

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 obtenção 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 obtenção 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 Chierigato 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 quimiotático, $b(1, t)$, e densidade das pontas capilares, $p(1, t)$	86
17	Resultados numéricos estimados pelo modelo (39) para VEGF, b , e brotamento 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 diabete, 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 (folículos 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 médula 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

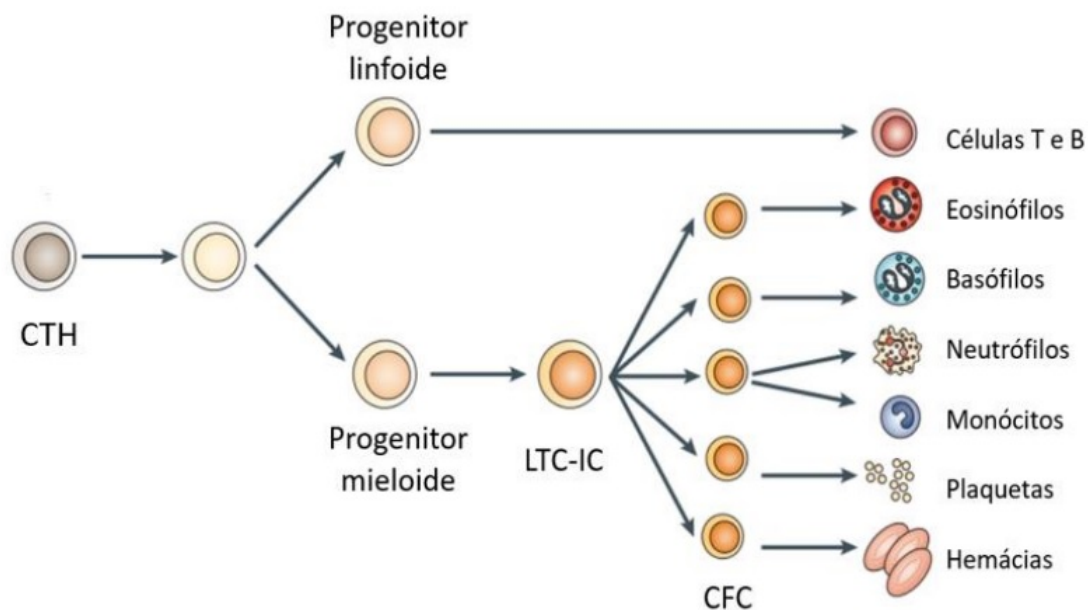


Figura 1: Representação esquemática da organização hierárquica da hematopoese na vida adulta. Na medula óssea a célula tronco hematopoética (CTH), após vários ciclos de divisão celular, origina os precursores das células do sangue: linhagens de progenitores capazes de extensa proliferação e diferenciação (LTC-IC). Após alguns ciclos dão origem às células formadoras de colônias (CFC), neutrófilos e monócitos (sangue), e estes últimos são denominados macrófagos após diferenciarem-se nos tecidos. Fonte: Vilas Boas (2019).

neutrófilos. Os macrófagos possuem enzimas hidrolíticas para a digestão do material fagocitado e produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que são tóxicas para bactérias, fungos e parasitas. Na Tabela 1 é listado algumas substâncias, e sua importância em processos fisiológico e patológico, produzidas pelos macrófagos. Algumas substâncias são produzidas e secretadas continuamente, ao passo que outras são liberadas após estímulos externos, ou seja, os macrófagos devem estar estimulados ou ativados (Kondo & Ishida, 2010; Carvalho & Collares-Buzato, 2005).

Os macrófagos mantêm suas atividades e seu metabolismo em níveis basais, pois as enzimas, citocinas e moléculas tóxicas produzidas por estas células podem causar sérios danos ao organismo se produzidas inadequadamente. Um macrófago ativo aumenta seu tamanho e volume, possui grande habilidade de adesão,

Tabela 1. Substâncias biologicamente ativas produzidas pelos macrófagos e algumas de suas funções.

Substância	Função
Interleucinas 1 e 6 e TNF- α	Inflamação e febre
Elastase, collagenase e FGF	Reorganização tecidual
VEGF	Angiogênese
Interferon α	Atividade antiviral
TGF- β	Antimitótico de linfócitos

Fonte: Carvalho & Collares-Buzato (2005).

produz grandes quantidades de mediadores biológicos e tem mais habilidade de fagocitar microrganismos e células tumorais (Carvalho & Collares-Buzato, 2005).

Segundo Carvalho & Collares-Buzato (2005), os fibroblastos são células que sintetizam componentes fibrilares (colágeno e elastina) e não fibrilares (glicoproteínas e proteoglicanos) da matriz extracelular do tecido conjuntivo. Essas células participam ativamente do processo de cicatrização e de fibrose em determinadas doenças. As modulações fenotípicas e a diferenciação dos fibroblastos são mediadas por citocinas promotoras de crescimento e por componentes da matriz extracelular, alguns destes mediadores estão descritos na Tabela 2.

Os fibroblastos diferenciados possuem capacidade de sintetizar proteínas estruturais da matriz extracelular, como os colágenos dos tipos I, III e V, glicoproteínas não-colagênicas, proteoglicanos, microfibrilas (colágeno tipo VI) e outros. Entre suas funções está a de contribuir para sustentação estrutural de tecidos e órgãos, ou seja, atuam como reguladoras do arranjo de componentes da matriz extracelular no processo de reparo de lesões, recrutando e, ou, comunicando-se com macrófagos, linfócitos, granulócitos e mastócitos. Os fibroblastos da derme são capazes de sintetizar grandes quantidade de colágeno tipo III. Os fibroblastos produzem as interleucinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, o fator de crescimento transformador β (TGF- β), entre outros, além das citocinas fibrogênicas IL-1 α e IL-1 β secretadas ini-

Tabela 2. Algumas substâncias biologicamente ativas produzidas pelos macrófagos.

Mediador	Fontes celulares e teciduais	Atividades
TGF- β e TGF- α	Linfócitos T, Macrófagos, Fibroblastos e Células musculares esqueléticas	Migração / Proliferação
FGF- α e FGF- β	Células endoteliais (cérebro, retina, matriz óssea) e Macrófagos	Migração / Proliferação
EGF	Granulócitos, Células ectodérmicas, Rins, Glândulas duodenais, Plaquetas	Migração / Proliferação
Interferon γ	Linfócitos T e Células NK	Migração / Proliferação
IL-1 α e IL-1 β	Macrófagos/Monócitos, Linfócitos T, B e NK, Fibroblastos, Queratinócitos, Células endoteliais, musculares lisas e Glia	Migração / Proliferação
PDGF	Macrófagos, Plaquetas, Células endoteliais, epiteliais, musculares lisas e Glia	Migração / Proliferação
TNF- α	Linfócitos	Proliferação
Colágeno e Elastina	Produzidos por diversas células presentes na matriz extracelular	Migração
IL-4	Linfócitos T e Mastócitos	Migração
TNF- β	Macrófagos/Monócitos, Linfócitos B e Fibroblastos	Migração

Fonte: Carvalho & Collares-Buzato (2005).

cialmente por linfócitos T e, posteriormente, por neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, mastócitos e fibroblastos. O TGF- β pode induzir, indiretamente, a proliferação celular por meio de outros fatores de crescimento, por exemplo dos fatores de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) (exacerba síntese de colágeno e inibe a produção de colagenase) (Carvalho & Collares-Buzato, 2005).

O processo de reparação tecidual, em lesões, caracteriza-se pela inflamação aguda seguida pela deposição de um tecido de granulação transitório, constituído, principalmente, por fibroblastos e uma matriz extracelular vascularizada, contendo os colágenos tipo I e III e fibronectina (Carvalho & Collares-Buzato, 2005).

1.2 Cicatrização de feridas na pele

A expressão “cicatrização de feridas” designa uma série de processos biológicos complexos e que, normalmente, são descritos em três fases sucessivas e sobrepostas: inflamatória (hemostasia e inflamação), proliferativa (formação de tecido de granulação e reepitelização) e remodelamento dos tecidos. Na Figura 2 estão ilustradas as fases de cicatrização de feridas baseando-se em resultados de feridas de animais (Gushiken, 2017; Rittié, 2016; Reinke & Sorg, 2012; Witte & Barbul, 1997). Falha ou prolongamento em uma fase pode resultar no atraso da cicatrização ou no não fechamento da ferida (Reinke & Sorg, 2012; Witte & Barbul, 1997).

Uma fase precisa declinar para que a próxima se inicie; a desativação da fase inflamatória é pré-requisito para deposição da matriz extracelular no leito da ferida. O processo de cicatrização é contínuo e a divisão em fases é útil para fins didáticos (Rittié, 2016).

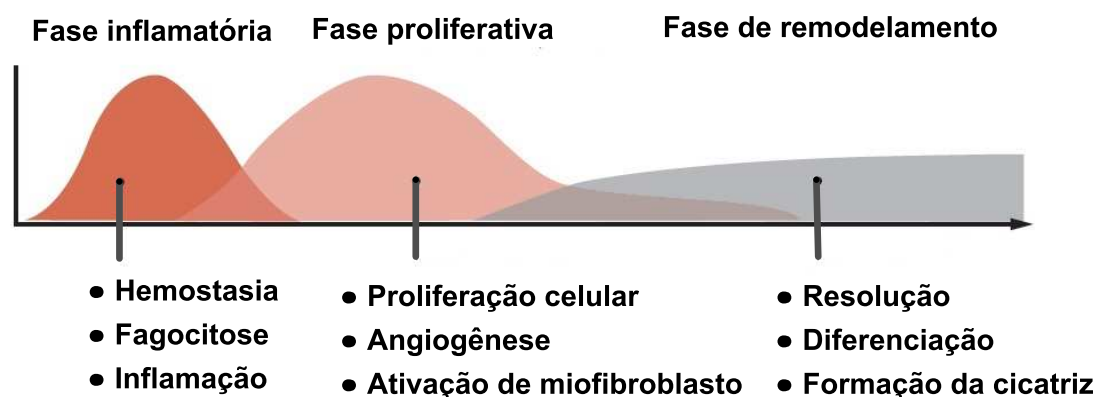


Figura 2: Ilustração das fases de cicatrização de feridas. Figura modificada de Eming et al. (2017).

1.2.1 Fase Inflamatória

A fase inflamatória é uma fase essencial na cicatrização de feridas caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia das células da circulação para a ferida, liberação local de citocinas e fatores de crescimento e ativação das células migratórias (Witte & Barbul, 1997). O papel da fase inflamatória é limpar a ferida de células e moléculas estranhas antes da reconstrução da pele (Rittié, 2016).

A hemostasia precede a inflamação: a ruptura dos vasos sanguíneos expõe o colágeno subendotelial às plaquetas resultando em agregação de plaquetas e ativação da parte intrínseca de coagulação (a vasoconstrição ocorre de 5 a 10 minutos após a lesão dos vasos). O contato entre colágeno e plaquetas, bem como a presença de trombina e fibronectina, resulta na liberação de citocinas e fatores de crescimento, tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fa-

tor de crescimento transformador β (TGF- β), fibronectina e serotonina. O coágulo de fibrina formado localmente serve como estrutura para células invasoras como os neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais (Reinke & Sorg, 2012; Witte & Barbul, 1997).

Os neutrófilos são as primeiras células a invadirem a ferida e permanecem até 5 dias após a lesão caso a ferida não esteja infectada. A permeabilidade vascular aumenta devido à inflamação e liberação de prostaglandinas juntamente com o gradiente de concentração de substâncias quimiotáticas como interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e TGF- β . A resposta da célula, a um sinal quimiotático, também é mediada por receptores de superfície celular, por exemplo, PDGF é um quimiotático potencial para fibroblastos e células musculares lisas, mas não para células endoteliais, células epiteliais e leucócitos (Reinke & Sorg, 2012; Witte & Barbul, 1997). Os neutrófilos agem como quimiotáticos para outras células presentes na fase inflamatória liberando mediadores tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6 os quais amplificam a resposta inflamatória e estimulam VEGF, IL-8 e IL-10. Na Figura 3 estão ilustrados alguns eventos que ocorrem na fase inflamatória (Horng et al., 2017; Reinke & Sorg, 2012).

As citocinas e os fatores de crescimento, geralmente, possuem mais de um efeito nas células. Por exemplo, TGF- β é quimiotático para monócitos na escala femtomolar e aumenta a síntese de colágeno na escala nanomolar, ou seja, TGF- β é quimiotático para monócitos em uma concentração menor (ordem de 10^6) do que a necessária para aumentar a síntese de colágeno e PDGF é quimiotático para fibroblastos em uma concentração 100 vezes menor do que a necessária para estimular a proliferação (Witte & Barbul, 1997).

Os neutrófilos são cruciais para que não haja contaminação bacteriana, os macrófagos e linfócitos são essenciais na fagocitose e na defesa antimicrobiana, funções primordiais durante a inflamação (Witte & Barbul, 1997). Estudos sugerem que os neutrófilos esgotam os quimiotáticos que inicialmente os atraíram para a ferida (Eming et al., 2017).

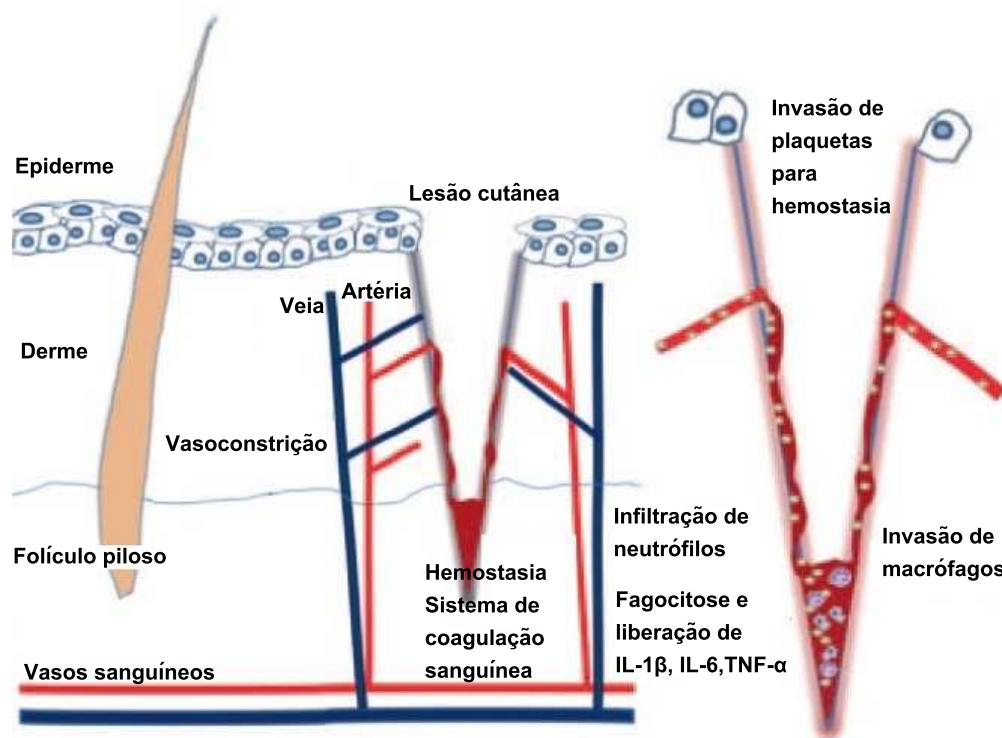


Figura 3: Ilustração de eventos que ocorrem na fase inflamatória da cicatrização de feridas na pele. Fonte: Gushiken (2017), figura modificada de Reinke & Sorg (2012).

A ativação dos macrófagos têm implicações fundamentais em vários aspectos da cicatrização de feridas como desbridamento, síntese matricial e angiogênese. A liberação inicial de fatores de plaquetas é o primeiro estímulo forte à ativação de macrófagos, os quais permanecem na ferida até o décimo dia, seguida pela fagocitose de detritos celulares como fibronectina ou colágeno (Moreski et al., 2018). A ativação de macrófagos leva a liberação de citocinas que mediam a angiogênese e a fibroplasia. Os macrófagos ativados podem ativar outras células, como os linfócitos, via citocinas, os linfócitos, por sua vez, liberam interferons (IFN's) e interleucinas. Os IFN's atuam de volta nos macrófagos para induzir a liberação de outras citocinas, como TNF- α , IL-1 e IL-6. Esse exemplo ilustra a complexidade das interações entre as células durante a cicatrização (Carvalho & Collares-Buzato, 2005; Witte & Barbul, 1997).

Os fibroblastos derivados da ferida são caracterizados pelo aumento na síntese e contração de colágeno e na diminuição da proliferação quando comparados aos fibroblastos normais (Witte & Barbul, 1997).

A resposta inflamatória reduzida afeta muito o processo de cicatrização, mas também existem consequências negativas se essa resposta for aumentada, por exemplo, a ativação de um processo fibrótico que pode debilitar a função do tecido ou levar à falência do órgão (Eming et al., 2017; Witte & Barbul, 1997). Assim temos que é fundamental o equilíbrio entre os mediadores anti-inflamatórios e os pró-inflamatórios (Gushiken, 2017). As células leucocíticas sofrem alterações comportamentais do estado pró-inflamatório para o anti-inflamatório.

A inflamação, de um processo normal de restauração da arquitetura dos tecidos, possui três etapas distintas: uma etapa pró-inflamatória precoce na qual elementos de resposta imune inata iniciam o reparo mobilizando e recrutando as principais células inflamatórias, na segunda etapa a resposta pró-inflamatória começa a reduzir e as principais células inflamatórias, como os macrófagos, mudam para um fenótipo restaurador e na última etapa a homeostase do tecido é restaurada e as células inflamatórias evadem da lesão ou são eliminadas por apoptose (Eming et al., 2017).

1.2.2 Fase Proliferativa

Na fase de proliferação (3 a 10 dias após a lesão) o foco principal do processo de cicatrização está na recuperação da superfície da ferida, na formação do tecido de granulação e na restauração da rede vascular (Reinke & Sorg, 2012).

A epiderme humana é um epitélio estratificado composto por camadas organizadas de queratinócitos e o processo de reepitelização requer grande quantidade de novas células para repor os queratinócitos perdidos na lesão (Rittié, 2016).

O tecido de granulação consiste em uma densa população de macrófagos, fibroblastos, vasos sanguíneos embutidos em uma matriz frouxa de fi-

bras de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico. A matriz do tecido de granulação é depositada por fibroblastos. A formação do tecido de granulação para através do processo de apoptose das células (Rittié, 2016; Reinke & Sorg, 2012).

Os fibroblastos e as células endoteliais são as células principais dessa fase. Os fibroblastos migram para o interior da ferida através do tecido circundante (os quais precisam ser ativados, a partir do seu estado de repouso, no qual não são replicativos), as células endoteliais proliferam das células intactas próximas à ferida e formam novos brotos capilares pelo processo de angiogênese. Os fatores de crescimento e as citocinas responsáveis pela proliferação desses dois tipos celulares advém, principalmente, de plaquetas e macrófagos ativados. Muitos dos fatores de crescimentos como PDGF, fator de crescimento epidermal (EGF) e VEGF induzem quimiotaxia, proliferação e replicação de fibroblastos (Reinke & Sorg, 2012; Witte & Barbul, 1997).

Os brotos capilares formam pequenos canais capilares que se interconectam formando um laço de vasos os quais, posteriormente se diferenciam em artérias e vênulas, completando o processo angiogênico após a estabilização das paredes dos vasos. O último passo na fase de proliferação é a formação do tecido de granulação (grande quantidade de compostos celulares) ao mesmo tempo em que a fase de remodelamento se iniciou. A angiogênese ainda não está completa, logo o tecido é bastante vascularizado, e como consequência a ferida pode apresentar vermelhidão e pode ser traumatizada facilmente (Moreski et al., 2018; Reinke & Sorg, 2012). Na Figura 4 é ilustrado os principais eventos que ocorrem na fase proliferativa.

1.2.3 Fase de Remodelamento

A principal característica na fase de remodelamento é a deposição de colágeno. Do ponto de vista clínico essa é a fase mais importante, pois é nela que se determina a força da cicatriz (Witte & Barbul, 1997).

A derme intacta é composta, predominantemente, por colágenos tipo

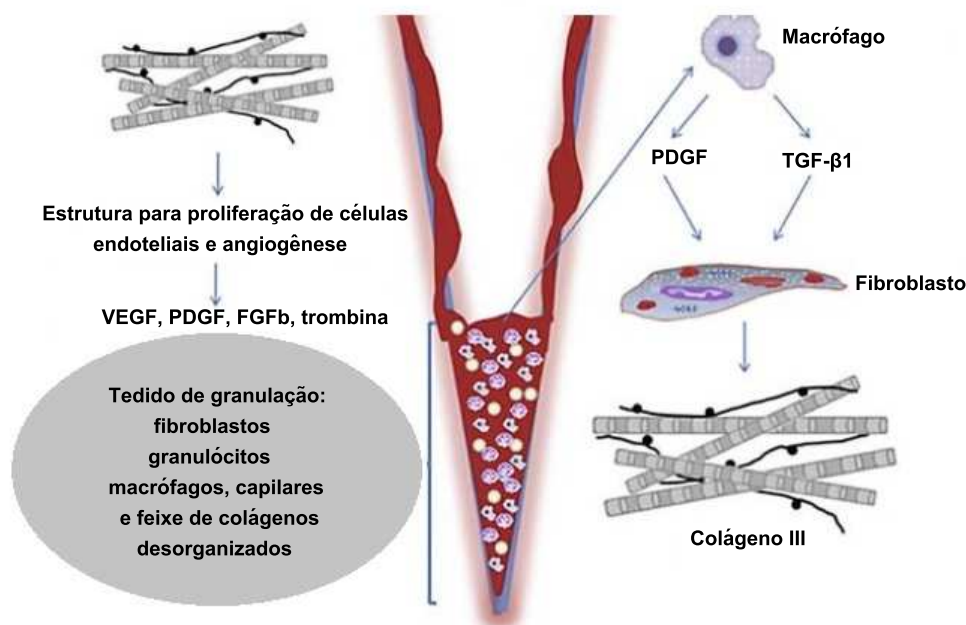


Figura 4: Ilustração de eventos que ocorrem na fase proliferativa da cicatrização de feridas na pele. Fonte: Gushiken (2017), figura modificada de Reinke & Sorg (2012).

I (80% a 90%) e tipo III (10% a 20%). No tecido de granulação o colágeno tipo III é aumentado para cerca de 30%, enquanto na cicatriz madura essa taxa se reduz a 10%. O aparecimento precoce do colágeno tipo III coincide com o da fibronectina, no entanto esse aparecimento precoce não contribui para a resistência da cicatriz. As fontes de colagenase na ferida são as células inflamatórias e endoteliais, os fibroblastos e os queratinócitos (Witte & Barbul, 1997).

O remodelamento é a última fase da cicatrização que pode durar até um ano após a lesão. Essa fase é avascular, acelular e a deposição de colágeno tipo III (fase proliferativa) é substituída pela deposição do colágeno tipo I (Reinke & Sorg, 2012). Na Figura 5 é ilustrado os principais eventos que ocorrem na fase proliferativa.

Existem componentes da pele que nunca se recuperam após o fechamento da ferida, em adultos a epiderme da cicatriz (última etapa fisiológica da reparação de feridas em mamíferos) resultante difere da pele não lesionada (Reinke & Sorg, 2012).

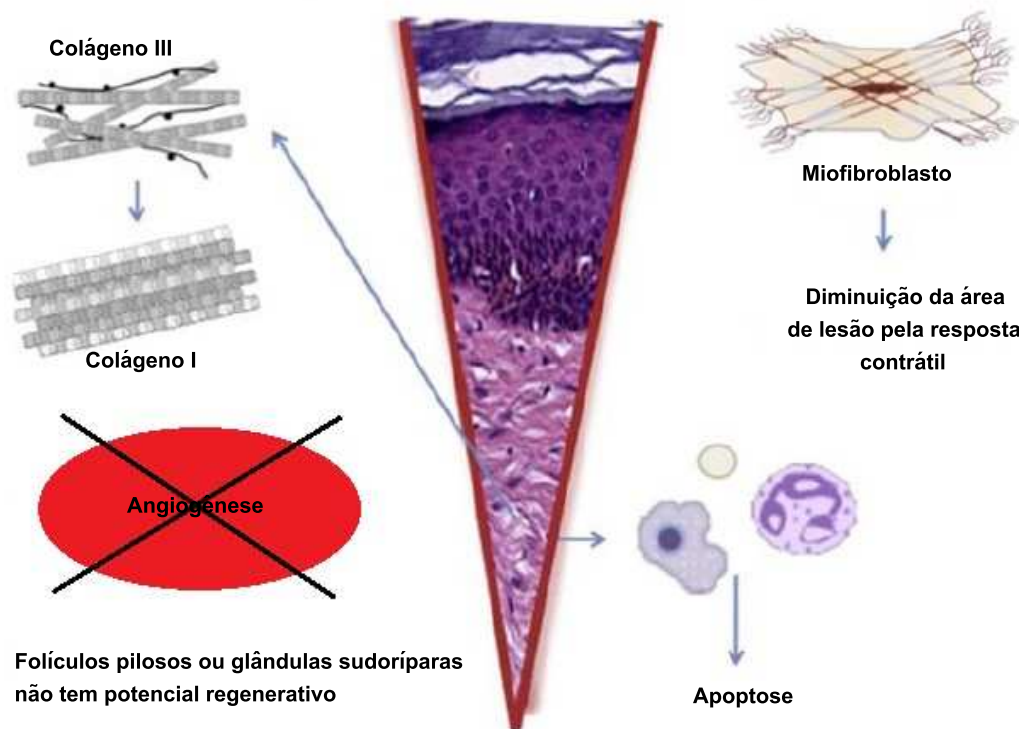


Figura 5: Ilustração de eventos que ocorrem na fase de remodelamento da cicatrização de feridas na pele. Fonte: Gushiken (2017), figura modificada de Reinke & Sorg (2012).

A maioria das feridas que não cicatrizam não progridem normalmente nas fases de reparo da ferida, mas permanecem em um estado inflamatório crônico levando a um reparo anormal, ou seja, cicatrizes hipertróficas ou quelóides (Reinke & Sorg, 2012).

1.3 Angiogênese

A formação de novos vasos sanguíneos, mais especificamente de novos capilares, a partir de uma rede capilar pré-existente é denominada angiogênese (Flegg et al., 2015, 2012; Bischoff, 1995). Os vasos sanguíneos são formados por artérias, arteríolas, veias, vênulas e capilares (tubos formados por células endoteliais) e estão ilustrados na Figura 6. As paredes finas dos capilares permitem a troca de substâncias entre o sangue e os tecidos do corpo (Meneghelli, 2013; Bischoff, 1995).

