

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 01/02/2023.

**MODELAGEM MATEMÁTICA DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
CUTÂNEAS COM BASE EM MODELO BIOLÓGICO EM RATOS**

Marta Helena de Oliveira

Tese apresentada à Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para a ob-
tenção do título de Doutor em Biometria.

BOTUCATU
São Paulo - Brasil
Fevereiro – 2021

**MODELAGEM MATEMÁTICA DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
CUTÂNEAS COM BASE EM MODELO BIOLÓGICO EM RATOS**

Marta Helena de Oliveira

Orientador: Dr. **Paulo Fernando de Arruda Mancera**

Coorientadora: Dra. **Cláudia Helena Pellizzon**

Tese apresentada à Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para a ob-
tenção do título de Doutor em Biometria.

BOTUCATU
São Paulo - Brasil
Fevereiro – 2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Oliveira, Marta Helena de.

Modelagem matemática da cicatrização de feridas
cutâneas com base em modelos biológicos em ratos / Marta
Helena de Oliveira. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Paulo Fernando de Arruda Mancera

Coorientador: Cláudia Helena Pellizzon

Capes: 90194000

1. Modelos matemáticos. 2. Angiogênese. 3. Pele -
Ferimentos e lesões. 4. Cicatrização. 5. Equações
diferenciais.

Palavras-chave: Angiogênese; Celularidade; Cicatrização ;
Equações diferenciais; Feridas na pele.

Dedicatória

Esse trabalho é dedicado à minha família.

Agradecimentos

Entre tropeços e recomeços escolhi viver essa aventura. Um árduo caminho a ser trilhado e o que seria deste sem meus apoiadores? Na concretização desse sonho ousou dizer que de nada valeria a conquista sem que eles estivessem comigo. Sempre tive apoio e companhia, fosse na glória ou na tribulação. E em primeiro lugar devo agradecer aos meus heróis: meus pais José e Áurea, guerreiros incansáveis e não muito além aos meus irmãos Ailton, Meirinês e Inês por todo apoio, carinho e incentivo.

Aos meus sobrinhos André, Letícia, Camila, Artur e Alexandre, meus eternos meninos, pelo sorriso e pelo brilho no olhar esternando constante orgulho, admiração e me impulsionando a resistir as grandes dificuldades.

À todos os amigos que me acompanharam nessa jornada tornando-a mais gratificante e aqui devo citar Lucas Fernando Sérgio Gushiken, Eduardo Ribeiro Pinto, Jairo Gomes da Silva, Daniel Chieregato Vicentin, Francini Piccolo Ferreira, Gabriela Colovati de Almeida, Juliana Aparecida Gualberto, Felipe Teles Barbosa, Luiz Gustavo Lyra, Janielly Matos Vieira, Roniel Antonio de Araújo e Felipe de Almeida Camargo.

À todos os docentes e funcionários do Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia pela cordialidade e profissionalismo.

Ao meu orientador do mestrado César Guilherme de Almeida que muito contribuiu com meus conhecimentos científicos e a Rosana Sueli da Motta Jafelice pelo incentivo.

À minha coorientadora Cláudia Helena Pellizzon pela sua presteza, pelo companherismo e por todo apoio e aqui não poderia deixar de relatar minha

admiração por sua competência profissional e humana.

Ao meu orientador Paulo Fernando de Arruda Mancera por todo companherismo, pela prontidão, pelos ensinamentos didáticos, científicos e humanos a quem devo muito mais que agradecimentos. Por ele tenho profunda admiração, me sinto honrada de ter sido agraciada com sua orientação e agora ousou chamá-lo de amigo.

À Faculdade de Matemática da Universidade Federal de Uberlândia por todo apoio, inclusive financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Ao programa de pós-graduação em Biometria da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Botucatu.

À banca examinadora pela disposição e pelo zelo.

Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida, e que, porventura, não tenham sido citadas.

Sumário

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xviii
SUMMARY	xx
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Células	3
1.2 Cicatrização de feridas na pele	7
1.2.1 Fase Inflamatória	8
1.2.2 Fase Proliferativa	11
1.2.3 Fase de Remodelamento	12
1.3 Angiogênese	14
1.4 Tratamentos de Feridas na Pele	18
1.5 Dados Experimentais	20
1.6 Modelagem Matemática da Cicatrização de Feridas na Pele	26
1.7 Estrutura do Texto	27
1.8 Objetivo	28
2 MODELAGEM MATEMÁTICA DA FASE INFLAMATÓRIA	29
2.1 Equação de Hill	29
2.2 Problemas <i>Stiff</i>	31

2.3	Modelos Matemáticos	33
2.3.1	Calibração dos Parâmetros	44
2.3.2	Resultados e Discussão	45
2.4	Modelo Matemático da Fase Inflamatória	52
3	MODELAGEM MATEMÁTICA DA DIFUSÃO CELULAR	59
3.1	Equação de Fisher-Kolmogorov	59
3.1.1	Solução Numérica	61
3.1.2	Ondas Viajantes	63
3.2	Sistema Reação-Difusão	65
3.3	Modelagem Matemática da Fase Proliferativa	68
3.4	Um Modelo Matemático Difusivo da Fase Inflamatória	73
4	UM MODELO MATEMÁTICO PARA ANGIOGÊNESE DE FERIDAS CUTÂNEAS	81
4.1	Modelagem Matemática	82
4.2	Resultados	88
5	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

