente em relação ao grupo normal ( $p < 0,05$ ) e ( $p < 0,01$ ) respectivamente.

Em relação à densidade do colágeno no 21º dia o grupo fumaça de artemísia e filme de poliuretano mostrou diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,01$ ), nos demais grupo não foi verificada diferença estatística (fig 38B).

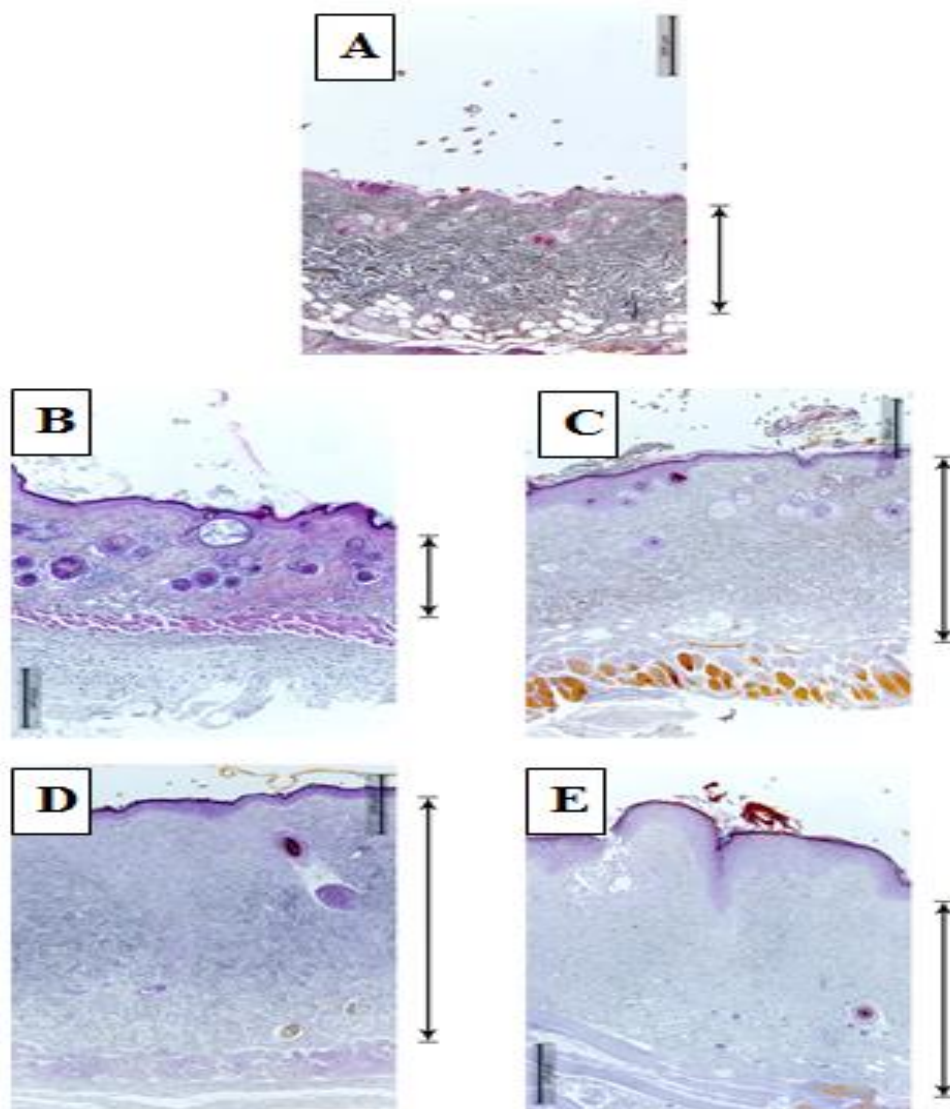
Figura 38 - Efeito da fumaça de *Artemísia vulgaris* sobre a síntese de colágeno no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Foi medida a espessura do colágeno na derme (painel A) e a densidade do colágeno, através da porcentagem de pixels de coloração azul do tricrômio de Mallory (painel B) em fotomicrografias. Foram avaliados os grupos controle (C; com úlcera e sem tratamento); grupo fumaça de artemísia (A; com úlcera e tratado); grupo fumaça de artemísia e filme de poliuretano (A+F; com úlcera e tratado); grupo hidrogel e filme (H+F; com úlcera e tratado) e um grupo de animais sem úlcera e sem tratamento (N), nos dias 14 e 21 (painel A) e no dia 21 (painel B) após o primeiro dia de indução da úlcera por pressão. Foram avaliados no mínimo 5 feridas por grupo. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , comparado ao controle (ANOVA seguido de Bonferroni) (painel A). #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo N (Teste t de Student), e como média  $\pm$  o DP. \*\*  $p < 0,01$  (painel B).

Figura 39 - Fotomicrografia mostrando a camada de colágeno na derme



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Fotomicrografia da pele do dorso de camundongos: grupo normal - sem indução de úlcera nem tratado (A), grupo controle - com indução de úlcera sem tratamento (B), grupo artemísia - indução de úlcera tratado com artemísia (C), grupo artemísia e filme de poliuretano - indução da úlcera e tratamento com artemísia e filme de poliuretano (D) e grupo hidroel e filme de poliuretano - indução de úlcera e tratamento com hidrogel e filme de poliuretano (E). Todas as lâminas são de úlceras no 21º após indução com o modelo não invasivo. Tricrômio de Mallory – 100x.

#### 4.2.7 Avaliação da espessura da epiderme no modelo de úlcera por pressão em camundongos

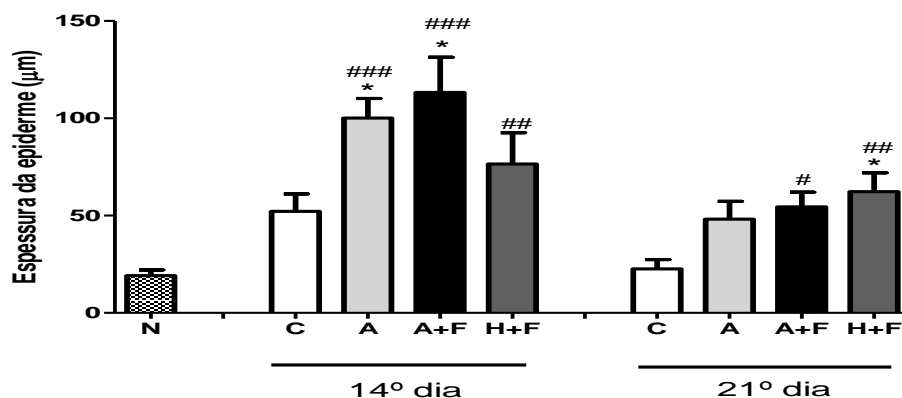
Foi observado um aumento na espessura da epiderme da cicatriz no dia 14 em todos os grupos do estudo e no dia 21 ocorreu uma diminuição dos valores

encontrados na mensuração da espessura da epiderme, fato este verificado em todos os grupos estudados.

Em relação ao dia 14, os animais tratados com Artemísia e Artemísia e filme de poliuretano, mostraram diferença estatística tanto com o grupo controle ( $p < 0,05$ ) como no grupo de animais normais sem indução e sem tratamento ( $p < 0,001$ ). Os animais do grupo tratado com hidrogel e filme de poliuretano mostraram diferença significativa somente quando comparados aos animais do grupo normal ( $p < 0,01$ ).

No dia 21 ocorreu uma redução geral na espessura da epiderme em todos os grupos, porém as mensurações dos animais do grupo hidrogel e filme de poliuretano mostraram diferença significativa tanto com relação aos animais do grupo controle ( $p < 0,05$ ) como os animais do grupo normal ( $p < 0,01$ ). Já nos animais do grupo artemísia e filme de poliuretano, houve diferença estatística somente em relação aos do grupo normal ( $p < 0,05$ ) (fig 40 e fig 41).

Figura 40 - Efeito da fumaça de *Artemísia vulgaris* sobre a espessura da epiderme no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Foram realizadas 10 medidas do tamanho da camada celular da epiderme em fotomicrografias com aumento de 400X na região da cicatriz. Foram avaliados os grupos controle (C; com úlcera e sem tratamento); grupo fumaça de artemísia (A; com úlcera e tratado); grupo fumaça de artemísia e filme de poliuretano (A+F; com úlcera e tratado); grupo hidrogel e filme de poliuretano (H+F; com úlcera e tratado) e um grupo de animais sem úlcera e sem tratamento (N). As feridas foram avaliadas nos dias 14 e 21 após o primeiro dia de indução da úlcera por pressão de, no mínimo, 5 feridas por grupo. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ , comparado ao controle. ##  $P < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo normal (ANOVA seguido de Bonferroni).

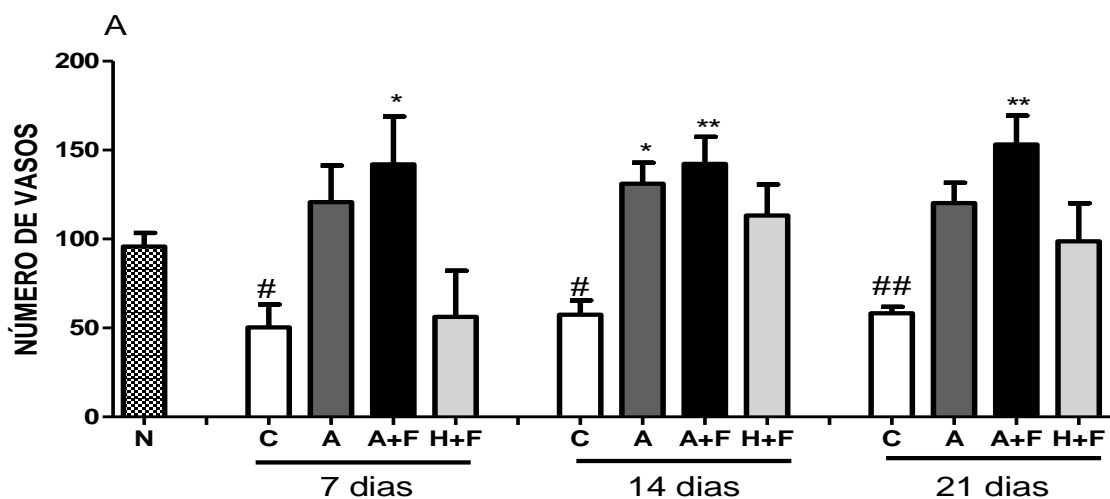


número de vasos no dia 7, 14 ( $p < 0,05$ ) e 21 ( $p < 0,01$ ), em relação aos animais normais, com pele íntegra sem indução de úlcera (fig. 42).

Foi observado que no dia 7 o tratamento com artemísia e filme de poliuretano aumentou de forma significativa o número de vasos ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, o tratamento com artemísia também aumentou o número de vasos, porém não de forma significativa. No 14º dia, que corresponde ao período proliferativo, tanto o tratamento com artemísia como o artemísia e filme de poliuretano demonstraram uma maior contagem de vasos comparado ao grupo tratado com hidrogel e também ao grupo controle ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ , respectivamente) (fig 42). Esses dados sugerem um aumento no suprimento sanguíneo no tecido dos animais tratados.

No dia 21 somente o grupo tratado com artemísia e filme de poliuretano mostrou uma maior contagem do número de vasos na derme, tendo um aumento significativo em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ).

Figura 42 - Efeito da fumaça de *Artemísia vulgaris* sobre o número de vasos sanguíneos e área dos vasos no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos



Fonte: Elaborada pelo autor.