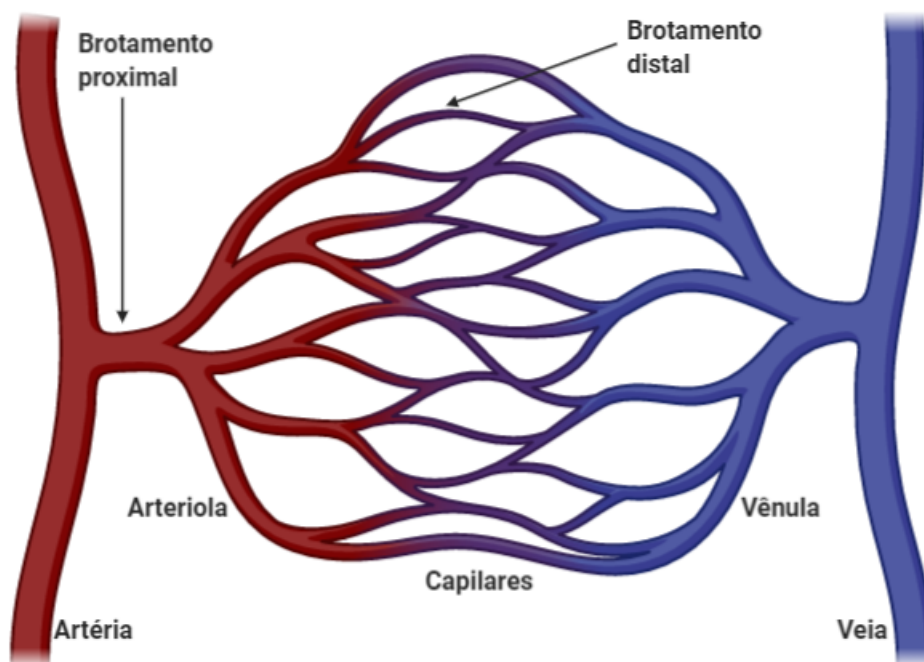


Figura 6: Ilustração dos vasos sanguíneos. As artérias ramificam-se em artérias menores chamadas arteríolas as quais ramificam-se em uma miríade de vasos sanguíneos minúsculos denominados capilares. Grupos de capilares, no interior dos tecidos, reúnem-se para formar pequenas veias chamadas vênulas as quais se fundem para formar as veias (Meneghelli, 2013). Figura modificada de Adams & Alitalo (2007) e gerada pelo aplicativo BioRender (Aoki, 2020).

No início da fase inflamatória ocorre grande influxo de células inflamatórias (como macrófagos e neutrófilos) para região da ferida liberando uma variedade de fatores de crescimento e angiogênicos tais como VEGF (Flegg et al., 2012; Schugart et al., 2008). Proteínas de coagulação, células inflamatórias, e subprodutos metabólicos fornecem uma grande quantidade de fatores angiogênicos e de crescimento para o interior da ferida o qual é condicionado à moderada hipóxia. Esses fatores angiogênicos recrutam fibroblastos e células endoteliais os quais se acumulam na região da ferida, esse acúmulo de células aumenta a demanda por suprimentos sanguíneos (Schugart et al., 2008). Em situações de aumento de consumo de oxigênio e de nutrientes a rede vascular basal é insuficiente para o suprimento da regeneração

tecidual (Oliveira et al., 2010); Esses fatores químicos fornecem o estímulo necessário para a angiogênese (Flegg et al., 2015, 2012; Bischoff, 1995).

O crescimento de novos vasos sanguíneos em direção ao centro da ferida, direcionados por fatores químicos angiogênicos liberados por macrófagos, se inicia com o desenvolvimento de novos vasos precursores denominados brotos (do inglês *buds*). A formação dos brotos, recrutados de vasos intactos na borda da ferida, é induzida por elevados níveis de fatores angiogênicos (Pettet et al., 1996a). Cada broto se estende para formar um pequeno brotamento proximal (do inglês *sprout*) cujas extremidades, denominadas brotamento distal (do inglês *tip*), movem em direção ao centro da ferida, ou seja, na direção da fonte de fatores angiogênicos. O processo de formação dos brotos está ilustrado na Figura 7.

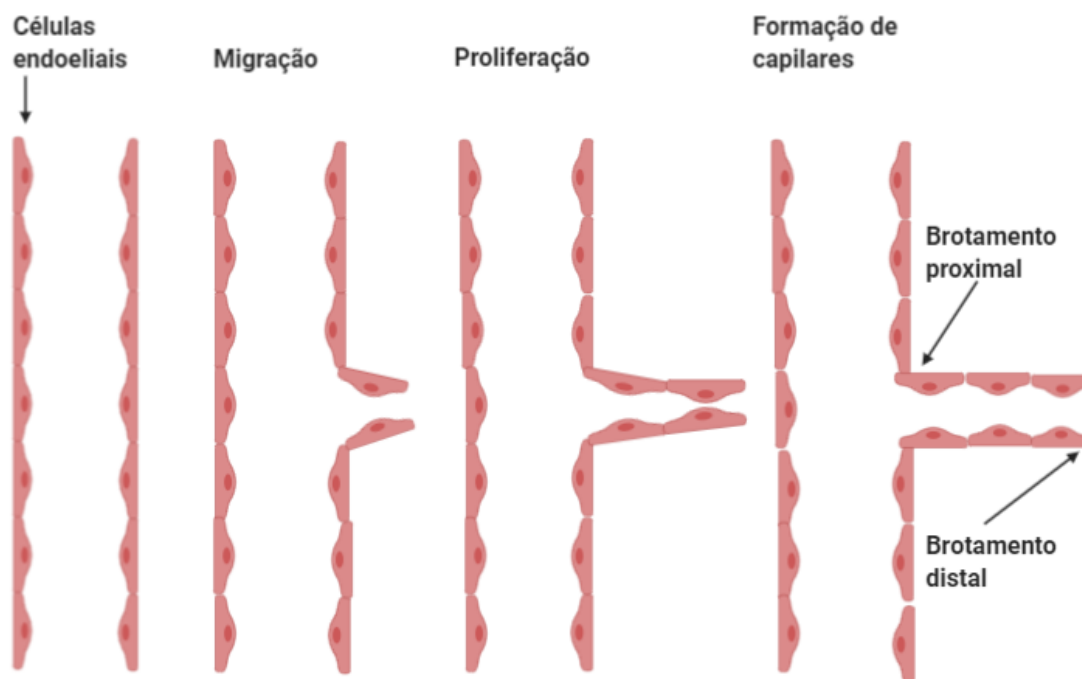


Figura 7: Ilustração da formação dos brotos (*buds*) e do brotamento proximal (*sprout*). Figura modificada de Bischoff (1995) e gerada pelo aplicativo BioRender (Aoki, 2020).

Enquanto as extremidades dos vasos, ou dos capilares, se direcionam ao centro da ferida ocorrem muitos contatos do tipo brotamento distal-com-brotamento

distal ou brotamento distal-com-brotamento proximal formando arcadas ou *loops* em um processo denominado anastomose (Flegg et al., 2015; Adams & Alitalo, 2007; Pettet et al., 1996a).

Angiogênese é um processo fundamental e decisivo em resposta protética tal como na cicatrização de feridas (Flegg et al., 2012; Schugart et al., 2008; Pettet et al., 1996b; Bischoff, 1995) envolvendo a resposta quimiotática das células endoteliais dos vasos sanguíneos aos fatores angiogênicos produzidos pelos macrófagos no interior da ferida (Pettet et al., 1996a). A epiderme bem nutrida mantém sua capacidade de migração e proliferação e a manutenção desses nutrientes é garantida pelos vasos sanguíneos, ou seja, acredita-se que a angiogênese seja um processo essencial na recuperação de feridas na pele (Strigini & Ryan, 1996).

Angiogênese é altamente regulada pela ação de citocinas e fatores de crescimento e auxilia no transporte de macrófagos e neutrófilos para o leito da ferida (Flegg et al., 2015). Miofibroblastos e macrófagos desempenham um papel importante na angiogênese devido a secreção de VEGF durante o processo de cicatrização de feridas o qual é um fator angiogênico essencial na formação do tecido de granulação (Khalaf et al., 2019).

Uma vez que a necessidade metabólica da cicatrização é atingida, a ferida se fecha e os vasos sanguíneos regridem (as células endoteliais tornam-se quiescentes) deixando a região vascularizada com cicatriz fibrosa na proporção da ocorrência da inflamação (Schugart et al., 2008; Bischoff, 1995). Em condições fisiológicas como reprodução, desenvolvimento embrionário e regeneração tecidual, a angiogênese é altamente controlada, ou seja, é desencadeada por breves períodos e em seguida é completamente inibida o que não ocorre em alguns cânceres que possui crescimento anômalo de vasos sanguíneos (Meneghelli, 2013; Bischoff, 1995). A angiogênese patológica promove o recrutamento contínuo de células inflamatórias exacerbando a inflamação e os danos (Kim et al., 2013). Segundo Flegg et al. (2015) o crescimento tumoral e a cicatrização de feridas possuem muitas semelhanças tal como a ligação célula-célula e a reorganização tecidual, no entanto existem diferenças

fundamentais como, por exemplo, a angiogênese associada à cicatrização de feridas é muito regulada, sendo que os novos vasos sanguíneos regredem após a cicatrização estar completa.

A quimiotaxia é um fenômeno presente tanto na cicatrização de feridas quanto no desenvolvimento de tumores (Pettet et al., 1996a; Balding & McElwain, 1985). Segundo Iglesias & Devreotes (2008) muito do nosso entendimento do mecanismo direcionado (quimiotaxia) é oriundo dos neutrófilos.

A quimiotaxia, nas células eucarióticas, envolve uma série de processos coordenados e distintos: motilidade (as células se movem por extensão dos pseudópodes anteriores e retração dos posteriores), polarização (as células reorganizam os componentes celulares, levando ao desenvolvimento de bordas dianteiras e traseiras com sensibilidades distintas para quimioatratantes) e detecção de gradiente (células eucarióticas, como neutrófilos, possuem a habilidade de detectar e amplificar gradiente espacial) (Iglesias & Devreotes, 2008).

A quimiotaxia, a capacidade de detectar heterogeneidades espaciais na concentração de quimioatratantes extracelulares e de responder por polarização e migração em direção às fontes, é crucial para direcionamento das células do sistema imunológico, bem como aquelas em tecidos em regeneração. A quimiotaxia também desempenha um papel fundamental em eventos patológicos, como metástases e inflamação excessiva (Iglesias & Devreotes, 2008).

1.4 Tratamentos de Feridas na Pele

A migração epidérmica é duas vezes mais rápida em uma ferida úmida do que em uma desidratada. A remoção da crosta e o contato com o ar também reduzem a migração de queratinócitos. Assim, cremes e adesivos curativos, para feridas, podem auxiliar no processo de cicatrização (Rittié, 2016). No entanto, em alguns casos, as feridas cutâneas apresentam dificuldades na cicatrização devido a estados patológicos associados como a diabetes, perturbações imunes e isquemia (Mo-

reski et al., 2018). Outros aspectos afetam o processo de cicatrização como, por exemplo, localização, profundidade da lesão, presença ou não de infecção, estado nutricional do paciente, doenças crônicas degenerativas, faixa etária e obesidade (Guo & DiPietro, 2010; Ferreira et al., 2003).

Falhas na cicatrização de feridas continuam sendo um problema clínico importante, com grandes impactos nos custos com cuidados na saúde (Witte & Barbul, 1997). Segundo Gushiken (2017), no Brasil não existem dados oficiais sobre os gastos com tratamentos de lesões cutâneas, mas nos Estados Unidos esse custo atinge o valor de US\$37 bilhões por ano, com gasto de aproximadamente US\$5,700 por pessoa.

O mercado oferece uma diversidade de produtos para o tratamento de feridas, entretanto não há consenso sobre a opção mais indicada, assim a busca por medicamentos, que possam acelerar o processo cicatricial, minimizando o desgaste físico e emocional dos pacientes e o custo, é uma área promissora (Moreski et al., 2018; Ferreira et al., 2003).

Uma alternativa é o uso de produtos naturais e de plantas medicinais, por serem muito utilizadas popularmente desde o início da humanidade no tratamento de feridas. Já se conhece o efeito de vários produtos naturais (a base de babosa, arnica, babaçu, barbatimão, papaína, etc) que auxiliam na cicatrização da pele lesada. A Organização Mundial de Saúde recomenda o levantamento, a identificação, o estímulo e a orientação do uso de plantas medicinais que possuam eficácia e segurança terapêutica comprovada (Moreski et al., 2018; Ferreira et al., 2003).

Estudos comprovaram propriedades antimicrobianas, analgésicas, antiulcerosas, antitumorais e o potencial cicatrizante de diferentes formulações de *Copaifera langsdorffi*, popular copaíba, árvore nativa das regiões norte e nordeste do Brasil. Esses estudos consideraram produtos à base da óleo-resina das cascas e do extrato hidroalcoólico das folhas das árvores (Gushiken et al., 2017b,a; Paiva et al., 2002).

1.5 Dados Experimentais

A obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas e da óleo-resina da casca de copaíba em forma de creme foi realizada pela equipe do Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), dentro do projeto FAPESP 2011/13630-7 - “Validação Química e Farmacológica de Extratos e Princípios Ativos de Espécies de Copaífera”.

Foram obtidos 90 mL da óleo resina de *Copaifera langsdorffii* de uma amostra localizada em Cajuru, São Paulo, Brasil. Um espécime de comprovante (SPFR 10120) identificado por Milton Groppo Junior foi depositado no Departamento de Biologia, FFCLRP, USP. Folhas de *Copaifera langsdorffii* foram coletadas em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil e identificadas por Milton Groppo Junior. Um espécime de comprovante (SPFR 10120) foi depositado no Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP.

O creme lanette (CL) foi usado como veículo para o preparo dos cremes à base de *Copaifera langsdorffii* nas concentrações de 10%, tanto da óleo-resina da casca, quanto do extrato hidroalcoólico das folhas da planta. Também foi sintetizado um creme à base de Colagenase 1.2 UI (nome utilizado para designar o creme comercial à base de colagenases) a partir do veículo (creme lanette/base) a fim de utilizar um controle positivo semelhante ao medicamento de referência no mercado para comparação com os tratamentos à base de copaíba (Gushiken, 2017).

O CL é uma base farmacêutica iônica comumente indicado para incorporação de extratos por assegurar significativa estabilidade ao produto (Souza Neto Júnior et al., 2019; Silva, 2012). O CL apresenta pH entre 5,0 e 6,5 e sua cera é uma dispersão coloidal composta por 90 partes de álcool graxo e 10 partes de tensoativo (Silva, 2012). A colagenase é uma agente desbridante enzimática usada no tratamento de feridas infectadas e cirúrgicas. Estudos anteriores relatam que a colagenase atua limpando o tecido necrótico da ferida por um método enzimático, acelerando a formação do tecido de granulação e subsequente reepitelização em lesões

dérmicas de ratos (Durmus et al., 2009).

Os dados biológicos foram coletados pela equipe da Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu, dentro dos projetos FAPESP 2011/13630-7 - “Validação química e farmacológica de extratos e princípios ativos de espécies de copaífera” e 2014/23684-5 - “Avaliação dos mecanismos celulares e moleculares na cicatrização de lesões cutâneas utilizando cremes à base de extrato hidroalcoólico e óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*”. Todas as práticas experimentais foram executadas de acordo com os protocolos experimentais e de ética animal (Protocolo nº 413-CEUA de 19 de junho de 2012) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso entre 200 g e 250 g, os quais tiveram o dorso tricotomizado e feita uma lesão na região dorsal com o auxílio de um *punch* de 2 cm de diâmetro, conforme ilustrado na Figura 8. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: creme base lanette (controle negativo), creme de Colagenase 1.2 UI (controle positivo), extrato hidroalcoólico das folhas de copaíba na concentração de 10% (10% EH) e óleo-resina da casca de copaíba na concentração 10% (10% OR).

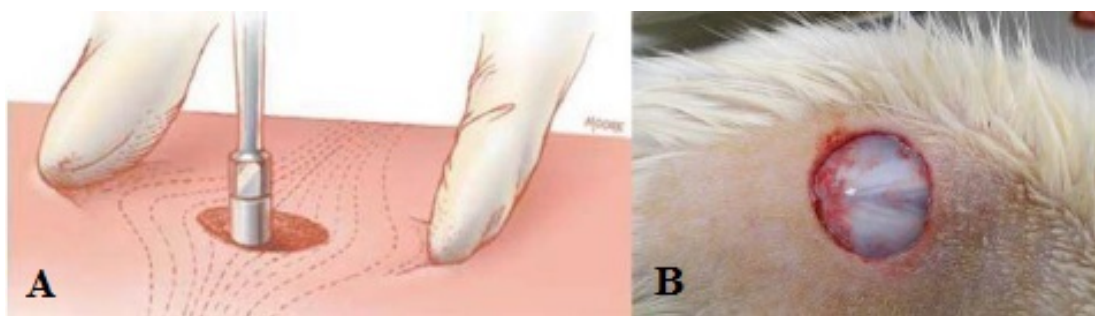


Figura 8: Esquema (A) e fotografia (B) ilustrando o modelo de excisão de lesão cutânea de segunda intenção utilizando *punch* de 2 cm de diâmetro. Fonte: Gushiken (2017).

Os animais foram tratados uma vez ao dia com a aplicação dos cremes de acordo com o respectivo grupo experimental, por 3 diferentes períodos de

tratamento: 3, 7 ou 14 dias (cada período com 32 animais). Os dias, para experimentação, foram escolhidos de acordo com as fases da cicatrização de lesões cutâneas (inflamatória, proliferativa e de remodelamento) descritas na literatura (Gushiken, 2017; Reinke & Sorg, 2012).

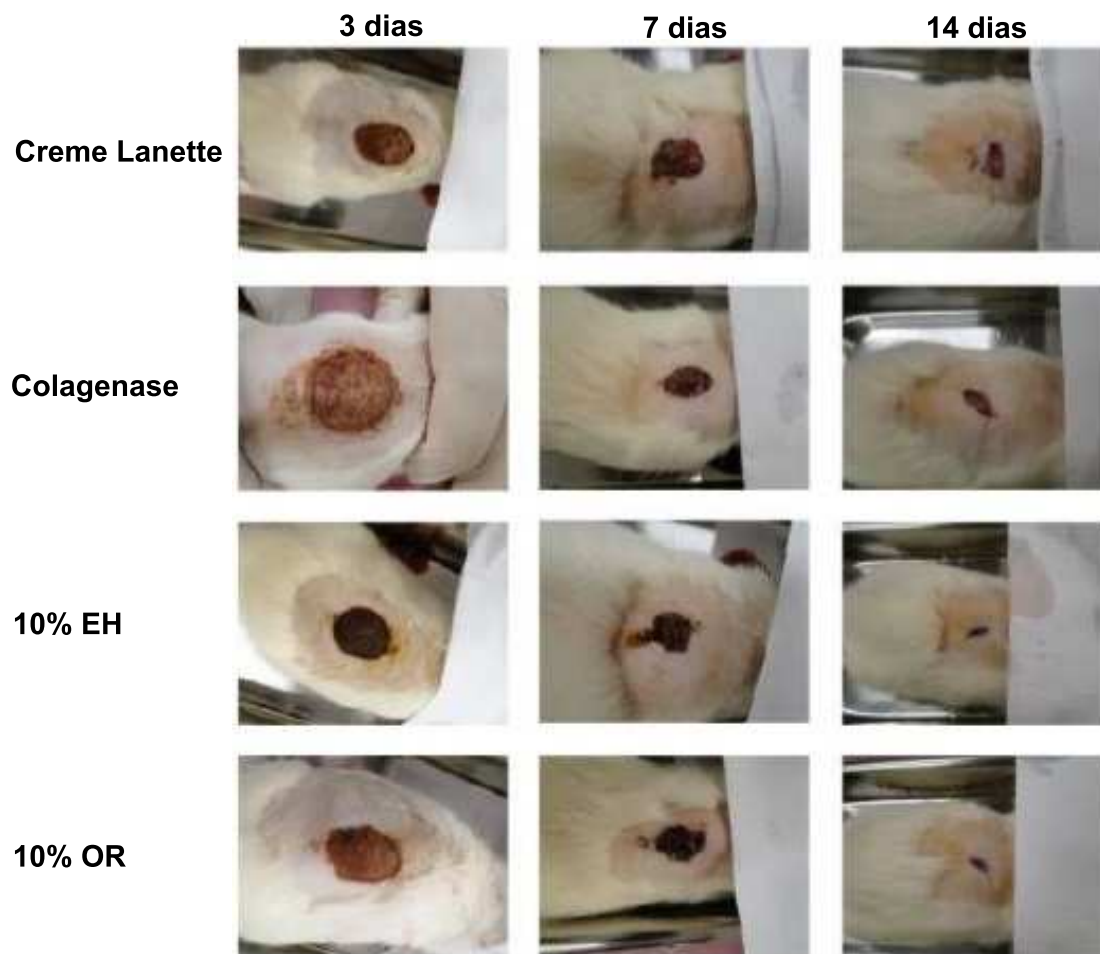


Figura 9: Fotografias das lesões dos animais tratados com cremes Lanette, Colagenase, 10% EH e 10% OR durante 3, 7 e 14 dias de experimentação. Os grupos 10% EH e 10% OR apresentavam no local somente a cicatriz da lesão enquanto os grupos CL e colagenase apresentavam crosta fibrinosa. Fonte: Gushiken (2017).

Pelas lesões analisadas ao longo de 3 dias de tratamento não constatarem diferença estatística de retração. Nas análises macroscópicas, os tratamentos

10% EH e 10% OR apresentaram lesões sem exsudato e com crosta aderida, sendo que nos demais grupos houve a presença de exsudato e edema na região das lesões. Após 7 dias de tratamento, os grupos tratados com 10% EH e 10% OR possuíam lesões com crosta aderida e sem a presença do exsudato, diferentemente do observado nos grupos CL e Colagenase. Pelas lesões analisadas ao longo de 14 dias constataram retração estatisticamente significativa para os grupos tratados com 10% EH e 10% OR. Nos animais do grupo CL e Colagenase, observou-se a permanência da crosta fibrinosa aderida à lesão. Nos grupos 10% EH e 10% OR, os animais não apresentavam mais a crosta de fibrina, apresentando no local somente a cicatriz da lesão (Gushiken, 2017). Efeitos dos tratamentos estão ilustrados na Figura 9.

As amostras de pele homogeneizadas foram submetidas à análise por ELISA para a quantificação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10. Segundo Gushiken (2017) pelos resultados obtidos na análise de IL-1 β constataram a redução da concentração dessa interleucina nos tratamentos 10% EH e 10% OR após 3 dias e as análises dos períodos de 7 e 14 dias não mostraram diferenças entre os tratamentos nas concentrações de IL-1 β . Os níveis de IL-6 também estavam reduzidos nos tratamentos 10% EH e 10% OR comparados aos níveis elevados dessa interleucina no grupo CL após 3 dias de tratamento. Não houve alteração na concentração de IL-6 (ilustrado na Figura 10) durante 7 e 14 dias (Gushiken, 2017). As concentrações de TNF- α também estavam reduzidas nos grupos 10% EH e 10% OR após 3 e 14 dias de tratamento. Não houve diferença significativa nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 após 3 dias de tratamento. Em 7 dias, observamos aumento da concentração dessa interleucina nos grupos 10% EH e 10% OR em comparação aos grupos CL e Colagenase, conforme ilustrado na Figura 11. Após 14 dias não houve diferença significativa entre os tratamentos (Gushiken, 2017; Gushiken et al., 2017a).

Na borda das lesões, observou-se no dia 3 um aumento significativo do número de células totais dos grupos 10% EH e 10% OR em relação aos grupos CL e Colagenase, conforme ilustrado na Figura 12. Também na borda das lesões, observou-

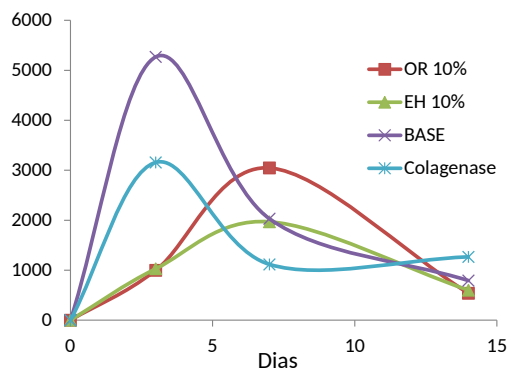


Figura 10: Dispersão da média das concentrações de IL-6 (pg/mg de proteína) dos resultados obtidos em laboratório.

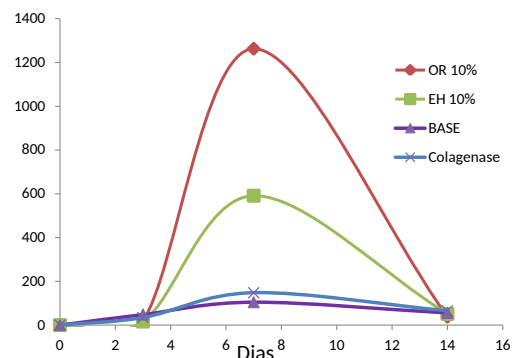


Figura 11: Dispersão da média das concentrações de IL-10 (pg/mg de proteína) dos resultados obtidos em laboratório.

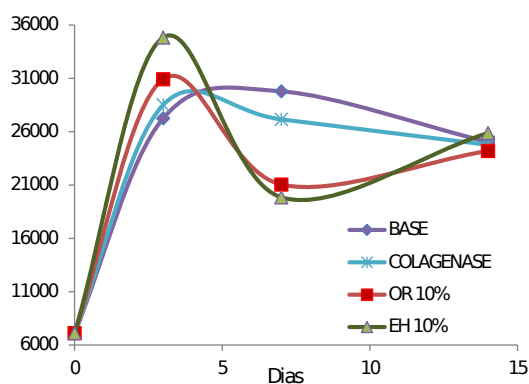


Figura 12: Curva de dispersão da média dos dados experimentais da celularidade total na borda da ferida (cel mm^{-3}).