Lista de Figuras

	Página
1 Representação esquemática da organização hierárquica da hematopoese na vida adulta.	4
2 Ilustração das fases de cicatrização de feridas. Figura modificada de Eming et al. (2017).	8
3 Ilustração de eventos que ocorrem na fase inflamatória da cicatrização de feridas na pele. Fonte: Gushiken (2017), figura modificada de Reinke & Sorg (2012).	10
4 Ilustração de eventos que ocorrem na fase proliferativa da cicatrização de feridas na pele. Fonte: Gushiken (2017), figura modificada de Reinke & Sorg (2012).	13
5 Ilustração de eventos que ocorrem na fase de remodelamento da cicatrização de feridas na pele. Fonte: Gushiken (2017), figura modificada de Reinke & Sorg (2012).	14
6 Ilustração do processo de formação dos vasos sanguíneos	15
7 Ilustração da formação dos brotos (<i>buds</i>) e do brotamento proximal (<i>sprout</i>). Figura modificada de Bischoff (1995) e gerada pelo aplicativo BioRender (Aoki, 2020).	16
8 Esquema (A) e fotografia (B) ilustrando o modelo de excisão de lesão cutânea de segunda intenção utilizando <i>punch</i> de 2 cm de diâmetro. Fonte: Gushiken (2017).	21

9	Fotografias das lesões dos animais tratados com cremes Lanette, Colagenase, 10% EH e 10% OR durante 3, 7 e 14 dias de experimentação. Os grupos 10% EH e 10% OR apresentavam no local somente a cicatriz da lesão enquanto os grupos CL e colagenase apresentavam crosta fibrinosa. Fonte: Gushiken (2017).	22
10	Dispersão da média das concentrações de IL-6 (pg/mg de proteína) dos resultados obtidos em laboratório.	24
11	Dispersão da média das concentrações de IL-10 (pg/mg de proteína) dos resultados obtidos em laboratório.	24
12	Curva de dispersão da média dos dados experimentais da celularidade total na borda da ferida (cel mm^{-3}).	24
13	Dispersão da média dos dados experimentais da concentração química da mitose (PCNA) na borda da ferida (pg mm^{-3}).	24
14	Curva de dispersão da média dos dados experimentais do quimiotratante VEGF na borda da ferida (μm^2).	25
15	Dispersão da média dos dados experimentais da densidade do brotamento distal na borda da ferida (U).	25
16	Ilustração dos gráficos da função de Hill para diferentes valores de n_h . . .	31
17	Ilustração dos gráficos da equação (3) para diferentes valores de V_{max}	31
18	Ilustração dos gráficos da equação (3) para diferentes valores de $k_{0.5}$	31
19	Diagrama representativo do modelo matemático (7).	35
20	Diagrama representativo do modelo matemático (10)	40
21	Ilustração da dinâmica do 10% OR, para o modelo 10. Tempo de cicatrização da ferida: 31,4 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando de forma descendente a linha pontilhada, a qual corresponde a 30% da celularidade total.	47
22	Ilustração da dinâmica do 10% EH, para o modelo 10. Tempo de cicatrização da ferida: 28,4 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando de forma descendente a linha pontilhada, a qual corresponde a 30% da celularidade total.	47

23	Ilustração da dinâmica do CL, para o modelo 10. Tempo de cicatrização da ferida: 16,9 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando de forma descendente a linha pontilhada, a qual corresponde a 30% da celularidade total.	48
24	Ilustração da dinâmica da Colagenase, para o modelo 10. Tempo de cicatrização da ferida: 41,5 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando de forma descendente a linha pontilhada, a qual corresponde a 30% da celularidade total.	48
25	Ilustração da dinâmica do tratamento 10% OR, para o modelo 26. Tempo de cicatrização da ferida: 18,9 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando a linha pontilhada de forma descendente, a qual corresponde a 30% da celularidade total.	53
26	Ilustração da dinâmica do tratamento 10% EH, para o modelo 26. Tempo de cicatrização da ferida: 17,3 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando a linha pontilhada de forma descendente, a qual corresponde a 30% da celularidade total.	53
27	Ilustração da dinâmica do CL, para o modelo 26. Tempo de cicatrização da ferida: 19,5 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando a linha pontilhada de forma descendente, a qual corresponde a 30% da celularidade total.	54
28	Ilustração da dinâmica da Colagenase, para o modelo 26. Tempo de cicatrização da ferida: 11,3 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando a linha pontilhada de forma descendente, a qual corresponde a 30% da celularidade total.	54
29	Diagrama representativo do domínio das EDP ilustrando o sentido da propagação.	61
30	Solução numérica do modelo para o caso linear $p = 0$ com $D = 10^{-3}$, $\Delta x = 5 \times 10^{-3}$ e $\Delta t = 6,25 \times 10^{-3}$. A celularidade evolui da direita para a esquerda. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.	62