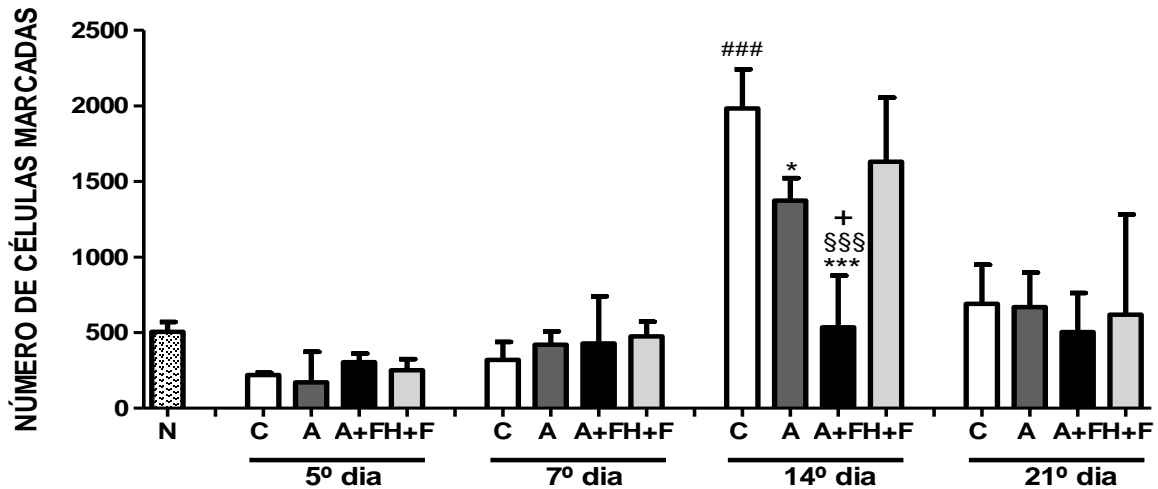
Legenda: Foram avaliados os grupos controle (C; com úlcera e sem tratamento); grupo fumaça de artemísia (A; com úlcera e tratado); grupo fumaça de artemísia e filme de poliuretano (A+F; com úlcera e tratado); grupo hidrogel e filme de poliuretano (H+F; com úlcera e tratado) e um grupo de animais sem úlcera e sem tratamento (N). Os vasos foram quantificados em 3 campos, com aumento de 400X na região da derme no leito da ferida ou na região da cicatriz nos dias 7, 14 e 21 após o primeiro dia de indução da úlcera por pressão de, no mínimo, 5 feridas por grupo. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , comparado ao controle (ANOVA seguido de Bonferroni). #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  comparado ao grupo N (Teste t de Student).

#### **4.2.9 Avaliação da imunoexpressão de NOSi e de nitrotirosina no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos**

A expressão da NOSi no grupo com úlcera e sem tratamento (controle) teve um aumento gradativo até o pico máximo no dia 14 ( $p < 0,001$ ), em comparação com o grupo normal (animais sem lesão). Nesse dia tanto a artemísia como a artemísia e filme de poliuretano foram capazes de diminuir a expressão dessa enzima de forma significativa ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) quando comparadas ao grupo controle do dia. Dentre os tratamentos o grupo que recebeu Artemísia e filme de poliuretano demonstrou o máximo de inibição da expressão de NOSi ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao controle, sendo inclusive diferente estatisticamente do grupo tratado com hidrogel e filme de poliuretano ( $p < 0,001$ ) e do grupo tratado somente com artemísia ( $p < 0,05$ ; figs 43 e 44).

A nitrotirosina reflete a ação dos radicais livres de nitrogênio onde se observa um aumento gradual no grupo controle de forma semelhante à expressão de NOSi, tendo o pico significativo ( $p < 0,01$ ) no dia 14 quando comparado ao grupo normal (sem ferida). Porém no dia 5 todos os grupos artemísia, e artemísia e filme de poliuretano mostraram uma menor marcação para nitrotirosina ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente) e também no dia 14 que é o pico de marcação no grupo controle. Sendo que nesse dia apenas o grupo artemísia e filme de poliuretano demonstrou uma diminuição significativa da marcação para nitrotirosina quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). Além disso, no dia 7 houve uma diferença estatística entre os grupos Artemísia e filme de poliuretano e hidrogel ( $p < 0,05$ ) (fig 44). O 21º dia mostra uma diminuição da marcação de nitrotirosina no grupo controle não havendo diferenças estatísticas entre esse grupo e os grupos tratados (figs 43, 44 e 45).

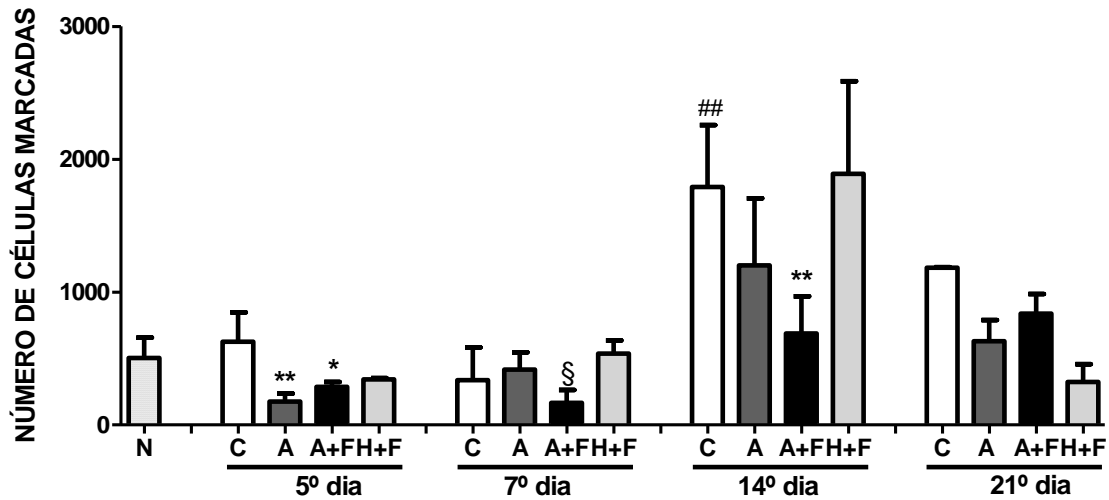
Figura 43 - Efeito da fumaça de *Artemísia vulgaris* sobre a imunexpressão de NOSi no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Foram avaliados os grupos controle (C; com úlcera e sem tratamento); grupo fumaça de artemísia (A; com úlcera e tratado); grupo fumaça de artemísia e filme de poliuretano (A+F; com úlcera e tratado); grupo hidrogel e filme de poliuretano (H+F; com úlcera e tratado) e um grupo de animais sem úlcera e sem tratamento (N). As células marcadas para NOSi foram contadas em 10 campos com aumento de 1000X na região da derme no leito da ferida ou na região da cicatriz. Foi avaliada a quantidade de células marcadas nos dias 5, 7, 14 e 21 após o primeiro dia de indução da úlcera por pressão de, no mínimo, 4 feridas por grupo. Os resultados estão apresentados como a média ± EPM. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle 14 dias; ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo normal (N), §§§  $p < 0,001$  comparado ao grupo H+F e +  $p < 0,05$  comparado ao grupo artemísia (A) (ANOVA seguido de Bonferroni).

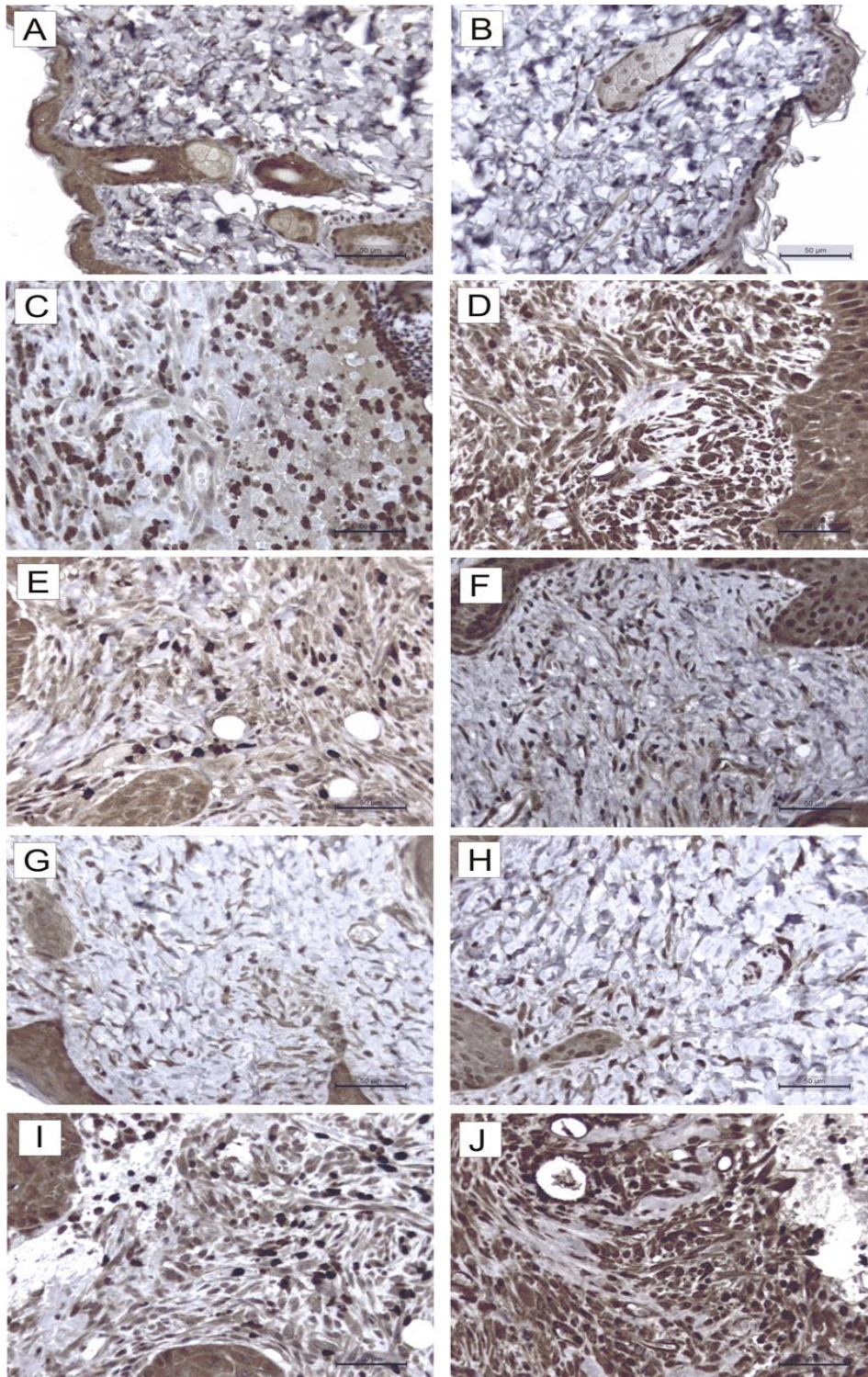
Figura 44 – Efeito da fumaça de *Artemísia vulgaris* sobre a imunoeexpressão de nitrotirosina no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlceras por pressão em camundongos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Foram avaliados os grupos controle (C; com úlcera e sem tratamento); grupo fumaça de artemísia (A; com úlcera e tratado); grupo fumaça de artemísia e filme (A+F; com úlcera e tratado); grupo hidrogel e filme de poliuretano (H+F; com úlcera e tratado) e um grupo de animais sem úlcera e sem tratamento (N). Foram contadas as células marcadas para nitrotirosina em 10 campos com aumento de 1000X na região da derme no leito da ferida ou na região da cicatriz. Foi avaliada a quantidade de células marcadas nos dias 5, 7, 14 e 21 após o primeiro dia de indução da úlcera por pressão. Foram avaliados no mínimo 4 feridas por grupo por grupo. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  comparado ao grupo Controle (C), ##  $p < 0,01$  comparado ao grupo normal (N) e §  $p < 0,05$  comparado ao grupo H+F (ANOVA seguido de Bonferroni).

Figura 45 – Fotomicrografia da imunoposição de NOSi e nitrotirosina em pele do dorso de camundongo submetidos ao modelo de úlcera por pressão



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Pele do dorso de camundongos sem indução de úlcera e sem tratamento, com marcação para NOSi (A) e nitrotirosina (B); indução de úlcera e sem tratamento, marcação para NOSi(C) e nitrotirosina (D); indução da úlcera e tratamento com artemísia com marcação para NOSi (E) e nitrotirosina (F); indução de úlcera e tratado com artemísia e filme de poliuretano com marcação para NOSi (G) e nitrotirosina (H); indução de úlcera e tratado com hidrogel e filme de poliuretano com marcação para NOSi (I) e sem indução de úlcera nem tratado com marcação para nitrotirosina (J). Todas as lâminas são de úlceras no 21º após indução com o modelo não invasivo. 400x.