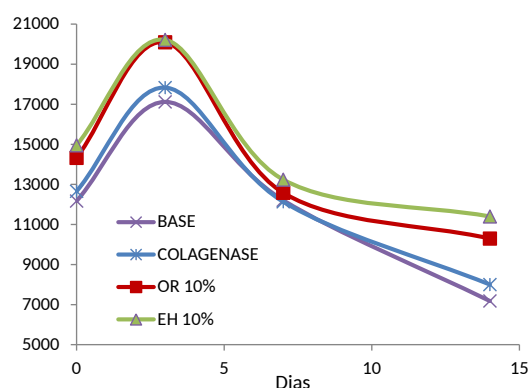


Figura 13: Dispersão da média dos dados experimentais da concentração química da mitose (PCNA) na borda da ferida (pg mm^{-3}).

se o aumento da imunomarcagem do anticorpo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) nos grupos 10% EH e 10% OR em relação aos grupos CL e Colagenase após 3 dias, conforme ilustrado na Figura 13. Durante o tratamento por 14 dias, houve aumento da área de retração nos grupos 10% EH e 10% OR comparados ao CL, conforme ilustrado na Figura 9 (Gushiken, 2017).

A IL-6 é uma citocina que possui efeito na inflamação, resposta imune e hematopoese. Juntamente com o $\text{TNF-}\alpha$ e a $\text{IL-1}\beta$, a IL-6 atua como um fator pró-

inflamatório, mediando a migração de neutrófilos e macrófagos para a área de lesão. Desse modo, a redução da concentração de IL-6 após 7 dias nos grupos 10% EH e 10% OR comprova a ação anti-inflamatória desses tratamentos sobre essa citocina.

O potencial anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico e da óleo-resina na cicatrização de feridas de pele pode ser evidenciado não só pela redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , mas também pela atividade da citocina anti-inflamatória IL-10, inibindo a inflamação crônica, o que evita a formação de fibrose tecidual e o atraso na cicatrização das lesões. Além de modular a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, a IL-10 também reduz a infiltração de neutrófilos e macrófagos na região da injúria.

Os resultados obtidos, por Gushiken et al. (2017a), pela contagem dos vasos nas bordas e centro das lesões dos grupos tratados em 3, 7 e 14 dias (contagem do brotamento distal, na borda da ferida, ilustrado na Figura 15), juntamente com a imunomarcagem para VEGF, ilustrado na Figura 14, indicam o estímulo dos tratamentos 10% EH e 10% OR na formação de vasos no centro das lesões após 3 dias e borda após 14 dias. O mecanismo de angiogênese local tem como um de seus mediadores o VEGF, entretanto, também pode haver influência do TGF- β 1.

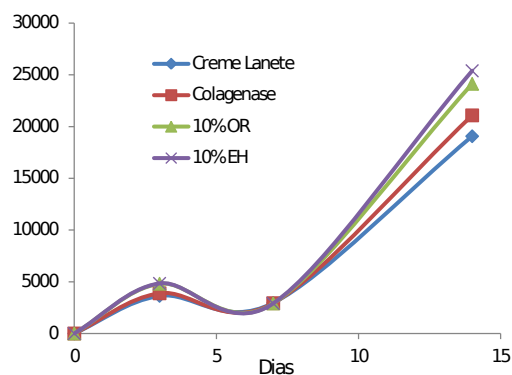


Figura 14: Curva de dispersão da média dos dados experimentais do quimiotrante VEGF na borda da ferida (μm^2).

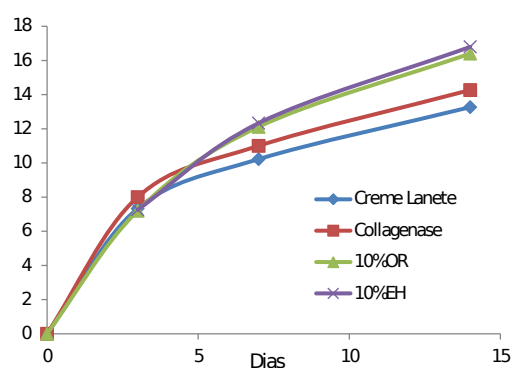


Figura 15: Dispersão da média dos dados experimentais da densidade do brotamento distal na borda da ferida (U).

As formulações 10% EH e 10% OR apresentaram atividade anti-

inflamatória, retração da área lesada, estímulo da angiogênese, da reepitelização e remodelamento da matriz extracelular. No entanto, a 10% OR apresentou maior expressão de FGF-2, caracterizando a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno, e o 10% EH a maior expressão de fator inibidor de migração de macrófago (MIF), estimulando a diferenciação de fibroblastos a miofibroblastos na área de retração da lesão (Gushiken et al., 2017a).

Gushiken (2017) verificou a eficácia dos tratamentos 10% EH e 10% OR na cicatrização a partir da retração macroscópica das lesões cutâneas após 14 dias de tratamento, além do efeito de ambos na atividade anti-inflamatória local, estímulo da reepitelização, angiogênese, proliferação celular e remodelamento de matriz extracelular.

Em termos de experimentos com animais de grande porte, Walton & Neal (1971) realizaram um estudo com feridas de segunda intenção de 4 cm² nos flancos e nos membros inferiores de cavalos que demoraram, em média, 27 e 59 dias para cicatrizarem, respectivamente. Sendo que foram verificadas alterações nas feridas durante 12 meses. Comparando o período de tempo necessário para experimentos com cavalos e ratos percebemos a viabilidade de se estudar modelos em roedores e aproximá-los para os equinos.

1.6 Modelagem Matemática da Cicatrização de Feridas na Pele

A cicatrização de feridas é crucial para preservar a integridade dos órgãos após perda de tecido, no entanto ainda é parcialmente compreendida, apesar de vários estudos (Murray, 2000b). Como investigações *in vivo*, não invasivas, são difíceis de executar, modelos matemáticos biologicamente realísticos fornecem uma ferramenta importante para compreender a cicatrização de feridas. O desenvolvimento de modelos matemáticos pode fornecer meios de identificar elementos do

processo, incluindo informações para auxiliar no aprimoramento de metodologias de tratamentos e na melhoria do gerenciamento clínico. Está bem estabelecido que esses modelos matemáticos têm o potencial de gerar previsão teórica, não antecipada por outros meios, estimulando pesquisas biomédicas e reduzindo o dispêndio de tempo e de gastos financeiros com experimentos (Flegg et al., 2015).

A aplicação de ferramentas computacionais modernas possibilita o contínuo e acelerado desenvolvimento de modelos matemáticos para melhor descrever o processo de cicatrização de feridas durante o fechamento facilitado e não facilitado. Logo, existe a oportunidade de obtenção de modelos cada vez mais completos e precisos, que não envolvam simplificações excessivas as quais levariam a resultados menos adequados. Todas as fases de cicatrização de feridas têm sido modeladas, mas a maioria dos trabalhos focam nas fases proliferativa e na contração. Assim, existe a oportunidade de se criar modelos para estudar o processo transiente da cicatrização de feridas, tal como a migração celular (Jorgensen & Sanders, 2016).

1.7 Estrutura do Texto

No Capítulo 2 revemos três modelos de equações diferenciais ordinárias (EDO) homogêneas desenvolvidos por Dunster et al. (2014) com uma breve explanação analítica dos pontos de equilíbrios. Será apresentado a calibração dos parâmetros para o terceiro modelo, o mais completo, e então propomos um novo modelo matemático com o objetivo de reproduzir mais realisticamente a dinâmica celular.

No Capítulo 3 expomos o estudo de dois modelos de equações diferenciais parciais (EDP) desenvolvido por Murray (2000b) e Sherratt & Murray (1990) com a descrição do estudo de ondas viajantes, com a reprodução das soluções numéricas e com a aplicação do modelo composto por um sistema de EDP's aos tratamentos 10% OR e Colagenase. Para finalizar propomos um novo modelo de EDP capaz de estimar a densidade celular total no leito da ferida e, conseqüentemente o tempo de

cicatrização da mesma.

No Capítulo 4 estendemos o modelo do Capítulo 3, baseado em Schu-
gart et al. (2008) e Pettet et al. (1996a), para um modelo original capaz de reproduzir
aspectos importantes associados a angiogênese.

No Capítulo 5 apresentamos a conclusão final do trabalho e direções
futuras para a pesquisa.

1.8 Objetivo

Utilizar modelos matemáticos capazes de prever o tempo de cica-
trização de feridas na pele e de descrever aspectos da angiogênese a partir de um
antioxidante fornecido.

2 MODELAGEM MATEMÁTICA DA FASE INFLAMATÓRIA

Apresentamos três modelos, descritos em Dunster et al. (2014), que descrevem a evolução de populações de células: macrófagos, neutrófilos ativos e neutrófilos apoptóticos, de um mediador pró-inflamatório (IL-6), que é quimiotático para células brancas (leucócitos), e um mediador anti-inflamatório (IL-10), que é liberado pelos macrófagos quando eles removem os neutrófilos apoptóticos. Ao final do capítulo propomos um modelo matemático considerando a inserção da ação dos macrófagos na produção do mediador pró-inflamatório. Os dois modelos mais completos serão aplicados aos quatro tratamentos descritos na Seção 1.5.

2.1 Equação de Hill

A resposta de variações, de muitas interações moleculares, em sistemas celulares exhibe uma curva sigmoide, para entradas de concentrações. A equação de Hill é utilizada para quantificar a cooperatividade em que a ligação de uma molécula efetora (ligante, ativador) ao receptor aumenta a ligação das moléculas seguintes. Isso é observado na regulação alostérica (que exige cooperatividade) de enzimas e de ligantes que se conectam às suas respectivas macromoléculas (Dubitzky et al., 2013; Ingalls, 2013). A equação de Hill descreve a saturação das moléculas receptoras, Y ,

em função da concentração efetora e é dada por:

$$Y = \frac{Z^{n_h}}{k_{0.5}^{n_h} + Z^{n_h}}, \quad (1)$$

sendo Z a concentração de entrada, n_h o coeficiente de Hill (coeficiente de cooperatividade) e $k_{0.5}$ a constante de meia saturação (quantifica a concentração limiar necessária para 50% da produção de resposta) (Dubitzky et al., 2013; Ingalls, 2013). Alguns gráficos da função de Hill estão ilustrados na Figura 16 para diferentes valores do coeficiente n_h . A equação (1) pode ser escrita na forma:

$$Y k_{0.5}^{n_h} = Z^{n_h} (1 - Y),$$

ou seja,

$$\frac{Y}{1 - Y} = \frac{Z^{n_h}}{k_{0.5}^{n_h}}.$$

Aplicando o logaritmo à equação anterior temos a equação de Hill linearizada:

$$\ln\left(\frac{Y}{1 - Y}\right) = n_h \ln Z - n_h \ln(k_{0.5}), \quad \text{para } 0 < Y < 1. \quad (2)$$

Para o cálculo das constantes pode-se utilizar a equação (1) na sua forma linearizada a qual é apresentada na equação (2).

Considerando V_{max} a taxa máxima de reação alostérica temos que a taxa líquida de reação alostérica, V , pode ser representada pela equação:

$$V = Y V_{max} = V_{max} \frac{Z^{n_h}}{k_{0.5}^{n_h} + Z^{n_h}}. \quad (3)$$

Se $n_h = 1$ a equação (3) se torna a equação de Michaelis-Menten, se $n_h > 1$ temos a resposta de cooperatividade positiva e para $n_h < 1$ a resposta de cooperatividade é negativa (Dubitzky et al., 2013). Gráficos para equação (3) estão ilustrados nas Figuras 17 e 18 para diferentes valores de V_{max} e de $k_{0.5}$, respectivamente.

A equação de Hill pode representar a cinética de repressão de uma reação biomolecular por meio da equação:

$$Y = \frac{k_{0.5}^{n_h}}{k_{0.5}^{n_h} + R^{n_h}}, \quad (4)$$

sendo R a concentração de molécula repressora (Dubitzky et al., 2013).

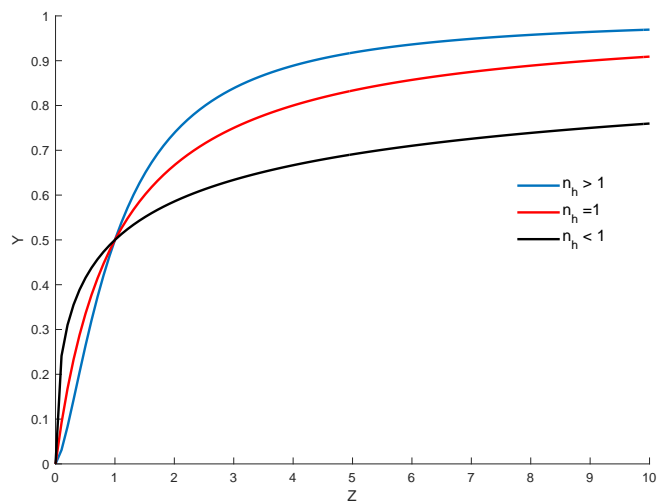


Figura 16: Ilustração dos gráficos da função de Hill para diferentes valores de n_h .

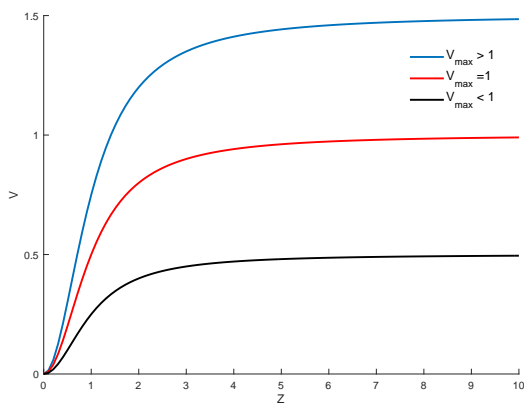


Figura 17: Ilustração dos gráficos da equação (3) para diferentes valores de V_{max} .

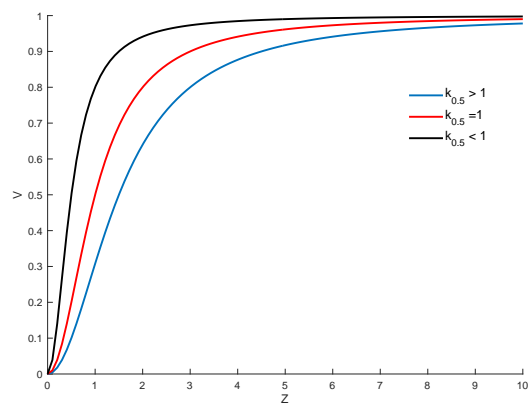


Figura 18: Ilustração dos gráficos da equação (3) para diferentes valores de $k_{0.5}$.

2.2 Problemas *Stiff*

Todos os métodos para aproximação de solução de problemas de valor inicial possuem termos de erro que envolvem uma derivada de ordem superior da solução da equação. Se a derivada puder ser limitada, então o método terá um limitante de erro que pode ser usado para estimar a precisão da aproximação. Mesmo

que a derivada cresça à medida que os passos aumentam, o erro pode ser mantido sob relativo controle, desde que a solução também cresça em módulo. Entretanto, muitas vezes surgem problemas para os quais o módulo da derivada aumenta, mas a solução não. Nessa situação o erro pode crescer tanto que chega a dominar os cálculos. Problemas de valores iniciais para os quais tal fato pode ocorrer são chamados “**equações rígidas**” (problema tipo *stiff*) e são bastante comuns, especialmente no estudo de vibrações, reações químicas e circuitos elétricos (Burden & Faires, 2008).

As equações rígidas têm restrições quanto ao uso de métodos numéricos para obtenção de suas soluções. Por exemplo, temos que um método pode ser aplicado à equação rígida $y' = \lambda y$, para $\lambda < 0$, somente se λh , em que h é o tamanho do passo, estiver na região de estabilidade absoluta do método - condição que impõe restrição sobre o tamanho de h . Por exemplo, se $h < \frac{2}{|\lambda|}$ o método de Euler pode ser aplicado à equação rígida $y' = \lambda y$ (Burden & Faires, 2008).

Segundo Sartori (2014), em geral, rigidez surge em sistemas de EDO sendo possível indentificar *o grau* de rigidez por meio da matriz associada ao sistema. Considere o sistema linear:

$$y' = Bx \tag{5}$$

com $y = y(t) \in \mathbb{R}^s$ e B uma matriz constante de dimensão $s \times s$ com autovalores $\lambda_i \in \mathbb{C}$, $i = 1, 2, \dots, s$. Considerando λ_{max} e λ_{min} os autovalores, da matriz B , de maior e de menor módulo, respectivamente, definimos que um sistema linear com coeficientes constantes é rígido se todos os autovalores, da matriz B , têm parte real negativa e se o coeficiente de rigidez (cr) for grande, ou seja, se

$$cr = \frac{|\lambda_{max}|}{|\lambda_{min}|} \gg 1. \tag{6}$$

A Equação (6) continua válida para sistemas de equações diferenciais ordinárias não lineares considerando A como sendo a matriz jacobiana do sistema (Sartori, 2014). Esta definição diz que a solução do sistema, tem algumas componentes que decaem muito mais rápido que outras, exigindo diferentes tamanhos de

passo para manter a solução dentro da região de estabilidade do método numérico. Se aplicarmos métodos explícitos em equações rígidas, precisaremos de passos bem pequenos para garantir a estabilidade, e assim serão necessários muitos passos para obter a solução, com uma dada tolerância, tornando o método muito caro, ou inviável (Sartori, 2014). Por outro lado, aplicando métodos implícitos com uma região de estabilidade absoluta grande o suficiente para não impor restrições de estabilidade, poderemos escolher o passo tão grande quanto quisermos (Sartori, 2014; Burden & Faires, 2008).

2.3 Modelos Matemáticos

Nessa seção serão apresentados três modelos de EDO's com complexidade, biológica e matemática, crescente. No contexto de EDO estamos interessados no tempo gasto para se obter os níveis celulares que caracterizam a cicatrização em uma região pré-definida, logo, acompanhemos as variações das populações de células tempo a tempo, para esse trabalho, dia a dia. As variáveis e os parâmetros, para todos os modelos desse capítulo estão descritos nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Iniciamos com o modelo da resposta inflamatória focando na resolução da inflamação baseada na interação de duas populações de células (macrófagos e neutrófilos) com uma citocina pró-inflamatória. Esse modelo é considerado em um ambiente estéril.

Sejam $n(t)$ e $a(t)$ a celularidade total de neutrófilos ativos e apoptóticos, respectivamente, $m(t)$ a celularidade total de macrófagos e $c(t)$ a concentração do mediador pró-inflamatório (IL-6), ao longo do tempo t . O estímulo do modelo é fornecido pela função $f(t)$, a qual modela o efeito físico do dano no tecido resultando em uma crescente concentração de mediador pró-inflamatório. O *feedback* positivo atua via neutrófilos os quais invadem a ferida em resposta ao mediador pró-inflamatório e morrem naturalmente transformando em neutrófilos apoptóticos. Os neutrófilos apoptóticos podem decompor liberando sua carga tóxica, danificando tecidos e, portanto, fechando o ciclo de *feedback* positivo aumentando os níveis do

mediador pró-inflamatório. Os macrófagos também chegam em resposta ao mediador pró-inflamatório, mas depois agem para remover neutrófilos apoptóticos (formando assim um *feedback* negativo) e morrem naturalmente. O decaimento da concentração do mediador pró-inflamatório se dá pela resolução do processo inflamatório (Dunster et al., 2014). O modelo resultante é dado por:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dn}{dt} = \chi_n c - \nu n, \\ \frac{da}{dt} = \nu n - \gamma_a a - \phi m a, \\ \frac{dm}{dt} = \chi_m c - \gamma_m m, \\ \frac{dc}{dt} = \alpha f(t) + \gamma_a k_a \left(\frac{a^2}{\beta_a^2 + a^2} \right) - \gamma_c c. \end{array} \right. \quad (7a)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{da}{dt} = \nu n - \gamma_a a - \phi m a, \\ \frac{dm}{dt} = \chi_m c - \gamma_m m, \\ \frac{dc}{dt} = \alpha f(t) + \gamma_a k_a \left(\frac{a^2}{\beta_a^2 + a^2} \right) - \gamma_c c. \end{array} \right. \quad (7b)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dm}{dt} = \chi_m c - \gamma_m m, \\ \frac{dc}{dt} = \alpha f(t) + \gamma_a k_a \left(\frac{a^2}{\beta_a^2 + a^2} \right) - \gamma_c c. \end{array} \right. \quad (7c)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dc}{dt} = \alpha f(t) + \gamma_a k_a \left(\frac{a^2}{\beta_a^2 + a^2} \right) - \gamma_c c. \end{array} \right. \quad (7d)$$

A função f representa o dano físico no tecido e é da forma

$$f(t) = H(A\pi - t) \text{sen}^2(t)$$

com

$$H(A\pi - t) = \begin{cases} 1 & , \text{ se } t \leq A\pi \\ 0 & , \text{ se } t > A\pi \end{cases}$$

em que A representa a quantia de danos ocorridos no tecido. As condições iniciais do sistema são impostas como $n(0) = a(0) = m(0) = c(0) = 0$.

O diagrama representando os eventos incorporados no modelo (7) está ilustrado na Figura 19. O modelo possui, no máximo, três pontos de equilíbrio, os quais são obtidos igualando o sistema à zero e desconsiderando o parâmetro α , pois para $t > A\pi$ temos que a função $f(t) = 0$. Temos o ponto de equilíbrio trivial $(n, a, m, c, g) = (0, 0, 0, 0, 0)$ correspondente ao estado saudável da pele, e os não triviais dados pelas equações:

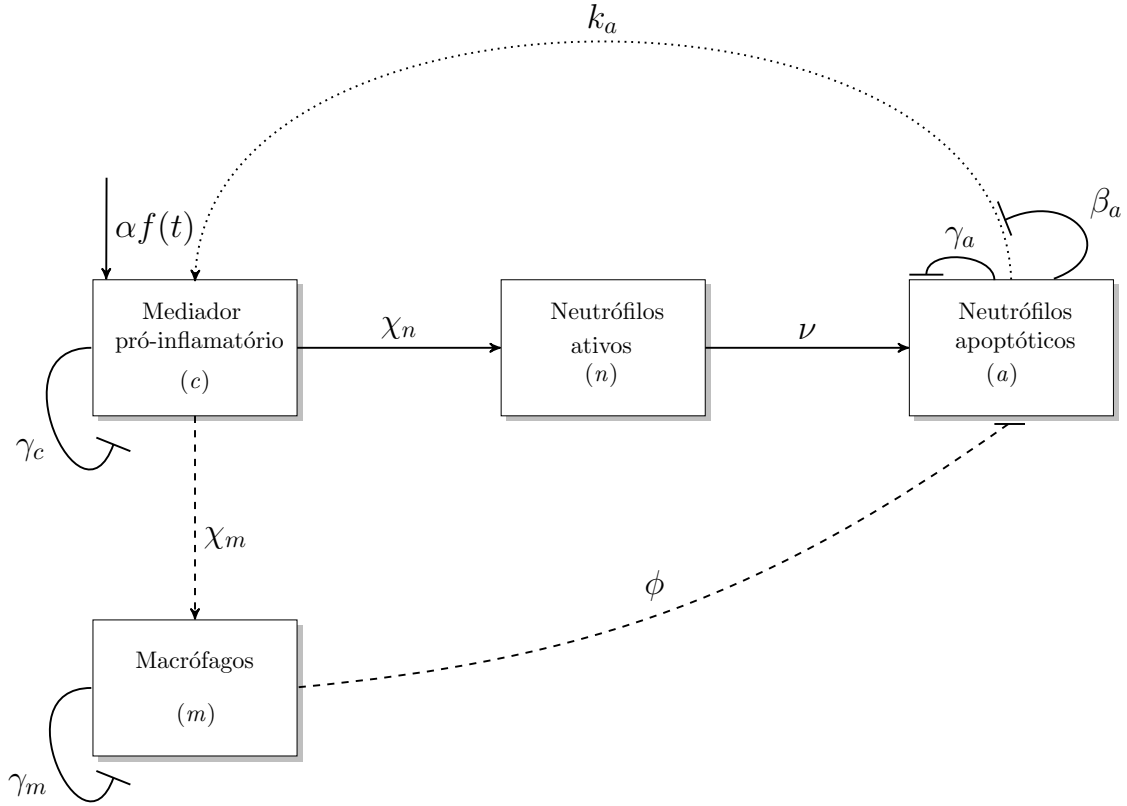


Figura 19: Diagrama representativo do modelo matemático (7). A linha pontilhada representa um *feedback* positivo e a linha tracejada o *feedback* negativo. O *feedback* positivo é baseado na habilidade dos neutrófilos apoptóticos em sintetizar o mediador pró-inflamatório à uma concentração k_a o qual atrai mais neutrófilos para a área lesada. O *feedback* negativo ocorre segundo a fagocitose dos neutrófilos apoptóticos pelos macrófagos a uma taxa ϕ . O impulso inicial do modelo se dá pela função $f(t)$ a uma taxa de concentração inicial de macrófagos. Baseado em Dunster et al. (2014).

$$n^* = \frac{\chi_n}{\nu} c^*, \quad (8a)$$

$$m^* = \frac{\chi_m}{\gamma_m} c^*, \quad (8b)$$

$$c^* = \frac{k_a \gamma_a}{\gamma_c} \frac{a^{*2}}{\beta_a^2 + a^{*2}}, \quad (8c)$$

$$a^* = \frac{1 \pm \sqrt{1 - 4 \left(\frac{\gamma_c}{k_a \chi_m} + \frac{\phi}{\gamma_m} \right) \left(\frac{\gamma_c \beta_a^2}{k_a \chi_m} \right)}}{2 \left(\frac{\gamma_c}{k_a \chi_m} + \frac{\chi}{\gamma_m} \right)} \quad (8d)$$

Tabela 3. Descrição das variáveis para os modelos.

Variáveis		Unidades
t	Tempo	Dia
$n(t)$	População de neutrófilos ativos no tempo t	cel mm ⁻³
$a(t)$	População de neutrófilos apoptóticos no tempo t	cel mm ⁻³
$m(t)$	População de macrófagos no tempo t	cel mm ⁻³
$c(t)$	Mediador pró-inflamatório no tempo t	pg mm ⁻³
$g(t)$	Mediador anti-inflamatório no tempo t	pg mm ⁻³

cel: número de células
pg: picogramas (10⁻¹⁵ kg)

correspondem ao estado não saudável da pele.

Se $\frac{1}{4} < \left(\frac{\gamma_c}{k_a \chi_m} + \frac{\phi}{\gamma_m} \right) \left(\frac{\gamma_c \beta_a^2}{k_a \chi_m} \right)$ temos que o modelo é monoestável (o ponto de equilíbrio trivial é sempre estável, pois todos os autovalores da sua matriz jacobiana são reais e negativos), senão temos dois pontos de equilíbrios adicionais representando a pele não saudável, quando forem positivos. Existe uma região na qual o modelo apresenta bifurcação de Hopf (Dunster et al., 2014; Strogatz, 1994).