31	Solução numérica do modelo para o caso não linear $p = 4$ com $D = 10^{-3}$, $\Delta x = 5 \times 10^{-3}$ e $\Delta t = 6,25 \times 10^{-3}$. A celularidade evolui da direita para a esquerda. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.	62
32	Solução numérica do modelo matemático (37). Densidade celular N do caso ativador.	67
33	Solução numérica do modelo (37). Concentração química da mitose C do caso ativador.	67
34	Solução numérica do modelo (37). Densidade celular N do caso inibidor.	68
35	Solução numérica do modelo (37). Concentração química da mitose C do caso inibidor	68
36	Ilustração do gráfico da função $N(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% OR.	70
37	Ilustração do gráfico da função $N(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% EH.	70
38	Ilustração do gráfico da função $N(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para CL. . . .	71
39	Ilustração do gráfico da função $N(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para Colagenase.	71
40	Ilustração do gráfico da função $C(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% OR.	71
41	Ilustração do gráfico da função $C(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% EH.	71
42	Ilustração do gráfico da função $C(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para CL. . . .	72
43	Ilustração do gráfico da função $C(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para Colagenase.	72
44	Solução numérica do modelo (36). Densidade celular N , caso inibidor, do tratamento 10% OR. $D_N = 9,9 \times 10^{-6}$, $D_C = 1,2 \times 10^{-7}$, $k = 3,7 \times 10^{-2}$ e $\lambda = 10^{-3}$. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.	72
45	Solução numérica do modelo (36). Densidade celular N , caso inibidor, do tratamento colagenase. $D_N = 9,7 \times 10^{-6}$, $D_C = 3,9 \times 10^{-6}$, $k = 3,7 \times 10^{-2}$ e $\lambda = 10^{-3}$. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.	72
46	Ilustração do gráfico da função $c(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% OR. .	75
47	Ilustração do gráfico da função $g(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% OR.	75

48	Ilustração do gráfico da função $c(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% EH. .	76
49	Ilustração do gráfico da função $g(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% EH. .	76
50	Ilustração do gráfico da função $c(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para CL. . . .	76
51	Ilustração do gráfico da função $g(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para CL. . . .	76
52	Ilustração do gráfico da função $c(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para Colagenase.	77
53	Ilustração do gráfico da função $g(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para Colagenase.	77
54	Solução numérica do modelo matemático (38). Celularidade total 10% OR. Ferida cicatrizada no tempo 14,2 dias. $D_N = 5 \times 10^{-3}$, $D_C = 10^{-2}$, $\gamma_c = 3,0$ e $\omega = 0,03$. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.	77
55	Solução numérica do modelo (38). Celularidade total 10% EH. Ferida cica- trizada no tempo 13,7 dias. $D_N = 5 \times 10^{-3}$, $D_C = 10^{-2}$, $\gamma_c = \frac{5}{9}\tilde{\gamma}_c = 2,5$ e $\omega = 0,03$. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.	77
56	Solução numérica do modelo matemático (38). Celularidade total do CL. Fe- rida cicatrizada no tempo 18,8 dias. $D_N = 5 \times 10^{-3}$, $D_C = 10^{-2}$, $\gamma_c = 4,4785$, $\chi_n = \tilde{\chi}_n/10 = 0,3915$ e $\omega = 0,03$. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.	78
57	Solução numérica do modelo matemático (38). Celularidade total colagenase. Ferida cicatrizada no tempo 16,3 dias. $D_N = 5 \times 10^{-3}$, $D_C = 10^{-2}$, $\gamma_c = 3,6$, $\chi_n = \tilde{\chi}_n = 5,0$ e $\omega = 0,03$. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.	78
58	Ilustração do gráfico da função $b(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% OR. .	86
59	Ilustração do gráfico da função $p(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% OR.	86
60	Ilustração do gráfico da função $b(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% EH. .	87
61	Ilustração do gráfico da função $p(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% EH. .	87
62	Ilustração do gráfico da função $b(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para CL. . . .	87
63	Ilustração do gráfico da função $p(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para CL. . . .	87
64	Ilustração do gráfico da função $b(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para Colagenase.	88

65	Ilustração do gráfico da função $p(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para Colagenase.	88
66	Ilustração da dinâmica da concentração de VEGF, no leito da ferida, para o tratamento 10% OR.	89
67	Ilustração da dinâmica da concentração de VEGF, no leito da ferida, para o tratamento 10% EH.	89
68	Ilustração da dinâmica da concentração de VEGF, no leito da ferida, para o tratamento CL.	90
69	Ilustração da dinâmica da concentração de VEGF, no leito da ferida, para o tratamento Colagenase.	90
70	Ilustração da densidade brotamento distal, no leito da ferida, para o tratamento 10% OR.	90
71	Ilustração da densidade brotamento distal, no leito da ferida, para o tratamento 10% EH.	90
72	Ilustração da densidade brotamento distal, no leito da ferida, para o tratamento CL.	91
73	Ilustração da densidade brotamento distal, no leito da ferida, para o tratamento Colagenase.	91

Lista de Tabelas

	Página
1 Substâncias biologicamente ativas produzidas pelos macrófagos e algumas de suas funções.	5
2 Algumas substâncias biologicamente ativas produzidas pelos macrófagos.	6
3 Descrição das variáveis para os modelos.	36
4 Descrição dos parâmetros para os modelos matemáticos. Todos os parâmetros são positivos.	37
5 Parâmetros do modelo matemático (10) para os tratamentos 10% OR e 10% EH. Apresentamos os valores numéricos e as respectivas proporções desses valores comparados aos à condição inicial.	49
6 Parâmetros do modelo matemático (10) para os tratamentos CL e Colagenase. Apresentamos os valores numéricos e as respectivas proporções desses valores comparados aos à condição inicial.	50
7 Resultados dos níveis celulares e os respectivos tempos do modelo (10). .	51
8 Parâmetros do modelo (26) para os tratamentos 10% OR e 10% EH. Apresentamos os valores dos parâmetros e as respectivas expressões de proporção desses valores quando comparados aos obtidos no modelo 10. .	55
9 Parâmetros do modelo (26) para os tratamentos CL e Colagenasse. Apresentamos os valores dos parâmetros e as respectivas expressões de proporção desses valores quando comparados aos obtidos no modelo 10. . . .	56
10 Resultados dos níveis celulares e os respectivos tempos do modelo (26). .	57
11 Descrição das variáveis e dos parâmetros do modelo (36).	69