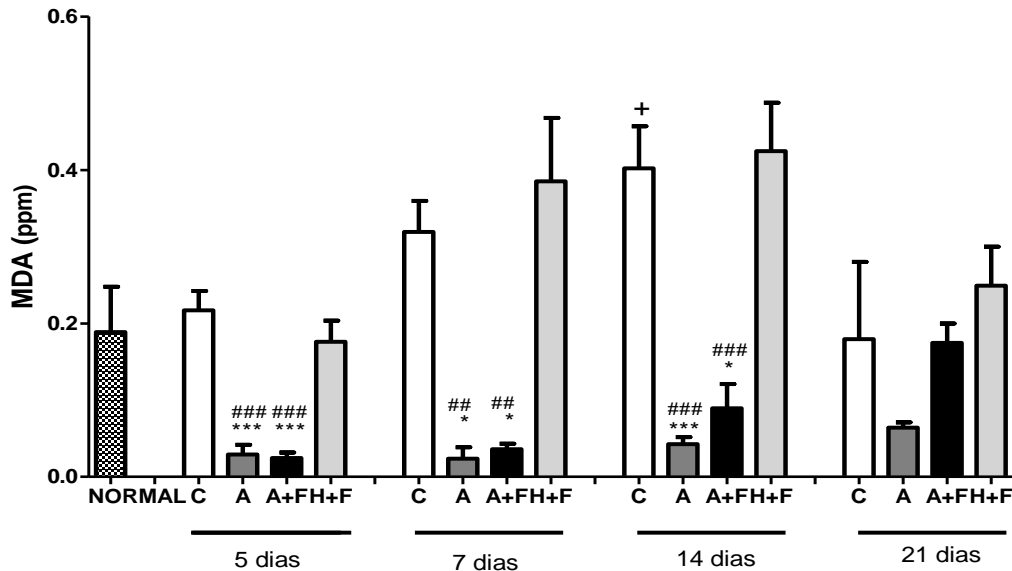
#### **4.2.10 Quantificação do MDA no leito da ferida no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos**

O MDA reflete a peroxidação lipídica advinda da ação dos ROS, no tecido estudado. A figura 46 mostra que existe um aumento da produção de MDA ao longo dos dias avaliados, sendo o pico de produção significativo o 14º dia ( $p < 0,05$ ), comparando-se o grupo de animais sem feridas (normal - pele intacta) e o grupo com ferida não tratado (controle). Com relação aos grupos tratados, artemísia e artemísia e filme de poliuretano, mostram uma diminuição no MDA já no 5º dia permanecendo baixo também nos dias 7 e 14.

No dia 5 os grupos tratados com artemísia e artemísia e filme de poliuretano foram significativamente diferentes tanto do grupo controle como do grupo tratado com hidrogel e filme de poliuretano ( $p < 0,001$ ). Já no dia 7 os grupos tratados também apresentaram diferença significativa com o grupo controle ( $p < 0,05$ ) e com o grupo hidrogel e filme de poliuretano ( $p < 0,01$ ). No dia 14 os grupos tratados com artemísia e artemísia e filme de poliuretano apresentaram diferenças estatísticas com o grupo controle ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente) e ambos também apresentaram diminuição na quantificação do MDA em relação ao tratamento com hidrogel e filme de poliuretano ( $p < 0,001$ ).

Em relação ao 21º dia não foi observado diferença significativa entre os grupos estudados, apesar do grupo artemísia ter apresentado uma menor dosagem de MDA quando comparado aos demais (fig 46).

Figura 46 - Efeito da fumaça de *Artemísia vulgaris* sobre o teste TBARS que quantifica o malondialdeído (MDA) no leito da ferida ou na cicatriz, no modelo experimental de úlcera por pressão em camundongos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Foram avaliados os grupos controle (C; com úlcera e sem tratamento); grupo fumaça de artemísia (A; com úlcera e tratado); grupo fumaça de artemísia e filme de poliuretano (A+F; com úlcera e tratado); grupo hidrogel e filme de poliuretano (H+F; com úlcera e tratado) e um grupo de animais sem úlcera e sem tratamento (N). O MDA que é o subproduto da peroxidação lipídica, de forma a avaliar a capacidade antioxidante da fumaça de artemísia foi quantificado nos dias 5, 7, 14 e 21 após o primeiro dia de indução da úlcera por pressão. Foram avaliados no mínimo 4 feridas por grupo por grupo. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle de cada dia, ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo H+F (ANOVA seguido de Bonferroni) e +  $p < 0,05$  comparado ao grupo N (Teste t de Student).

## 5 DISCUSSÃO

A úlcera por pressão é uma lesão comum entre pessoas doentes, hospitalizadas ou não, atingindo principalmente indivíduos com mobilidade física prejudicada e idosos. Vem se tornando um problema crescente no mundo inteiro devido, principalmente, ao envelhecimento da população. Pode levar a complicações graves, gerando demandas crescentes aos sistemas de saúde pública que se encontram saturados. A úlcera por pressão é tida como um indicador de qualidade dos serviços de saúde (DHARMARAJAN; AHMED, 2003).

Devido à cicatrização demorada esse tipo de lesão acarreta um alto custo para a sociedade e prejudica a qualidade de vida de milhões de pessoas em todo o mundo. Atualmente a atenção tem se voltado para a investigação de estratégias terapêuticas de cicatrização eficientes e de baixo custo. Dessa forma, as terapias tradicionais com uso de plantas medicinais, praticadas há séculos, estão sendo cientificamente investigadas por seu potencial no tratamento de feridas (KRISHNAN, 2006).

São documentados os efeitos cicatrizantes de diversos componentes presentes nas plantas como os triterpenos, alcalóides e flavonóides. Podendo ser citado o asiaticosídeo da *Centella asiatica*;  $\beta$ -sitosterol, a cemanano e glicoproteína do gel de *Aloe vera*; ácido oleanólico da *Anredra diffusa*; a quercetina, canferol e isoramnetina do *Hippophae rhamnoides*; proantocianidinas e resveratrol da *Vitis vinifera*; glicosídeos iridóides acilados da *Scrophularia nodosa*; ácidos fenólicos da *Chromolaena odorata*; (+)-epi- $\alpha$ -bisabolol da *Peperomia galioides*; ácidos fukinolico e cimicifugico de *Cimicifuga sps*. Os polissacarídeos também são, em parte, responsáveis pelo processo de cicatrização de feridas, como os arabinogalactanos da raiz de *Angélica acutiloba*, heteroglicanos ácidos das folhas de *Panax ginseng*, e polissacarídeos gerais das folhas de *Plantago major*. Mais recentemente a curcumina de *Curcuma longa*, tem se destacado como promissor agente cicatrizante por bloqueio da PhK/NF-kB e por proporcionar uma cicatrização livre de cicatrizes (AYYANAR; IGNACIMUTHU, 2009; HENG, 2011).

A artemísia é usada como planta medicinal há muito tempo tanto pela cultura oriental como a ocidental, sendo diversas as indicações de seu uso, podendo ser tópico ou oral. Dentre os diversos usos desta planta encontra-se o de cicatrização de feridas (SURESH *et al.*, 2011).

Erel et al. (2012) verificaram que tanto o extrato etanólico, como o óleo essencial de *Artemisia vulgaris*, mostraram propriedades anti-oxidantes com um maior efeito para o extrato etanólico. Com relação a ação antimicrobiana, o óleo essencial de artemísia teve atividade superior a ceftazidima contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*. O extrato metanólico mostrou uma atividade próxima a da ceftazidima contra *P. Aeruginosa* e uma ação inferior contra *E. Coli*. Ramezani et al. (2004), testando atividade de várias espécies de *Artemisia*, verificou que todas tinham ação antibacteriana para duas espécies de bactérias *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*.

A artemísia, em várias de suas espécies, é indicada tradicionalmente para malária, problemas de pele e feridas ulcerativas em diversas culturas, onde se utiliza principalmente a infusão das folhas aplicadas diretamente a afecção (ABAD et al., 2012; RAMEZANI et al., 2004, BISWAS; MUKHERJEE, 2003).

A espécie vem sendo muito estudada como uma alternativa barata e segura para doenças como malária, câncer, esquistossomose e antiviral contra o citomegalovírus humano e de outros membros da família *Herpes viridae* (vírus herpes simplex tipo 1 e Epstein-Barr), vírus da hepatite B, hepatite C e vírus da diarreia viral bovina e febre amarela. Além de efeito anestésico (EFFERTH et al., 2008; MENESES et al., 2009; PIRES et al., 2009; SINGH; LAI, 2004).

No presente trabalho foi utilizada a fumaça de moxa palito obtida a partir da parte aérea da planta *Artemisia vulgaris* como forma de tratamento, tanto a simples aplicação da fumaça, deixando a úlcera descoberta, como a aplicação seguida da cobertura com filme de poliuretano de forma a conservar o condensado no local da ferida. Durante a condensação da fumaça formava-se uma cera oleosa na superfície da ferida. O uso desta técnica de aplicação da artemisia é transmitido comumente de forma oral na Medicina Tradicional Chinesa (MTC), porém alguns poucos trabalhos escritos mostram esse procedimento (ZHANG et al., 2012; CILI et al., 2011).

A fumaça de plantas medicinais é utilizada pela humanidade desde tempos imemoriais, tendo seus primeiros registros em tábuas mesopotâmica de argila datada de 2600 a.C e no Rig Veda indiano escrito por volta de 1700 a 1100 a.C. Estes registros descrevem diversos usos dessa fumigação de plantas medicinais e aromáticas, que vão desde a desinfecção do ambiente até indicação como forma de tratamento para diversos tipos de doença. Ainda hoje é usada

tradicionalmente em 50 países dos 5 continentes. Com mais de 265 espécies ainda em uso para fumigação da fumaça, a família das Asteraceae é que concentra o maior número de espécies utilizadas (10.6%) (MOHAGHEGHZADEH et al., 2006; NAUTIYAL; CHAUHAN; NENE, 2007).

Na medicina chinesa, até hoje a fumigação com fumaça de moxa de artemísia isoladamente ou em combinação com acupuntura pode ser empregado para o tratamento de doenças infecciosas do tracto respiratório superior, doenças infecciosas da pele, como infecções de úlcera por pressão e infecções traumáticas das mãos e pés, com bons índices de cicatrização, além de minimizar a inflamação local. Também pode acelerar a absorção de líquidos e ajudar a cicatrizar lesões de herpes zoster, diminuindo a neuralgia pós-herpética. A *Artemisia vulgaris* mostra propriedade antibacteriana sobre *Pseudomonas aeruginosa*, a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Alcaligenes spp*, além de inibir adenovírus, rinovírus, vírus herpes, vírus influenza e vírus da parotidite (CILI et al., 2011; XI; YUAN, 2003).

Antes de avaliar o potencial terapêutico de uma planta é muito importante realizar primeiramente os testes toxicológicos, para investigar uma possível propriedade tóxica que inviabilize a utilização do fitoterápico. Dessa forma, foi avaliada, a possível toxicidade da aplicação tópica da fumaça de *Artemisia vulgaris* por moxa palito.

Em todas as avaliações: comportamentais, histopatológicos (renal, hepático, esplênico e dérmicos) e hematológico, a fumaça de artemísia não mostrou nenhuma alteração significativa dos parâmetros avaliados. Apesar de ter sido verificado uma discreta redução da polpa branca de três animais tratados, não houve repercussão na contagem do número de linfócitos do hemograma, mostrando que esta alteração não teve consequências no quadro geral no animal. De acordo com Suttie (2006) a redução da polpa branca do baço é uma mudança comum em roedores, principalmente em animais velhos, mas pode esta relacionada a tratamentos com substâncias que induzem a redução de peso nos animais.

Os dados encontrados neste estudo foram semelhantes aos de estudos realizados com varias dosagens de extratos brutos de *Artemisia vulgaris* e de extrato etanólico de *Artemisia annua*, com a realização de testes toxicológicos como: comportamentais, hemograma, bioquímica do sangue (ALT, AST, ureia, creatinina, testosterona, colesterol, glicemia) e avaliação histopatológica de órgãos como fígado, baço, pulmão, rins e coração, sem evidências de toxicidade (KODIPPILI et

*al.*, 2011; ETENG et al., 2012). Outros estudos verificaram o efeito hepatoprotetor de diversas espécies de artemisia, incluindo a *Artemisia vulgaris*, e esse efeito foi atribuído à atividade no metabolismo dos lipídeos, propriedades anti-oxidante e imunomoduladora, podendo ser indicada para o tratamento de várias doenças do fígado (LEE et al., 2011; AMAT et al., 2010; ADEWUSI; AFOLAYAN, 2010; GILANI et al., 2005; ANIYA et al., 2000).