Dunster et al. (2014) provaram a estabilidade do modelo (7), em sua forma adimensional, utilizando o critério de Routh-Hurwitz, apresentaram os diagramas de bifurcações e discutiram os efeitos de vários parâmetros-chave que são alvos para intervenção terapêutica e concluíram que a taxa de apoptose de neutrófilos juntamente com a taxa de fagocitose de macrófagos seriam benéficos para a resolução da inflamação (Edelstein-Keshet, 2005). A análise da estabilidade do modelo não será aqui apresentada por não ser objetivo desse estudo. Para pequenos valores de β_a o sistema é biestável e para grandes valores de β_a apenas o ponto de equilíbrio trivial é estável, o que também ocorre para pequenos valores de γ_m .

Dunster et al. (2014) afirmaram que embora o modelo (7) seja analiticamente tratável, ele é incapaz de reproduzir algum comportamento biológico obser-

Tabela 4. Descrição dos parâmetros para os modelos matemáticos. Todos os parâmetros são positivos.

Parâmetros		Unidades
ν	Taxa de apoptose dos neutrófilos	dia ⁻¹
χ_m	Taxa máxima de influxo dos macrófagos	cel pg ⁻¹ dia ⁻¹
χ_n	Taxa máxima de influxo dos neutrófilos	cel pg ⁻¹ dia ⁻¹
ϕ	Taxa de fagocitose	cel ⁻¹ mm ³ dia ⁻¹
α	Taxa de produção inicial do mediador c	pg mm ⁻³ dia ⁻¹
β_n	Taxa de saturação	cel mm ⁻³
β_a	Taxa de saturação	cel mm ⁻³
β_c	Taxa de saturação	pg mm ⁻³
β_g	Taxa de saturação	pg mm ⁻³
β_{gc}	Taxa de saturação	pg mm ⁻³
γ_a	Taxa de necrose secundária	dia ⁻¹
γ_m	Taxa de evasão dos macrófagos	dia ⁻¹
γ_g	Taxa de decaimento do mediador g	dia ⁻¹
γ_c	Taxa de decaimento do mediador c	dia ⁻¹
k_n	Taxa de produção do mediador c pelos neutrófilos	pg mm ⁻³ dia ⁻¹
k_a	Concentração da produção de c	pg mm ⁻³
k_g	Taxa de produção do mediador g	cel ⁻¹ pg
A	Número de vezes que o dano é causado ao tecido no tempo Sistema (26)	dia
k_m	Taxa de produção do mediador c pelos macrófagos	pg mm ⁻³ dia ⁻¹
β_m	Taxa de saturação	cel mm ⁻³

vado (no contexto de resposta inflamatória) necessitando, portanto, de melhoria. O modelo (9) inclui um *feedback* positivo advindo da liberação do fator pró-inflamatório pelos neutrófilos ativos e é dado por:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dn}{dt} = \chi_n c - \nu n, \end{array} \right. \quad (9a)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{da}{dt} = \nu n - \gamma_a a - \phi m a, \end{array} \right. \quad (9b)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dm}{dt} = \chi_m c - \gamma_m m, \end{array} \right. \quad (9c)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dc}{dt} = \alpha f(t) + k_n \left(\frac{n^2}{\beta_n^2 + n^2} \right) + \gamma_a k_a \left(\frac{a^2}{\beta_a^2 + a^2} \right) - \gamma_c c. \end{array} \right. \quad (9d)$$

Fixado os valores dos parâmetros do sistema (7), determinados pela análise da estabilidade, é possível fazer o estudo análogo para determinar a região desejada para k_n e β_n . As condições iniciais são as mesmas do modelo (7).

No modelo (9) dois *feedbacks* positivos ligam os neutrófilos ao mediador pró-inflamatório: através dos neutrófilos apoptóticos ($k_a \gamma_a$) e também dos neutrófilos ativos (k_n) introduzido nesse modelo. Baseado em experimentos biológicos é esperado que a taxa na qual os neutrófilos ativos produzem o mediador pró-inflamatório seja menor do que a taxa de produção pelos neutrófilos apoptóticos, ou seja, $k_n \ll k_a \gamma_a$. Com um *feedback* negativo e dois positivos a taxa de apoptose dos neutrófilos (ν) passa a alterar a dinâmica do sistema, em contraste ao modelo (7).

O próximo modelo matemático inclui a liberação do mediador anti-inflamatório (IL-10) derivado da ação dos macrófagos no processo inflamatório. Pensa-se que o reconhecimento de neutrófilos apoptóticos por macrófagos os reprogramem para liberar sinais anti-inflamatórios, incluindo IL-10 e TGF- β . Considerando que os macrófagos liberam um mediador genérico anti-inflamatório ($g(t)$) com taxa constante k_g quando os macrófagos fagocitam os neutrófilos apoptóticos.

Dunster et al. (2014) assumiram que o mediador anti-inflamatório decai linearmente a uma taxa γ_g e que auxilia na resolução da inflamação, diminuindo a taxa de influxo de neutrófilos (β_{gc} é a escala de concentração na qual a taxa de influxo de neutrófilos diminui) e aumentando a taxa apoptose de neutrófilos. Sabe-se que

a taxa na qual os neutrófilos sofrem apoptose pode ser modificada por estímulos extracelulares, e acredita-se que mediadores anti-inflamatórios aumentem essa taxa. Considerando o mediador pró-inflamatório como um marcador que decresce a taxa de apoptose dos neutrófilos à uma taxa β_c (nível normalizado do mediador pró-inflamatório) e o anti-inflamatório como um que aumenta a taxa de apoptose à uma taxa β_g . Esses efeitos foram incorporados na taxa de apoptose dos neutrófilos ν e o resultado é o modelo:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dn}{dt} = \frac{\chi_n c}{\left(1 + \frac{g}{\beta_{gc}}\right)} - \nu \frac{\left(1 + \frac{g}{\beta_g}\right)}{\left(1 + \frac{c}{\beta_c}\right)} n, \end{array} \right. \quad (10a)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{da}{dt} = \nu n \frac{\left(1 + \frac{g}{\beta_g}\right)}{\left(1 + \frac{c}{\beta_c}\right)} - \gamma_a a - \phi m a, \end{array} \right. \quad (10b)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dm}{dt} = \chi_m c - \gamma_m m, \end{array} \right. \quad (10c)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dc}{dt} = \alpha f(t) + k_n \left(\frac{n^2}{\beta_n^2 + n^2} \right) + \gamma_a k_a \left(\frac{a^2}{\beta_a^2 + a^2} \right) - \gamma_c c, \end{array} \right. \quad (10d)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dg}{dt} = k_g \phi m a - \gamma_g g, \end{array} \right. \quad (10e)$$

sendo que a condição inicial do mediador anti-inflamatório é $g(0) = 0$.

O diagrama representando os eventos incorporados no modelo (10) está ilustrado na Figura 20, enquanto as variáveis e os parâmetros estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

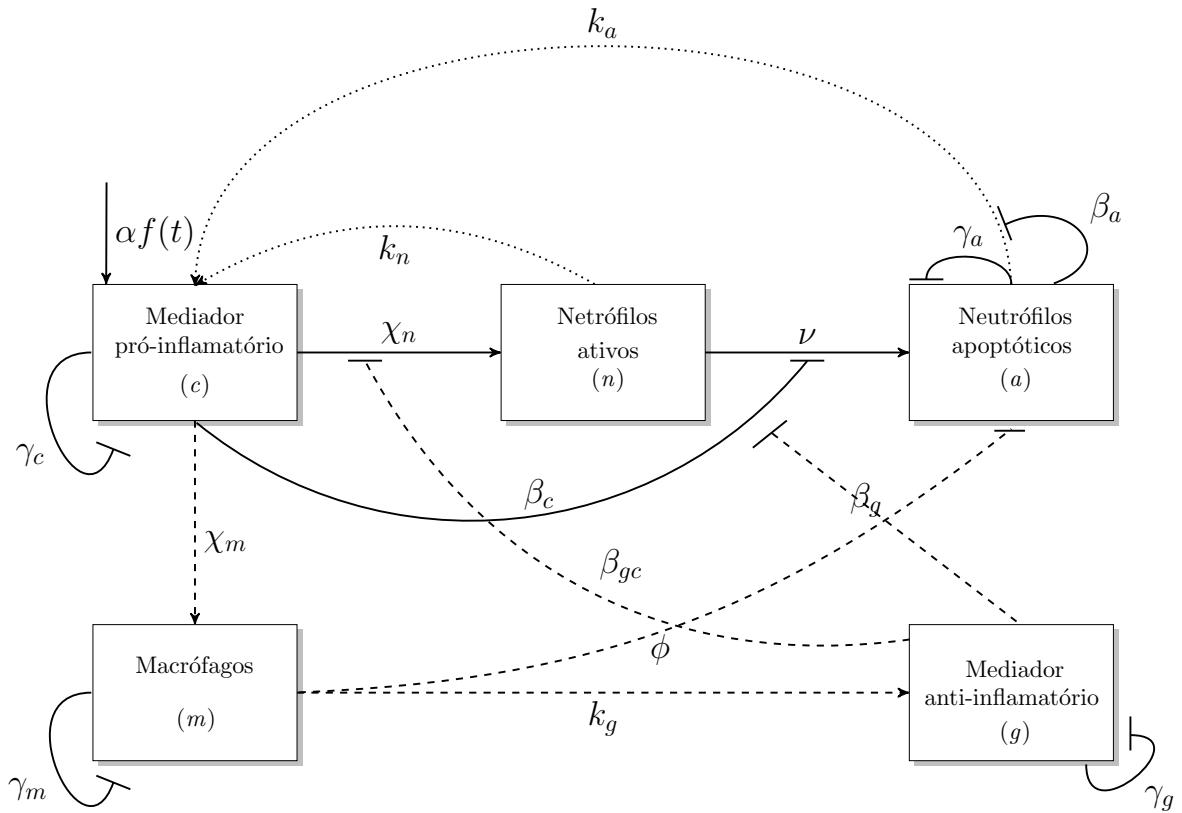


Figura 20: Diagrama representativo do modelo matemático (10). Um *feedback* positivo é adicionado ao modelo considerando a habilidade dos neutrófilos ativos de danificar o tecido e posteriormente liberar mediador pró-inflamatório à uma taxa k_n . Também é incluído a ação de um mediador anti-inflamatório o qual é produzido por macrófagos no processo de fagocitose dos neutrófilos apoptóticos. Baseado em Dunster et al. (2014)

O sistema (10) possui, no máximo, três pontos de equilíbrio, o trivial $(n, a, m, c, g) = (0, 0, 0, 0, 0)$ e os não triviais apresentados a seguir.

Igualando o sistema (10) à zero obtemos, da equação (10c):

$$m^* = \frac{\chi_m}{\gamma_m} c. \quad (11)$$

Das equações (10c) e (10e) temos:

$$g^* = L_1 c a, \quad (12)$$

no qual

$$L_1 = \frac{k_g \phi \chi_m}{\gamma_g \gamma_m}.$$

Substituindo a equação (12) na equação (10a), obtemos:

$$n^* = L_2 \left(\frac{c}{\beta_{gc} + L_1 c a} \right) \left(\frac{\beta_c + c}{\beta_g + L_1 c a} \right), \quad (13)$$

em que

$$L_2 = \frac{\chi_n \beta_g \beta_{gc}}{\nu \beta_c},$$

ou ainda,

$$n^2 = \left[L_2 \left(\frac{c}{\beta_{gc} + L_1 c a} \right) \left(\frac{\beta_c + c}{\beta_g + L_1 c a} \right) \right]^2. \quad (14)$$

Da equação (10e), temos que:

$$\phi m a = \frac{\gamma_m}{k_g} g. \quad (15)$$

Substituindo as equação (12) e (15) na equação (10b) obtemos:

$$a = \frac{L_3 n}{\beta_g (\beta_c + c) (\gamma_a k_g + \gamma_g L_1 c) - L_4 n c}, \quad (16)$$

em que

$$L_3 = \nu \beta_c k_g \beta_g \quad \text{e} \quad L_4 = \nu k_g \beta_c L_1.$$

Para que o segundo membro da equação (16) seja positivo é preciso que

$$\beta_g (\beta_c + c) (\gamma_a k_g + \gamma_g L_1 c) > L_4 n c.$$

Da equação (10d), temos:

$$n^2 = \frac{\beta_n^2 [c \gamma_c (a^2 + \beta_a^2) - k_a \gamma_a a^2]}{k_n (a^2 + \beta_a^2) - [c \gamma_c (a^2 + \beta_a^2) - k_a \gamma_a a^2]}. \quad (17)$$

Igualando as equações (14) e (17), temos:

$$\frac{L_2^2 c^2 (\beta_c + c)^2}{(\beta_{gc} + L_1 c a) (\beta_g + L_1 c a)} = \frac{\beta_n^2 [c \gamma_c (a^2 + \beta_a^2) - k_a \gamma_a a^2]}{k_n (a^2 + \beta_a^2) - [c \gamma_c (a^2 + \beta_a^2) - k_a \gamma_a a^2]}, \quad (18)$$

ou seja,

$$L_2^2 c^2 (\beta_c + c)^2 [(a^2 + \beta_a^2) (k_n - \gamma_c c) + k_a \gamma_a a^2] = \beta_n^2 [a^2 (c \gamma_c - k_a \gamma_a) + c \gamma_c \beta_a^2] (\beta_{gc} + L_1 c a)^2 (\beta_g + L_1 c a)^2.$$

Trabalhando com a equação acima temos

$$L_2^2 c^2 (\beta_c + c)^2 [(k_n - \gamma_c c) (a^2 + \beta_a^2) + k_a \gamma_a a^2] + \beta_n^2 (\beta_{gc} + L_1 c a)^2 (\beta_g + L_1 c a)^2 a^2 (k_a \gamma_a - c \gamma_c) = \beta_n^2 \beta_a^2 c \gamma_c (\beta_{gc} + L_1 c a)^2 (\beta_g + L_1 c a)^2. \quad (19)$$

Para que o segundo membro da equação (18) seja positivo é necessário que o numerador seja positivo, ou seja,

$$c \gamma_c (a^2 + \beta_a^2) > k_a \gamma_a a^2$$

e para que isso ocorra é suficiente que

$$c > \frac{k_a \gamma_a}{\gamma_c}. \quad (20)$$

Caso contrário (se o numerador for negativo o denominador será, mandatoriamente, positivo) o segundo membro será negativo e isso é um absurdo! Além disso, é preciso que o denominador seja positivo e, então,

$$\frac{k_n}{\gamma_c} + \frac{k_a \gamma_a}{\gamma_c} \frac{a^2}{a^2 + \beta_a^2} > c. \quad (21)$$

Dado que $\frac{k_a \gamma_a}{\gamma_c} \frac{a^2}{a^2 + \beta_a^2} < \frac{k_a \gamma_a}{\gamma_c}$ e comparando as desigualdades (20) e (21) temos uma condição de existência do ponto de equilíbrio não trivial

$$\frac{k_a \gamma_a}{\gamma_c} < c < \frac{k_a \gamma_a}{\gamma_c} + \frac{k_n}{\gamma_c}. \quad (22)$$

Substituindo a equação (13) na equação (16) temos:

$$a [\beta_g (\gamma_a k_g + \gamma_g L_1 c) (\beta_{gc} + L_1 c a) (\beta_g + L_1 c a) - L_2 L_4 c^2] = L_2 L_3 c. \quad (23)$$

Para que o primeiro membro da equação acima seja positivo é necessário que

$$\beta_g (\gamma_a k_g + \gamma_g L_1 c) (\beta_{gc} + L_1 c a) (\beta_g + L_1 c a) > \frac{k_g^2 \phi \chi_m \chi_n \beta_{gc} \beta_g}{\gamma_g \gamma_m} c^2, \quad (24)$$

e assim temos a segunda condição para a existência do ponto de equilíbrio não trivial.

Resolvendo o sistema não-linear formado pelas equações (19) e (23) temos as variáveis a e c do ponto de equilíbrio não trivial, enquanto as variáveis m , g e n são dadas pelas equações (11), (12) e (13), respectivamente.

Fixado os valores dos parâmetros do sistema (9) determinados pela análise da estabilidade é possível fazer o estudo análogo para determinar a região desejada para os novos parâmetros: β_c , β_g , β_{gc} , γ_g e k_g . Mas devido a complexidade do modelo, foram realizadas simulações numéricas para determinação dos parâmetros. Como um dos objetivos desse trabalho é determinar o tempo no qual a ferida estará cicatrizada, a busca dos parâmetros se concentrou na estabilidade do ponto de equilíbrio trivial, o qual representa a obtenção de uma pele saudável.

Dunster et al. (2014) realizaram o estudo dos modelos acima na forma adimensional e forneceram valores para os parâmetros resultantes. Na adimensionação do modelo ocorre a redução de cinco parâmetros: χ_m , χ_n , k_a , γ_c e β_{gc} tornando desafiador a obtenção dos mesmos, considerando a ausência de dados biológicos para determiná-los. Baseado nos valores adimensionais fornecidos e nas expressões do

processo de adimensionalização determinamos as expressões:

$$\begin{aligned} \nu &= 0,1\gamma_c, & \chi_m &= 0,2\frac{\gamma_c^2}{\phi k_a}, & k_g &= 0,07\phi, \\ \gamma_a &= \gamma_c, & \gamma_g &= \gamma_c, & \gamma_m &= 0,01\gamma_c, \\ \beta_{gc} &= \frac{k_g k_a \chi_n}{0,05\gamma_c}, & \beta_g &= 0,01\beta_{gc}, & \beta_c &= 0,12k_a, \end{aligned}$$

que serão utilizadas para determinar os valores dos parâmetros com dimensão.

2.3.1 Calibração dos Parâmetros

Os parâmetros do modelo foram determinados, com base na literatura e nos dados biológicos, de acordo com os procedimentos abaixo:

1. Calculado dos dados biológicos: $\alpha = \frac{(IL-6)_1 - (IL-6)_0}{t_1 - t_0}$.
2. De acordo com Dunster et al. (2014), considerando os valores dos parâmetros adimensionais fornecidos e as expressões do processo de adimensionalização: ν , β_g e γ_c .
3. Por meio da análise gráfica e numérica da dinâmica do modelo, estipulamos constantes a serem multiplicadas pelos parâmetros (valores e/ou expressões) fornecidos em Dunster et al. (2014): χ_m , χ_n , k_g , γ_a , γ_g , γ_m , β_c e β_{gc} . Esses parâmetros serão denotados nos resultados com uma barra, ou seja, $\bar{\chi}_m$, $\bar{\chi}_n$, \bar{k}_g , $\bar{\gamma}_a$, $\bar{\gamma}_g$, $\bar{\gamma}_m$, $\bar{\beta}_c$ e $\bar{\beta}_{gc}$.
4. Utilizando os dados biológicos, a equação de Hill (DBEH) e a ferramenta de otimização *fsolve* do Matlab/Octave, para resolução dos sistemas não lineares, obtivemos: k_a , k_n , β_a e β_n . O cálculo foi realizado com base nas equações (2), (3) e (10d) pelo seguinte procedimento:

- (a) para o cálculo de β_a e β_n utilizou-se as equações (10d) e (2). Considerou-se a forma linearizada das expressões $\left(\frac{n^2}{\beta_n^2 + n^2}\right)$ e $\left(\frac{a^2}{\beta_a^2 + a^2}\right)$ o que resulta em

$$\ln\left(\frac{c}{1-c}\right) = \ln n + \ln a - \ln \beta_n - \ln \beta_a, \quad \text{para } 0 < c < 1. \quad (25)$$

Utilizando os dados biológicos do mediador pró-inflamatório c nos dias 3, 7 e 14 e considerando condições iniciais para as variáveis (do sistema não linear resultante) β_n , β_a , n_i e a_i para $i = 1, 2, 3$ obtemos um sistema não linear retangular 3×8 o qual pode ser resolvido com a ferramenta *fsolve*. As condições iniciais de β_n e β_a foram baseadas nos valores fornecidos por Dunster et al. (2014) e os de n_i e a_i para $i = 1, 2, 3$ foram estipulados através de uma proporção dos dados biológicos e dos níveis celulares obtidos no modelo (7). Foram feitos testes para determinar os valores mais apropriados.

- (b) Para o cálculo de k_a e k_n baseamos nas equações (10d) e (3), nas formas originais, utilizamos a expressão como

$$\frac{dc}{dt} = k_n \left(\frac{n^2}{\beta_n^2 + n^2} \right) + \gamma_a k_a \left(\frac{a^2}{\beta_a^2 + a^2} \right).$$

Fixado os valores de β_a , β_n , n_i e a_i , para $i = 1, 2, 3$, encontrados anteriormente, resolve-se o sistema não-linear quadrado utilizando a ferramenta *fsolve*. Para as condições iniciais baseou-se nos valores fornecidos por Dunster et al. (2014).

5. A taxa ϕ na qual os macrofágos fagocitam os neutrófilos foi estipulada em $\phi = 10^{-3} \text{ cel}^{-1} \text{ mm}^3 \text{ dia}^{-1}$ e a taxa de decaimento do mediador pró-inflamatório $\gamma_c = 3,0 \text{ dia}^{-1}$ (considerando a meia vida do mediador pró-inflamatório, estipulou-se a escala de tempo como $\frac{1}{\gamma_c} \sim 8\text{h}$) (Dunster et al., 2014).

2.3.2 Resultados e Discussão

A inflamação pode ter um de dois resultados distintos: resolução ou inflamação crônica. A resolução é bem-sucedida se neutrófilos e macrófagos deixam o tecido, os mediadores inflamatórios diminuem e as fases subsequentes de cicatrização são alcançadas. Por outro lado, a inflamação crônica é iniciada se os glóbulos brancos permanecerem dentro do tecido, causando mais danos ao tecido (Dunster et al.,

2014). Os resultados apresentados ilustram apenas a situação na qual ocorre a resolução da inflamação, pois nosso objetivo é determinar o tempo necessário para cicatrização das feridas após a aplicação dos tratamentos.

Os autovalores da matriz jacobiana, associada ao sistema não linear (10), para o ponto de equilíbrio trivial são

$$\lambda_1 = -\gamma_c, \lambda_2 = -\nu, \lambda_3 = -\gamma_a, \lambda_4 = -\gamma_m \quad \text{e} \quad \lambda_5 = -\gamma_g.$$

Analisando os valores das Tabelas 5 e 6 temos que o coeficiente de rigidez, equação (6), é dado por $cr = \frac{|\gamma_g|}{|\gamma_m|}$ e assume os valores mínimo de 185,7 (10% OR e 10% EH) e máximo de 473,35 (Colagenase).

O modelo (10), dimensional, foi resolvido numericamente utilizando pacotes de *softwares* matemáticos (Matlab/Octave) para resolução de problemas rígidos (*stiff*). Para obtenção dos parâmetros consideramos ajuste não linear (ferramenta *lsqnonlin*) dadas as condições iniciais descritas na Seção 2.3.1. Os valores dos parâmetros, resultantes, estão apresentados nas Tabelas 5 e 6 e as Figuras 21 - 24 ilustram a dinâmica obtida pelo modelo (10), em resposta a um dano ($A = 1$), para os quatro tratamentos: 10% OR, 10% EH, CL e Colagenase, respectivamente. As expressões utilizadas para calcular os parâmetros, Tabela 5, foram as mesmas para 10% OR e 10% EH com exceção de χ_m .

O modelo (10) reproduziu a dinâmica celular da cicatrização de feridas na pele sugerindo níveis da celularidade dos macrófagos e dos neutrófilos, apresentados na Tabela 7, compatíveis com os valores da celularidade total obtida em laboratório. A curva do mediador pró-inflamatório ajustou com precisão o nível máximo de IL-6 ocorrido no dia 7 para os tratamentos 10% OR e 10% EH como ilustrado nas Figuras 21 e 22, respectivamente. O critério de cicatrização está ilustrado, em todas as figuras, pela linha vermelha pontilhada. Podemos observar, na Figura 23, que houve um atraso no pico do mediador pró-inflamatório e também ocorreu uma oscilação na curva solução, no dia $t = A\pi$, que não condiz com a realidade dos dados experimentais. Nota-se que ocorreu uma oscilação semelhante para o tratamento Colagenase, como ilustrado na Figura 24. Para os tratamentos CL e Colagenase

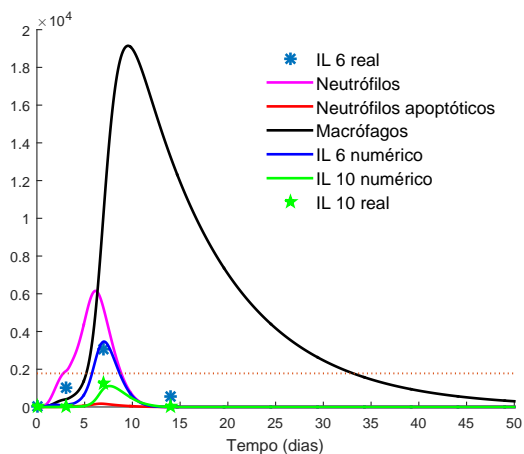


Figura 21: Ilustração da dinâmica do 10% OR, para o modelo 10. Tempo de cicatrização da ferida: 31,4 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando de forma descendente a linha pontilhada, a qual corresponde a 30% da celularidade total.

o nível máximo de IL-6 ocorreu no dia 3 e a aproximação do modelo não foi tão eficiente quanto a dos tratamentos a base de copaíba.

O nível máximo de macrófagos e de neutrófilos obtidos numericamente pelo modelo sugere que estes correspondem a 60% da celularidade total e estipulou-se que a ferida estaria cicatrizada quando a densidade celular numérica atingisse 50% da celularidade total da pele saudável (Kolter et al., 2019; Issekutz & Movat, 1979). Como as únicas células consideradas no modelo são macrófagos e neutrófilos, temos que a ferida cicatriza à 30% da celularidade total da pele saudável. Os tempos de cicatrização das feridas, para os quatro tratamentos, estão apresentados na Tabela 7.