12	Constantes das funções fronteira de Dirichlet para celularidade total $N(1, t)$ e concentração química da mitose $C(1, t)$	70
13	Constantes das funções fronteira de Dirichlet para IL-6, $c(1, t)$, e IL-10, $g(1, t)$	75
14	Descrição das variáveis do modelo (39).	83
15	Descrição dos parâmetros do modelo (39).	84
16	Constantes das funções fronteira de Dirichlet para concentração do quimi- otático, $b(1, t)$, e densidade das pontas capilares, $p(1, t)$	86
17	Resultados numéricos estimados pelo modelo (39) para VEGF, b , e bro- tamento distal dos capilares, p , no centro da ferida.	91

Lista de Símbolos

CFC	Células Formadoras de Colônias
Cel	Célula
CL	Creme Lanette
CR	Coefficiente de Rigidez
CTH	Célula Tronco Hematopoética
DBEH	Dados biológicos e equação de Hill
EDO	Equação Diferencial Ordinária
EDP	Equação Diferencial Parcial
EGF	Fator de crescimento epidermal
FGF- α	Fator de crescimento de fibroblasto α
FGF- β	Fator de crescimento de fibroblasto β
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto 2
IFN	Interferon
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-1 α	Interleucina 1 α
IL-1 β	Interleucina 1 β
LTC-IC	Linhagens de progenitores capazes de estensa proliferação e diferenciação
MIF	Fator inibidor de migração de macrófago

mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
pH	Potencial Hidrogeniônico
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TNF- β	Fator de necrose tumoral β
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
μm^2	Micrômetros quadrados
pg	Picograma
U	Unidade

MODELAGEM MATEMÁTICA DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS COM BASE EM MODELO BIOLÓGICO EM RATOS

Autora: MARTA HELENA DE OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. PAULO FERNANDO DE ARRUDA MANCERA

Coorientadora: Profa. Dra. CLÁUDIA HELENA PELLIZZON

RESUMO

O acometimento de feridas na pele aciona o imediato processo de cicatrização para reparar a lesão. A cicatrização de feridas é um processo complexo e composto por fases sucessivas e sobrepostas: inflamação, proliferação e remodelamento. A cicatrização de feridas cutâneas é um processo complexo, devido aos estados patológicos associados, como a diabetes, a localização e profundidade da lesão, presença ou não de infecção, estado nutricional do paciente, doenças crônicas, faixa etária e obesidade. As falhas no processo de cicatrização de feridas são um problema clínico importante com grandes impactos nos custos e cuidados com a saúde abrindo espaço para pesquisas. Uma alternativa de tratamento é o uso de produtos baseados em plantas medicinais por serem utilizadas popularmente desde o início da humanidade. As formulações dos tratamentos 10% óleo-resina e 10% extrato hidroalcoólico

da copaíba apresentam atividade anti-inflamatória, estímulo da angiogênese, da reepitelização, remodelamento da matriz extracelular e retração da área lesada. Como investigações *in vivo*, não invasivas, são difíceis de executar, modelos matemáticos, biologicamente realísticos, fornecem uma ferramenta importante para compreender a cicatrização de feridas por meio de previsões teóricas não obtidas de outra forma. Nesse trabalho é proposto a modelagem matemática dos tratamentos 10% óleo-resina e 10% extrato hidroalcoólico através de equações diferenciais ordinárias e equações diferenciais parciais determinísticas afim de obter o tempo de cicatrização das feridas, evidenciar aspectos fundamentais da angiogênese e fazer previsões acerca de resultados não obtidos em laboratório. Para verificar a eficiência dos tratamentos comparou-se os tratamentos à base de copaíba com o creme referência Colagenase e com o creme lanette, veículo dos cremes 10% óleo-resina e 10% extrato hidroalcoólico. O modelo de equações diferenciais ordinárias estudado reproduziu a resolução do processo inflamatório, o primeiro modelo de equações diferenciais parciais reproduziu a dinâmica de dispersão celular ao longo do raio da ferida e possibilitou encontrar o tempo de cicatrização das feridas. O segundo modelo de equações diferenciais parciais estimou a concentração de fator de crescimento endotelial vascular e a densidade do brotamento distal no leito da ferida.