Mukinda e Syce (2007), ao avaliar a toxicidade do extrato aquoso de *Artemisia afra*, concluíram que esta espécie não é tóxica quando administrada oral de forma aguda. Na avaliação de toxicidade crônica mostrou um baixo potencial e, em doses elevadas, pode ter um efeito hepatoprotetor.

A toxicidade da maioria das espécies de *Artemisia* se dá por meio de terpenóides, onde a cânfora é o mais tóxico, seguido por 1,8-cineol, porém essa toxicidade é mais pronunciada em insetos e outras plantas do que nos seres humanos. A cânfora apresenta um potencial perigo somente quando utilizado de forma errada ou em altas dosagens acima de 11% (NEGAHBAN; MOHARRAMIPOUR; SEFIDKON, 2007; WANG *et al.*, 2006; BARNEY; HAY; WESTON, 2005; COMMITTEE ON DRUGS, 1994; HALLIGAN, 1975).

As escalas PUSH e PSST, são instrumentos de avaliação de cicatrização de úlceras por pressão muito utilizadas na clínica. Porém por ser de uso em humanos não contempla aspectos peculiares dos modelos experimentais em animais de pequeno porte. Foi então que resolvemos criar a escala EWAT para esta finalidade. Através da escala EWAT tem-se uma avaliação macroscópica geral da cicatrização, pois estes escores levam em consideração variáveis diversas como tamanho da ferida, a presença de exsudato e suas características e quantidades. Também leva em consideração o tipo de tecido do leito da ferida e sua quantidade, traduzindo em números todos esses aspectos.

Utilizando a escala EWAT, no presente estudo, foi observado que nos dois grupos a aplicação tópica da fumaça de artemísia resultou em uma cicatrização acelerada no dia 7. Após isso somente o grupo com aplicação de fumaça de artemísia e filme de poliuretano manteve essa aceleração em relação aos demais grupos. Dessa forma, sugerimos que a ação dos princípios ativos da fumaça de artemísia foi potencializada pela oclusão pelo filme de poliuretano. Esses fatos foram verificados através dos escores totais da escala EWAT, pela diminuição da área da ferida e pela percentagem de contração da ferida. A contração da ferida é um

importante fator contribuidor para o processo de cicatrização, pois consiste na aproximação das extremidades da ferida (WITTE; BARBUL, 1997).

De acordo com Zhai e Maibach (2001) a aplicação de produtos químicos/fármacos sob condições oclusivas, aumenta a absorção de fármacos, com o aumento da hidratação do estrato córneo. A oclusão também reduz progressivamente a eficiência do estrato córneo como barreira, alterando a química dos compartimentos da camada superficial da pele. Ocorre um aumento da umidade do estrato córneo, inchaço dos corneócitos e alteração na organização da fase intercelular lipídica. Outro fator observado é a elevação da temperatura da superfície da pele, aumentando o fluxo de sangue, dificultando a evaporação de compostos voláteis, servindo como um reservatório de fármaco facilitando sua penetração. Inicialmente, a droga penetra a camada córnea sob condições oclusivas. Após remoção do curativo, o estrato córneo desidrata, o movimento do medicamento diminui e o estrato córneo se torna um reservatório. Os efeitos da oclusão são complexos e podem produzir alterações profundas, como alteração lipídica epidérmica, síntese de DNA, renovação epidérmica, alterações da flora microbiana, o pH, a morfologia da epiderme, glândulas sudoríparas, células de Langerhans e a cicatrização de feridas.

Outro benefício da oclusão é potencializar o debridamento autolítico, iniciando-se 72 a 96 h após a oclusão. O debridamento autolítico é conseguido através da umidade promovida por curativos oclusivos como filme de poliuretano, colocados preferencialmente em lesões que não contenham muito tecido necrótico (MORIN; TOMASELLI, 2007; ROLSTAD; OVINGTON, 2007; DAVID; STEED, 2004). O mecanismo do debridamento autolítico não é totalmente conhecido, porém sabe-se que os leucócitos, acumulados na superfície da úlcera, liberam grânulos lisossomais para o fluido. As enzimas derivadas desses grânulos em pH ácido são potencializadas, degradando substratos tais como proteínas, mucopolissacarídeos, glicoproteínas, glicolípidos, DNA e RNA (WITKOWSKI; PARISH, 1991).

As bactérias são encontradas na superfície de úlceras até a reepitelização final ocorrer, mesmo com ausência de infecção clínica. Provavelmente as enzimas das bactérias também participem do debridamento autolítico de úlceras com umidade por curativos retentivos (WITKOWSKI; PARISH, 1991). As propriedades autolíticas do curativo oclusivo podem ser potencializadas pelo uso concomitante do hidrogel que aumenta a hidratação do tecido (OVINGTON, 2007).

Ao avaliar os parâmetros de debridamento da escala EWAT, verificamos que somente a aplicação da fumaça de artemisia com o filme de poliuretano foi capaz de ter um bom resultado, sendo até superiores ao uso do hidrogel e filme de poliuretano, que é debridante autolítico clássico. Possivelmente, as ações protetora e de retenção de umidade do filme de poliuretano, foram somadas as propriedades da fumaça de artemisia fazendo com que a oclusão pelo filme de poliuretano potencializasse o debridamento autolítico do tecido.

Desbridamento é definido como a remoção de tecido hiperqueratótico, infectado e não viável de uma ferida, que quando ocorre de forma adequada é essencial, já que acelera o processo de cicatrização, prevenindo infecção e inflamação dos tecidos viáveis (BREM; TOMIC-CANIC, 2007). Existem vários tipos de debridamento: cirúrgico; mecânico com solução salina e gase ou irrigação salina; autolítico por meio de enzimas do próprio organismo; enzimático por produtos contendo enzimas; e biológico por meio de larvas criadas em um ambiente estéril especialmente para este tipo de procedimento (STEED, 2004).

Com relação aos parâmetros inflamatórios de edema, exsudato e eritema da escala EWAT, a aplicação de fumaça de artemisia, e principalmente quando acrescida ao uso do filme de poliuretano, também diminui consideravelmente seus escores. Esse fato foi observado desde o segundo dia de aplicação e se estendeu até o fim do experimento. No último dia, foi mais eficaz até mesmo do que o tratamento padrão, hidrogel. Estes achados foram semelhante nos parâmetros histopatológicos de infiltrado leucocitário, de hemorragia e de fibrose, que apresentaram diferença estatística nos grupos tratados com artemisia. A artemisia reduziu a manifestação desses eventos na fase final do experimento.

De acordo com Tigno e Gumila (2000), lactonas de sesquiterpenos e outras substâncias presentes na artemisia aumentam a liberação de prostaciclina, atuam na eliminação de radicais livres, por meio da tirosina-quinase, inibindo a liberação de metabólitos do ácido araquidônico. Atuam também na inibição de hemólise mediada pelo complemento, na agregação plaquetária e na quimiotaxia e migração de leucócitos, os quais podem contribuir para a sua capacidade de prevenir a adesão de leucócitos durante a reperfusão nas lesões de isquemia/reperfusão.

Ainda é desconhecido o mecanismo de ação exato da artemisia, mas supõe-se que seu efeito antiinflamatório se dá através da inibição de metabólitos

inflamatórios da via dos prostanóides. No modelo de inflamação por isquemia e reperfusão, foi demonstrado uma ação imunossupressora e diminuição da produção excessiva de NO durante a fase de reperfusão. Também foi observada a diminuição da peroxidação lipídica e liberação de citocinas quimiotáticas para leucócitos, impedindo dessa forma danos decorrentes da inflamação exacerbada após isquemia-reperfusão. Trabalhos demonstram que a *Artemisia princeps* inibiu a degranulação de mastócitos e a proliferação de células T, como também inibiu a liberação de óxido nítrico em modelo murino de isquemia-reperfusão no mesentério, produzindo efeito inibitório sobre os macrófagos. (TIGNO; GUMILA, 2000; RYU; OAK; KIM, 2000; CHANG *et al.*, 2009). A diminuição da produção de NO, através da diminuição da expressão de NOSi, está descrita também com uso da fumaça de artemísia (SAKAGAMI *et al.*, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2005) e corrobora com o presente estudo.

No 14º dia houve uma redução na expressão de NOSi nos grupos tratados com fumaça de artemísia, principalmente no que foi usado concomitante o filme de poliuretano. Da mesma forma, a expressão de nitrotirosina, marcador para dano tecidual induzido por radicais livres de nitrogênio, foi reduzida. Estes dados sugerem que a fumaça foi capaz diminuir a expressão de NOSi, e provavelmente por esse motivo também pode ter havido uma diminuição do excesso de óxido nítrico formado por esta enzima, deixando um nível basal e benéfico para a cicatrização da úlcera. Reunindo esses dados com o que existe na literatura, podemos sugerir que a fumaça de artemísia inibe a expressão da NOSi, mas provavelmente não interfere na síntese de óxido nítrico pela NOSe. De acordo com Witte *et al.* (2000) a supressão de NO diminui a síntese de colágeno, entretanto a síntese de colágeno não foi diminuída com a aplicação da fumaça de artemísia. Sendo assim provavelmente a síntese basal de NO foi preservada. Ademais, segundo Shoskes (1998) os flavonóides reduzem consideravelmente os danos em lesões por isquemia-reperfusão por interferir com a atividade da NOSi.

O óxido nítrico é importante para a colagênese. De acordo Schäffer *et al.* (1997) a inibição de óxido nítrico não afeta a proliferação de fibroblastos, mas diminui a síntese de colágeno por essas células. O mecanismo de ação do NO na síntese de colágeno pode ser pela ADP-ribosilação de proteínas como a GAPDH, onde o NA(H) é transformado em N-nitroso-NAD(H), produzindo uma proteína mono-ADP-ribose e uma NAD (H)-símile com a porção que perdeu sua capacidade de

redução. A diminuição de NAD favorece a expressão de mRNA de colágeno. Outro mecanismo potencial é o de regulação da atividade da proteína quinase C (PKC), que é uma proteína que diminui a síntese de colágeno, dessa forma inibindo a atividade da PKC, aumenta a síntese de colágeno por fibroblastos (WITTE *et al.*, 2000). Por outro lado, o excesso de óxido nítrico faz com que os fibroblastos entrem em apoptose devido danos no DNA por estresse oxidativo e nitrosativo, fosforilação e ativação da p53 (MCLAUGHLIN; DEMPSEY, 2005). Além disto, em camundongosknockout para NOSi, a cicatrização foi equilibrada pela ação da eNOS e do TGF- $\beta$ 1. (MOST *et al.*, 2002).

Com relação ao número de fibroblastos não foram observadas diferenças entre os grupos nas fases iniciais da cicatrização, porém foi aumentado no grupo fumaça de artemísia no 14<sup>o</sup> dia e no grupo fumaça de artemísia e filme de poliuretano no 21<sup>o</sup> dia. Em relação à colagênese foi visto um efeito maior no tratamento com a fumaça de artemísia desde o 14<sup>o</sup> dia da avaliação, onde a taxa de síntese de colágeno pelos fibroblastos foi superior no grupo que utilizou da fumaça de artemísia e filme de poliuretano, seguida do grupo que utilizou a artemisia sem cobertura. Esse resultado indica que a ação das substâncias proveniente da fumaça de artemisia, sobre a síntese de colágeno, foi reforçada pela oclusão com o filme de poliuretano.

Os fibroblastos produzem colágeno através da liberação de FGF-2, TGF- $\beta$ , e IGF pelos macrófagos (BAUM; ARPEY, 2005). Porém, em algumas feridas crônicas, principalmente as úlceras por pressão, mesmo tendo um número normal de fibroblastos, estes se tornam prematuramente senescentes independente da idade do indivíduo. Os fibroblastos senescentes perdem a sua capacidade para produzir o colágeno e produzir níveis elevados de pro-colagenase e baixos níveis de inibidor tecidual das metaloproteinases. Um dos possíveis fatores preponderantes para a senescência precoce do fibroblasto é o processo inflamatório do leito da ferida. Essa senescência, somada à própria inflamação, contribui para a cronicidade da ferida (VANDE BERG *et al.*, 1998; VANDE BERG *et al.*, 2005).