Analisando os valores dos parâmetros na Tabela 5, temos que os coeficientes de influxo dos macrófagos e dos neutrófilos, χ_m e χ_n , são maiores no tratamento 10% EH do que no 10% OR (corroborado com os dados *in vivo*) e pela Tabela 7 temos

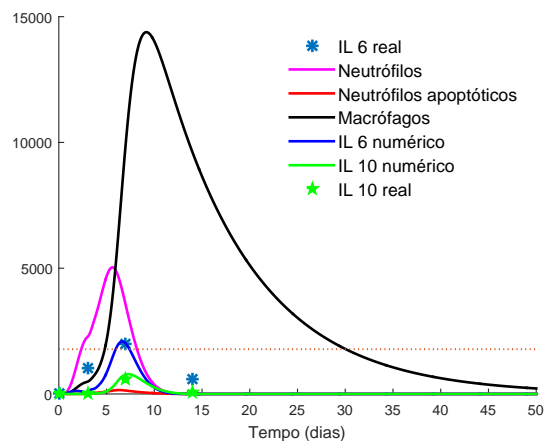


Figura 22: Ilustração da dinâmica do 10% EH, para o modelo 10. Tempo de cicatrização da ferida: 28,4 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando de forma descendente a linha pontilhada, a qual corresponde a 30% da celularidade total.

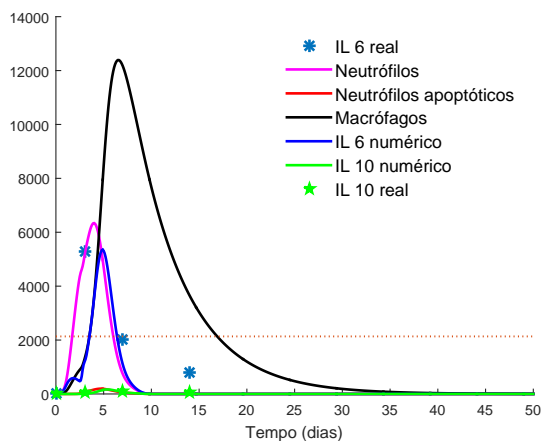


Figura 23: Ilustração da dinâmica do CL, para o modelo 10. Tempo de cicatrização da ferida: 16,9 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando de forma descendente a linha pontilhada, a qual corresponde a 30% da celularidade total.

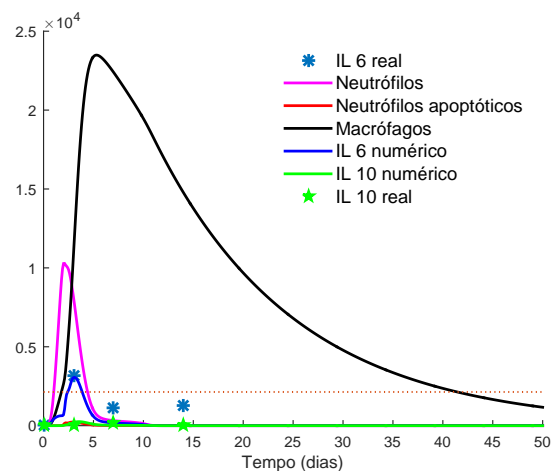


Figura 24: Ilustração da dinâmica da Colagenase, para o modelo 10. Tempo de cicatrização da ferida: 41,5 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando de forma descendente a linha pontilhada, a qual corresponde a 30% da celularidade total.

que a concentração dos macrófagos e dos neutrófilos é menor no tratamento 10% EH do que no 10% OR levando à resolução mais eficaz do processo inflamatório e, consequentemente, obtendo a cicatrização da ferida em um tempo menor. Esse processo pode estar diretamente ligado à concentração inicial de IL-6, α , que nos primeiros 3 dias é maior no tratamento 10% EH (quando comparado ao 10% OR) e menor ao longo da resolução do processo inflamatório.

Considerando, ainda a concentração obtida das células vemos a conformidade com os coeficientes de concentração de produção do mediador pró-inflamatório pelos neutrófilos ativos e apoptóticos, k_n e k_a respectivamente, pois estes são maiores no tratamento 10% OR do que no 10% EH. Com base nessa análise podemos concluir que a cicatrização no tratamento 10% EH foi mais eficiente do que no 10% OR, fato que está em conformidade com os dados laboratoriais de retração das feridas.

Tabela 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.

Parâmetros	10% OR	10% EH	Expressão
χ_m	2,2698	2,6765	10% OR: $3\bar{\chi}_m$ 10% EH: $2,4\bar{\chi}_m$
χ_n	9,8734	11,6426	$4,35\chi_m$
ν	0,3	0,3	Dunster et al. (2014)
ϕ	10^{-3}	10^{-3}	Dunster et al. (2014)
α	332,0	342,9877	$\frac{IL6_1 - IL6_0}{t_1 - t_0}$
γ_a	9,0	9,0	$\gamma_a = 3\bar{\gamma}_a$
γ_m	0,1050	0,1050	$3,5\bar{\gamma}_m$
γ_c	3,0	3,0	Dunster et al. (2014)
γ_g	19,50	19,50	$6,5\bar{\gamma}_g$
k_g	11,20	11,20	$0,16\bar{k}_g$
k_a	2379,1080	1614,070	DBEH
k_n	60,4759	57,220	DBEH
β_a	172,1065	173,43	DBEH
β_n	172,1065	173,430	DBEH
β_c	2,8549	1,9369	$10^{-2} \times \bar{\beta}_c$
β_g	0,3898	0,3118	Dunster et al. (2014)
β_{gc}	38,9760	31,1808	$\bar{\beta}_{gc}/4,5 \times 10^4$

DBEH: Dados biológicos e equação de Hill; $\bar{\chi}_m = 0,2 \frac{\gamma_c^2}{\phi k_a}$, $IL6_1$ e $IL6_0$ são os valores *in vivo* da interleucina 6 nos dias 3 e zero, respectivamente.

Temos que os coeficientes χ_m e χ_n dos tratamentos a base de copaíba são maiores do que os do CL e menores do que os da Colagenase; os coeficientes k_n e k_a dos tratamentos a base de copaíba são menores do que os dos tratamentos

Tabela 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.

Parâmetros	CL	Colagenase	Expressão	Expressão
			CL	Colagenase
χ_m	1,2459	3,9999	$1,375\bar{\chi}_m$	$2,2272\bar{\chi}_m$
χ_n	5,4199	17,3997	$4,35\bar{\chi}_n$	
ν	0,530	0,5	Dunster et al. (2014)	$\frac{10}{101}\bar{\nu}$
ϕ	10^{-3}	10^{-3}	Dunster et al. (2014)	
α	1756,3735	1756,3735	$\frac{IL6_1 - IL6_0}{t_1 - t_0}$	
γ_a	15,90	15,150	$3\bar{\gamma}_a$	
γ_m	0,1855	0,0705	$3,5\bar{\gamma}_m$	$\frac{349}{250}\bar{\gamma}_m$
γ_c	5,30	5,050	$\frac{53}{30}\bar{\gamma}_c$	$\frac{101}{60}\bar{\gamma}_c$
γ_g	34,7150	33,5825	$6,55\bar{\gamma}_g$	
k_g	3,40	2,8250	$\frac{17}{350}\bar{k}_g$	$\frac{117}{2800}\bar{k}_g$
k_a	6199,8794	2840,0	DBEH	
k_n	1482,00	1482,0	DBEH	
β_a	315,4379	315,4379	DBEH	
β_n	315,4379	315,4379	DBEH	
β_c	6,7635	3,0982	$\bar{\beta}_c/110$	
β_g	0,1078	0,1425	Dunster et al. (2014)	
β_{gc}	10,7783	4,6993	$2,50002 \times 10^{-5}\bar{\beta}_{gc}$	$3,0322\bar{\beta}_{gc}$

CL e Colagenase sugerindo que a faixa de valores encontrados para o 10% OR e 10% EH são mais apropriados para a predição do tempo de cicatrização, pois os resultados obtidos nos tratamentos CL e Colagenase não estão em acordo com os dados biológicos.

Tabela 7. Resultados dos níveis celulares e os respectivos tempos do modelo (10).

Tratamentos	Nível máximo macrófagos	Tempo (dias)	Nível máximo neutrófilos	Tempo (dias)	Tempo de cicatrização 30%
10% OR	19143,53	9,6	6153,77	6,2	31,4
10% EH	14383,57	9,3	5035,47	5,7	28,4
CL	12389,89	6,6	6339,85	4,1	16,9
Colagenase	23486,20	5,4	10283,71	2,2	41,5

Temos que o nível máximo dos neutrófilos ocorre antes do nível máximo dos macrófagos e ambos ocorrem antes do dia 10 de experimentação, para os quatro tratamentos, e essas duas constatações estão em conformidade com a literatura (Witte & Barbul, 1997).

Nos quatro tratamentos temos que os macrófagos removem os neutrófilos apoptóticos levando as células a retornarem ao estado basal da pele, o mediador pró-inflamatório diminui e o sistema retorna ao estado estável saudável, o que evidencia que o modelo conseguiu simular a resolução da inflamação. No entanto, podemos observar que o tempo de cicatrização das feridas, nos quatro tratamentos, não é compatível com o determinado em laboratório (seção 1.5) sugerindo que o modelo precisa de aprimoramento.

De acordo com Dunster et al. (2014) os macrófagos são conhecidos por terem resposta heterogênea para diferentes mediadores, ou seja, eles podem desempenhar tanto o papel anti-inflamatório quanto o pró-inflamatório em resposta ao processo inflamatório. Para que o modelo matemático (10) represente melhor a realidade biológica podemos incorporar a influência dos macrófagos na produção do mediador pró-inflamatório, o que faremos no próximo modelo.

2.4 Modelo Matemático da Fase Inflamatória

Considerando que os macrófagos liberam, ao longo do processo de fagocitose, mediadores pró-inflamatórios, introduzimos no modelo (10) um *feedback* positivo adicional na equação do mediador pró-inflamatório. Inserimos um parâmetro ω , no modelo, com o objetivo de retirar/reduzir a oscilação obtida na curva resultado do mediador pró-inflamatório entre os dias 3 e 7 por meio da modificação do período da função $\sin^2(t)$ e assim reescrevemos o modelo como:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dn}{dt} = \frac{\chi_n c}{\left(1 + \frac{g}{\beta_{gc}}\right)} - \nu \frac{\left(1 + \frac{g}{\beta_g}\right)}{\left(1 + \frac{c}{\beta_c}\right)} n, \end{array} \right. \quad (26a)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{da}{dt} = \nu n \frac{\left(1 + \frac{g}{\beta_g}\right)}{\left(1 + \frac{c}{\beta_c}\right)} - \gamma_a a - \phi m a, \end{array} \right. \quad (26b)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dm}{dt} = \chi_m c - \gamma_m m, \end{array} \right. \quad (26c)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dc}{dt} = \alpha F(t) + k_n \left(\frac{n^2}{\beta_n^2 + n^2}\right) + \gamma_a k_a \left(\frac{a^2}{\beta_a^2 + a^2}\right) - \gamma_c c + k_m \left(\frac{m^2}{\beta_m^2 + m^2}\right), \end{array} \right. \quad (26d)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dg}{dt} = k_g \phi m a - \gamma_g g, \end{array} \right. \quad (26e)$$

sendo $F(t) = H(A\pi - \omega t) \sin^2(\omega t)$ e ω o período. Considerou-se $\frac{\pi}{7} \cong 0,45$ como condição inicial para a calibração de ω .

As expressões dos pontos de equilíbrio não triviais do modelo (26) são as mesmas do modelo (10) com exceção da equação (19) a qual se torna:

$$\frac{L_2^2 c (\beta_c + c)}{(\beta_{gc} + L_1 c a) (\beta_g + L_1 c a)} = \frac{\beta_n^2}{k_n \gamma_c} \left(\frac{PF1}{PF2} \right), \quad (27)$$

com

$$PF1 = c (\beta_a^2 + a^2) (\beta_m^2 + m^2) - (k_a \gamma_a \gamma_c a^2 (\beta_m^2 + m^2) + k_m \gamma_c m^2 (\beta_a^2 + a^2)),$$

$$PF2 = (\beta_a^2 + a^2) (\beta_m^2 + m^2) (k_n \gamma_c - c) + (k_a \gamma_a \gamma_c a^2 (\beta_m^2 + m^2) + k_m \gamma_c m^2 (\beta_a^2 + a^2))$$

e $m = \frac{\chi_m}{\gamma_m} c$. Assim, os pontos de equilíbrio não triviais são dados pelas equações (11), (12), (13), (23) e (27).

Os autovalores da matriz jacobiana, associada ao sistema não linear (26), para o ponto de equilíbrio trivial são

$$\lambda_1 = -\gamma_c, \lambda_2 = -\nu, \lambda_3 = -\gamma_a, \lambda_4 = -\gamma_m \quad \text{e} \quad \lambda_5 = -\gamma_g,$$

os mesmos do modelo (10). Os valores dos parâmetros, resultantes, estão apresentados nas Tabelas 8 e 9 e as Figuras 25 - 28 ilustram a dinâmica obtida pelo modelo (26), em resposta a um dano ($A = 1$), para os quatro tratamentos: 10% OR, 10% EH, CL e Colagenase, respectivamente.

Analisando os valores das Tabelas 8 e 9 temos que o coeficiente de rigidez, equação (6), é dado por $cr = \frac{|\gamma_g|}{|\gamma_m|}$ com os valores mínimo de 39,97 (10% OR) e máximo de 110,19 (CL). Observamos a redução no coeficiente de rigidez, o que implica o modelo (26) ter um grau de rigidez menor do que o modelo (10), tornando mais fácil a resolução numérica do mesmo.

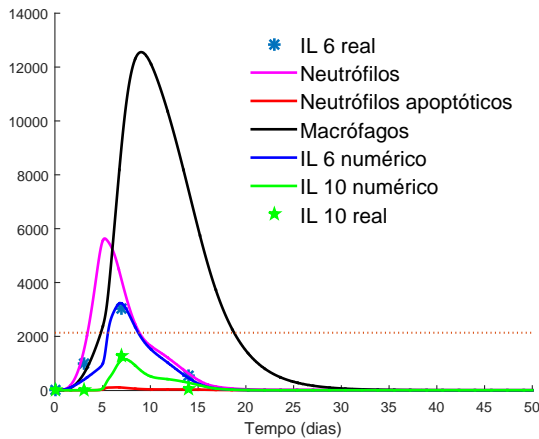


Figura 25: Ilustração da dinâmica do tratamento 10% OR, para o modelo 26. Tempo de cicatrização da ferida: 18,9 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando a linha pontilhada de forma descendente, a qual corresponde a 30% da celularidade total.

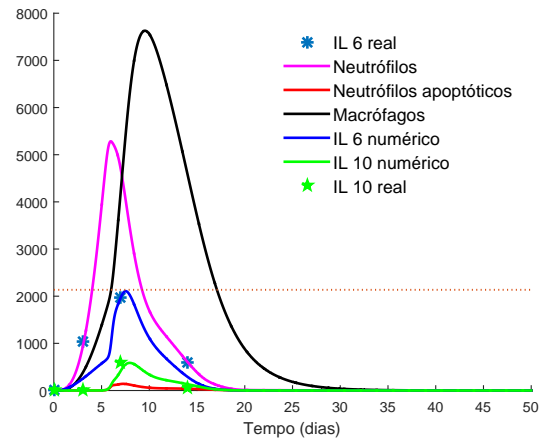


Figura 26: Ilustração da dinâmica do tratamento 10% EH, para o modelo 26. Tempo de cicatrização da ferida: 17,3 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando a linha pontilhada de forma descendente, a qual corresponde a 30% da celularidade total.

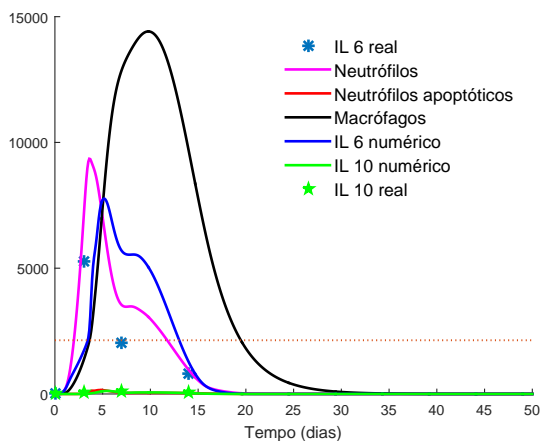


Figura 27: Ilustração da dinâmica do CL, para o modelo 26. Tempo de cicatrização da ferida: 19,5 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando a linha pontilhada de forma descendente, a qual corresponde a 30% da celularidade total.

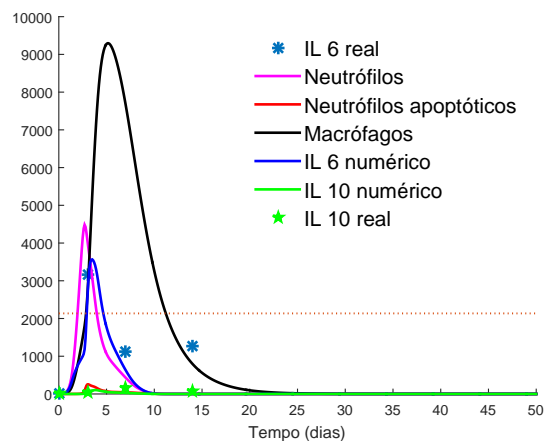


Figura 28: Ilustração da dinâmica da Colagenase, para o modelo 26. Tempo de cicatrização da ferida: 11,3 dias, quando a celularidade total retorna ao estado basal, ultrapassando a linha pontilhada de forma descendente, a qual corresponde a 30% da celularidade total.

Da Tabela 8 temos que os coeficientes χ_m e χ_n são menores no tratamento 10% EH do que no 10% OR e também são menores os respectivos níveis celulares obtidos no modelo (10). O tempo de cicatrização obtido pelo tratamento 10% EH foi, novamente, menor do que no 10% OR o que confirma a eficiência do tratamento. Podemos observar que os coeficientes χ_m e χ_n , nos quatro tratamentos, estão mais próximos aos obtidos nos tratamentos a base de copaíba do que da Colagenase e do CL, o que produziu melhores resultados indicando a adequação dos tratamentos à base de copaíba à fase inflamatória. O mesmo observado nos parâmetros k_n e k_a no modelo (10) se verifica nesse último modelo.

Consideramos, novamente, que a ferida cicatriza à 30% da celularidade total da pele saudável. Os tempos de cicatrização das feridas do modelo (26), para os quatro tratamentos, estão apresentados na Tabela 10.

Considera-se que esse resultado é melhor do que o obtido no modelo

Tabela 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.

Parâmetros	10% OR	10% EH	Expressão 10% OR	Expressão 10% EH
χ_m	2,0201	1,8735	$0,89\hat{\chi}_m$	$0,7\hat{\chi}_m$
χ_n	3,9392	3,7470	$1,95\chi_m$	$2,0\chi_m$
ν	0,3	0,3	$\hat{\nu}$	$\hat{\nu}$
ϕ	10^{-3}	10^{-3}	$\hat{\phi}$	$\hat{\phi}$
α	4150,0	3772,87	$12,5\hat{\alpha}$	$11\hat{\alpha}$
γ_a	9,0	9,0	$\hat{\gamma}_a$	$\hat{\gamma}_a$
γ_m	0,315	0,315	$3\hat{\gamma}_m$	$3\hat{\gamma}_m$
γ_c	3,0	4,5	$\hat{\gamma}_c$	$1,5\hat{\gamma}_c$
γ_g	11,9925	19,5	$0,615\hat{\gamma}_g$	$\hat{\gamma}_c$
k_g	15,008	14,56	$1,34\hat{k}_g$	$1,3\hat{k}_g$
k_a	2379,108	1614,07	\hat{k}_a	\hat{k}_a
k_n	60,4759	57,22	\hat{k}_n	\hat{k}_n
β_a	172,1065	173,43	$\hat{\beta}_a$	$\hat{\beta}_a$
β_n	172,1065	173,43	$\hat{\beta}_n$	$\hat{\beta}_n$
β_c	2,8549	1,9369	$\hat{\beta}_c$	$\hat{\beta}_c$
β_g	0,6821	0,3118	$1,75\hat{\beta}_g$	$\hat{\beta}_g$
β_{gc}	38,9759	46,7712	$\hat{\beta}_{gc}$	$1,5\hat{\beta}_{gc}$
k_m	2,7198	1,6141	$\left(10^{-3}\hat{k}_a\right)^{\#}$	$\left(10^{-3}\hat{k}_a\right)^{\#}$
β_m	159,77	173,43	$\left(\hat{\beta}_a\right)^{\#}$	$\left(\hat{\beta}_a\right)^{\#}$
ω	0,2	0,2	—	—

$(\cdot)^{\#}$: expressões das condições iniciais dos parâmetros para o ajuste não linear.

$(\hat{\cdot})$: são os parâmetros do modelo (10).

(10), pois os valores numéricos do mediador pró-inflamatório (IL-6) aproximaram melhor os dados dos experimentos biológicos nos dias 3 e 14 (Figuras 25, 26 compa-

radas com as Figuras 21 e 22, respectivamente), assim como o tempo de cicatrização da ferida, no entanto, ainda não foi capaz de reproduzi-lo com exatidão. Os tempos obtidos para os tratamentos a base de copaíba foram os mais próximos ao esperado,

Tabela 9: Parâmetros do modelo (26) para os tratamentos CL e Colagenase. Apresentamos os valores dos parâmetros e as respectivas expressões de proporção desses valores quando comparados aos obtidos no modelo 10.

Parâmetros	CL	Colagenase	Expressão CL	Expressão Colagenase
χ_m	0,9	2,0	$0,7224\hat{\chi}_m$	$0,5\hat{\chi}_m$
χ_n	3,9152	5,0	$4,35\chi_m$	$2,5\chi_m$
ν	0,4293	1,7	$\hat{\nu}$	$3,4\hat{\nu}$
ϕ	10^{-3}	10^{-3}	$\hat{\phi}$	$\hat{\phi}$
α	21954,67	3512,75	$12,5 \hat{\alpha}$	$2 \hat{\alpha}$
γ_a	15,9	9,0	$\hat{\gamma}_a$	$0,5941 \hat{\gamma}_a$
γ_m	0,315	0,3525	$1,698 \hat{\gamma}_m$	$5 \hat{\gamma}_m$
γ_c	4.4785	3.6	$0,845\hat{\gamma}_c$	$0,7128 \hat{\gamma}_c$
γ_g	34,715	33,5825	$\hat{\gamma}_g$	$\hat{\gamma}_g$
k_g	3,4	2,825	\hat{k}_g	\hat{k}_g
k_a	6199,8794	2840,0	\hat{k}_a	\hat{k}_a
k_n	1482,0	1482,0	\hat{k}_n	\hat{k}_n
β_a	315,4379	315,4379	$\hat{\beta}_a$	$\hat{\beta}_a$
β_n	315,4379	315,4379	$\hat{\beta}_n$	$\hat{\beta}_n$
β_c	7,4993	3,0982	$1,1088\hat{\beta}_c$	$\hat{\beta}_c$
β_g	0,09001	0,1425	$0,8351 \hat{\beta}_g$	$\hat{\beta}_g$
β_{gc}	3,0007	4,6993	$0,2784 \hat{\beta}_{gc}$	$\hat{\beta}_{gc}$
k_m	0,1482	0,1482	$10^{-4}\hat{k}_n$	$10^{-4}\hat{k}_n$
β_m	315,4379	315,4379	$\hat{\beta}_a$	$\hat{\beta}_a$
ω	0,2	0,4	—	—

($\hat{\cdot}$): são os parâmetros do modelo (10).

Tabela 10. Resultados dos níveis celulares e os respectivos tempos do modelo (26).

Tratamentos	Nível máximo macrofágos	Tempo (dias)	Nível máximo neutrófilos	Tempo (dias)	Tempo de cicatrização
10% OR	12554,97	9,1	5634,19	5,2	18,9
10% EH	7628,42	9,5	5283,01	5,9	17,3
CL	14469,71	9,9	9302,21	3,7	19,5
Colagenase	9295,13	5,3	4482,99	2,8	11,3

sugerindo a melhor adaptação do modelo a esse tipo de antígenos.

A inserção dos novos termos propiciou o aumento no intervalo de busca dos parâmetros, até mesmo os das outras equações, entretanto a inserção de ω não foi capaz de retirar a oscilação das curvas antes do dia 7, principalmente para os tratamentos CL e colagenase, conforme está ilustrado nas Figuras 27 e 28, respectivamente. O tempo de cicatrização obtido pelo modelo para o tratamento CL é considerado coerente com os dados experimentais, no entanto para a colagenase o tempo obtido é incompatível com o observado em laboratório.

As expressões denotadas por $(\cdot)^{\#}$, na Tabela 8 foram consideradas como condições iniciais dos parâmetros para o ajuste não linear. Para o resultado final não foi possível obter uma relação que aproximasse os valores.

Os modelos (10) e (26) empregados nesse estudo permitiram determinar alguns pontos de ações de interleucinas pró e anti-inflamatória durante o processo cicatricial de feridas de pele, dados compatíveis com os obtidos *in vivo*, sendo que as aproximações do modelo (26) foram mais precisas.

Modelos experimentais de cicatrização têm revelado que a resposta inflamatória é caracterizada por alterações na localização espacial de várias células brancas (Dunster et al., 2014) e para capturar essa resposta quimiotática dos neutrófilos e dos macrófagos e a difusão dos mediadores químicos, no nosso modelo, propomos seu aprimoramento considerando a inserção do termo de reação-difusão.

No próximo capítulo apresentamos dois modelos e propomos um novo modelo para cicatrização de feridas na pele:

- o primeiro modelo, possui uma equação, e baseado na equação de Fisher-Kolmogorov e se encontra em Murray (2000b) e Sherratt & Murray (1990);
- o segundo modelo, é um sistema de duas equações, e baseado nas equações de reação-difusão se encontra em Murray (2000b) e Sherratt & Murray (1990);
- o terceiro modelo, é composto por cinco equações, e é a extensão do modelo homogêneo (26) por meio da inserção dos termos difusivos.

3 MODELAGEM MATEMÁTICA DA DIFUSÃO CELULAR

Após a injúria não há imediato aumento na taxa de geração de células acima da taxa normal mitótica encontrada na epiderme, a migração epidermal é essencialmente o espalhamento das células existentes. Logo após o início da migração epidermal a atividade mitótica, da nova epiderme, cresce na borda da ferida podendo chegar a 15 vezes a taxa normal da epiderme o que provoca o fechamento da ferida. Vários fatores têm sido propostos para o estímulo do crescimento da mitose inclusive a presença de um fator ativador ou a ausência de um inibidor (Sherratt & Murray, 1990).

Num estudo pioneiro, Sherratt & Murray (1990) modelaram a cicatrização de feridas na pele usando a equação de Fisher-Kolmogorov. Neste capítulo revemos tal modelo, propomos um modelo de EDP, baseado no modelo (26), da dinâmica temporal das populações de células envolvidas no processo, e na equação de reação-difusão, visualização da dinâmica temporal e espacial da epiderme, e apresentamos resultados obtidos por simulações numéricas aplicadas aos tratamentos apresentados na Seção 1.5.

