

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 23/02/2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

"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*"

Candidato: **Lucas Fernando Sérgio Gushiken**

Orientadora: **Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon**

Co-orientadora: **Profa. Dra. Arianne Leite Rozza**

Botucatu – SP

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

"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*"

Candidato: **Lucas Fernando Sérgio Gushiken**

Orientadora: **Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon**

Co-orientadora: **Profa. Dra. Ariane Leite Rozza**

Dissertação de mestrado apresentada
ao programa de pós-graduação em Biotecnologia

Linha de pesquisa: Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal

Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu

FAPESP 2011/13630-7 e 2014/23684-5

Botucatu – SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 9/5651

Gushiken, Lucas Fernando Sérgio.

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* / Lucas Fernando Sérgio Gushiken. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Cláudia Helena Pellizzon

Coorientador: Arianne Leite Rozza

Capes: 90300009

1. Pele - Ferimentos e lesões. 2. Copaíba - Uso terapêutico. 3. Cicatrização de ferimentos. 4. Agentes anti-inflamatórios.

Palavras-chave: Cicatrização de lesões; *Copaifera langsdorffii*; Pele.

AGRADECIMENTOS

Creio que seja difícil expressar em poucas palavras toda a gratidão que sinto pelas pessoas que me ajudaram a concluir mais uma etapa de minha vida. Se hoje escrevo a dissertação de meu mestrado é porque sonhei um dia em ser pesquisador. Meu sonho, entretanto, foi sustentado por inúmeras pessoas. Cada uma com sua participação, ajudou em minha formação e desenvolvimento, não só como pesquisador, mas como ser humano.

Desse modo, nem todas as palavras de nosso extenso dialeto seriam suficientes para expressar minha gratidão à Tia Sônia, uma segunda mãe que a vida me deu, por me criar desde que tinha apenas alguns meses. Não poderia esquecer-me de agradecer também a todos os professores e funcionários do colégio Objetivo de Tupã e Cristo Rei de Marília, que me deram todo o suporte para escolher a profissão que tanto amo e entrar na faculdade. Agradeço a todos os meus amigos de Tupã por todos os momentos maravilhosos que vivemos durante todos esses anos e pelo apoio e companheirismo nos momentos complicados. Sem vocês, certamente não conseguiria chegar até aqui. Agradeço também todos os professores e funcionários do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, pois sem vocês, não teria conseguido o tão sonhado diploma de Biomédico. Como não lembrar das conversas e causos com o José Eduardo aqui na Morfologia? Das risadas com a Renata e Nivaldo da graduação?

Mas não foi só isso que a UNESP e Botucatu me proporcionaram. Ao longo dos meus 6 anos na cidade, conheci pessoas maravilhosas às quais tenho orgulho de chamar de amigos e que sempre me ajudaram nos momentos difíceis e com quem compartilhei muitas alegrias. Por isso, meu agradecimento especial à Roseli e ao Bardela por terem ajudado a me estabelecer na cidade; à Vera por me acolher em sua casa; a todos veteranos, coleguinhas e calouros da Biomedicina e aos companheiros (ou melhor dizendo, família) do ENBM por sempre estarem comigo nos momentos difíceis e partilhar dos momentos alegres. Muito obrigado a todos os integrantes do Laboratório de Experimentação de Produtos Naturais, Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega, Prof. Dr. Carlos Alberto Hussni, Prof. Dr. Jairo Bastos e Dr. Emanuel Ricardo Monteiro Martinez, pois esse projeto só pôde ser concluído graças à ajuda, empenho, esforço e paciência de todos. Muito obrigado a vocês Roney, Arthur, Aron, Thiago, Eric, Chico, Richard, Samuel, Vinícius, Meri, Diego...se deixei minha família de sangue em Tupã, minha família do coração encontrei aqui em Botucatu.