MATHEMATICAL MODELLING OF SKIN WOUND HEALING BASED ON RATS BIOLOGICAL MODEL

Author: MARTA HELENA DE OLIVEIRA

Adviser: Prof. Dr. PAULO FERNANDO DE ARRUDA MANCERA

Coadviser: Profa. Dra. CLÁUDIA HELENA PELLIZZON

SUMMARY

The skin wounds occurrence triggers the immediate healing process to repair the injury. The wound healing is a complex process and consists of successive and overlapping phases: inflammation, proliferation and remodeling. The healing of skin wounds is difficult due to the associated pathological conditions, such as diabetes, the location, depth of the lesion, the presence or absence of infection, the patient's nutritional status, chronic diseases, age range and obesity. The failures in the wound healing process are an important clinical problem with major impacts on costs and health care, and many researches are being developed. The use of products based on medicinal plants is an alternative treatment for wound healing due to their popularity since the beginning of the humanity. The formulations of the treatments, 10% oilresin and 10% hydroalcoholic extract of copaiba, have anti-inflammatory activity, stimulating angiogenesis, re-epithelialization, the extracellular

matrix remodeling and injured area retraction. As non-invasive *in vivo* investigations are difficult to perform, then mathematical models, biologically realistic, provide an important tool for the understanding of the wound healing through theoretical predictions which can not be obtained by other ways. In this work, we propose the mathematical modelling of the treatments, 10% oilresin and 10% hydroalcoholic extract, using ordinary differential equations and partial differential equations to find the time for the wound healing, to highlight fundamental aspects of angiogenesis and to make predictions about results not obtained in the laboratory. In order to verify the treatment efficacy the copaiba-based treatments were compared with the collagenase cream reference and with the lanette cream, which is the vehicle for the creams 10% oilresin and 10% hydroalcoholic extract. The resolution of the inflammatory process was reproduced by the model of ordinary differential equations, the first model of partial differential equations replicated the dynamics of cell dispersion along the radius of the wound and made it possible to find the healing time of the wounds. The second model of partial differential equations estimated the concentration of vascular endothelial growth factor and the density of the capillary tips in the wound centre.

"Não existe sucesso sem sucessor."

John Maxwell

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico, complexo, de grande demanda metabólica e regulado por mecanismos celulares, moleculares, bioquímicos e humorais (relativo à imunidade), que se inicia logo após a ocorrência do ferimento e pode durar anos (Eming et al., 2017; Reinke & Sorg, 2012).

A cicatrização de feridas cutâneas é reconhecida como importante para a saúde desde o princípio da humanidade. Pergaminhos do antigo Egito (3200-300 A.C.) já descrevem procedimentos de tratamentos de feridas, com o uso de compressão para hemostasia e princípios de cicatrização em diferentes tipos de feridas (Reinke & Sorg, 2012; Murray, 2000b).

A pele, maior órgão do corpo humano, é composto por duas camadas: a epiderme (superfície da pele) e a derme (alguns autores consideram a hipoderme, ou camada adiposa, como camada da pele). A pele possui anexos (folicúlos capilares, glândulas sebáceas e sudoríparas), nervos, corpúsculos sensoriais e vasculatura (Moreski et al., 2018; Rittié, 2016; Reinke & Sorg, 2012). Os vasos sanguíneos que fornecem oxigênio e nutrientes para a pele e que removem resíduos de produtos metabólicos são encontrados na derme (Flegg et al., 2015). Entre as principais funções da pele normal pode-se destacar a garantia de uma barreira protetora ao ambiente externo, a termorregulação corpórea e a proteção contra perda de água (Gushiken, 2017; Horng et al., 2017; Rittié, 2016). Quando essa barreira protetora é rompida por trauma, lesão, radiação, lesão química ou lesão térmica ocorre a injúria, que resulta na ruptura da pele, chamada de ferida ou úlcera e, imediatamente é acionado o processo de cicatrização para reparar o dano (Horng et al., 2017; Gushiken, 2017).

As feridas podem afetar uma ou mais camadas da pele. Feridas superficiais afetam a epiderme e, possivelmente, uma parte da derme, cuja cicatrização é, basicamente, por reepitelização. Feridas profundas destroem a derme e, possivelmente, mais camadas e a cicatrização requer a formação de tecido de granulação (Rittié, 2016; Murray, 2000b).

O sucesso na cicatrização de feridas profundas depende tanto de fatores intrínsecos, como espécies oxidantes e fatores induzíveis por hipóxia, quanto de fatores extrínsecos como medicação, estresse emocional, nutrição e idade (Flegg et al., 2015).

Três principais abordagens são utilizadas para classificar/tratar uma ferida (Rittié, 2016):

- primeira intenção: locais cirúrgicos não infectados com perda mínima de tecido fechados com suturas (as mais simples);
- segunda intenção: processo de reparo de grandes perdas de tecido;
- terceira intenção: feridas abertas por determinado tempo, intencionalmente para observação, desinfecção e desbridamento, e suturadas quando estiverem limpas (as mais complicadas).

Nos seres humanos a maioria das feridas profundas são de primeira intenção. As feridas superficiais são pouco estudadas em pequenos roedores (ratos, camundongos, coelhos), pois sua epiderme possui cerca de 50 μm (0.05 mm) de espessura, o que inviabiliza a repetição dos ferimentos (Rittié, 2016). A epiderme e a derme, combinadas, têm a espessura de, aproximadamente, 1-3 mm, em porcos e humanos, e a camada do tecido adiposo pode ter mais de 1 cm de espessura em alguns locais da pele. No entanto, existem diferenças no mecanismo de cicatrização, no tecido fibroso, entre humanos e animais dificultando a transposição de estudos de animais para humanos (Rittié, 2016; Abdullahi et al., 2014). Segundo Chvapil et al. (1979) existem similaridades, na biologia do tecido conjuntivo, entre ratos e cavalos possibilitando a extrapolação de resultados obtidos nos experimentos com ratos para

cavalos, animais de grande porte e alto valor econômico. Em equinos, a cicatrização de feridas cirúrgicas ou traumáticas se estende por períodos prolongados e muitas vezes o custo limita ou inviabiliza o sucesso do processo de cicatrização (DeRossi et al., 2009).