3.1 Equação de Fisher-Kolmogorov

Na cicatrização epidérmica o fechamento da ferida é inteiramente devido à migração epidermal, proporcionando a oportunidade de estudar esse processo

independente da contração da ferida (Sherratt & Murray, 1990).

O modelo matemático proposto considera constante os efeitos bioquímicos. A epiderme possui uma espessura suficientemente fina para supor que o problema seja bidimensional, consideramos uma ferida circular radialmente simétrica. Logo consideramos que o modelo depende apenas de uma dimensão espacial. Na ferida as células têm preferência de direção, ou seja, o processo de cicatrização evolui da borda da ferida em direção ao centro. Considerando $N(x, t)$ a densidade celular por unidade de área, ao longo do raio da ferida, $x \in \mathbb{R}$, no tempo, t , D o coeficiente de difusão, p uma constante positiva, N_0 a densidade celular da pele saudável e s uma constante positiva relacionada à taxa mitótica máxima, Sherratt & Murray (1990) propuseram o seguinte modelo para a cicatrização de feridas epidérmicas:

$$\frac{\partial N}{\partial t} = D \nabla \cdot \left[\left(\frac{N}{N_0} \right)^p \nabla N \right] + s N \left(1 - \frac{N}{N_0} \right). \quad (28)$$

O primeiro membro da equação, $\frac{\partial N}{\partial t}$, representa a taxa de variação da densidade celular N . Os termos no segundo membro da equação (28) são, respectivamente, migração celular, sendo $\nabla \cdot$ o divergente, e geração mitótica das células dentro da ferida, sendo que a geração mitótica das células segue o crescimento logístico, que assegura o crescimento celular até o limite de suporte do tecido epitelial N_0 .

A equação (28), adimensionalizada, se torna independente de s e de N_0 e pode ser escrita na forma (Sherratt & Murray, 1990):

$$\frac{\partial N}{\partial t} = D \nabla \cdot [N^p \nabla N] + N(1 - N). \quad (29)$$

Temos a condição inicial $N(x, 0) = 0$ no intervalo $x \in [0, 1)$ e nas de fronteiras da direita e da esquerda temos a condição de Dirichlet $N(1, t) = 1$ e de Neumann $N_x(0, t) = 0$, respectivamente. A região considerada está ilustrada na Figura 29 e a seta aponta o sentido da propagação.

A equação de Fisher-Kolmogorov foi avaliada em duas situações $p = 0$ (linear) e $p = 4$ (não linear) (Sherratt & Murray, 1990).

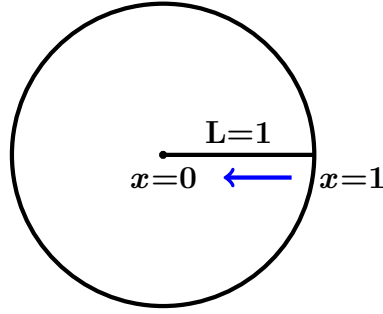


Figura 29: Diagrama representativo do domínio das EDP ilustrando o sentido da propagação.

3.1.1 Solução Numérica

Usando o método das diferenças finitas avançadas de primeira ordem para discretização no tempo, temos:

$$\frac{\partial N}{\partial t} \approx \frac{N_i^{j+1} - N_i^j}{\Delta t} \quad (30)$$

e centrada de segunda ordem para discretização no espaço temos:

$$\frac{\partial^2 N}{\partial x^2} \approx \frac{N_{i-1}^j - 2N_i^j + N_{i+1}^j}{\Delta x^2}. \quad (31)$$

Logo, a equação (29) é reescrita como:

$$N_i^{j+1} = N_i^j + \frac{D \Delta t}{\Delta x^2} (N_{i-1}^j - 2N_i^j + N_{i+1}^j) + \Delta t N_i^j (1 - N_i^j) \quad (32)$$

para o caso linear, e

$$N_i^{j+1} = N_i^j + \frac{D \Delta t}{\Delta x} \left[\left(N^p \frac{\partial N}{\partial x} \right)_{i+\frac{1}{2}}^j - \left(N^p \frac{\partial N}{\partial x} \right)_{i-\frac{1}{2}}^j \right] + \Delta t N_i^j (1 - N_i^j) \quad (33)$$

para o caso não linear, com $i = 0, 1, \dots, M_x$, $j = 0, 1, \dots, M_y$, $\Delta x = \frac{1}{M_x}$ o tamanho do passo no espaço e $\Delta t = \frac{1}{M_y}$ o espaçamento no tempo (Kreger, 2015; Cuminato & Meneguette Júnior, 2013; Burden & Faires, 2008). Os pontos médios dos intervalos espaciais, indexados por $i + \frac{1}{2}$, são calculados como a média dos valores da função nos pontos i e $i + 1$ da seguinte forma:

$$N_{i+\frac{1}{2}}^j = \frac{N_i^j + N_{i+1}^j}{2}.$$

A condição CFL, $\Delta t \leq \frac{(\Delta x)^2}{2D}$, é necessária para a convergência do método de diferenças finitas (Cuminato & Meneguette Júnior, 2013). Considerou-se que ocorre a cicatrização no interior da ferida quando a densidade celular alcança 0,8 (80%) da celularidade da pele saudável (Sherratt & Murray, 1990). O critério de cicatrização está ilustrado, nas figuras obtidas pelas simulações numéricas, pela linha preta pontilhada e a evolução das curvas, nas figuras, ocorre da direita para esquerda, pois a ferida cicatriza da borda para o centro. Os resultados obtidos por Sherratt & Murray (1990) estão apresentados nas Figuras 30 e 31 para o caso linear ($p = 0$) e o não linear ($p = 4$), respectivamente. Utilizamos $D = 10^{-3}$, $\Delta x = 5 \times 10^{-3}$ e $\Delta t = 6,25 \times 10^{-3}$ para ambos os casos, linear e não linear.

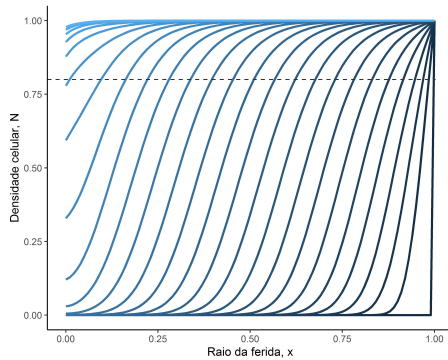


Figura 30: Solução numérica do modelo para o caso linear $p = 0$ com $D = 10^{-3}$, $\Delta x = 5 \times 10^{-3}$ e $\Delta t = 6,25 \times 10^{-3}$. A celularidade evolui da direita para a esquerda. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.

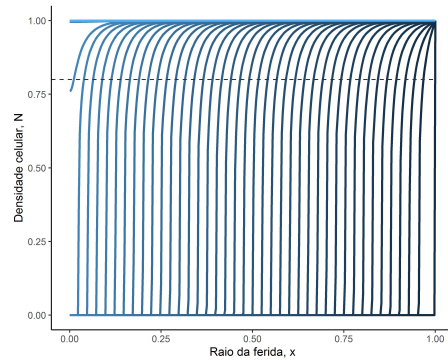


Figura 31: Solução numérica do modelo para o caso não linear $p = 4$ com $D = 10^{-3}$, $\Delta x = 5 \times 10^{-3}$ e $\Delta t = 6,25 \times 10^{-3}$. A celularidade evolui da direita para a esquerda. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.

Com base nos resultados obtidos, Sherratt & Murray (1990) afirmaram que a equação linear modela melhor a estagnação inicial do fechamento da ferida, enquanto a não linear a propagação de frente de onda do fechamento da ferida, no entanto nenhuma aproxima a situação por completo necessitando de melhorias.

3.1.2 Ondas Viajantes

Segundo Murray (2000b), uma onda viajante é uma curva na qual não há variação em sua forma e a velocidade de propagação é constante. Usando o método das curvas características a equação (29) reduz-se a um sistema EDO de primeira ordem. Para tanto, considere a transformação $z = x - ct$ de forma que z é a variável que representa a característica e c a velocidade da onda. Segundo Murray (2000b), a equação (29) é invariante se $x \rightarrow -x$ implica que a velocidade c pode ser positiva ou negativa.

Considerando a mudança de variável:

$$N(x, t) = \tilde{N}(z) = \tilde{N}(x - ct),$$

calculando as derivadas necessárias e substituindo na Equação (29), para $p = 0$, obtemos:

$$\tilde{N}'' = -\frac{k}{D} \tilde{N}' - \frac{\tilde{N}}{D} (1 - \tilde{N}).$$

Fazendo a mudança de variável $M(z) = \tilde{N}'(z)$ obtemos o sistema de EDO's:

$$\begin{cases} \tilde{N}' = M \\ M' = -\frac{c}{D} M - \frac{\tilde{N}}{D} (1 - \tilde{N}) \end{cases}. \quad (34)$$

O sistema de EDO possui dois pontos de equilíbrio:

$$(\tilde{N}, M) = (0, 0) \quad \text{e} \quad (\tilde{N}, M) = (1, 0).$$

Para fazer o estudo da estabilidade desses pontos é necessário o cálculo da matriz jacobiana associada ao sistema (34):

$$J(\tilde{N}, M) = \begin{pmatrix} 0 & 1 \\ -\frac{1}{D} (1 - 2\tilde{N}) & -\frac{c}{D} \end{pmatrix}. \quad (35)$$

A equação característica associada ao ponto de equilíbrio $(\tilde{N}, M) = (0, 0)$ é:

$$D\lambda^2 + c\lambda + 1 = 0,$$

cujos autovalores são:

$$\lambda = \frac{1}{2D} \left(-c \pm \sqrt{c^2 - 4D} \right).$$

- Para $c > 0$ temos que o ponto de equilíbrio $(\tilde{N}, M) = (0, 0)$ será atrator, pois a parte real do autovalor é negativa. Se $c < 2\sqrt{D}$ o ponto será foco atrator e se $c > 2\sqrt{D}$ será nó atrator, logo em $c = 2\sqrt{D}$ ocorre uma mudança no comportamento do ponto de equilíbrio.
- Se $c < 0$ o ponto de equilíbrio será repulsor, pois a parte real dos autovalores é positiva. Se $c < 2\sqrt{D}$ o ponto será foco repulsor e se $c > 2\sqrt{D}$ será nó repulsor, ou seja, em $c = 2\sqrt{D}$ ocorre uma mudança no comportamento do ponto de equilíbrio.

Assim, se $c \geq c_{\min} = 2\sqrt{D}$ a origem será um nó, sendo degenerado para $c = c_{\min} = 2\sqrt{D}$ o qual mede a velocidade da onda da solução da equação linear, para $D = 10^{-3}$ temos $c = 6,3 \times 10^{-2} \text{ mm h}^{-1}$. De forma análoga verifica-se que o ponto de equilíbrio $(\tilde{N}, M) = (1, 0)$ é um ponto sela, tanto para $c > 0$, quanto para $c < 0$. Segundo Sherratt & Murray (1990), a velocidade da onda da equação (29), para $p = 4$, é de $c = 9 \times 10^{-3} \text{ mm h}^{-1}$ e a velocidade obtida nos dados experimentais é $c = 8,3 \times 10^{-3} \text{ mm h}^{-1}$.

Logo, a velocidade da frente de onda, para o caso não linear, é mais próxima da observada em dados experimentais de cicatrização de feridas epidérmicas (Kreger, 2015; Murray, 2000a; Sherratt & Murray, 1990).

3.2 Sistema Reação-Difusão

Esse modelo consiste de duas equações conservativas. Sejam $N(x, t)$ a densidade celular, por unidade de área, em $x \in \mathbb{R}$, no tempo t e $C(x, t)$ a concentração química da mitose, em $x \in \mathbb{R}$, no tempo t (Sherratt & Murray, 1990). Considerando, novamente, que a epiderme é fina o suficiente para que a ferida seja bidimensional e que é radialmente simétrica, temos que o modelo, ao longo do raio da ferida, L , é dado por:

$$\begin{cases} \frac{\partial N}{\partial t} = D_N \nabla^2 N + s(C) N \left(2 - \frac{N}{N_0} \right) - k N, & (36a) \\ \frac{\partial C}{\partial t} = D_C \nabla^2 C + f(N) - \lambda C, & (36b) \end{cases}$$

sendo D_N e D_C os coeficientes de difusão para a densidade celular e concentração química da mitose, respectivamente, N_0 é a densidade celular normal da pele saudável, λ e k são constantes positivas. O modelo (36) utiliza a equação linear de Fick para modelar a difusão, pois o modelo anterior sugeriu que o termo não linear não é fundamental para modelar o espalhamento celular (Sherratt & Murray, 1990). Esse modelo incorpora os efeitos de fatores ativadores da mitose ou a ausência de fatores inibidores por meio das funções $f(N)$ e $s(C)$ de acordo com o exposto a seguir (Sherratt & Murray, 1990):

Ativador	Inibidor
$f(N) = \lambda C_0 \frac{N}{N_0} \left(\frac{N_0^2 + \alpha^2}{N^2 + \alpha^2} \right)$	$f(N) = \lambda C_0 \frac{N}{N_0}$
$s(C) = k \left(\frac{2C_m (h - \beta) C}{C_m^2 + C^2} + \beta \right)$	$s(C) = k \frac{(h - 1) C + h C_0}{2(h - 1) C + C_0}$

em que C_0 a taxa de mitose da pele saudável, h , α e C_m são constantes positivas e $\beta = \frac{C_0^2 + C_m - 2hC_m C_0}{(C_0 - C_m)^2}$. O modelo (36) adimensionalizado é dado por (Sherratt & Murray, 1990):

$$\begin{cases} \frac{\partial N}{\partial t} = D_N \nabla^2 N + s(C) N (2 - N) - N, \\ \frac{\partial C}{\partial t} = D_C \nabla^2 C + \lambda f(N) - \lambda C, \end{cases} \quad (37a)$$

$$\quad (37b)$$

com as funções f e s assumindo as seguintes formas (Sherratt & Murray, 1990):

Ativador	Inibidor
$f(N) = N \left(\frac{1 + \alpha^2}{N^2 + \alpha^2} \right)$	$f(N) = N$
$s(C) = \left(\frac{2C_m (h - \beta) C}{C_m^2 + C^2} + \beta \right)$	$s(C) = \frac{(h - 1) C + h}{2(h - 1) C + 1}$

em que $\beta = \frac{1 + C_m - 2hC_m}{(1 - C_m)^2}$. A seguir apresentamos as condições iniciais e de fronteira para o problema, em $x \in \mathbb{R}$ (Sherratt & Murray, 1990).

Condições iniciais	Condições de Neumann à esquerda	Condições de Dirichlet à direita
$N(x, 0) = 0,$	$N_x(0, t) = 0,$	$N(L = 1, t) = 1 = N_0,$
$C(x, 0) = 0,$	$C_x(0, t) = 0,$	$C(L = 1, t) = 1 = C_0.$

O modelo (37) foi resolvido numericamente utilizando as equações (30) e (31) para os casos de ativador e inibidor da mitose e os resultados estão ilustrados nas Figuras 32 - 35, respectivamente. Considerou-se $\alpha = 0,1$, $h = 10$ e $C_m = 40$. Para o caso ativador considerou-se $D_N = 5 \times 10^{-4}$, $D_C = 0,45$ e $\lambda = 30$ e para o caso inibidor $D_N = 10^{-4}$, $D_C = 0,85$ e $\lambda = 5$.

A solução numérica exibiu as duas fases importantes na cicatrização de feridas, a fase inicial de estagnação seguida pela fase linear, caracterizando que a regulação química da mitose é fundamental para o processo de migração epidermal (Sherratt & Murray, 1990).

Na epiderme saudável a homeostasia é caracterizada pela interação entre fatores ativadores e inibidores de crescimento (Murray, 2000b). Ambos fatores químicos são necessários para cicatrização de feridas: ocorre a multiplicação celular

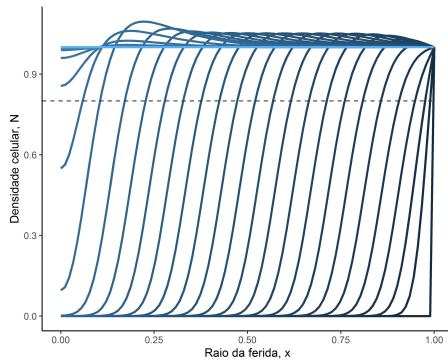


Figura 32: Solução numérica do modelo matemático (37). Densidade celular N do caso ativador. $D_N = 5 \times 10^{-4}$, $D_C = 0,45$ e $\lambda = 30$. A celularidade evolui da direita para a esquerda ao longo do tempo. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.

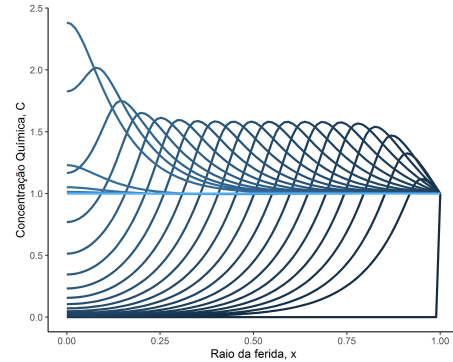


Figura 33: Solução numérica do modelo (37). Concentração química da mitose C do caso ativador. $D_N = 5 \times 10^{-4}$, $D_C = 0,45$ e $\lambda = 30$. As curvas evoluem da direita para a esquerda ao longo do tempo.

rápida o suficiente para cobrir a ferida em um curto espaço de tempo, mas também é preciso uma forma de desativar essa replicação crescente de células ao redor da ferida uma vez que esta esteja cicatrizada. Se isso não ocorrer a replicação celular rápida e indefinida levará a formação de camadas extras na pele ou até mesmo de cânceres (Kreger, 2015).

Podemos observar nas Figuras 32 e 34 a variação da densidade celular acima do máximo da pele saudável o que corrobora com os dados experimentais uma vez que a celularidade total verificada ao longo do processo de cicatrização foi cerca de quatro vezes maior do que a da pele saudável (Sherratt & Murray, 1990). As Figuras 33 e 35 ilustram a dinâmica da concentração química da mitose para os casos ativador e inibidor da mitose, respectivamente. Podemos perceber a exarcebação dessa concentração no caso ativador no centro da ferida, $x = 0$.

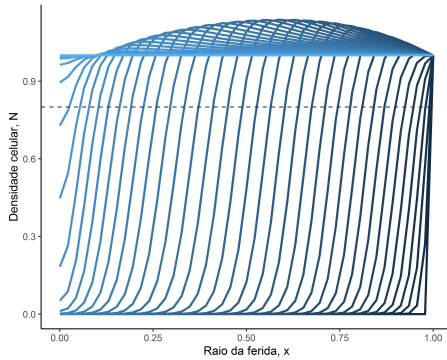


Figura 34: Solução numérica do modelo (37). Densidade celular N do caso inibidor. $D_N = 10^{-4}$, $D_C = 0,85$ e $\lambda = 5$. A celularidade evolui da direita para a esquerda ao longo do tempo. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.

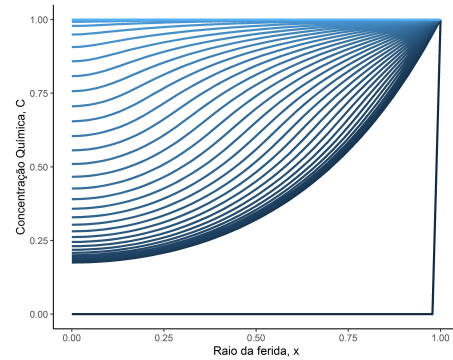


Figura 35: Solução numérica do modelo (37). Concentração química da mitose C do caso inibidor. $D_N = 10^{-4}$, $D_C = 0,85$ e $\lambda = 5$. As curvas evoluem da direita para a esquerda ao longo do tempo.

3.3 Modelagem Matemática da Fase Proliferativa

Propomos, na Seção 3.4, um modelo matemático, baseado em Sherratt & Murray (1990), do mecanismo celular (crescimento, migração, difusão e mitose) observado no processo, por meio das equações (36), para os tratamentos 10% OR e Colagenase afim de obter os respectivos coeficientes de difusão. Esses coeficientes serão considerados para os tratamentos 10% EH e CL uma vez que apresentam comportamento semelhantes ao 10% OR e Colagenase, respectivamente. As variáveis e os parâmetros, com as respectivas unidades de medidas, estão descritos na Tabela 11. A seguir apresentamos as condições iniciais e de fronteiras em $x \in \mathbb{R}$.

Condições iniciais	Condições de Neumann	Condições de Dirichlet
	à esquerda	à direita
$N(x, 0) = 0,$	$N_x(0, t) = 0,$	$N(1, t) = p_1^2 \frac{(t + q_1)}{(t^2 + r_1^2)},$
$C(x, 0) = 0,$	$C_x(0, t) = 0,$	$C(1, t) = p_1^2 \frac{(t + q_1)}{(t^2 + r_1^2)}.$

Tabela 11. Descrição das variáveis e dos parâmetros do modelo (36).

Variáveis		Unidades
$N(x, t)$	Densidade celular	cel mm ⁻³
$C(x, t)$	Concentração química da mitose	pg mm ⁻³
t	Tempo	dia
x	Posição radial na ferida	cm
D_N	Coefficiente de difusão da celularidade	cm ² s ⁻¹
D_C	Coefficiente de difusão da concentração química	cm ² s ⁻¹
N_0	Densidade celular na pele saudável	cel mm ⁻³
C_0	Concentração química da mitose na pele saudável	pg mm ⁻³
k	Taxa de decaimento da densidade celular	dia ⁻¹
λ	Taxa de decaimento da ativação química da mitose	dia ⁻¹
h	Constante positiva	—

As funções $N(1, t)$ e $C(1, t)$ foram escolhidas de forma que ajustassem os dados experimentais da celularidade total e do PCNA ilustrados nas Figuras 12 e 13, respectivamente. As constantes p_1, q_1 e r_1 , das funções $N(1, t)$ e $C(1, t)$ foram obtidas por otimização não linear (*Trust Region Method*) (Nocedal & Wright, 1999) e análise matemática das funções, considerando os valores obtidos em laboratório para a celularidade total e PCNA (ilustrados em asteriscos), e os resultados estão apresentados na Tabela 12 e ilustrados nas Figuras 36-43.

No início do processo de cicatrização de feridas na pele ocorre um influxo exacerbado de células para o tamponamento e hemostasia e, logo após, essas

Tabela 12. Constantes das funções fronteira de Dirichlet para celularidade total $N(1, t)$ e concentração química da mitose $C(1, t)$.

		p_1	r_1	q_1
10% OR	Celularidade	518,2	4,8	0,625
	PCNA	319,5	4,75	3,2
10% EH	Celularidade	496,2	4	0,5
	PCNA	336	5,7	4,4
CL	Celularidade	626,9	7,082	0,92
	PCNA	296,7	4,747	3,112
Colagenase	Celularidade	597,6	6,604	0,925
	PCNA	301,3	4,737	3,12

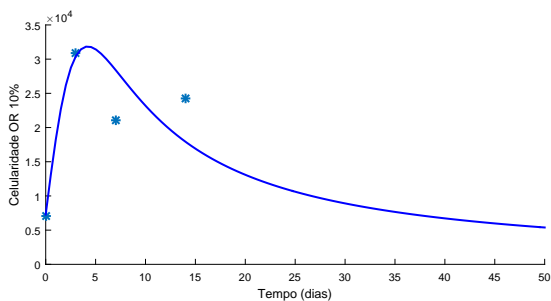


Figura 36: Ilustração do gráfico da função $N(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% OR.

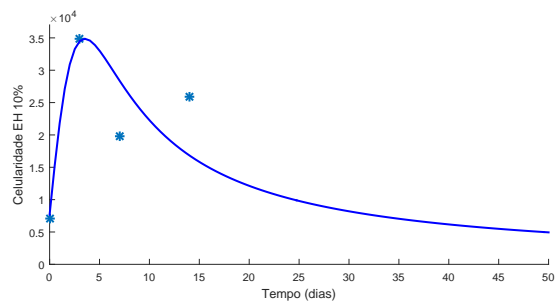


Figura 37: Ilustração do gráfico da função $N(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% EH.

células entram em apoptose para possibilitar a evolução da cicatrização para a fase inflamatória com níveis apropriados de células e mediadores químicos (temos que celularidade total na borda da ferida é cerca de quatro vezes a celularidade da pele saudável). A apoptose, desse número elevado de células, desencadeia uma queda brusca na densidade celular (especialmente próximo ao tempo $t = 0$) a qual se estabiliza ao longo do raio e do tempo de cicatrização da ferida formando o platô visualizado nas Figuras 44 e 45 quando, então as células se proliferam em direção ao

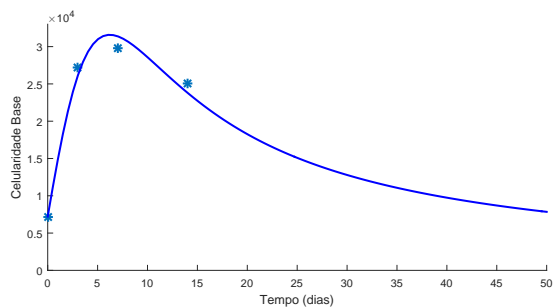


Figura 38: Ilustração do gráfico da função $N(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para CL.

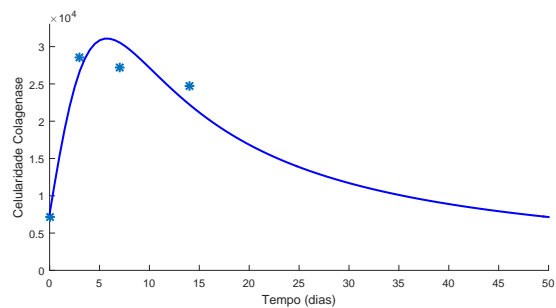


Figura 39: Ilustração do gráfico da função $N(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para Colagenase.

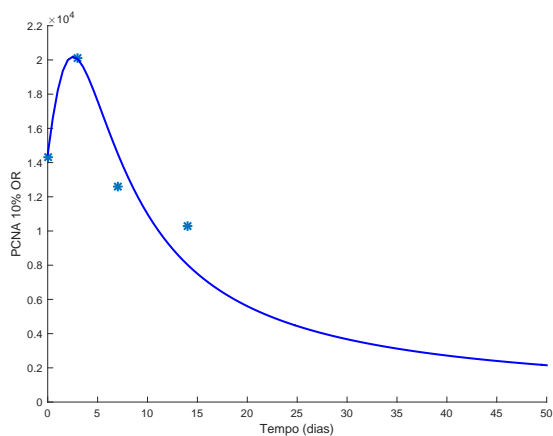


Figura 40: Ilustração do gráfico da função $C(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% OR.