Para agradecer a você, Professora Cláudia, realmente me faltam palavras e não há como não ser prolixo ao falar de você, chefe. Se me formei em Biomedicina, foi certamente com sua ajuda. Se hoje amo a pesquisa e passar o meu conhecimento aos outros, foi porque fiz minha Iniciação Científica e Mestrado contigo e aprendi, aos poucos, a amar tudo o que fazemos. Se hoje me tornei um homem melhor do que era antes, foi porque aprendi um pouco com suas lições e conversas tomando café às 8 horas e depois do almoço. Em sua sala, está enquadrada uma homenagem da turma de Biologia de 2002 e, logo que entrei em sua sala, em meu primeiro dia de estágio, vi a mensagem de Isaac Newton: “Se pude enxergar mais longe, foi porque me apoiei nos ombros de gigantes”. Quem diria que, após esses anos de convivência, essa frase que me marcou logo no primeiro dia de estágio seria tão exata para defini-la, professora. Se cheguei até a defesa de meu mestrado e, se algum dia puder enxergar mais longe, tenha certeza que foi porque me apoiei nos ombros de uma mulher excepcional.

Por fim, agradeço a toda a família Sérgio e Gushiken, em especial à minha mãe, meu pai e minha irmã. “Temos nossa” dissertação de mestrado escrita, com o orgulho e convicção de que “fizemos nosso” melhor. Todos os verbos e pronomes na primeira pessoa do plural, pois, onde quer que eu esteja, vocês sempre me acompanham e sempre me acompanharão. Tudo o que sou, sou porque vocês me ensinaram. Tudo o que conquistei, conquistei porque me ajudaram. Não preciso mais escrever muito, pois não é preciso palavras para que saibam que sempre estão comigo, que amo vocês e agradeço por tudo o que vivemos e viveremos. Muito obrigado a todos, por fazerem parte mais esta realização!

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro durante minhas Iniciações Científicas e Mestrado (FAPESP 2012/15092-5 e 2014/23684-5).

SUMÁRIO

RESUMO	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	7
1.1. - Pele e cicatrização de feridas	7
1.2. - Fatores endógenos na cicatrização	12
1.3. - Fármacos utilizados no tratamento de feridas cutâneas e o uso de produtos naturais	15
1.4. - <i>Copaifera langsdorffii</i> e seu uso na cicatrização de lesões de pele	17
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. - Material Biológico para obtenção do extrato hidroalcoólico de copaíba	20
3.2. - Preparo das formulações contendo extrato das folhas e óleo-resina da casca de copaíba	20
3.3. - Animais	21
3.4. - Modelo de excisão circular de feridas cutâneas	21
3.5. - Grupos experimentais e doses empregadas	23
3.6. - Tempos de tratamento	23
3.7. - Análise macroscópica	24
3.8. - Atividade anti-inflamatória	24
3.8.1. - Quantificação de proteínas totais	24
3.8.2 - Determinação dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10	25
3.9. - Análise da expressão gênica	25
3.9.1 - Extração de RNA e síntese de cDNA	25
3.9.2. - PCR quantitativo (RT-qPCR)	26
3.10. - Análises histológicas	27
3.11. - Análise estatística	28
4. RESULTADOS	29
4.1. - Análise macroscópica	29
4.2. - Atividade anti-inflamatória	31
4.4. - Análise molecular	34
4.5. - Análises histológicas	36
5. DISCUSSÃO	84
6. CONCLUSÕES	92
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