Vários estudos comprovam a eficácia dos produtos naturais em diminuir o processo inflamatório e o estresse oxidativo. Essas propriedades são atribuídas a alguns componentes chaves presentes na composição química de algumas plantas. Annan e Houghton (2008), ao realizar trabalho com extrato aquoso de *Gossypium arboreum L.*, verificaram que esta planta apresenta ação anti-oxidante, e esta

propriedade foi atribuída a presença de flavonóides, dentre seus constituintes. Um dos fatos observados com a diminuição do estresse oxidativo pela ação do extrato foi o aumento no número de fibroblasto. A proteção destas células foi relacionada ação anti-oxidante. Koganov, Dueva, Tsorin (1999) descrevem os fenóis como moduladores sobre o crescimento de fibroblastos, os quais beneficiam o processo de cicatrização. Outros autores descrevem a ação do extrato etanólico de *Calendula officinalis*, uma planta medicinal conhecida por suas propriedades cicatrizantes. Através do seu efeito sobre a proliferação e migração de fibroblastos, promove a granulação e reepitelização de feridas. Esta ação é devido à presença terpenóides anti-inflamatórios, que contribuem para a proliferação e migração de fibroblastos. Ambos os efeitos são pré-requisitos para a granulação e reepitelização da ferida (FRONZA *et al.*, 2009).

Quanto à avaliação do efeito da fumaça de artemísia sobre o estresse oxidativo, verificamos uma potente atividade antioxidante. Os níveis de malondialdeído foram reduzidos a partir de seis horas após a primeira aplicação, no 5º dia pós-indução, e se estendeu por todos os dias do experimento. Sugerimos assim, que um ambiente com baixos níveis de radicais livres pode ser importante para uma diminuição da inflamação e conseqüentemente favorece a cicatrização no modelo experimental.

Em síntese, os ROS e RNS, em níveis baixos e em condições fisiológicas, regulam moléculas de sinalização de células importantes na manutenção da homeostase dos tecidos. Em contraste, ROS e RNS produzido em maiores quantidades durante respostas inflamatórias agudas são chave para a destruição de agentes patogênicos invasores e materiais estranhos. No entanto, quando ROS e RNS são gerados em quantidades excessivas e sem controle, o estresse oxidativo e nitrosativo pode acontecer, levando a lesão tecidual. Lipídios, proteínas e DNA são alvos de modificação por ROS/RNS com diversas conseqüências patológicas, incluindo funcionamento alterado, necrose e apoptose. O estresse oxidativo e o nitrosativo, pode também induzir à ativação de fatores de transcrição redox como o fator nuclear- $\kappa$  B (NF- $\kappa$  B) e ativador de proteína-1 (AP-1), amplificando a resposta inflamatória e a lesão tecidual (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Os mecanismos pelos quais os radicais livres danificam as funções celulares não são totalmente compreendidos, mas um dos fatores mais importantes parece ser a peroxidação lipídica, a qual resulta em dano da membrana celular. Os

flavonóides parecem ser os fitocompostos mais poderosos em proporcionar uma proteção do organismo contra espécies reativas de oxigênio (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Extratos aquosos e metanólicos de *Artemisia vulgaris* mostraram ação antioxidante que auxilia na cicatrização, varrendo tanto radicais livres de oxigênio como os de nitrogênio, proporcionando uma ação anti-inflamatória (TEMRAZ; EL-TANTAWY, 2008). Estas propriedades podem ser explicadas pela presença de compostos flavonóides em especial os flavonóis, assim como devido à presença de traços de metais como zinco, magnésio e selênio (RAVIPATI *et al.*, 2012; WOJDYLO, OSZMIAŃSKI; CZEMERYS, 2007).

O potencial antioxidante e de varredura de radicais livres, tanto de oxigênio como de nitrogênio, também já foram demonstrados, onde o efeito anti-inflamatório e outras ações medicinais da fumaça de artemísia são atribuídos a esta capacidade de diminuir a quantidade desses radicais livres (SAKAGAMI *et al.*, 2005; HATSUKARI *et al.*, 2002; HITOSUGI *et al.*, 2001). De acordo com Njveldt *et al.* (2001), os radicais livres podem estimular a liberação de vários mediadores inflamatórios, contribuindo para uma resposta inflamatória geral e dano nos tecidos.

Com a ferida aberta o organismo tem dois objetivos principais: livrar-se de agentes infecciosos e fechar a ferida. Para cumprir o primeiro objetivo de diminuir a quantidade de microrganismos no leito da ferida, os neutrófilos liberam os radicais livres no tecido lesionado. O superóxido gerado pelos neutrófilos serve como estímulo para os fibroblastos entrarem em proliferação, e assim sintetizarem o colágeno para preencher o leito da ferida. O preenchimento da área da lesão facilita a migração dos queratinócitos, e estes selam a ferida, protegendo contra novas infecções (MCCORD, 2000). Porém, quando o estresse oxidativo é prolongado pode levar a fibrose, e em altas concentrações, o superóxido pode ser prejudicial as células epiteliais, incluindo os fibroblastos, devido a ação citotóxica deste radical livre de oxigênio (MURRELL; FRANCIS; BROMLEY, 1990).

Os fibroblastos são células importantes para a cicatrização, sendo responsáveis pela síntese, deposição e remodelamento do colágeno. Diferenciam-se em miofibroblastos agindo na contração da ferida, assim como liberam fatores de crescimento que irão repercutir positivamente em outros eventos da cicatrização da úlcera, como a angiogênese e reepitelização pelos queratinócitos (PORTER, 2007; SINGER; CLARK, 1999).

Foi verificado neste trabalho que com a aplicação da fumaça de artemisia, e de modo particular quando está associada ao filme de poliuretano, houve um aumento expressivo do número de vasos sanguíneos, proporcionando uma boa angiogênese desde o 7º dia até o fim do experimento. Esses dados nos levaram a supor que este aumento no número de vasos sanguíneos pode ter sido influenciado tanto por fatores de crescimento como pelo próprio óxido nítrico agindo de forma homeostática.

De acordo com Mendonça *et al.* (2010), a cicatrização não pode ocorrer sem a angiogênese, principalmente em tecidos submetidos à isquemia. Juntamente com o aumento da permeabilidade vascular, a angiogênese permite que uma variedade de citocinas e fatores de crescimento atinjam o tecido danificado, além de fornecer uma ampla variedade de nutrientes e retirar metabólitos do local da lesão.

Já foi demonstrado que outra espécie de artemisia também estimulou o processo de angiogênese. Kaji *et al.* (1990) verificaram que o extrato aquoso de *Artemisia princeps* proporcionou um efeito estimulante de proliferação de células endoteliais por aumento a síntese de bFGF (FGF2) em cultura de células de aorta bovina.

Os principais fatores envolvidos na angiogênese são os FGF, VEGF, TGF- $\beta$ , angiopoietina, triptanos de mastócitos, assim como a matriz extracelular através de receptores de integrinas (TONNESEN; FENG; CLARK, 2000). Com relação ao FGF2, também denominado bFGF, este fator de crescimento da família FGF, tem papel importante, além da angiogênese, também atua na granulação, reepitelização e remodelamento tecidual. Além dos fatores de crescimento, o óxido nítrico (NO) também participa da angiogênese através da inibição de trombospondina 1 (TSP1) via fosforilação da ERK por ação do GMPc (KOTTAKIS *et al.*, 2011; RIDNOUR *et al.*, 2005).

Além do aumento no número de vasos, caracterizando angiogênese, no 14º dia houve um discreto aumento no calibre dos vasos nos grupos tratados com a fumaça de artemisia. A vasodilatação aumenta o aporte de nutrientes e oxigênio, fatores importantes para a cicatrização. Este achado foi concomitante ao pico de expressão da nitrotirosina na imuno-histoquímica, que foi reduzido nos grupo tratados com a fumaça de artemisia. Sendo assim, entendemos que a ação do NO, nos grupos tratados com fumaça de artemisia parece ser homeostática, gerando vasodilatação sem causar danos no leito da ferida.

No tecido lesado, a primeira resposta vascular é a vasoconstricção que dura entre 5 a 10 minutos. Após isto ocorre uma vasodilatação que persiste até a cicatrização da ferida (RENDELL *et al.*, 2002). Essa vasodilatação proporciona uma boa perfusão vascular que é importante para a cicatrização, oferecendo nutrientes, e juntamente com a drenagem linfática, retira metabólitos e neutraliza patógenos na ferida (GOSAIN; DIPIETRO, 2004). De acordo com Warren (1994), o óxido nítrico, além de ser um conhecido vasodilatador, também está envolvido no aumento do fluxo sanguíneo.

No 14<sup>o</sup> dia os grupos tratados com fumaça de artemísia mostraram uma espessura maior da epiderme em relação aos demais grupos. No 21<sup>o</sup> dia essa espessura sofreu uma redução, porém continuou maior em relação ao controle e significativamente maior que a pele normal. Em modelo de ferida excisional em porcos, Staiano-Coico *et al.* (1993) verificaram que a aplicação de KFG (fator de crescimento de queratinócitos) proporcionava acantose, aumento da espessura da epiderme, quando reepitelizadas, porém este fato não foi observado com a aplicação de EGF ou de bFGF. Este fato também foi observado em um estudo com uso do bb-PGDF, um fator de crescimento que vem sendo usado clinicamente para tratamento de ferida crônica. O tratamento com bb-PGDF produziu um aumento na proliferação de células na camada epitelial, resultando em uma maior espessura da epiderme, voltando aos níveis de normalidade após seis semanas (LYNCH *et al.*, 1987).

A epiderme é uma barreira protetora do corpo que medeia interações com o meio ambiente. A exposição contínua da pele aos danos e ferimentos, e possivelmente, as características intrínsecas do programa de diferenciação, exigem que a epiderme seja continuamente renovada. A renovação é assegurada por células-tronco que residem na camada basal e dão origem a queratinócitos proliferativos, ou seja, células de amplificação em trânsito. Após cessar a proliferação, inicia-se a diferenciação terminal dos queratinócitos, que migram para as camadas suprabasais. E por último, essas células se transformam em corneócitos que constituem a camada cornificada que, posteriormente, se desprendem da superfície da pele (GANDARILLAS, 2000).

Todo o processo é comandado pelos fatores de crescimento EGF, TGF- $\alpha$  e mais recentemente, o HB-EGF (Fator de crescimento do tipo epidermal e ligante de heparina) e o KGF. Outros fatores de crescimento podem também regular a reparação epidérmica, a exemplo do TGF- $\beta$ 1, FGF-2, PDGF e algumas citocinas

pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e o TNF- $\alpha$ , que parecem estimular a expressão de algumas das subunidades de integrinas facilitando a migração de queratinócitos (MARTIN, 1997; BARRIENTOS *et al.*, 2008).

Na cicatrização, os fibroblastos tornam-se ativados e produzem colágeno, fibronectina, proteoglicanos de sulfato de heparano, a proteína secretada ácida rica em cisteína (SPARC), tenascina, e fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTFG), EGF, FGF-2, TGF- $\beta$ , PDGF, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), que estão envolvidas na angiogênese. Citocinas como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  secretadas pelos fibroblastos induzem a síntese e secreção de VEGF ou agem sinergicamente a ele na angiogênese. Além disso, a mudança na expressão de VE-caderina de células endoteliais humanas por ação do FGF pode contribuir para a regulação da angiogênese. Os fibroblastos também promovem a reepitelização agindo nos queratinócitos, assim como é conhecida sua capacidade de se diferenciar em miofibroblasto e exercer a atividade de contração da ferida (BLAKAJ; BUCALA, 2012; NEWMAN *et al.*, 2011; MARTIN; GALISTEO; GUTKIND, 2009; BARRIENTOS *et al.*, 2008; FERRARA; GERBER; LECOATER, 2003; SALVEN *et al.*, 2002; MARTIN; HARDING; JIANG, 2011; MARTIN; HARDING; JIANG, 1999; MANSBRIDGE *et al.*, 1999; KOOLWIJK *et al.*, 1996; ELIAS *et al.*, 1989).

De forma semelhante ao fibroblasto, e com um potencial ainda maior, os macrófagos também podem influenciar na angiogênese, colagênese, modelação da matriz extracelular e reepitelização através da indução de proliferação, migração e ativação de células por liberação de substâncias como proteases, fatores de crescimento bFGF, GM-CSF, TGF- $\alpha$ , IGF-I, PDGF, VEGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF TGF- $\beta$ , e citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , substância-P, prostaglandinas, trombospondina 1. Vale ressaltar que o fenótipo M2 dos macrófagos e em especial sua subdivisão M2d está ligada de forma especial na cicatrização de feridas, por liberar mais fatores de crescimento que os do fenótipo M1 (LASKIN *et al.*, 2011; ENFIELD; LEBOVICH, 2011; RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010; BARRIENTOS *et al.*, 2008; EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; MARTIN, 1997; SUNDERKÖTTER *et al.*, 1994).