1.1 Células

As células tronco hematopoéticas (CTH), produzidas na medula óssea, são pluripotentes (originam todas as células sanguíneas). As células precursoras resultantes da diferenciação das CTH expressam diferentes genes, a cada ciclo de mitose, e diferenciam-se em apenas um tipo celular, alguns destes estão representados na Figura 1. A diferenciação celular ocorre sob influência de fatores solúveis (por exemplo CSF - *colony stimulatory-factor*) e de interleucinas (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5 e IL-6) produzidas por células maduras (Vilas Boas, 2019; Carvalho & Collares-Buzato, 2005).

Os monócitos circulam na corrente sanguínea e quando são recrutados no tecido, por fatores químicos, se diferenciam em macrófagos. A função dos macrófagos é regulada por diversas citocinas, leucotrienos e quimiocinas (fatores que controlam a locomoção celular). O monócito é a maior das células brancas sanguíneas, seu diâmetro mede de 12 a 15 μm e seu núcleo é grande e localizado centralmente. Os macrófagos dos tecidos possuem aparência semelhante, porém são um pouco maiores, possuindo de 20 a 25 μm de diâmetro. Tanto a vida média, quanto a capacidade migratória dos macrófagos são pouco conhecidas (Carvalho & Collares-Buzato, 2005).

A principal função dos macrófagos é a defesa do organismo, a partir da fagocitose, e apresentação de antígenos. Em estágio avançado de um processo inflamatório estas células podem se acumular em grandes quantidades englobando e digerindo detritos de células destruídas, proteínas indesejadas, microrganismos, células senescentes e tumorais e, até mesmo células com potencial fagocítico como os

5 CONCLUSÃO

Os modelos de EDO nos permitiram determinar alguns pontos de ação das interleucinas pró e anti-inflamatórias durante o processo de cicatrização de feridas cutâneas. Os dados numéricos obtidos são compatíveis com aqueles *in vivo*, e as aproximações do último modelo de EDO foram mais precisas.

Os modelos de EDO reproduziram a dinâmica celular de cicatrização de feridas na pele de ratos, apresentando resultados para os níveis de celularidade de macrófagos e neutrófilos, consistentes com os valores de celularidade total obtidos em laboratório. A curva do mediador pró-inflamatório ajustou com precisão o nível máximo de IL-6 que ocorreu no dia 7 para os tratamentos 10% OR e 10% EH. O nível máximo de IL-6 para os tratamentos com CL e Colagenase ocorreu no dia 3 e a abordagem do modelo não foi tão eficiente quanto para os tratamentos a base de copaíba. O tempo de cicatrização obtido pelo tratamento com 10% EH foi inferior a 10% OR, o que confirma a eficiência do tratamento.

A inserção do termo na equação da produção da IL-6 advinda dos macrófagos, no modelo EDO, reduziu o coeficiente de rigidez do modelo proporcionando um aumento no intervalo de busca dos parâmetros para o método numérico e tornou o modelo mais realístico biologicamente.

O primeiro modelo de EDP proposto reproduziu a celularidade na borda da ferida, que é maior para 10% EH do que para 10% OR, o que corrobora com os dados *in vivo*. Observamos a dispersão e o nível celular ao longo do raio da ferida, para todos os tratamentos, o que está de acordo com os dados *in vivo*. Notamos que a densidade celular é influenciada diretamente pelos neutrófilos no leito

da ferida, pelos macrófagos na borda da ferida e também encontramos o tempo de cicatrização para todos os tratamentos por meio da inserção dos termos difusivos no modelo de EDO.

O segundo modelo de EDP proposto, o de angiogênese, estimou os valores do VEGF e do brotamento distal no centro da ferida para o tempo final de experimentação, dos quatro tratamentos, além de permitir o cálculo do tempo de cicatrização das feridas. Verificou-se a relação entre o processo inflamatório e a angiogênese e também a preponderância da quimiotaxia na formação e no direcionamento dos novos capilares.

Os modelos propostos levaram a obtenção de resultados que aproximaram resultados de experimentos biológicos *in vivo*, os quais são invasivos, de alto valor econômico e de difícil operacionalização. Os modelos matemáticos evidenciaram aspectos importantes da celularidade e da angiogênese da cicatrização de feridas mostrando o mútuo benefício da colaboração entre pesquisadores de diferentes áreas.

Portanto, esperamos que nosso estudo possa contribuir para a compreensão da cicatrização de feridas cutâneas, bem como, em trabalhos futuros, auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos como alternativa para a utilização de feridas cutâneas em modelos animais.