RESUMO

A pele é fundamental para manter a integridade do organismo e a descontinuidade desse sistema promove o mecanismo cicatricial, processo fisiológico que pode ser dividido em fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento. As lesões cutâneas têm grande importância no investimento de recursos públicos devido à possibilidade de algum tipo de deficiência física ou até mesmo levar à morte. A *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae) é uma árvore que, segundo conhecimento popular, apresenta atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e de cicatrização de feridas. Sendo assim, o projeto teve por objetivo investigar o potencial cicatrizante dos cremes à base de extrato hidroalcoólico das folhas (10% EH) ou óleo-resina das cascas (10% OR) de *Copaifera langsdorffii* em feridas cutâneas de ratos e os mecanismos envolvidos. Ratos *Wistar* machos foram randomicamente divididos em quatro grupos experimentais (n = 8): creme base lanette (controle negativo - veículo), creme Collagenase 1.2 UI (controle positivo), cremes 10% EH ou 10% OR. Os animais foram submetidos à anestesia e indução da lesão dorsal de 2 cm de diâmetro. As lesões foram tratadas uma vez por dia e tiveram a área medida durante 3, 7 e 14 dias. Após a eutanásia, a região da ferida foi destinada a análises moleculares, histológicas, imunohistoquímicas e determinação de atividade anti-inflamatória local. Nossos resultados mostram o potencial cicatricial dos tratamentos 10% EH e 10% OR, com a significativa retração das lesões comparadas ao grupo Lanette. Os tratamentos à base de copaíba apresentaram atividade anti-inflamatória, com redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. Os resultados moleculares e imunohistoquímicos mostraram a atividade dos tratamentos 10% EH e 10% OR nos mecanismos de proliferação celular, angiogênese estimulada por VEGF, reepitelização mediada por EGF, MMP-2 e MMP-9, retração da lesão estimulada pelo MIF e remodelação das fibras colágenas. Desse modo, os tratamentos 10% EH e 10% OR apresentaram grande potencial na cicatrização de lesões cutâneas, com resultados melhores que o fármaco de referência na de proliferação, angiogênese e retração da lesão e apresentando resultados semelhantes ao fármaco na reepitelização e remodelamento de matriz, demonstrando potencial na cicatrização de lesões de pele.

Palavras-chave: cicatrização de lesões, pele, *Copaifera langsdorffii*

ABSTRACT

The skin is fundamental to maintain the integrity of the body and the disruption of this system promotes the wound healing mechanism, physiological process that can be divided into inflammatory, proliferative and remodeling phases. The skin wounds have great importance in the investment of public resources due to the possibility of some type of physical disability or even death. The *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae) is a tree that, according to popular knowledge, has anti-inflammatory, antimicrobial and wound healing activities. Therefore, the aim of this study was to investigate the healing potential of the ointments containing hydroalcoholic extracts of the leaves (10% EH) or oleoresin of the bark (10% OR) of *Copaifera langsdorffii* in cutaneous wounds of rats and the mechanisms involved. Male *Wistar* rats were randomly divided into four experimental groups (n = 8): lanette ointment (negative control - vehicle), Collagenase 1.2 IU ointment (positive control), 10% EH or 10% OR ointments. The animals were submitted to anesthesia and induction of the dorsal lesion of 2 cm in diameter. The lesions were treated once a day and had their areas measured for 3, 7 and 14 days. After euthanasia, the wounds were assigned to molecular, histological, immunohistochemical analysis and determination of the local anti-inflammatory activity. Our results show the healing potential of treatments 10% EH and 10% OR, with significant retraction of the wounds compared to the Lanette group. The copaiba-based treatments showed anti-inflammatory activity, with reduction of pro-inflammatory cytokines and increase of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Molecular and immunohistochemical results showed the activity of 10% EH and 10% OR in the mechanisms of cell proliferation, VEGF-stimulated angiogenesis, reepithelialization mediated by EGF, MMP-2 and MMP-9, MIF-stimulated wound retraction and remodeling of collagen fibers. Thus, the treatments 10% EH and 10% OR presented great potential in skin wound healing, with better results than the reference drug in the proliferation, angiogenesis and retraction of the lesion and presenting similar results as the reference drug in reepithelialization and remodeling, with great potential in the skin wound healing.