De acordo com Tonnesen, Feng e Clark (2000) macrófagos, fibroblastos e vasos sanguíneos invadem o leito da ferida. Os macrófagos são uma fonte contínua de citocinas e fatores de crescimento necessários para estimular a angiogênese

efibroplasia. Os fibroblastos secretam fatores de crescimento semelhantes aos macrófagos, além de sintetizar matriz extracelular, que serve de suporte de crescimento para células, e para os vasos sanguíneos, que assim transportam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo das células.

Compostos terpenóides funcionam como anti-inflamatório por diminuir a atividade de macrófagos via inibição de NF- $\kappa$ B e I $\kappa$ B quinase. Já os flavonóides inibem a liberação de citocinas inflamatórias e radicais livres pelos macrófagos tendo como um dos mecanismos de ação a via MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno), inibição de ERK, p38 e ativação CK2 (caseína quinase 2) (XAGORARI; ROUSSOS; PAPAPETROPOULOS, 2002; CASTRILLO *et al.*, 2001; AVIRAM e FUHRMAN, 1998).

Compostos fenólicos flavonóides e terpenóides são extensamente documentados como cicatrizantes e estão presentes tanto na *Artemisia vulgaris*, como na fumaça de moxa de artemísia (CILI *et al.*, 2011; TEMRAZ; EL-TANTAWY, 2008; RAGASA *et al.*, 2008; LEE, 1998; WANG *et al.*, 2006; BARNEY; HAY; WESTON, 2005; COMMITTEE ON DRUGS, 1994; HALLIGAN, 1975; AYYANAR; IGNACIMUTHU, 2009; HENG, 2011; RAVIPATI *et al.*, 2012; TEMRAZ; EL-TANTAWY, 2008; WOJDYLO; OSZMIAŃSKI; CZEMERYYS, 2007). A aceleração do processo cicatricial também foi verificada em outra espécie de artemísia, a *Artemisia aucheri*, em seu extrato hidro-alcoólico em modelo de ferida excisional em ratos (ÂLLAHTAVAKOLI, *et al.* 2010).

Os dados do presente estudo sugerem que a aplicação tópica da fumaça de *Artemisia vulgaris* melhora a cicatrização da úlcera por pressão e que a cobertura da ferida com o filme de poliuretano amplifica esse efeito. Fazendo uma síntese do que está descrito na literatura com os resultados do presente estudo, sugere-se que, possivelmente, a presença de compostos terpenóides e/ou fenólicos na fumaça estimulem os fibroblastos de forma direta ou de forma indireta através da ação sobre macrófagos, ou simultaneamente em ambos. Esses, por sua vez, estimulam a migração e proliferação celular nos eventos de colagênese, angiogênese e reepitilização, acelerando assim a cicatrização da úlcera por pressão. Adicionalmente não demonstrou efeitos tóxicos e possui um potencial anti-oxidante, inibindo a marcação para nitrotirosina, expressão da NOSi e a peroxidação lipídica.

## 6 CONCLUSÕES

- a) A aplicação tópica da fumaça de *Artemisia vulgaris* não induziu toxicidade nos animais avaliados pelos diversos parâmetros bioquímicos, hematológicos, histopatológicos e comportamentais avaliados;
- b) A fumaça de *Artemisia vulgaris* acelerou a cicatrização das úlceras:
  - Reduzindo escores inflamatórios macroscópicos e histológicos, de reepitelização, hemorragia e fibrose tecidual;
  - Aumentando a fibroplasia, colagênese e angiogênese;
  - Induzindo o fechamento precoce da ferida com camada epitelial espessa.
- c) O uso do filme de poliuretano intensificou a ação da fumaça de Artemísia;
- d) O efeito antioxidante parece contribuir para o potencial cicatrizante da fumaça de *Artemisia vulgaris*.

## REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J. *et al.* The *Artemisia* L. Genus: a review of bioactive essential oils. **Molecules**, v. 2, n. 17, p. 2542-2566, mar. 2012.
- ADEWUSI, E. A.; AFOLAYAN, A. J. A review of natural products with hepatoprotective activity. **JMPR**, v. 4, n. 13, p. 1318-1334, jul. 2010.
- ÂLLAHTAVAKOLI, M. *et al.* Effect of Hydro-Alcoholic Extract of *Artemisia Aucheri* on Healing of Skin Wound in Rat. **J Mazandaran Univ Med Sci.**, v. 20, n. 77, p. 70-76, jul. 2010.
- AMĂLINEI, C.; CĂRUNTU, I. D.; BĂLAN, R. A. Biology of metalloproteinases. **Rom J Morphol Embryol.**, v. 48, n. 4, p. 323-34, 2007.
- ANDRADE, T. A. *et al.* The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Braz J Med Biol Res.**, v. 44, n. 10, p. 1036-1047, out. 2011.
- ANIYA, Y. *et al.* Antioxidant and hepatoprotective actions of the medicinal herb *Artemisia campestris* from the Okinawa Islands. **Biol Pharm Bull.**, v. 23, n. 3, p. 309-312, mar. 2000.
- ANNAN, K.; HOUGHTON, P. J. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of aqueous extracts of *Ficus asperifolia* Miq. and *Gossypium arboreum* L., wound-healing plants of Ghana. **J Ethnopharmacol.**, v. 2, n. 119, supl. 1, p. 141-144, set. 2008.
- ARMSTRONG, D. G.; JUDE, E. B. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. **J Am Podiatr Med Assoc.**, v. 92, n. 1, p. 12-18, jan. 2002.
- AUTEROCHE, B.; AUTEROCHE, M. **Guia Prático de Acupuntura e Moxabustão**. São Paulo: Editora Andrei, 1996.
- AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 137, Supl. 1, p. 45-50, abr. 1998.
- AYYANAR, M. IGNACIMUTHU, S. Herbal medicines for wound healing among tribal people in Southern India: Ethnobotanical and Scientific evidences. **Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.**, v. 2, n. 3, p. 29-42, set./out. 2009.
- BARNEY, J. N.; HAY, A. G.; WESTON, L. A. Isolation and characterization of allelopathic volatiles from mugwort (*Artemisia vulgaris*). **J Chem Ecol.**, v. 31, n. 2, p. 247-265, fev. 2005.
- BARRICK, B.; CAMPBELL, E. J.; OWEN, C. A. Leukocyte proteinases in wound healing: roles in physiologic and pathologic processes. **Wound Repair Regen.**, v. 7, n. 6, p. 410-422, nov./dez. 1999.

BARRIENTOS, S. et al. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regen.**, v. 16, n. 5, p. 585-601, set./out. 2008.

BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatol Surg.**, v. 31, n. 6, p. 674-686, jun. 2005.

BEST HEALTH OPTION. [**Fumigação com moxa de *Artemisia vulgaris***]. 2013. Disponível em: <<http://www.pinterest.com/besthealthopt/moxibustion>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

BISWAS, T. K.; MUKHERJEE, B. Plant medicines of Indian origin for wound healing activity: a review. **Int J Low Extrem Wounds**, v. 2, n. 1, p. 25-39, mar. 2003.

BLAKAJ, A. E.; BUCALA, R. Fibrocytes in Fibrotic Diseases and Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 1, n. 1, p. 36-40, fev. 2012.

BOUTEN, C. V. et al. The etiology of pressure ulcers: skin deep or muscle bound? **Arch Phys Med Rehabil**, v. 84, n. 4, p. 616-619, abr. 2003.

BRAITHWAITE M.; VAN VUUREN S. F; VILJOEN A. M. Validation of smoke inhalation therapy to treat microbial infections. **J Ethnopharmacol**, v. 119, n. 3, p. 501-506, out. 2008.

BREM, H.; LYDER, C. Protocol for the successful treatment of pressure ulcers. **Am J Surg**, v. 188, Supl. 1, p. 9-17, jul. 2004.

BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. **J Clin Invest**, v. 117, n. 5, p. 1219-22, maio 2007.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, mar. 2004.

BROWN, B. N. et al. Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine. **Biomaterials**, v. 33, n. 15, p. 3792-3802, maio 2012.

CALS-GRIERSON, M. M.; ORMEROD, A. D. Nitric oxide function in the skin. **Nitric Oxide**, v. 10, n. 4, p. 179-193, jun. 2004.

CAO, D. et al. Pretreatment effect of moxibustion on the permeation of FITC-dextran. **Inter. J. of Pharm.**, v. 354, p. 117-125, 2008.

CARDINI, F.; WEIXIN, H. Moxibustion for Correction of Breech Presentation. **The J. of the Amer. Med. Assoc.**, v. 280, p. 1580-1584, 1998.

CASTRILLO, A. et al. Inhibition of the nuclear factor kappa B (NF-kappa B) pathway by tetracyclic kaurene diterpenes in macrophages. Specific effects on NF-kappa B-inducing kinase activity and on the coordinate activation of ERK and p38 MAPK. **J Biol Chem.**, v. 276, n. 19, p. 15854-15860, maio 2001.

CATANIA, K. et al. Wound wise: PUPPI: the pressure ulcer prevention protocol interventions. **Am J Nurs**, v. 107, n. 4, p. 44-52, abr. 2007.

CHANG, S. H. et al. Anti-inflammatory effects of *Artemisia princeps* in antigen-stimulated T cells and regulatory T cells. **J Pharm Pharmacol.**, v. 61, n. 8, p. 1043-1050, ago. 2009.

CILI, Z. et al. Research Advance on Moxa Smoke. **J. Acupunct.Tuina. Sci.**, v. 9 n. 2, p. 67-72, abr. 2011.

CIRÚRGICA SÃO PAULO. [Filme transparente de poliuretano]. São Paulo: Cirúrgica São Paulo, 2013. Disponível em: <[www.cirurgicasaopaulo.com.br](http://www.cirurgicasaopaulo.com.br)>. Acesso em: 10 jan. 2013.

COMMITTEE ON DRUGS. Camphor Revisited: Focus on Toxicity. **Pediatrics**, v. 94, n. 1, p. 127-128, jul. 1994.

CREW J. et al. NeutroPhase in chronic non-healing wounds. **Int J Burns Trauma**, v. 2, n. 3, p. 126-134, dez. 2012.

DAUER, D. J. et al. Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer. **Oncogene**, v. 24, n. 21, p. 3397-4408, maio 2005.

DAVID, L.; STEED, M. D. Debridement. **The American Journal of Surgery**, v. 187, n. 5, Supl. 1, 71s-74s, maio 2004.

DHARMARAJAN, T. S.; AHMED, S. The growing problem of pressure ulcers. Evaluation and management for an aging population. **Postgrad Med.**, v. 113, n. 5, p. 77-78, 81-84, 88-90, maio 2003.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front Biosci.**, v. 9, n. 1, p. 283-289, jan. 2004.

DORNER, B.; POSTHAUER, M. E.; THOMAS, D. National Pressure Ulcer Advisory Panel. The role of nutrition in pressure ulcer prevention and treatment: National Pressure Ulcer Advisory Panel white paper. **Adv Skin Wound Care**, v. 22, n. 5, p. 212-221, maio 2009.

DOVI, J. V.; HE, L. K.; DIPIETRO, L. A. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. **J Leukoc Biol.**, v. 73, n. 4, p. 448-455, abr. 2003.

EDSBERG, L. E. Pressure ulcer tissue histology: an appraisal of current knowledge. **Ostomy Wound Manage**, v. 53, n. 10, p. 40-49, out. 2007.

EFFERTH, T. et al. The Antiviral Activities of Artemisinin and Artesunate. **Clinical Infect. Diseases**. v. 47, p. 804-811, set. 2008.

ELIAS, J. A. et al. Fibroblast interleukin 1 beta: synergistic stimulation by recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor and posttranscriptional regulation. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 86, n. 16, p. 6171-6175, ago. 1989.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **J Invest Dermatol.**, v. 127, n. 3, p. 514-525, mar. 2007.

ENFIELD, G. P. LEIBOVICH, S. J. Macrophage Heterogeneity and Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 2, p. 89-95, 2011.

EREL, Sura Baykan et al. Antimicrobial and antioxidant properties of Artemisia L. species from western Anatolia. **Turkish Journal of Biology**, v. 36, n. 1, p. 78, jan. 2012.

ETENG, M. U. et al. Biochemical and Haematological Evaluation of Repeated Dose Exposure of Male Wistar Rats to an Ethanolic Extract of Artemisia *annua*. **Phytother Res.**, jun. 2012.