Como trabalho futuro propõe-se a aplicação de ferramentas computacionais com abordagem discreta, em dimensão maior que um, para simular tempos de cicatrização de feridas e taxas de crescimento de tecidos de múltiplas populações de células em proliferação e migração e o desenvolvimento da rede vascular.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, A.; AMINI-NIK, S.; JESCHKE, M. G. Animal models in burn research. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.71, n.17, p.3241–3255, 2014.
- ADAMS, R. H.; ALITALO, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.8, p.464–478, 2007.
- ANDERSON, A. R. A.; CHAPLAIN, M. A. J. Continuous and discrete mathematical models of tumor-induced angiogenesis. **Bulletin of Mathematical Biology**, v.60, p.857–900, 1998.
- AOKI, S. BioRender. Disponível em: biorender.com, 2020. Acesso em: 20 nov. 2020.
- BALDING, D.; MCELWAIN, D. L. S. A mathematical model of tumour-induced capillary growth. **Journal of Theoretical Biology**, v.114, p.53–73, 1985.
- BISCHOFF, J. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. **Trends in Cell Biology**, v.5, p.69–74, 1995.
- BURDEN, R. L.; FAIRES, J. D. **Análise numérica**. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 465p.
- CABAR, F. R. Concentração sérica do fator de crescimento vascular endotelial - VEGF - e a profundidade da invasão trofoblástica na parede tubária em gestações ampulares. São Paulo, 2008. 107p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo.
- CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Manole, 2005. 465p.

CHVAPIL, M.; PFISTER, T.; SCALADA, S.; UDWIG, J.; PEACOCK JR, E. E. Dynamics of the healing of skin wounds in the horse as compared with the rat. **Experimental and Molecular Pathology**, v.30, p.349–359, 1979.

CUMINATO, J. A.; MENEGUETTE JÚNIOR, M. **Discretização de equações diferenciais parciais**. Rio de Janeiro: SBM, 2013. 367p.

DEROSS, R.; COELHO, A. C. A. O.; MELLO, G. S.; FRAZÍLIO, F. O.; LEAL, C. R. B.; FACCO, G. G.; BRUM, K. B. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.24, n.4, p.276–281, 2009.

DUBITZKY, W.; WOLKENHAUER, O.; CHO, K. H.; YOKOTA, H. **Encyclopedia of systems biology**. New York: Springer, 2013. 2367p.

DUNSTER, J. L.; BYRNE, H. M.; KING, J. R. The resolution of inflammation: a mathematical model of neutrophil and macrophage interactions. **Bulletin of Mathematical Biology**, v.76, p.1953–1980, 2014.

DURMUS, A. S.; HAN, M. C.; YAMAN, I. Comparative evaluation of collagenase and silver sulfadiazine on burned wound healing in rats. **Firat Universitesi Saglik Bilimleri Veteriner Dergisi**, v.23, p.135–139, 2009.

EDELSTEIN-KESHET, L. **Mathematical models in biology**. Canada: SIAM, 2005. 631p.

EMING, S. A.; WYNN, T. A.; MARTIN, P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. **Science**, v.356, p.1026–1030, 2017.

FERREIRA, E.; LUCAS, R.; ROSSI, L. A.; ANDRADE, D. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v.37, n.1, p.44–51, 2003.

FLEGG, J. A.; BYRNE, H. M.; FLEGG, M. B.; MCELWAIN, D. L. S. Wound healing angiogenesis: the clinical implications of a simple mathematical model. **Journal of Theoretical Biology**, v.300, p.309–316, 2012.

FLEGG, J. A.; MENON, S. N.; MAINI, P. K.; MCELWAIN, D. L. S. On the mathematical modeling of wound healing angiogenesis in skin as a reaction-transport process. **Frontiers in Physiology**, v.6, p.262:1–17, 2015.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Firat Universitesi Saglik Bilimleri Veteriner Dergisi**, v.89, n.3, p.219–229, 2010.

GUSHIKEN, L. F. S. Avaliação dos mecanismos bioquímicos, celulares e moleculares na cicatrização de lesões cutâneas em ratos utilizando cremes à base de extrato hidroalcoólico e óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*. Botucatu, 2017. 105p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

GUSHIKEN, L. F. S.; HUSSNI, C. A.; BASTOS, J. K.; ROZZA, A. L.; BESERRA, F. P.; VIEIRA, A. J.; PADOVANI, C. R.; LEMOS, M.; POLIZELLO JUNIOR, M.; SILVA, J. J. M.; NÓBREGA, R. H.; MARTINEZ, E. R. M.; PELLIZZON, C. H. Skin wound healing potential and mechanisms of the hydroalcoholic extract of leaves and oleoresin of *Copaifera Langsdorffii* Desf. Kuntze in rats. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2017, p.1–16, 2017a.

GUSHIKEN, L. F. S.; HUSSNI, C. A.; BASTOS, J. K.; ROZZA, A. L.; PADOVANI, C. R.; TAKAHIRA, R. K.; PELLIZZON, C. H. Hydroalcoholic extract from *Copaifera Langsdorffii* has skin wound healing activity in rats. **International Journal of Complementary & Alternative Medicine**, v.6, n.1, p.1–7, 2017b.

HORNG, H. C.; SHANG, W.-H.; YEH, C.-C.; HUANG, B.-S.; SHANG, C.-P.; CHEN, Y.-J.; TSUI, K.-H.; HUANG, P.-H. Estrogen effects on wound healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.11, p.2325–2339, 2017.

IGLESIAS, P. A.; DEVREOTES, P. N. Navigating through models of chemotaxis. **Current Opinion in Cell Biology**, v.20, p.35–40, 2008.

INGALLS, B. **Mathematical modelling in systems biology: an introduction**. London: MIT Press, 2013. 631p.

ISSEKUTZ, A. C.; MOVAT, H. Z. Quantitation of neutrofil infiltration *in vivo*. **Immunology Letters**, v.1, p.27–30, 1979.