Key words: wound healing, skin, *Copaifera langsdorffii*

Abreviações:

°C: graus Celsius

µL: microlitros

µm: micrometros

µm²: micrômetros quadrados

ANOVA: análise de variância

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2 protein*

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

COX-2: ciclooxigenase-2

Ct: *threshold cycle*

ddCt: delta *threshold cycle*

DNase: desoxirribonuclease

EGF: fator de crescimento epidermal

EH: extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii*

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EUA: Estados Unidos da América

F: *forward primer*

FGF: fator de crescimento de fibroblasto

FGF-2: fator de crescimento de fibroblasto-2

GC-FID: cromatografia gasosa por detector de ionização de chama

HE: hematoxilina-eosina

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-UV-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV

IBB: Instituto de Biociências de Botucatu

IFN-γ: interferon-γ

IL-10: interleucina-10

IL-1β: interleucina-1β

IL-2: interleucina-2

IL-3: interleucina-3

IL-4: interleucina-4
IL-6: interleucina-6
IL- γ : interleucina- γ
KGF: fator de crescimento de queratinócitos
MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1
mg: miligramas
MIF: fator inibidor de migração de macrófago
MIP-1 α : proteína inflamatória de macrófago-1 α
MMP-1: metaloproteinase de matriz extracelular – 1
MMP-13: metaloproteinase de matriz extracelular – 13
MMP-2: metaloproteinase de matriz extracelular – 2
MMP-8: metaloproteinase de matriz extracelular – 8
MMP-9: metaloproteinase de matriz extracelular – 9
MMPs: metaloproteinases de matriz extracelular
nm: nanômetros
NMR: ressonância magnética nuclear
OR: óleo-resina da casca de *Copaifera langsdorffii*
PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular
PCR: reação em cadeia da polimerase
PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta
pg: picogramas
PMNs: células polimorfonucleares
pró-MMP-2: forma inativa da MMP-2
pró-MMP-9: forma inativa da MMP-9
psi: libra por polegada quadrada
R: *reverse primer*
RNA: ácido ribonucleico
RNAm: ácido ribonucleico mensageiro
RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcrição reversa
Temp: temperatura em °C
TGF- β 1: fator de crescimento transformador- β 1

TNF- α : fator de necrose tumoral- α

UI: unidade internacional

UNESP: Universidade Estadual Paulista

USP: Universidade de São Paulo

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. - Pele e cicatrização de feridas

A pele é o maior órgão do corpo, com origem embriológica dupla, ectodérmica e mesodérmica, sendo estruturada em duas camadas. A primeira é responsável pela formação da epiderme, e a segunda pela derme. A epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, onde a célula predominante é o queratinócito, além de possuir melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel, organizadas em 5 estratos. A derme é constituída pelas camadas reticular e papilar, com predomínio de componentes de matriz extracelular como colágeno tipo I e elastina – que promovem a força tensora do tecido – e fibroblastos que atuam na organização da matriz que compõe a derme. Apresenta ainda grande número de terminações nervosas responsáveis por receber informações ambientais e enviá-las ao sistema nervoso central (EVANS et al., 2013; RITTIÉ, 2016). Entre as principais funções da pele, estão a proteção dos vertebrados em todos os ambientes, incluindo exposição do organismo a antígenos, proteção química e física contra agentes externos, termorregulação corpórea, controle da entrada e saída de eletrólitos e proteção contra perda de água (DE BENEDETTO; KUBO; BECK, 2012; GUO; DIPIETRO, 2010).

A perda da integridade da pele causa uma injúria, que resulta em abertura ou ruptura da pele, chamada de ferida ou úlcera (FIKRU et al., 2012). Tais feridas podem ser causadas por uma variedade de eventos traumáticos, tais como exposição ao calor, frio, materiais corrosivos, radiação ou problemas circulatórios (MORIN et al., 2012). Em resposta a essas injúrias, inicia-se a cicatrização, um processo dinâmico que reestabelece a função e a integridade do tecido lesado (GUO; DIPIETRO, 2010; PEREIRA; BÁRTOLO, 2013).