EUROPEAN PRESSURE ULCER ADVISORY PANEL AND NATIONAL PRESSURE ULCER ADVISORY PANEL (EPUAP & NPUAP). **Treatment of pressure ulcers: Quick Reference Guide**, Washington DC, National Pressure Ulcer Advisory Panel, 2009.

FANTONE, J. C.; WARD, P. A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **Am J Pathol.**, v. 107, n. 3, p. 395–418, jun. 1982.

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

FRAGA, C. G.; LEIBOVITZ, B. E.; TOPPEL, A. L. Lipid peroxidation measured as TBARS in tissue slices. Characterization and comparison with homogenate and microsome. **Free Radic Biol Med.**, v. 4, n. 3, p. 155-161, 1988.

FRIDLENDER, Z. G. et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. **Cancer Cell.**, v. 16, n. 3, p. 183-194, set. 2009.

FRONZA, M. et al. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **J Ethnopharmacol.**, v. 126, n. 3, p. 463-467, dez. 2009.

GANDARILLAS, A. Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways? **Exp Gerontol.**, v. 35, n. 1, p. 53-62, fev. 2000.

GILANI, A. H. et al. Hepatoprotective activity of aqueous-methanol extract of *Artemisia vulgaris*. **Phytother Res.**, v. 19, n. 2, p.170-172, fev. 2005.

GILL, S. E; PARKS, W. C. Metalloproteinases and Their Inhibitors: Regulators of Wound Healing. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 40, n. 6-7, p. 1334–1347, jun./jul. 2008.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **J Leukoc Biol.**, v. 69, n. 4, p. 513-521, abr. 2001.

GOSAIN, A.; DIPIETRO, L. A. Aging and wound healing. **World J Surg**, v. 28, n. 3, p. 321-326, mar. 2004.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-321, mai. 2008.

HALLIGAN, J. P. Toxic Terpenes From *Artemisia Californica*. **Ecology**, v. 56, n. 4, p. 999-1003, jul. 1975.

HASHIMOTO, M.; KUROSE, T.; KAWAMATA, S. Comparison between a weight compression and a magnet compression for experimental pressure ulcers in the rat. Histological studies and effects of anesthesia. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 71, n. 5, p. 303-316, dez. 2008.

HATSUKARI, I. *et al.* Partial purification of cytotoxic substances from moxaextract. **Anticancer Res.**, v. 22, n. 5, p. 2777-2782, set./out. 2002.

HAYAT M. Q. *et al.* Ethnobotany of the Genus *Artemisia* L. (*Asteraceae*) in Pakistan. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 7, p. 147-162, maio 2009.

HENG, M.C. Wound healing in adult skin: aiming for perfect regeneration. **Int J Dermatol.**, v. 50, n. 9, p. 1058-1066, set. 2011.

HITOSUGI, N. *et al.* Diverse biological activities of moxa extract and smoke. **In Vivo**, v. 15, n. 3, p. 249-54, maio/jun. 2001.

HITOSUGI, N. *et al.* Induction of cell death by pro-oxidant action of moxa smoke. **Anticancer Res.**, v. 22, p. 159-163, jan./fev. 2002.

HOUGHTON, P. E. *et al.* Photographic assessment of the appearance of chronic pressure and leg ulcers. **Ostomy Wound Manage**, v. 46, n. 4, p. 20-26, 28-30, abr. 2000.

IBVMEDICAL. **[Moxa palito e base de sustentação]**. Formosa, GO: IBVMedical, 2013. Disponível em: <[www.ibvmedical.com](http://www.ibvmedical.com)>. Acesso em: 10 jan. 2013.

ICHIOKA, S. Therapeutic approach to chronic skin ulcers (Article in Japanese). **Nippon Ronen Igakkai Zasshi**, v. 45, n. 6, p. 591-593, nov. 2008.

INTERACTIVE AGRICULTURAL ECOLOGICAL ATLAS OF RUSSIA AND NEIGHBORING COUNTRIES. **[*Artemisia vulgaris*]**. Russia, 2009. Disponível em: <[http://www.agroatlas.ru/en/content/weeds/Artemisia\\_vulgaris](http://www.agroatlas.ru/en/content/weeds/Artemisia_vulgaris)>. Acesso em: 10 jan. 2013.

JIANG, L. P. *et al.* Ischemia-reperfusion injury-induced histological changes affecting early stage pressure ulcer development in a rat model. **Ostomy Wound Manage**, v. 57, n. 2, p. 55-60, fev. 2011.

KAJI, T. et al. A Stimulatory effect of Artemisia Leaf extract on the proliferation of cultured Endothelial cells. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 38, n. 2, p. 538-540, fev. 1990.

KIM, D.S. **Dicionário de Medicina Oriental**. São Paulo: Dong Yang, 2008.

KODIPPILI, K. et al. An investigation of the antimalarial activity of *Artemisia vulgaris* leaf extract in a rodent malaria model. **Int. J. of Green Pharmacy**, v. 5, n. 4, p. 276-281, mar. 2011.

KOGANOV, M. M.; DUEVA, O. V.; TSORIN, B. L. Activities of plant-derived phenols in a fibroblast cell culture model. **J Nat Prod.**, v. 62, n. 3, p. 481-483, mar. 1999.

KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Rev Mol Med.**, v. 11, n. 13, p. 1-12, jul. 2011.

KOKATE, J. Y. et al. Temperature-modulated pressure ulcers: a porcine model. **Arch Phys Med Rehabil.**, v. 76, n. 7, p. 666-673, jul. 1995.

KOOLWIJK, P. et al. Cooperative effect of TNF-alpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. **J Cell Biol.**, v. 132, n. 6, p. 1177-1188, mar. 1996.

KOSIAK, M. Etiology of decubitus ulcers. **Arch Phys Med Rehabil.**, v. 42, p. 19-29, jan. 1961.

KOTTAKIS, F. et al. FGF-2 regulates cell proliferation, migration, and angiogenesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 pathway. **Mol Cell.**, v. 43, n. 2, p. 285-298, jul. 2011.

KRISHNA, S. et al. Artemisinins: their growing importance in medicine. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 29, n. 10, p. 520-527, out. 2008.

KRISHNAN, P. The scientific study of herbal wound healing therapies: Current state of play. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 17, n. 1, p. 21-27, 2006.

KROUSKOP, T. A. et al. Mechanisms of decubitus ulcer formation--an hypothesis. **MedHypotheses.**, v. 4, n. 1, p. 37-39, jan./fev. 1978.

LASKIN, D. L. et al. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 51, p. 267-288, out. 2011.

LEE, H. I. et al. Comparative study of the hepatoprotective efficacy of *Artemisia iwayomogi* and *Artemisia capillaris* on ethanol-administered mice. **J Food Sci.**, v. 76, n. 9, nov./dez. 2011.

LEE, S. J. Estrogenic Flavonoids from *Artemisia vulgaris* L. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, n. 8, p. 3325-3329, jul. 1998.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin Dermatol.**, v. 25, n. 1, p. 9-18, jan./fev. 2007.

LINDER-GANZ, E. et al. Assessment of mechanical conditions in sub-dermal tissues during sitting: a combined experimental-MRI and finite element approach. **J Biomech.**, v. 40, n. 7, p.1443-1454, ago. 2007.

LYNCH, S. E. et al. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 84, n. 21, p. 7696–7700, nov. 1987.

MACEDO, L. et al. Wound healing is impaired in MyD88-deficient mice: a role for MyD88 in the regulation of wound healing by adenosine A2A receptors. **Am J Pathol.**, v. 171, p. 1774, dez. 2007.

MAHDAVIAN, Delavary B. et al. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, v. 216, n. 7, p. 753-762, jul. 2011.

MANSBRIDGE, J. N. et al. Growth factors secreted by fibroblasts: role in healing diabetic foot ulcers. **Diabetes Obes Metab.**, v. 1, n. 5, p. 65-79, set. 1999.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol.**, v. 11, n. 8, p. 519-531, jul. 2011.

MARTIN, D.; GALISTEO, R.; GUTKIND, J. S. CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NF-kappa-B through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. **J Biol Chem.**, v. 284, n. 10, p. 6038-6042, mar. 2009.

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

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol.**, v. 15, n. 11, p. 599-607, nov. 2005.

MARTIN, T. A.; HARDING, K.; JIANG, W. G. Matrix-bound fibroblasts regulate angiogenesis by modulation of VE-cadherin. **Eur J Clin Invest.**, v. 31, n. 11, p. 931-938, nov. 2001.

MARTIN, T. A.; HARDING, K. G.; JIANG, W. G. Regulation of angiogenesis and endothelial cell motility by matrix-bound fibroblasts. **Angiogenesis**, v. 3, n. 1, p. 69-76, maio 1999.

MATSUMOTO, H. et al. Inhibition by moxa smoke of NO production and NOSi expression in mouse macrophage-like cells Raw 264.7. **In Vivo**, v. 19, n. 2, p. 471-474, mar./abr. 2005.

MCCOLL, S. R. et al. Human neutrophils produce high levels of the interleukin 1 receptor antagonist in response to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. **J Exp Med.**, v. 176, n. 2, p. 593-598, ago. 1992.

MCCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **Am J Med.**, v. 108, n. 8, p. 652-9, jun. 2000.

MCLAUGHLIN, L. M.; DEMPLE, B. Nitric oxide-induced apoptosis in lymphoblastoid and fibroblast cells dependent on the phosphorylation and activation of p53. **Cancer Res.**, v. 65, n. 14, p. 6097-6104, jul. 2005.

MENDONÇA, R. J. et al. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Phytother Res.**, v. 24, n. 5, p. 764-768, maio 2010.

MENEGAZZI, R.; DECLEVA, E.; DRI, P. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? **Blood.**, v. 119, n. 5, p. 1214-1216, fev. 2012.

MENESES, R. et al. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v. 6, n. 8, p. 8, mar. 2009.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem.**, v. 86, n. 1, p. 271-278, maio 1978.

MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J Immunol.**, v. 164, n. 12, p. 6166-73, jun. 2000.

MOHAGHEGHZADEH, A. et al. Medicinal smokes. **J Ethnopharmacol.**, v. 108, n. 2, p. 161-184, nov. 2006.

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

MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 85, n. 13, p. 4894-4897, jul. 1988.

MORANT, G. S. **Acupuntura**. Buenos Aires: Medica Panamericana, 1990.

MORIN, R. J.; TOMASELLI, N. L. Interactive dressings and topical agents. **Clin Plast Surg.**, v. 34, n. 4, p. 643-658, out. 2007.

MOST, D. et al. Characterization of incisional wound healing in inducible nitric oxide synthase knockout mice. **Surgery**, v. 132, n. 5, p. 866-876, nov. 2002.

MUKINDA, J. T.; SYCE, J. A. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. **J Ethnopharmacol.**, v. 112, n. 1, p. 138-144, maio 2007.

MURRELL, G. A.; FRANCIS, M. J.; BROMLEY, L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. **Biochem J.**, v. 265, n. 3, p. 659-665, fev. 1990.

NAUTIYAL, C. S.; CHAUHAN, P. S.; NENE, Y. L. Medicinal smoke reduces airborne bacteria. **J Ethnopharmacol.**, v. 114, n. 3, p. 446-451, dez. 2007.

NEGAHBAN, M.; MOHARRAMIPOUR, S.; SEFIDKON, F. Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. **J Stored Prod Res.**, v. 43, n. 2, p. 123-128, 2007.

NEWMAN, A. C. et al. The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. **Mol Biol Cell.**, v. 22, n. 20, p. 3791-3800, out. 2011.

NG, M. F. Y. The role of mast cells in wound healing. **Int Wound J.**, v. 7, p. 55-61, fev. 2010.

NIEDERHAUSER, A. et al. Comprehensive programs for preventing pressure ulcers: a review of the literature. **Adv Skin Wound Care.**, v. 25, n. 4, p. 167-188, abr. 2012.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr.**, v. 74, n. 4, p. 418-425, out. 2001.

NUCLEUS MEDICAL MEDIA. **[Danos teciduais na úlcera por pressão e Formação da úlcera por pressão]**. Estados Unidos: Nucleus Medical Media, 2013. Disponível em: <<http://www.nucleuscatalog.com>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

NUSSBAUM, E. L. et al. Ultraviolet-C irradiation in the management of pressure ulcers in people with spinal cord injury: a randomized, placebo-controlled trial. **Arch Phys Med Rehabil.**, v. 94, n. 4, p. 650-659, abr. 2013.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test Guideline 411. Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study. Paris: OECD, 1981.