JORGENSEN, S. N.; SANDERS, J. R. Mathematical models of wound healing and closure: a comprehensive review. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v.54, p.1297–1316, 2016.

KHALAF, A. A.; HASSANEN, E. I.; ZAKI, A. R.; TOHAMY, A. F.; IBRAHIM, M. A. Histopathological, immunohistochemical, and molecular studies for determination of wound age and vitality in rats. **International Wound Journal**, v.16, p.1416–1425, 2019.

KIM, Y. W.; WEST, X. Z.; BYZOVA, T. V. Molecular pathology of wound healing. **Journal of Molecular Medicine**, v.91, p.323–328, 2013.

KOLTER, J.; FEUERSTEIN, R.; ZEIS, P.; HAGEMEYER, N.; PATERSON, N.; D'ERRICO, P.; BAASCH, S.; AMANN, L.; MASUDA, T.; LÖSSLEIN, A.; GHARUN, K.; MEYER-LUEHMANN, M.; WASKOW, C.; FRANZKE, C.-W.; GRÜN, D.; LÄMMERMANN, T.; PRINZ, M.; HENNEKE, P. A Subset of skin macrophages contributes to the surveillance and regeneration of local nerves. **Immunity**, v.50, n.6, p.1482–1497, 2019.

KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Science International**, v.203, p.93–198, 2010.

KREGER, J. On mathematical modeling of epidermal wound healing. Disponível em: sites.uci.edu/jessekreger/files/2016/11/

Kreger-Epidermal-Wound-Healing-11-16.pdf, 2015. Acesso em: 20 jan. 2018.

MENEGHELLI, C. Atividade modeladora do extrato hidroalcoólico de própolis catarinense na formação de vasos sanguíneos. Florianópolis, 2013. 181p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina.

MORESCHI, D. A. B.; LEITE-MELLO, E. V. S.; BUENO, F. G. Ação cicatrizante de plantas medicinais: um estudo de revisão. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v.22, n.1, p.63–69, 2018.

MURRAY, J. D. **Mathematical biology I: an introduction**. Berlim: Springer-Verlag, 2000a. 551p.

MURRAY, J. D. **Mathematical biology II: spacial models and biomedical applications**. Berlim: Springer-Verlag, 2000b. 839p.

NOCEDAL, J.; WRIGHT, S. J. **Numerical optimization**. New York: Springer, 1999. 634p.

OLIVEIRA, L. B. O.; GOMES, C. F.; BAMPI, V.; RHEINGANTZ, M. G.; SOUZA, M. A. L. Angiogênese e tumorigênese: onde ocorre a interseção e as possibilidades de terapias. **Phytotherapy Research**, v.22, n.2, p.11–22, 2010.

PAIVA, L. A. F.; CUNHA, K. M. A.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Investigation on the wound healing activity of oleoresin from *Copaifera langsdorffi* in rats. **Phytotherapy Research**, v.16, p.737–739, 2002.

PETTET, G. J.; BYRNE, H. M.; MCELWAIN, D. L. S.; NORBURY, J. A Model of wound-healing angiogenesis in soft tissue. **Mathematical Biosciences**, v.136, p.35–63, 1996a.

PETTET, G. J.; CHAPLAIN, M. A. J.; MCELWAIN, D. L. S.; BYRNE, H. M. On the role of angiogenesis in wound healing. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.263, p.1487–1493, 1996b.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v.49, p.35–43, 2012.

RITTIE, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v.10, p.103–120, 2016.

SARTORI, L. M. Métodos para resolução de EDO's stiff resultantes de modelos químicos atmosféricos. São Paulo, 2014. 99p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.

SCHUGART, S. C.; FRIEDMAN, A.; ZHAO, R.; SEN, C. K. Wound angiogenesis as a function of tissue oxygen tension: a mathematical model. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.105, n.7, p.628–2633, 2008.

SHERRATT, J. A.; MURRAY, J. D. Models of epidermal wound healing. **Proceedings of the Royal Society B**, v.241, n.1300, p.29–36, 1990.

SILVA, A. M. S. Formulação de emulsões Lanette e Polamax e Avaliação da Qualidade Físico-Química e Microbiológica, 2012.

SOUZA NETO JÚNIOR, J. C.; ESTEVÃO, L. R. M.; FERRAZ, A. A.; SIMÕES, R. S.; VIEIRA, M. G. F.; EVÊNCIO-NETO, J. Ointment of *Ximenes americana* promotes acceleration of wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.34, n.3, p.1–8, 2019.

STRIGINI, L.; RYAN, T. Wound healing in elderly human skin. **Clinics in Dermatology**, v.14, n.2, p.197–206, 1996.

STROGATZ, S. H. **Nonlinear dynamics and chaos: with applications to physics, biology, chemistry and engineering**. USA: Perseus Books, 1994. 498p.

VILAS BOAS, F. L. Modelo de camundongo imunodeficiente (NSG) para enxertia de células tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto, 2019. 61p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.

WALTON, G. S.; NEAL, P. A. Observations on wound healing in the horse: the role of wound contraction. **Equine Veterinary Journal**, p.93–97, 1971.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical Clinics of North America**, v.77, n.3, p.509–528, 1997.

ZHAO, R.; LIANG, H.; CLARKE, E.; JACKSON, C.; XUE, M. Inflammation in chronic wounds. **Surgical Clinics of North America**, v.17, n.12, p.1–14, 2016.