Todos os estágios do mecanismo cicatricial de segunda intenção dependem de processos bioquímicos, celulares e moleculares para a restauração estrutural e fisiológica da região lesada. Devido à alta complexidade dessa cascata de eventos, alguns autores utilizam classificações didáticas para separar as etapas da reparação (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Esses processos são altamente complexos e envolvem uma sequência de estágios interdependentes e sobrepostos: hemostasia e inflamação (fase inflamatória), formação do tecido de granulação e reepitelização (fase

proliferativa) e fase de remodelamento da matriz extracelular (MORIN et al., 2012; RITTIE, 2016).

Na fase inflamatória, após a quebra da integridade do tegumento, a primeira etapa da cicatrização consiste na reparação da hemostasia local, realizada pela ativação da via de coagulação extrínseca. Forma-se uma rede hemostática de fibrina, que é posteriormente solidificada pelas plaquetas (GURTNER et al., 2008). Uma vez que seja estancada a perda de sangue, a próxima etapa é a remoção de tecido morto e prevenção de infecções. Para tanto, as células inflamatórias são cruciais nesse processo. Nos primeiros cinco dias de lesão, os neutrófilos invadem a área da injúria rica em fibrina, promovendo a eliminação de bactérias e degradação do tecido morto através de processos de fagocitose e secreção de proteases. No terceiro dia após a lesão, há a migração de macrófagos para a área da ferida e, além de fagocitar patógenos e tecido morto, secretam uma variedade de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, moléculas sinalizadoras vitais para a coordenação dos eventos que ocorrerão na fase seguinte, a fase proliferativa (TZIOTZIOS; PROFYRIS; STERLING, 2012).

6. CONCLUSÕES

Com nossos resultados, foi possível confirmar a atividade cicatricial das formulações à base de extrato hidroalcoólico das folhas e óleo-resina da casca de *Copaifera langsdorffii* na concentração de 10%, sendo que ambas as formulações reduziram a área das lesões comparadas ao grupo controle. Além disso, embora existam semelhanças entre os mecanismos das formulações 10% EH e 10% OR, caracterizados pela atividade anti-inflamatória, estímulo da angiogênese, da reepitelização e remodelamento de matriz extracelular e retração da área lesada; existem algumas diferenças entre os mecanismos das formulações, como a maior expressão de FGF-2 no grupo 10% OR, caracterizando a influência desse tratamento na via de proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno, e a maior expressão de MIF no grupo 10% EH, estimulando a diferenciação de fibroblastos a miofibroblastos na retração da área de lesão. Além disso, ambos os tratamentos à base de copaíba apresentaram-se mais eficientes na cicatrização de lesões cutâneas que o fármaco de referência, atuando tanto nos mecanismos de reepitelização e remodelamento de matriz extracelular (mecanismos de ação da Collagenase 1.2 UI), quanto diminuindo a área da lesão, apresentando atividade anti-inflamatória estimulando a proliferação celular e angiogênese. Sendo assim, foi possível demonstrar o potencial cicatricial da óleo-resina na concentração de 10% na cicatrização de lesões cutâneas - comprovando o uso popular do produto - além da descoberta da atividade cicatrizante do extrato das folhas a 10% como uma nova formulação, com maior biomassa disponível, sendo que ambos os tratamentos apresentam potencial para o desenvolvimento de um possível fitoterápico ou fármaco cicatrizante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, R. et al. Enhancement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in injured epidermis and cultured fibroblasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1500, p. 1–9, 2000.
- AHANGER, A. A. et al. Pro-healing potential of hemin: an inducer of heme oxygenase-1. **European Journal of Pharmacology**, v. 645, p. 165–170, 2010.
- AKKOL, E. K. et al. Wound healing and anti-inflammatory properties of *Ranunculus pedatus* and *Ranunculus constantinopolitanus*: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 478–84, 2012.
- ALVES, J. M. et al. *In vivo* protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, p. 854–60, 2013.
- ALZOGHAIBI, M. A. et al. Temporal expression of IL-1 β and IL-10 in rat skin, muscle, small bowel, and colon wounds: a correlative study. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 25, p. 205–10, 2014.
- ARAI, K. et al. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 59, p. 783–836, 1990.
- ARMSTRONG, D. G.; JUDE, E. B. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 92, p. 12–18, 2002.
- ARUNACHALAM, K.; PARIMELAZHAGAN, T. Anti-inflammatory, wound healing and *in-vivo* antioxidant properties of the leaves of *Ficus amplissima* Smith. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 139–45, 2013.
- ATIBA, A. et al. *Aloe vera* oral administration accelerates acute radiation-delayed wound healing by stimulating transforming growth factor- β and fibroblast growth factor production. **American Journal of Surgery**, v. 201, p. 809–818, 2011.
- BAI, R.; WAN, L.; SHI, M. The time-dependent expressions of IL-1 β , COX-2, MCP-1 mRNA in skin wounds of rabbits. **Forensic Science International**, v. 175, p. 193–7, 2008.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma

- revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 27–51, 2005.
- BASILE, A. C. et al. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 101–109, 1988.
- BAYAT, A.; MCGROUTHER, D. A.; FERGUSON, M. W. J. Skin scarring. **BMJ**, v. 326, p. 88–92, 2003.
- BENNETT, S. P. et al. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. **British Journal of Surgery**, v. 90, p. 133–146, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRANCALION, A. P. S. et al. Effect of hydroalcoholic extract from *Copaifera langsdorffii* leaves on urolithiasis induced in rats. **Urological Research**, v. 40, p. 475–81, 2012.
- CAIADO, F. et al. The role of fibrin E on the modulation of endothelial progenitors adhesion, differentiation and angiogenic growth factor production and the promotion of wound healing. **Biomaterials**, v. 32, p. 7096–7105, 2011.
- CARVALHO, J. C. T. et al. Topical anti-inflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 946–50, 2005.
- CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, p. 773–778, 2000.
- CETIN, E. O. et al. Incision wound healing activity of pine bark extract containing topical formulations: a study with histopathological and biochemical analyses in albino rats. **Pharmazie**, v. 68, p. 75–80, 2013.
- DE BENEDETTO, A.; KUBO, A.; BECK, L. A. Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, p. 949–63, 2012.
- DOVI, J. V.; HE, L.-K.; DIPIETRO, L. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, p. 448–455, 2003.
- EVANS, N. D. et al. Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 28, p. 397–409, 2013.
- FERREIRA, E. et al. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. **Revista da**

- Escola de Enfermagem da USP**, v. 37, p. 44–51, 2003.
- FIKRU, A. et al. Evaluation of *in vivo* wound healing activity of methanol extract of *Achyranthes aspera* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 469–74, 2012.
- FURTADO, R. A. et al. Antiedematogenic evaluation of *Copaifera langsdorffii* leaves hydroethanolic extract and its major compounds. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–7, 2015.
- FUTAGAMI, A. et al. Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. **Laboratory Investigation**, v. 82, p. 1503–1513, 2002.
- GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **The Journal of Pathology**, v. 200, p. 500–3, 2003.
- GÁL, P. et al. Effect of *Atropa belladonna* L. on skin wound healing: biomechanical and histological study in rats and in vitro study in keratinocytes, 3T3 fibroblasts, and human umbilical vein endothelial cells. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, p. 378–86, 2009.
- GANESHKUMAR, M. et al. Topical application of *Acalypha indica* accelerates rat cutaneous wound healing by up-regulating the expression of type I and III collagen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 14–22, 2012.
- GAUTAM, M. et al. Effects of *Azardirachta indica* on vascular endothelial growth factor and cytokines in diabetic deep wound. **Planta Medica**, v. 81, p. 713–721, 2015.
- GILLIVER, S. C. et al. MIF: a key player in cutaneous biology and wound healing. **Experimental Dermatology**, v. 20, p. 1–6, 2011.
- GOMES, N. M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 486–92, 2007.
- GOYAL, M.; NAGORI, B. P.; SASMAL, D. Wound healing activity of latex of *Euphorbia caducifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 786–90, 2012.
- GREAVES, N. S. et al. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v. 72, p. 206–17, 2013.
- GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, p. 219–29, 2010.
- GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, p. 314–21, 2008.