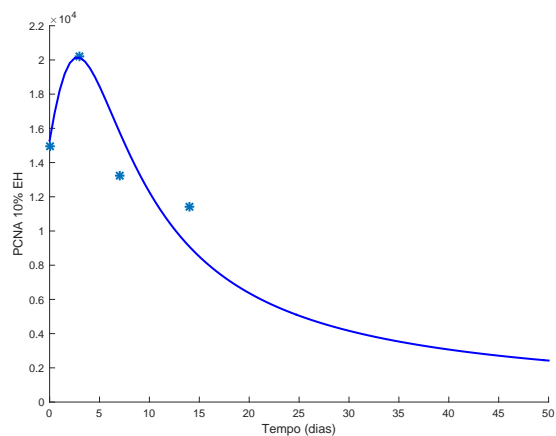


Figura 41: Ilustração do gráfico da função $C(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% EH.

centro da ferida resultando no fechamento da mesma, ou seja, no sucesso do processo de cicatrização.

Caso ocorra a desregulação do processo (interação entre as células e a concentração química) poderá ocorrer, no mínimo, duas situações indesejadas:

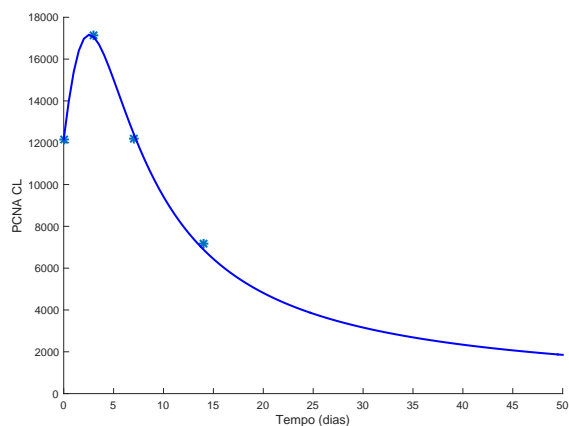


Figura 42: Ilustração do gráfico da função $C(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para CL.

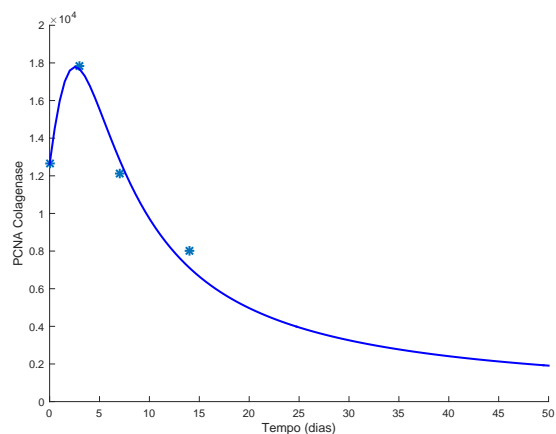


Figura 43: Ilustração do gráfico da função $C(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para Colagenase.

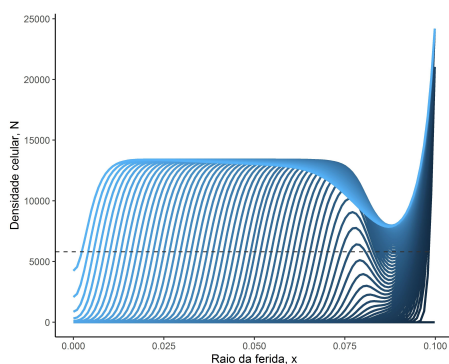


Figura 44: Solução numérica do modelo (36). Densidade celular N , caso inibidor, do tratamento 10% OR. $D_N = 9,9 \times 10^{-6}$, $D_C = 1,2 \times 10^{-7}$, $k = 3,7 \times 10^{-2}$ e $\lambda = 10^{-3}$. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.

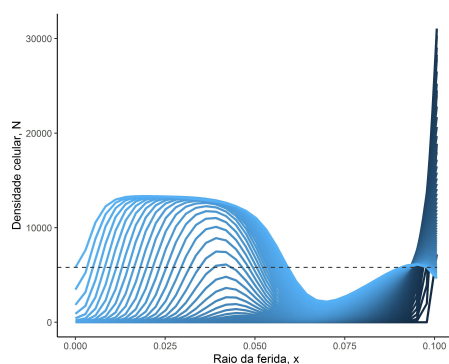


Figura 45: Solução numérica do modelo (36). Densidade celular N , caso inibidor, do tratamento colagenase. $D_N = 9,7 \times 10^{-6}$, $D_C = 3,9 \times 10^{-6}$, $k = 3,7 \times 10^{-2}$ e $\lambda = 10^{-3}$. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.

- a densidade celular tende a zero e não volta a crescer, significando a não cicatrização da ferida
- a densidade volta a crescer, próxima ao centro, e se estabiliza nesse valor ocor-

rendo a formação de fibroses.

Os valores de D_N , D_C , k e λ foram obtidos pelo ajuste de parâmetros com condições iniciais, para esses parâmetros, dadas em Sherratt & Murray (1990). Podemos observar que os coeficientes de difusão da Colagenase são menores do que os do 10% OR o que está em acordo com os dados experimentais apresentados na seção 1.5. Observando os dados biológicos percebemos que o CL e a Colagenase possuem padrão semelhante na celularidade e concentração de PCNA, o mesmo ocorre para 10% EH e 10% OR, assim os respectivos coeficientes de difusão serão considerados os mesmos para os tratamentos que possuem padrão semelhante.

Com o modelo (36) foi possível reproduzir a atuação de celularidade no raio da ferida de pele, entretanto, ainda há a necessidade de melhoria dos modelos matemáticos para definirmos o tempo de cicatrização total da pele, de acordo com Gushiken (2017). Assim, esse estudo é fundamental para o desenvolvimento de um modelo matemático que possa auxiliar processos de seleção de novos produtos para a cicatrização de pele.

Os modelos discutidos acima nos leva a selecionar aspectos importantes, que permeiam a cicatrização de feridas, para serem investigados. Considerando os melhores resultados obtidos numericamente nós propomos um novo modelo matemático que melhor prediz o tempo de cicatrização das feridas.

3.4 Um Modelo Matemático Difusivo da Fase Inflamatória

Nós estendemos o modelo homogêneo (26) que captura a interação entre mediadores inflamatórios, neutrófilos e macrófagos para incorporar a propagação espacial das células e dos mediadores inflamatórios. Então, o modelo de equações

diferenciais parciais (EDP) que abrange o espalhamento espacial é dado por:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial n}{\partial t} = D_N \nabla^2 n + \frac{\chi_n c}{\left(1 + \frac{g}{\beta_g}\right)} - \nu \frac{\left(1 + \frac{g}{\beta_g}\right)}{\left(1 + \frac{c}{\beta_c}\right)} n, \end{array} \right. \quad (38a)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{da}{dt} = \nu n \frac{\left(1 + \frac{g}{\beta_g}\right)}{\left(1 + \frac{c}{\beta_c}\right)} - \gamma_a a - \phi m a, \end{array} \right. \quad (38b)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial m}{\partial t} = D_N \nabla^2 m + \chi_m c - \gamma_m m, \end{array} \right. \quad (38c)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial c}{\partial t} = D_C \nabla^2 c + \alpha F(t) + k_n \left(\frac{n^2}{\beta_n^2 + n^2} \right) + \gamma_a k_a \left(\frac{a^2}{\beta_a^2 + a^2} \right) - \gamma_c c + \\ \quad + k_m \left(\frac{m^2}{\beta_m^2 + m^2} \right), \end{array} \right. \quad (38d)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial g}{\partial t} = D_C \nabla^2 g + k_g \phi m a - \gamma_g g. \end{array} \right. \quad (38e)$$

As condições iniciais são todas nulas, ou seja, $n(x, 0) = a(x, 0) = m(x, 0) = c(x, 0) = g(x, 0) = 0$ assim como as condições da fronteira esquerda que são condições de Neumann logo temos que $n_x(0, t) = a_x(0, t) = m_x(0, t) = c_x(0, t) = g_x(0, t) = 0$. As condições da fronteira à direita são de Dirichlet e estão apresentadas abaixo, para $x \in \mathbb{R}$.

$$n(L = 1, t) = 0, 2N(L = 1, t).$$

$$a(L = 1, t) = 0, 5n(L = 1, t).$$

$$m(L = 1, t) = 0, 4N(1, t).$$

$$c(L = 1, t) = p_2 \exp \left(- \left(\frac{t - q_2}{r_2} \right)^2 \right).$$

$$g(L = 1, t) = p_2 \exp \left(- \left(\frac{t - q_2}{r_2} \right)^2 \right).$$

As funções $c(1, t)$ e $g(1, t)$ foram escolhidas de forma a ajustarem os dados experimentais da IL-6 e da IL-10, ilustrados nas Figuras 10 e 11, respectivamente. As funções $n(1, t)$ e $m(1, t)$ foram escolhidas como 20% e 40%, respectivamente, da celularidade total (funções $N(1, t)$). As constantes p_2, q_2 e r_2 , das funções $c(1, t)$ e $g(1, t)$ foram obtidas por otimização não linear (*Trust Region Method*) (Nocedal &

Wright, 1999) e análise matemática das funções e os resultados estão apresentados na Tabela 13 e ilustrados nas Figuras 46-53.

Tabela 13. Constantes das funções fronteira de Dirichlet para IL-6, $c(1, t)$, e IL-10, $g(1, t)$.

		p_2	q_2	r_2
10% OR	IL-6	3046,8	7,0	4,503
	IL-10	1262,8	7,0	2,683
10% EH	IL-6	1969,2	7,0	5,366
	IL-10	591,1	7,0	2,964
CL	IL-6	5269,1	3,0	1,561
	IL-10	104,4	7,0	5,781
Colagenase	IL-6	3156,7	3,0	1,582
	IL-10	104,4	7,0	5,781

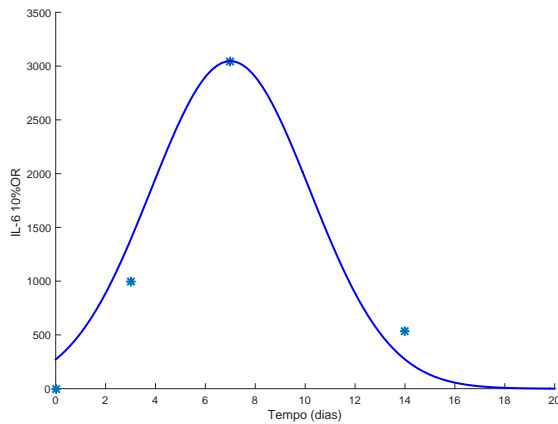


Figura 46: Ilustração do gráfico da função $c(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% OR.

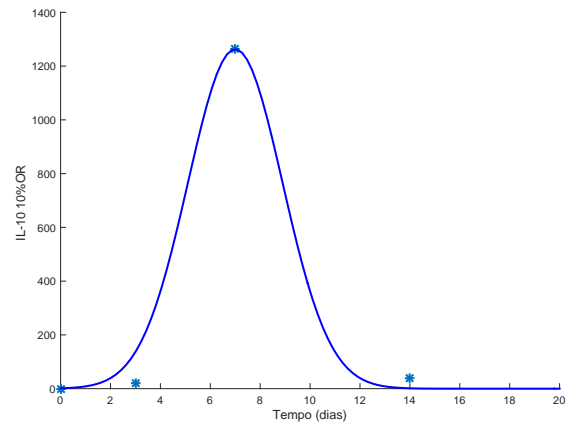


Figura 47: Ilustração do gráfico da função $g(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% OR.

Assim como os resultados apresentados nas Figuras 44 e 45 temos que o resultado do modelo (38) apresentado nas Figuras 54 - 57, ilustra um influxo exa-

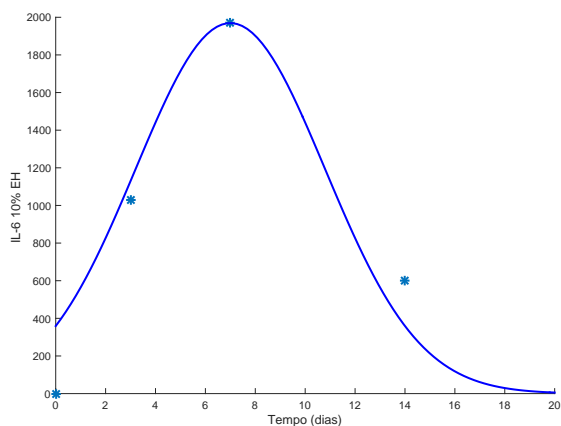


Figura 48: Ilustração do gráfico da função $c(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% EH.

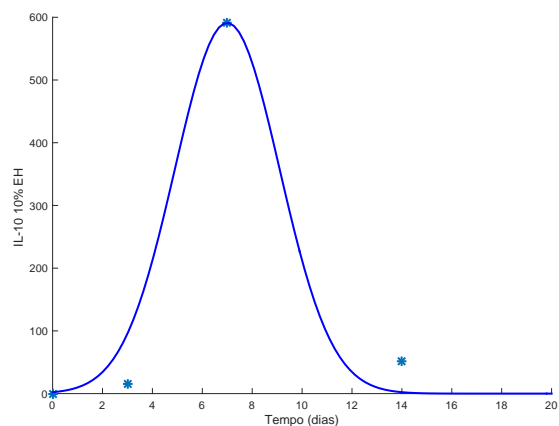


Figura 49: Ilustração do gráfico da função $g(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% EH.

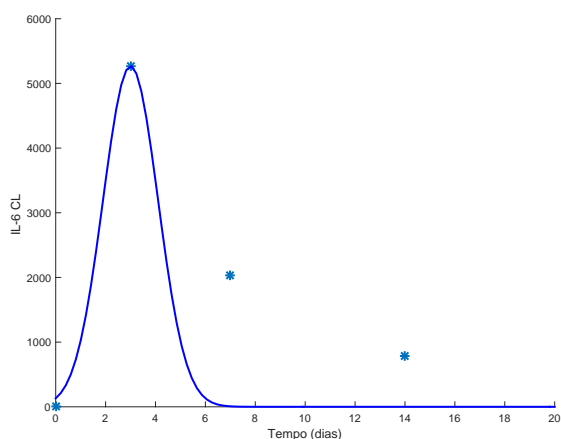


Figura 50: Ilustração do gráfico da função $c(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para CL.

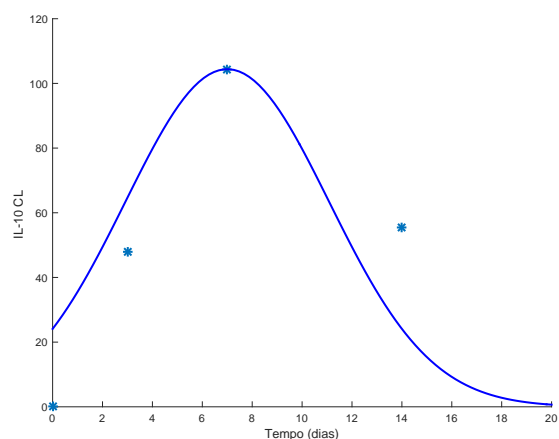


Figura 51: Ilustração do gráfico da função $g(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para CL.

cerbado de células, no início do processo de cicatrização de feridas, e, logo após, essas células entram em apoptose para possibilitar a evolução da cicatrização para a fase inflamatória com níveis apropriados de células e mediadores químicos (temos que celularidade total (macrófagos e neutrófilos) na borda da ferida é cerca de quatro vezes a celularidade da pele saudável). A apoptose, desse número elevado de células, de-

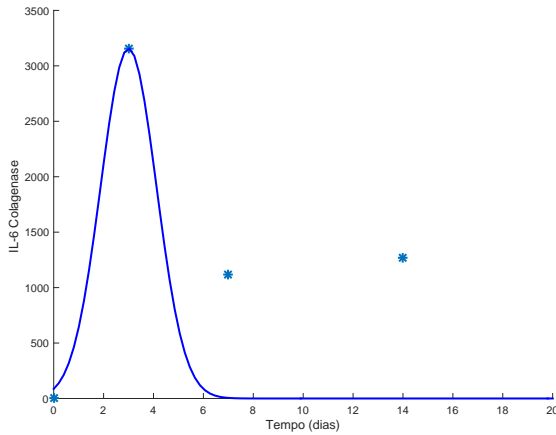


Figura 52: Ilustração do gráfico da função $c(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para Colagenase.

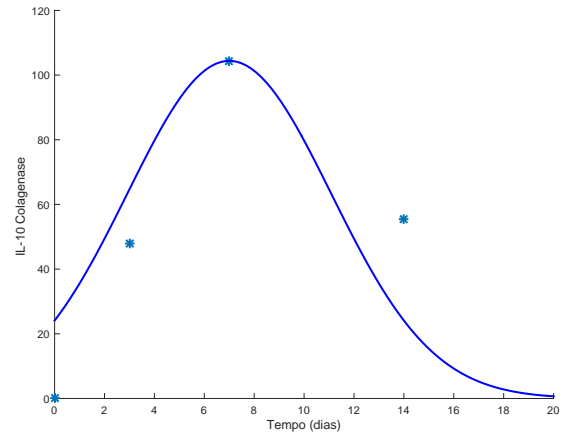


Figura 53: Ilustração do gráfico da função $g(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para Colagenase.

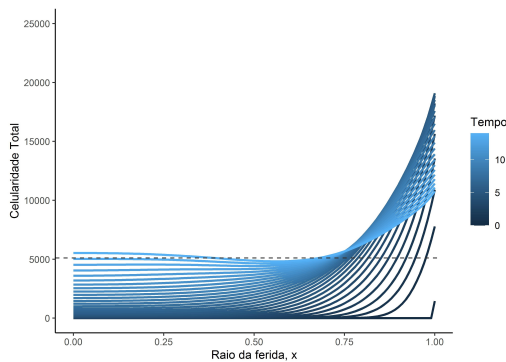


Figura 54: Solução numérica do modelo matemático (38). Celularidade total 10% OR. Ferida cicatrizada no tempo 14,2 dias. $D_N = 5 \times 10^{-3}$, $D_C = 10^{-2}$, $\gamma_c = 3,0$ e $\omega = 0,03$. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.

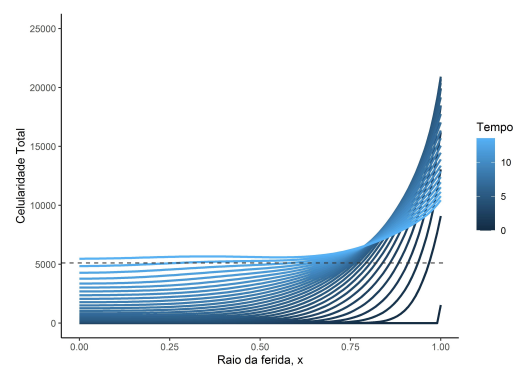


Figura 55: Solução numérica do modelo (38). Celularidade total 10% EH. Ferida cicatrizada no tempo 13,7 dias. $D_N = 5 \times 10^{-3}$, $D_C = 10^{-2}$, $\gamma_c = \frac{5}{9}\tilde{\gamma}_c = 2,5$ e $\omega = 0,03$. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.

sencadeia uma queda brusca na densidade celular (especialmente próximo ao tempo $t = 0$) a qual se estabiliza ao longo do raio e do tempo de cicatrização da ferida quando, então as células se proliferam em direção ao centro da ferida resultando no

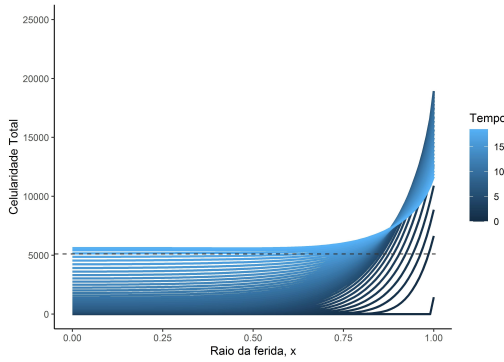


Figura 56: Solução numérica do modelo matemático (38). Celularidade total do CL. Ferida cicatrizada no tempo 18,8 dias. $D_N = 5 \times 10^{-3}$, $D_C = 10^{-2}$, $\gamma_c = 4,4785$, $\chi_n = \tilde{\chi}_n/10 = 0,3915$ e $\omega = 0,03$. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.

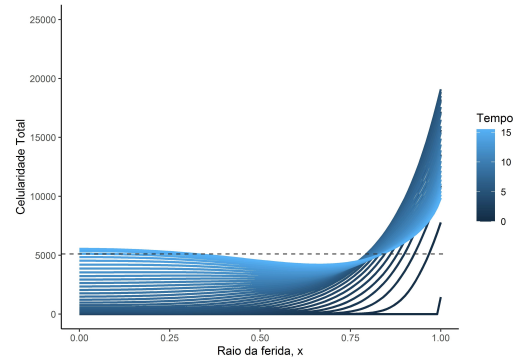


Figura 57: Solução numérica do modelo matemático (38). Celularidade total colagenase. Ferida cicatrizada no tempo 16,3 dias. $D_N = 5 \times 10^{-3}$, $D_C = 10^{-2}$, $\gamma_c = 3,6$, $\chi_n = \tilde{\chi}_n = 5,0$ e $\omega = 0,03$. A linha tracejada corresponde ao critério de cicatrização imposto: 80% da celularidade total.

fechamento da mesma, ou seja, no sucesso do processo de cicatrização. Podemos observar que nos tratamentos 10% OR e Colagenase, ilustrados nas Figuras 54 e 57, respectivamente ocorre a elevação da densidade celular resultando na formação de pequenos platôs no centro da ferida.

É possível notar que a celularidade, na bora da ferida, é maior no tratamento 10% EH (20917,44) do que 10% OR (19087,99), fato que corrobora com os dados *in vivo*. Também percebemos que a dispersão, ao longo do raio da ferida, é semelhante nos tratamentos, no entanto o tratamento 10% EH apresenta um menor nível celular (neutrófilos) próximo ao centro da ferida e que, o decaimento próximo à borda da ferida (macrófagos) ocorre em um raio de retração menor do que o tratamento 10% OR. Contudo, ambos os tratamentos à base de copaíba exibem o decaimento da densidade celular em raio maior do que o CL, ilustrado na Figura 56.

Notamos uma elevação na celularidade quando comparamos os tratamentos de copaíba com o CL, Figura 56, no centro da ferida, (base dos medicamentos

10% OR e 10% EH). Nos tratamentos CL (18939,77) e Colagenase (19087,99), ilustrados na Figuras 56 e 57, percebemos que a celularidade, na borda da ferida, é menor do que no tratamentos 10% OR e 10% EH, o que está em acordo com os dados *in vivo*. Temos ainda que o CL apresentou o maior valor para celularidade no centro da ferida.

Os parâmetros γ_c e χ_n são baseados nos do modelo (26) denominados de $\tilde{\gamma}_c$, $\tilde{\chi}_n$. A inserção dos termos difusivos deu ao modelo maior liberdade para calibração dos parâmetros e obtivemos uma taxa de influxo dos neutrófilos, χ_n , dez vezes menor do que a obtida anteriormente para o CL, sugerindo que nesse tratamento o recrutamento celular foi menor e, conseqüentemente, foi necessário maior tempo para cicatrização da ferida.

A taxa de decaimento do mediador pró-inflamatório γ_c é menor no tratamento 10% EH e maior no CL, pois a produção de IL-6 é menor no tratamento 10% EH, seguido pelo 10% OR, Colagenase e, por último, pelo CL.

A equação (38a) considera uma proporção entre as taxas de repressão da IL-10 e IL-6 e podemos observar, dos dados experimentais, que o máximo dessas interleucinas ocorrem em dias diferentes (IL-6 no dia 3 e IL-10 no dia 7) para os tratamentos CL e Colagenase e concomitantemente (no dia 7) para os tratamentos 10% OR e 10% EH. Assim, podemos deduzir que o balanceamento dessas interleucinas está melhor modelado nos tratamentos à base de copaíba.

Observamos, a partir dos resultados numéricos, que a densidade celular é influenciada diretamente pelos neutrófilos, no leito da ferida, e pelos macrófagos, na borda da ferida. Essas influências se justificam pela síntese de mediadores químicos na borda da ferida, pelos macrófagos, e pelo processo de desbridamento no leito da ferida pelos neutrófilos (Zhao et al., 2016).

A inserção dos termos difusivos no modelo (26) possibilitou encontrar o tempo de cicatrização das feridas para os quatro tratamentos: 14,2 dias no 10% OR, 13,7 dias no 10% EH, 18,8 dias no CL e 16,3 dias na Colagenase sugerindo que os novos parâmetros determinados são mais condizentes com os dados laboratoriais.

No próximo capítulo apresentamos um modelo original para o cálculo de componentes essenciais da angiogênese baseando no modelo (38), em Schugart et al. (2008) e em Pettet et al. (1996a).

4 UM MODELO MATEMÁTICO PARA ANGIOGÊNESE DE FERIDAS CUTÂNEAS

Segundo Flegg et al. (2015), a cicatrização não pode ocorrer normalmente sem a formação de novos vasos sanguíneos, os quais são responsáveis pelo suprimento de oxigênio, componente vital para o sucesso da reparação dos tecidos. O processo de angiogênese envolve migração, proliferação, diferenciação e adesão de vários tipos de células, incluindo as endoteliais e as inflamatórias (Kim et al., 2013; Bischoff, 1995). Uma variedade de células inflamatórias, incluindo os neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, macrófagos, células matadoras naturais (do inglês *natural killers*) (NK's) e células dendríticas estão envolvidas na indução e promoção da angiogênese (Kim et al., 2013).

Segundo Khalaf et al. (2019), análises histopatológicas evidenciaram reação inflamatória evidente em seção de tecidos de feridas, incluindo a presença de macrófagos e linfócitos associados com a proliferação de fibroblastos, e neovascularização entre os dias 5 e 7 de experimentação. Também foi detectado níveis significantes de VEGF e de seu mRNA no estágio inicial da cicatrização das feridas (até o dia 5), sendo que o pico de expressão ocorreu no dia 7 (Khalaf et al., 2019). VEGF é uma proteína sinalizadora, produzida pelas células, que estimula a formação de vasos sanguíneos e possui importante papel durante a angiogênese (Khalaf et al., 2019).