OSKERITZIAN, C. A. Mast Cells and Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 1, n. 1, p. 23-28, fev. 2012.

OVINGTON, L. G. Advances in wound dressings. **Clin Dermatol.**, v. 25, n. 1, p. 33-38, jan./fev. 2007.

PARAPURAM, S. K. et al. Loss of PTEN expression by dermal fibroblasts causes skin fibrosis. **J Invest Dermatol.**, v. 131, n. 10, p. 1996-2003, out. 2011.

PIEPER, B. Mechanical Forces: Pressure, Shear, and Friction. In: BRYANT, R. A.; NIX, D. P. **Acute & Chronic Wounds**: current management concepts. 3. ed. St. Louis: Elsevier, 2007.

PILCHER, B. K. et al. Collagenase-1 and collagen in epidermal repair. **Arch Dermatol Res.**, v. 290, supl. 1, p. 37-46, jul. 1998.

PILLEN, H. et al. Assessment of wound healing: validity, reliability and sensitivity of available instruments. **Wound Practice and Research.**, v. 17, n. 4, p. 208-217, nov. 2009.

PIRES, J. M. et al. Antinociceptive peripheral effect of *Achillea millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L.: both plants known popularly by brand names of analgesic drugs. **Phytother Res.**, v. 23, n. 2, p. 212-219, fev. 2009.

PORTER, S. The role of the fibroblast in wound contraction and healing. **Wounds UK.**, v. 3, n. 1, p. 33-40, 2007.

RAGASA, C. Y. et al. A new sesquiterpene from *Artemisia vulgaris*. **J Nat Med.**, v. 62, p. 461-463, 2008.

RAMANATHAN, M. et al. Differential regulation of HIF-1a isoforms in murine macrophages by TLR4 and adenosine A2A receptor agonists. **J Leukoc Biol.**, v. 86, p. 681, 2009.

RAMEZANI, M. et al. Antimicrobial activity of four *Artemisia* species of Iran. **Fitoterapia**, v. 75, n. 2, p. 201-203, mar. 2004.

RAVIPATI, A. S. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. **BMC Complement Altern Med.**, v. 6, n. 12, p. 173, out. 2012.

REDDY, M. et al. Treatment of Pressure Ulcers. **The J. of the Amer. Med. Assoc.**, v. 300, n. 22, dez. 2008.

REDDY, N. P.; COCHRAN, G. V. Interstitial fluid flow as a factor in decubitus ulcer formation. **J Biomech.**, v. 14, n. 12, p. 879-881, 1981.

REDELINGS, M. D.; LEE, N. E.; SORVILLO, F. Pressure ulcers: more lethal than we thought? **Adv Skin Wound Care**, v. 18, n. 7, p. 367-372, 2005.

REED, K. et al. **Health Grades Patient Safety in American Hospitals Study.** Denver: HealthGrades, mar. 2011.

REINKE, J.M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **Eur Surg Res.** v.49, n.1, p.35-43, 2012.

RENDELL, M. S. et al. Skin blood flow response in the rat model of wound healing: expression of vasoactive factors. **J Surg Res.**, v. 107, n. 1, p. 18-26, set. 2002.

RIDNOUR, L. A. et al. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 102, n. 37, p. 13147-13152, set. 2005.

RODERO, M. P.; KHOSROTEHRANI, K. Skin wound healing modulation by macrophages. **Int J Clin Exp Pathol.**, v. 3, n. 7, p. 643-653, jul. 2010.

ROLSTAD, B. S.; OVINGTON, L.G. Principles of Wound Management. In: BRYANT, R. A.; NIX, D. P. **Acute & Chronic Wounds:** current managment concepts. 3. ed. St. Louis: Elsevier, 2007. cap. 9, p. 391-426.

- RYU, S. Y.; OAK, M. H.; KIM, K. M. Yomogin inhibits the degranulation of mast cells and the production of the nitric oxide in activated RAW 264.7 cells. **Planta Med.**, v. 66, n. 2, p. 171-173, mar. 2000.
- SAITO, Y. et al. The Loss of MCP-1 Attenuates Cutaneous Ischemia-Reperfusion Injury Mouse Model of Pressure Ulcer. **J. of Invest Dermatol.**, v. 128, p. 1838-1851, jan. 2008.
- SAKAGAMI, H. et al. Cytotoxicity and radical modulating activity of moxa smoke. **In Vivo**, v. 19, n. 2, p. 391-397, mar./abr. 2005.
- SALCIDO, R.; POPESCU, A.; AHN, C. Animal Models in Pressure Ulcer Research. **J Spinal Cord Med.**, v. 30, n. 2, p. 107-116, 2007.
- SALVEN, P. et al. Interleukin-1alpha promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion. **FASEB J.**, v. 16, n. 11, p. 1471-1473, set. 2002.
- SARATH, V. J et al. *Artemisia princeps varorientalis* induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. **Anticancer Res.**, v. 27, p. 3891-3898, nov./dez. 2007.
- SCHÄFER, M.; WERNER, S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 9, n. 8, p. 628-638, ago. 2008.
- SCHÄFFER, M. R. et al. Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. **J Immunol.**, v. 158, n. 5, p. 2375-2381, 1997.
- SHENOY, R. R. et al. Normal and delayed wound healing is improved by sesamol, an active constituent of *Sesamum indicum* (L.) in albino rats. **J Ethnopharmacol.**, v. 133, n. 2, p. 608-612, jan. 2011.
- SHOSKES, D. A. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. **Transplantation**, v. 66, p. 147-152, 1998.
- SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med.**, v. 341, n.10, p. 738-746. set. 1999.
- SINGH, N. P.; LAI, H. C. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells. **Anticancer Res.**, v. 24, n. 4, p. 2277-2280, jul./ago. 2004.
- STADLER, I. et al. Development of a simple, noninvasive, clinically relevant model of pressure ulcers in the mouse. **J. Invest. Surg.**, v. 17, p. 221–227, 2004.
- STAIANO-COICO, L. et al. Human keratinocyte growth factor effects in a porcine model of epidermal wound healing. **J Exp Med.**, v. 178, n. 3, p. 865-878, set. 1993.
- STAUSBERG, J.; KIERFER, E. Classification of pressure ulcers: a systematic literature review. **Stud. Health Technol. Inform.**, v. 146, p. 511-515, 2009.

- STEED, D. L. Debridement. **Am J Surg.**, v. 187, n. 5A, p. 71-74, maio 2004.
- STOUT, R. D. Macrophage functional phenotypes: no alternatives in dermal wound healing? **J Leukoc Biol.**, v. 87, n. 1, p. 19-21, jan. 2010.
- SUMAN, P. et al. The use of angiogenic-antimicrobial agents in experimental wounds in animals: problems and solutions. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1270, p. 28-36. out. 2012.
- SUNDERKÖTTER, C. et al. Macrophages and angiogenesis. **J Leukoc Biol.**, v. 55, n. 3, p. 410-422, mar. 1994.
- SURESH, J. et al. Determination of Artemisinin in *Artemisia Arbotanum* and *Artemisia Pallens* by LC/MS Method. **Int J Curr Pharm Res.**, v. 3, n. 1, 2011.
- SUTTIE, A. W. Histopathology of the Spleen. **Toxicol. Pathol.**, v. 34, p. 466-503, 2006.
- SYSTAGENIX. **[Hidrogel com alginato]**. Vinhedo, SP: Systagenix, 2013. Disponível em: <[www.systagenix.com.br](http://www.systagenix.com.br)>. Acesso em: 10 jan. 2013.
- TELLER, P.; WHITE, T. K. The physiology of wound healing: injury through maturation. **Surg Clin North Am.**, v. 89, n. 3, p. 599-610, jun. 2009.
- TEMRAZ, A.; EL-TANTAWY, W. H. Characterization of antioxidant activity of extract from *Artemisia vulgaris*. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v. 21, n. 4, p. 321-326, out. 2008.
- TERRA, D. A. et al. Effect of an Extract of *Artemisia vulgaris* L. (Mugwort) on the *in vitro* Labeling of Red Blood Cells and Plasma Proteins with Technetium-99m. **Bras. Arch. Biol. And Tecn. Intern. J.**, v. 50, p. 123-128, set. 2007.
- THEILGAARD-MÖNCH, K. et al. The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. **J. Immunol.**, v. 172, n. 12, p. 7684-7693, jun. 2004.
- TIGNO, X. T.; GUMILA, E. In vivo microvascular actions of *Artemisia vulgaris* L. in a model of ischemia-reperfusion injury in the rat intestinal mesentery. **Clin Hemorheol Microcirc.**, v. 23, n. 2, p. 159-165, 2000.
- TONNESEN, M. G.; FENG, X.; CLARK, R. A. Angiogenesis in wound healing. **J Investig Dermatol Symp Proc.**, v. 5, n. 1, p. 40-46, dez. 2000.
- TRABUCCHI, E. et al. Low molecular weight hyaluronic acid prevents oxygen free radical damage to granulation tissue during wound healing. **Int J Tissue React.**, v. 24, n. 2, p. 65-71, 2002.
- TREADWELL, T. et al. The regenerative peptide thymosin  $\beta$ 4 accelerates the rate of dermal healing in preclinical animal models and in patients. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1270, p. 37-44, out. 2012.

TSUJI, S. et al. Analysis of ischemia-reperfusion injury in a microcirculatory model of pressure ulcers. **Wound Repair Regen.**, v. 13, n. 2, p. 209-215, mar./abr. 2005.

VAALAMO, M. et al. Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. **J Invest Dermatol.**, v. 109, n. 1, p. 96-101, jul. 1997.

VANDE BERG, J. S. et al. Cultured pressure ulcer fibroblasts show replicative senescence with elevated production of plasmin, plasminogen activator inhibitor-1, and transforming growth factor-beta1. **Wound Repair Regen.**, v. 13, n. 1, p. 76-83, jan./fev. 2005.

VANDE BERG, J. S. et al. Fibroblast senescence in pressure ulcers. **Wound Repair Regen.**, v. 6, n. 1, p. 38-49, jan./fev. 1998.

VIDISNK, B. P.; GAL, T.; TOPORCER, F.; LONGAUER, L.; LENHARDT, N.; BOBROV, J. Sabo: Histological Study of the First Seven Days of Skin Wound Healing in Rats. **Acta Vet. Brno**, v.75, p.197-202, 2006.

WANG, J. et al. Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **J. Stored Prod. Res.**, v. 42, p. 339-347, 2006.

WARREN, J. B. Nitric oxide and human skin blood flow responses to acetylcholine and ultraviolet light. **FASEB J.**, v. 8, n. 2, p. 247-251, fev. 1994.

WHEELER, J.; COPPOCK, B.; CHEN, C. Does the burning of moxa (*Artemisia vulgaris*) in traditional Chinese Medicine constitute a health hazard? **Acupunct. Med.**, v. 27, n. 1, p. 16-20, mar. 2009.

WITKOWSKI, J. A.; PARISH, L. C. Debridement of cutaneous ulcers: medical and surgical aspects. **Clin Dermatol.**, v. 9, n. 4, p. 585-591, out./dez. 1991.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg Clin North Am.**, v. 77, n. 3, p. 509-528, jun. 1997.

WITTE, M. B. et al. Enhancement of fibroblast collagen synthesis by nitric oxide. **Nitric Oxide**, v. 4, n. 6, p. 572-582, dez. 2000.

WOJDYLO, A; OSZMIAŃSKI, J; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 940-949, 2007.

XAGORARI, A.; ROUSSOS, C.; PAPAPETROPOULOS, A. Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin. **Br J Pharmacol.**, v. 136, n. 7, p. 1058-1064, ago. 2002.

XI, M. Q.; YUAN, X. J. [Composição química da fumaça de moxa e investigação farmacológica: revisão de literatura]. **Shi Zhen Guo Yi Guo Yao**, v. 14, n. 8, 2003.

ZHAI, H.; MAIBACH, H. I. Skin occlusion and irritant and allergic contact dermatitis: an overview. **Contact Dermatitis.**, v. 44, n. 4, p. 201-206, abr. 2001.

ZHANG, Q. H. et al. Traditional Chinese medicine for pressure ulcer: a meta-analysis. **Int Wound J.**, v. 8, abr. 2012.

ZHAO, B. et al. Effects of moxa (*Artemisia vulgaris*) smoke inhalation on heart rate and its variability. **Chinese Medicine**, v. 2, n. 2, p. 53-57, 2011.