- GURTNER, G. C.; CHAPMAN, M. A. Regenerative medicine : charting a new course in wound healing. **Advances in Wound Care**, v. 5, p. 314–328, 2016.
- GÜVENÇ, A. et al. Wound healing and anti-inflammatory activities of the *Michauxia L'Hérit* (Campanulaceae) species native to Turkey. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 401–8, 2012.
- HAIFEI, S. et al. The effect of collagen-chitosan porous scaffold thickness on dermal regeneration in a one-stage grafting procedure. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 29, p. 114–25, 2014.
- HAIAGHAALIPOUR, F. et al. The effect of *Camellia sinensis* on wound healing potential in an animal model. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 386734, 2013.
- HANSBROUGH, J. F. et al. Wound healing in partial-thickness burn wounds treated with collagenase ointment versus silver sulfadiazine cream. **Journal of Burn Care and Rehabilitation**, v. 16, p. 241–247, 1995.
- HARDING, K.; STECHMILLER, J. K.; SCHULTZ, G. **Acute and Chronic Wound Healing**. Disponível em: <<http://nursekey.com/acute-and-chronic-wound-healing/>>. Acesso em: 2 de janeiro de 2017.
- HINZ, B. et al. Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, p. 4310–4320, 2004.
- HINZ, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 526–37, 2007.
- KANG, R. et al. Antimicrobial activity of the volatile constituents of *Perilla frutescens* and its synergistic effects with polygodial. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2328–2330, 1992.
- KANT, V. et al. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Immunopharmacology**, v. 20, p. 322–30, 2014.
- KIERAN, I. et al. Interleukin-10 reduces scar formation in both animal and human cutaneous wounds: results of two preclinical and phase II randomized control studies. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, p. 428–36, 2013.
- KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Science**

- International**, v. 203, p. 93–8, 2010.
- LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 9–18, 2007.
- LI, J.; ZHANG, Y.-P.; KIRSNER, R. S. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microscopy Research and Technique**, v. 60, p. 107–14, 2003.
- LIM, Y.; LEVY, M. A.; BRAY, T. M. Dietary supplementation of N-acetylcysteine enhances early inflammatory responses during cutaneous wound healing in protein malnourished mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 328–36, 2006.
- LIMA, S. R. M. et al. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 1048–53, 2003.
- MAEHATA, Y. et al. Type III collagen is essential for growth acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. **Matrix Biology**, v. 26, p. 371–381, 2007.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, p. 393–408, 2003.
- MANTLE, D.; GOK, M. A.; LENNARD, T. W. Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders. **Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews**, v. 20, p. 89–103, 2001.
- MARTINS, V. L.; CALEY, M.; O'TOOLE, E. A. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. **Cell and Tissue Research**, v. 351, p. 255–68, 2013.
- MIDWOOD, K. S.; WILLIAMS, L. V.; SCHWARZBAUER, J. E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 1031–7, 2004.
- MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Reviews in Immunology**, v. 19, p. 683–765, 2001.
- MORI, R. et al. Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration. **The FASEB Journal**, v. 16, p. 963–974, 2002.
- MORIN, C. et al. Modulation of inflammation by *Cicaderma* ointment accelerates skin wound healing. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 343, p.