Alguns autores definem o processo de cicatrização de feridas como a evolução da **unidade de cicatrização** que é composta por uma frente principal de

fibroblastos, seguida por uma arcada de capilares e posteriormente por uma rede de vasos maturados (Flegg et al., 2015; Pettet et al., 1996a).

4.1 Modelagem Matemática

Consideramos a extensão do modelo de EDP (38), o qual modela a densidade celular na epiderme, para possibilitar a modelagem da angiogênese, processo fundamental no desenvolvimento do tecido de granulação. O modelo proposto foca na migração das células endoteliais do brotamento distal na direção do crescimento de quimiotáticos derivados de macrófagos e neutrófilos (Iglesias & Devreotes, 2008; Pettet et al., 1996a).

Não consideramos explicitamente a variação dos níveis de oxigênio, assumimos que a concentração de oxigênio cresce na proporção que a produção dos fatores angiogênicos decrescem, ou seja, supomos que baixos níveis na densidade de vasos sanguíneos indicam baixa oxigenação e alta produção de quimiotáticos derivados de macrófagos, enquanto altos níveis na densidade de vasos sanguíneos corresponde a um tecido bem oxigenado com macrófagos inativos, onde alterações morfológicas nos vasos sanguíneos e apoptose celular realizam a gradual redução da densidade dos vasos (Pettet et al., 1996a). A redução da proliferação celular, que ocorre após a resolução da demanda adicional de oxigênio, possibilita a regressão de vasos neoformados evitando o aporte excessivo de oxigênio (Oliveira et al., 2010).

A angiogênese é indiretamente acentuada por quimiocinas, especialmente aquelas derivadas de neutrófilos (Kim et al., 2013). Nós assumimos que o quimiotático VEGF é produzido por células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos) em resposta a hipóxia a uma taxa λ_m (Flegg et al., 2012), que a concentração do VEGF, b , submete-se ao movimento aleatório, a uma taxa de difusão D_b e decresce devido a decomposição do quimiotático à taxa λ_b (Equação (39f)).

O modelo proposto também considera que a redução da densidade do brotamento distal, p , ocorre em função da resolução das fases da cicatrização da ferida

a uma taxa, (λ_p) , e da capacidade de suporte dos brotos capilares p_3 modelados pela equação de Michaelis-Menten (Tabela 16) - não consideramos diretamente o processo de anastomose (Flegg et al., 2012). A densidade do brotamento distal é calculado no plano perpendicular ao qual a frente de onda da cicatrização avança (eixo x).

A quimiotaxia $\frac{\partial}{\partial x} (p \frac{\partial b}{\partial x})$ é incorporada, nesse modelo, como característica dominante no direcionamento da frente da onda para o interior da ferida, numa taxa χ , região onde se encontram os quimiotáticos e para a qual se direciona o movimento aleatório do brotamento distal a uma taxa de difusão D_p . Por último, salientamos que o crescimento do brotamento distal foi considerado proporcional à quantidade de macrófagos e neutrófilos presentes no leito da ferida diretamente a uma taxa λ_{bp} , fato que deixa o modelo matemático muito dependente da densidade celular e isto corrobora com outros trabalhos publicados (Horng et al., 2017; Kim et al., 2013; Reinke & Sorg, 2012). Não consideramos, na modelagem, que os vasos sanguíneos auxiliam no transporte de macrófagos e neutrófilos para o leito da ferida com o objetivo de manter os resultados obtidos no modelo (38).

Angiogênese é um processo tridimensional, ocorrido na derme, no entanto nós assumimos simetria radial e aproximamos um modelo bidimensional por um unidimensional. O modelo resultante, equações (39a)-(39g), descreve a evolução do brotamento distal das células endoteliais e em como eles migram em direção à fonte crescente do quimiotático VEGF liberado pelos macrófagos e neutrófilos. As variáveis e os parâmetros adicionais do modelo estão descritos nas Tabelas 14 e 15, respectivamente.

Tabela 14. Descrição das variáveis do modelo (39).

Variáveis		U
$b(x, t)$	Concentração do quimiotático VEGF	pg μm^{-2} (Cabar, 2008)
$p(x, t)$	Densidade do brotamento distal	U μm^{-2}
t	Tempo	dia
x	Posição radial na ferida	cm

Tabela 15. Descrição dos parâmetros do modelo (39).

Parâmetros	U
D_b Coeficiente de difusão do quimioatratante	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
D_p Coeficiente de difusão da densidade do brota - mento distal	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
χ Taxa de quimiotaxia (Anderson & Chaplain, 1998)	$\text{cm}^2 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \text{pg}^{-1}$
λ_m Taxa de produção do VEGF pelos monócitos	$\mu\text{m}^{-2} \text{mm}^3 \text{pg cell}^{-1} \text{dia}^{-1}$
λ_b Taxa de decaimento da produção do VEGF	dia^{-1}
λ_{bp} Taxa de crescimento do brotamento distal em resposta a fatores angiogênicos produzidos pelas células inflamatórias	$\text{U mm}^3 \mu\text{m}^{-2} \text{cell}^{-1} \text{dia}^{-1}$
λ_p Taxa de decaimento do brotamento distal	dia^{-1}

Então, o modelo matemático proposto é dado por:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial n}{\partial t} = D_N \nabla^2 n + \frac{\chi n c}{\left(1 + \frac{g}{\beta_{gc}}\right)} - \nu \frac{\left(1 + \frac{g}{\beta_g}\right)}{\left(1 + \frac{c}{\beta_c}\right)} n, \end{array} \right. \quad (39a)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{da}{dt} = \nu n \frac{\left(1 + \frac{g}{\beta_g}\right)}{\left(1 + \frac{c}{\beta_c}\right)} - \gamma_a a - \phi m a, \end{array} \right. \quad (39b)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial m}{\partial t} = D_N \nabla^2 m + \chi_m c - \gamma_m m, \end{array} \right. \quad (39c)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial c}{\partial t} = D_C \nabla^2 c + \alpha F(t) + k_n \left(\frac{n^2}{\beta_n^2 + n^2} \right) + \gamma_a k_a \left(\frac{a^2}{\beta_a^2 + a^2} \right) - \gamma_c c + \\ \quad + k_m \left(\frac{m^2}{\beta_m^2 + m^2} \right), \end{array} \right. \quad (39d)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial g}{\partial t} = D_C \nabla^2 g + k_g \phi m a - \gamma_g g, \end{array} \right. \quad (39e)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial b}{\partial t} = D_b \nabla^2 b + \lambda_m (m + n) - \lambda_b b, \end{array} \right. \quad (39f)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial p}{\partial t} = D_p \nabla^2 p - \chi \frac{\partial}{\partial x} \left(p \frac{\partial b}{\partial x} \right) + \lambda_{bp} (m + n) - \lambda_p (p - p_3). \end{array} \right. \quad (39g)$$

As condições iniciais são todas nulas, ou seja, $n(x, 0) = a(x, 0) = m(x, 0) = c(x, 0) = g(x, 0) = b(x, 0) = p(x, 0) = 0$ com $x \in [0, 1]$. As condições da fronteira à esquerda, que são condições de Neumann, são dadas por $n_x(0, t) = a_x(0, t) = m_x(0, t) = c_x(0, t) = g_x(0, t) = b_x(0, t) = p_x(0, t) = 0$. As condições da fronteira à direita são de Dirichlet e estão apresentadas a seguir, para $x \in \mathbb{R}$:

$$\begin{aligned} n(L = 1, t) &= 0,2p_1^2 \frac{(t + q_1)}{(t^2 + r_1^2)}, & a(L = 1, t) &= 0,5n(L = 1, t), \\ m(L = 1, t) &= 0,4p_1^2 \frac{(t + q_1)}{(t^2 + r_1^2)}, & c(L = 1, t) &= p_2 \exp^{-\left(\frac{t - q_2}{r_2}\right)^2}, \\ g(L = 1, t) &= p_2 \exp^{-\left(\frac{t - q_2}{r_2}\right)^2}, & b(L = 1, t) &= p_3 \exp^{-\left(\frac{t - q_3}{r_3}\right)^2}, \\ p(L = 1, t) &= p_3 \frac{t}{q_3 + t}. \end{aligned}$$

As funções $b(1, t)$ e $p(1, t)$ foram obtidas por regressão não linear através dos dados laboratoriais do VEGF e do brotamento distal na borda da ferida (fronteira à direita do modelo) apresentados nas Figuras 14 e 15, respectivamente. A função gaussiana modelou com precisão os dados do quimiotático VEGF, pois esse deve retornar ao valor basal da pele (próximo de zero) após a resolução do processo de cicatrização, sendo que para os dados do brotamento distal utilizamos a função de Michaelis-Menten, pois os valores basais dos vasos sanguíneos da pele não se aproximam de zero mas sim de um valor limiar (Pettet et al., 1996a). Os valores das constantes estão apresentados na Tabela 16 e os gráficos das funções, para os quatro tratamentos, estão ilustrados nas Figuras 58-65 juntamente com os dados empíricos ilustrados pelos asteriscos.

Tabela 16. Constantes das funções fronteira de Dirichlet para concentração do quimiotático, $b(1, t)$, e densidade das pontas capilares, $p(1, t)$.

		p_3	q_3	r_3
10% OR	Concentração do quimiotático	$3,199 \times 10^4$	18,44	8,19
	Densidade das pontas capilares	25,21	7,54	—
10% EH	Concentração do quimiotático	$3,716 \times 10^4$	19,31	8,50
	Densidade das pontas capilares	26,2	7,84	—
Creme Lanette	Concentração do quimiotático	$1,951 \times 10^4$	15,5	6,78
	Densidade das pontas capilares	16,99	4,19	—
Colagenase	Concentração do quimiotático	$2,293 \times 10^4$	16,23	7,03
	Densidade das pontas capilares	18,08	4,03	—

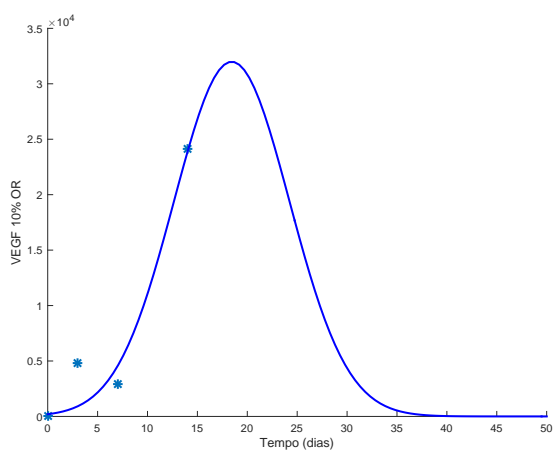


Figura 58: Ilustração do gráfico da função $b(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% OR.

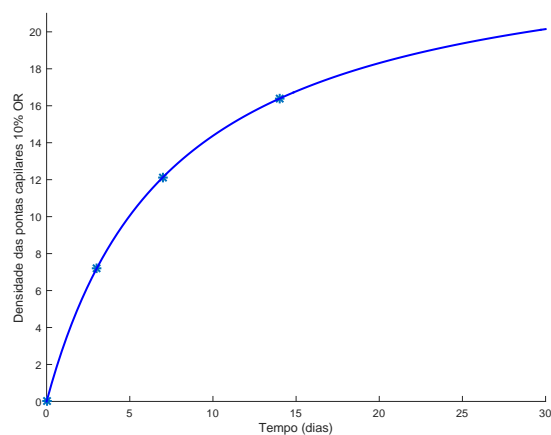


Figura 59: Ilustração do gráfico da função $p(1, t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% OR.

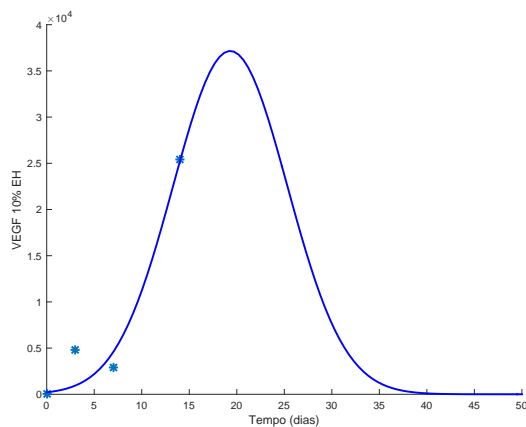


Figura 60: Ilustração do gráfico da função $b(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% EH.

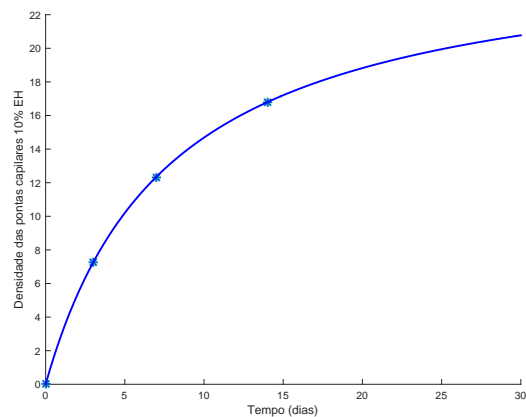


Figura 61: Ilustração do gráfico da função $p(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para 10% EH.

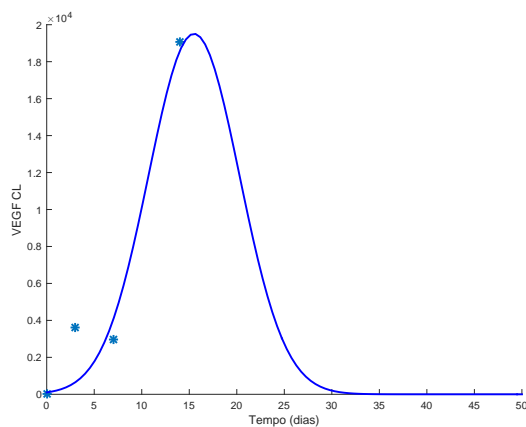


Figura 62: Ilustração do gráfico da função $b(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para CL.

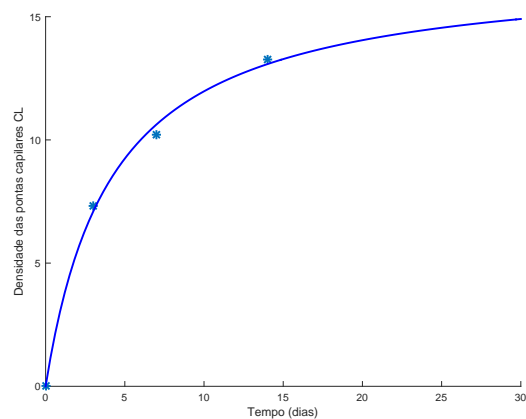


Figura 63: Ilustração do gráfico da função $p(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para CL.

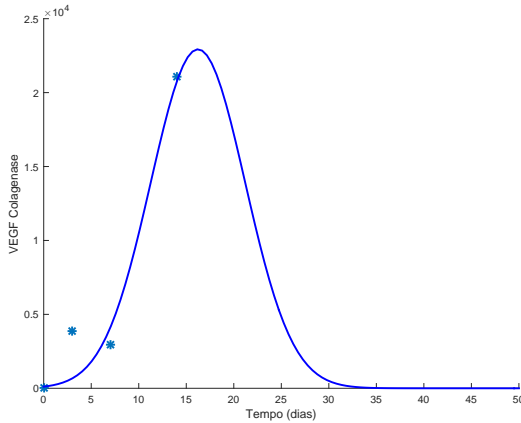


Figura 64: Ilustração do gráfico da função $b(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para Colagenase.

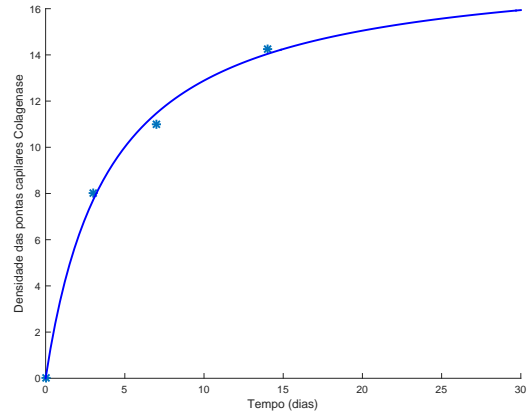


Figura 65: Ilustração do gráfico da função $p(1,t)$ da fronteira de Dirichlet para Colagenase.

4.2 Resultados

Os valores dos novos parâmetros do modelo foram obtidos por regressão não linear, através da ferramenta *lsqnonlin* do Matlab/Octave, considerando como condição inicial para os parâmetros os valores fornecidos nos artigos, ou seja, D_b , λ_m e λ_b foram extraídos de Schugart et al. (2008) e D_p , χ , λ_{bp} e λ_p de Pettet et al. (1996a). Obtivemos os valores $D_b = 10^{-2}$, $D_p = 6 \times 10^{-13}$, $\chi = 6 \times 10^{-9}$, $\lambda_b = 4 \times 10^{-5}$, $\lambda_p = 2 \times 10^{-4}$ para os quatro tratamentos, $\lambda_{bp} = 4,4 \times 10^{-4}$ para 10% OR e 10% EH, $\lambda_{bp} = 4,2 \times 10^{-4}$ para CL e $\lambda_{bp} = 3,55 \times 10^{-4}$ para Colagenase, $\lambda_m = 1,584$ para 10% OR, $\lambda_m = 1,69$ para 10% EH, $\lambda_m = 0,905$ para CL e $\lambda_m = 1,0275$ para Colagenase. Assim, temos a mesma taxa de difusão do VEGF, D_b , e dos brotamentos distais, D_p ; as mesmas taxas de decaimento λ_b e λ_p e a mesma taxa de quimiotaxia χ para os quatro tratamentos. Os únicos parâmetros que diferenciam a dinâmica do quimiotático e dos brotamentos distais, nos tratamentos, são a taxa de produção do VEGF, λ_m , e a taxa de produção do brotamento distal, λ_{bp} .

Verificamos que a difusão (coeficiente D_p) do brotamento distal é insignificante quando comparado ao da quimiotaxia (coeficiente χ), ou seja, o processo

de quimiotaxia é preponderante na formação e no direcionamento dos novos capilares (Pettet et al., 1996a).

Os resultados obtidos por meio de simulações numéricas reproduzem apenas a progressão normal da cicatrização da ferida e, então, para a dinâmica da produção do VEGF, estão apresentados nas Figuras 66-69 e para a dinâmica da produção do brotamento distal temos as ilustrações nas Figuras 70-73 para os quatro tratamentos. Analisando a dinâmica dos resultados numéricos da densidade do brotamento distal dos capilares temos o desenvolvimento de uma faixa densa de capilares próximo a borda direita da ferida, fato que está diretamente relacionado à densidade celular (neutrófilos no leito da ferida e macrófagos na borda) esse fenômeno é conhecido como *brush-border effect* (Pettet et al., 1996a). Comportamento análogo ocorre na concentração do VEGF.

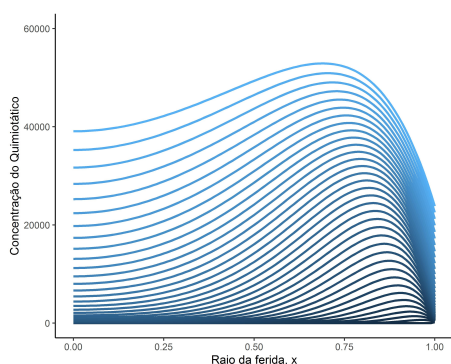


Figura 66: Ilustração da dinâmica da concentração de VEGF, no leito da ferida, para o tratamento 10% OR.

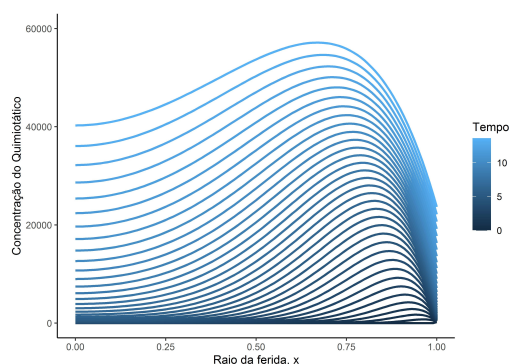


Figura 67: Ilustração da dinâmica da concentração de VEGF, no leito da ferida, para o tratamento 10% EH.

Utilizando os valores dos dados laboratoriais na fronteira da ferida, para o VEGF e o brotamento distal, o modelo estimou os valores de ambas as medições no centro da ferida no dia 14 com todos os resultados pertencentes ao intervalo (média \pm desvio padrão) (Gushiken, 2017). Então, concluímos que o modelo possibilita a redução dos experimentos uma vez que não é necessário as medições no centro da ferida. As predições do modelo (39) estão apresentadas na Tabela 17. O

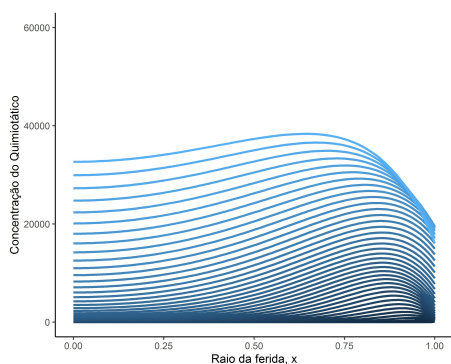


Figura 68: Ilustração da dinâmica da concentração de VEGF, no leito da ferida, para o tratamento CL.

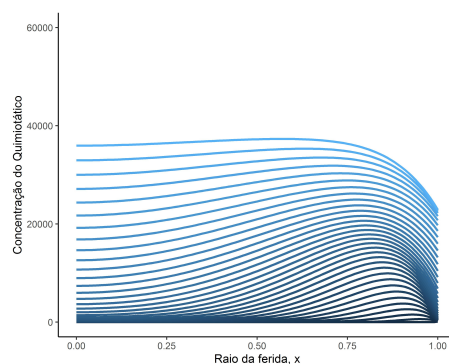


Figura 69: Ilustração da dinâmica da concentração de VEGF, no leito da ferida, para o tratamento Colagenase.

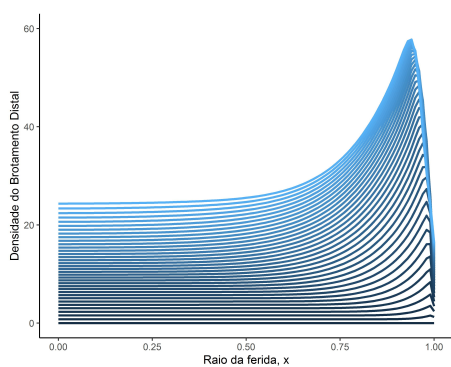


Figura 70: Ilustração da densidade brotamento distal, no leito da ferida, para o tratamento 10% OR.

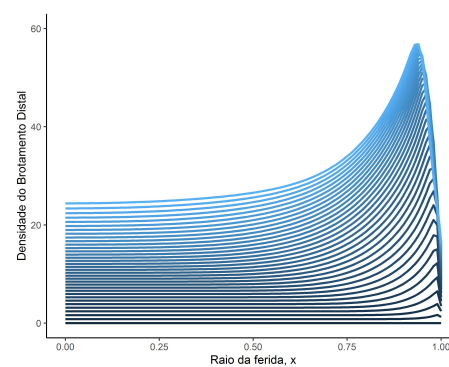


Figura 71: Ilustração da densidade brotamento distal, no leito da ferida, para o tratamento 10% EH.

tempo de cicatrização da ferida, para os quatro tratamentos, permanecem os mesmos do capítulo 3, pois não houve alterações nas equações (39a)-(39e).

A análise dos resultados numéricos possibilitou melhor entendimento da evolução do VEGF e do brotamento distal das células endoteliais no leito da ferida e evidenciou como o balanceamento entre quimiotaxia, a proliferação e redução dos vasos sanguíneos alteraram a estrutura da propagação da unidade de cicatrização.

O modelo corrobora com os resultados apresentados na literatura,

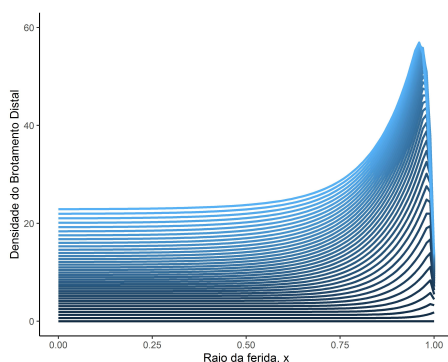


Figura 72: Ilustração da densidade brotamento distal, no leito da ferida, para o tratamento CL.

posto que exemplificou a relação entre o processo inflamatório e a angiogênese, ou seja, os vasos sanguíneos recém formados permitem o recrutamento de células inflamatórias as quais liberam uma variedade de citocinas pró-angiogênicas (Kim et al., 2013).

O tempo máximo de evolução da dinâmica utilizado foi de $t = 20$ dias para os quatro tratamentos, pois o tempo de cicatrização foi de, aproximadamente, 14, 18 e 16 dias, para os tratamentos a base de copaíba, CL e Colagenase, respectivamente.

Tabela 17. Resultados numéricos estimados pelo modelo (39) para VEGF, b , e brotamento distal dos capilares, p , no centro da ferida.

	10% OR	10% EH	CL	Colagenase
VEGF	40720,86	41131,79	34263,86	38013,96
Brotamento distal	24,76	24,6	23,45	22,02

Enfatizamos que a redução na densidade do brotamento distal devido a anastomose pode ser modelado pela inserção do termo dependendo de $-p^2$ na equação (39g) possibilitando a reprodução mais realística dos dados *in vivo* (Flegg et al., 2015, 2012; Pettet et al., 1996a,b). Também destacamos que o modelo pode ser estendido

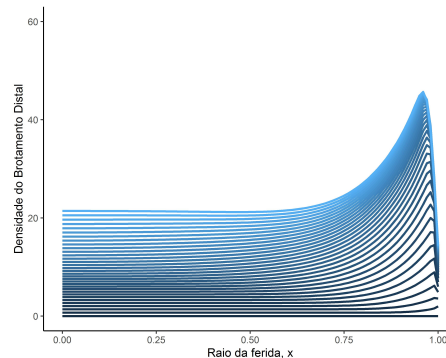


Figura 73: Ilustração da densidade brotamento distal, no leito da ferida, para o tratamento Colagenase.

pela inclusão de diferentes mecanismos biológicos, como por exemplo, a concentração de oxigênio ou a densidade dos vasos sanguíneos, no entanto evidenciamos que nosso modelo apresenta aspectos para incorporar características da angiogênese. Além de que a inserção de novos processos aumentaria o grau de dificuldade na obtenção dos resultados numéricos.

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.

DEROSSI, 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.

KREGGER, 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.

MORESKI, 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.

RITTIÉ, 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.