- 115–24, 2012.
- NETEA, M. G. et al. IL-1 β processing in host defense: beyond the inflammasomes. **PloS Pathogens**, v. 6, p. 1–9, 2010.
- OBERRINGER, M. et al. *In vitro* wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor β 1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model. **Journal of Molecular Histology**, v. 39, p. 37–47, 2008.
- PAIVA, L. A. F. et al. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 737–9, 2002.
- PAIVA, L. A. F. et al. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sciences**, v. 75, p. 1979–87, 2004.
- PALMIERI, B.; MAGRI, M. A new formulation of collagenase ointment (Irujol[®] Mono) in the treatment of ulcers of the lower extremities. A randomised, placebo-controlled, double-blind study. **Clinical Drug Investigation**, v. 15, p. 381–387, 1998.
- PARENTE, L. M. L. et al. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 375671, 2012.
- PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, v. 18, p. 18–23, 2004.
- PENG, L.-H. et al. Topical astragaloside IV-releasing hydrogel improves healing of skin wounds *in vivo*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, p. 881–8, 2012.
- PEREIRA, R. F.; BÁRTOLO, P. J. Traditional therapies for skin wound healing. **Advances in Wound Care**, v. 5, p. 208–229, 2013.
- RAJAKARIAR, R.; YAQOOB, M. M.; GILROY, D. W. COX-2 in inflammation and resolution. **Molecular Interventions**, v. 6, p. 199–207, 2006.
- REGAN, M. C. et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits *in vivo* collagen synthesis. **Surgery**, v. 113, p. 173–7, 1993.
- REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, p. 35–43, 2012.
- RENNERT, R. C. et al. Biological therapies for the treatment of cutaneous wounds: phase III and launched therapies. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 13, p. 1523–41, 2013.
- RITTIÉ, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. **Journal of Cell**

- Communication and Signaling**, p. 103–120, 2016.
- ROSENSTEEL, S. M. et al. COL1A1 oligodeoxynucleotides decoy: biochemical and morphologic effects in an acute wound repair model. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 89, p. 307–313, 2010.
- ROY, P. et al. *In vivo* antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 186–192, 2012.
- SACHETTI, C. G. et al. Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1080–5, 2011.
- SHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 878–888, 2011.
- SEN, C. K. et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, p. 763–71, 2009.
- SENAPATI, A. K. et al. Wound healing potential of *Pterospermum acerifolium* Wild. with induction of tumor necrosis factor- α . **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 2, p. 203–206, 2011.
- SERINI, G. et al. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor- β 1. **The Journal of Cell Biology**, v. 142, p. 873–881, 1998.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 35–40, 2002.
- SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 738–46, 1999.
- STUPP, T. et al. Characterization and potential uses of *Copaifera langsdorffii* seeds and seed oil. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2659–63, 2008.
- SUN, D. et al. Interleukin (IL)-19 promoted skin wound healing by increasing fibroblast keratinocyte growth factor expression. **Cytokine**, v. 62, p. 360–8, 2013.
- TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, p. a016295, 2014.
- TARAMESHLOO, M. et al. A comparative study of the effects of topical application of *Aloe*

- vera, thyroid hormone and silver sulfadiazine on skin wounds in *Wistar* rats. **Laboratory Animal Research**, v. 28, p. 17–21, 2012.
- TUMEN, I. et al. Wound repair and anti-inflammatory potential of essential oils from cones of *Pinaceae*: preclinical experimental research in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1215–20, 2011.
- TZIOTZIOS, C.; PROFYRIS, C.; STERLING, J. Cutaneous scarring: pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 66, p. 13–24, 2012.
- UPADHYAY, A. et al. *Eleutherine indica* L. accelerates *in vivo* cutaneous wound healing by stimulating Smad-mediated collagen production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 490–4, 2013.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, Â. C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, p. 273–286, 2002.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, Â. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519–528, 2005.
- VOELKEL, N. F.; TUDER, R. M. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, p. 733–738, 2000.
- WARD, R. S.; SAFFLE, J. R. Topical agents in burn and wound care. **Physical Therapy**, v. 75, p. 526–38, 1995.
- WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 835–870, 2003.
- WU, X. et al. The effects of *Polygonum cuspidatum* extract on wound healing in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 934–7, 2012.
- XIMENES, R. M. et al. Antinociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. essential oil. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, p. 758–64, 2013.
- ZHAO, R. et al. Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharide 4 on kidneys in streptozotocin-induced diabetic rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 87, p. 711–9, 2009.
- ZUBER, T. J. Punch biopsy of the skin. **American Family Physician**, v. 65, p. 1155–1158, 2002.