

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 27/08/2023.



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho" INSTITUTO DE  
BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

LUCAS FERNANDO SÉRGIO GUSHIKEN

**Avaliação do potencial cicatricial de formulações tópicas contendo  $\beta$ -  
cariofileno em lesões cutâneas de ratos**

**Botucatu – SP**

**2021**



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



LUCAS FERNANDO SÉRGIO GUSHIKEN

## **Avaliação do potencial cicatricial de formulações tópicas contendo $\beta$ - cariofileno em lesões cutâneas de ratos**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon

**Botucatu – SP**

**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

Gushiken, Lucas Fernando Sérgio.

Avaliação do potencial cicatricial de formulações tópicas contendo  $\beta$ -cariofileno em lesões cutâneas de ratos / Lucas Fernando Sérgio Gushiken. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Cláudia Helena Pellizzon

Capes: 90300009

1. Pele - Doenças. 2. Cicatrização. 3. Fabaceae.  
4. Copaíba. 5. Plantas medicinais.

Palavras-chave:  $\beta$ -cariofileno; Carreadores lipídicos nanoestruturados; Cicatrização; *Copaifera langsdorffii*; Pele.

LUCAS FERNANDO SÉRGIO GUSHIKEN

**Avaliação do potencial cicatricial de formulações tópicas contendo  $\beta$ -cariofileno em lesões cutâneas de ratos**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor.

Aprovado em 15/07/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

1º Titular/Presidente

Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon (IBB/UNESP)

---

2º Titular

Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo (IBTEC/UFU)

---

3º Titular

Dr. Fernando Pereira Beserra (FCFRP/USP)

---

4º Titular

Profa. Dra. Leônia Maria Batista (CCS/UFPB)

---

5º Titular

Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari (FCFRP/USP)

## **AUXÍLIO FINANCEIRO:**

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)



*"Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto. Quando você faz uma descoberta – mesmo se você for a última pessoa na Terra a ver a luz – você jamais vai se esquecer."*

Carl Sagan

# *Dedicatória*

Aos meus pais, Paulo e Isabel, e minha irmã Paula, que sempre me apoiaram em minhas escolhas pessoais e profissionais, sendo meu alicerce, meu refúgio, minha inspiração e fortaleza. Que um dia eu consiga fazer jus a todo o amor, carinho e força que vocês sempre me deram.

A cada homem e mulher que dedicaram e dedicam suas vidas para o conhecimento científico, em prol da melhoria na qualidade de vida e desenvolvimento das futuras gerações.

# *Agradecimentos*

Durante minha graduação em Ciências Biomédicas, li certa vez uma frase de Isaac Newton que me marcou: *“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”*. Nenhuma pessoa jamais está só ou realiza algo por si mesma. Cada indivíduo traz consigo o legado de todos que já passaram por sua vida. Por isso, chego ao final de meu doutorado ao escrever esta tese certo de que fui ajudado por muitos. Sendo assim, gostaria de agradecer a todos aqueles que me ajudaram a concluir mais esta etapa de minha vida.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu pai Paulo Gushiken, minha maior inspiração e motivação para prosseguir na carreira acadêmica. Mesmo com tantos exemplos famosos na área de ciências biológicas, reafirmo em ti minha maior inspiração. Homem simples, de cidade pequena, tendo apenas concluído o ensino médio, para mim você sempre foi “o cara” mais sábio. Desde pequeno, você tinha todas as respostas na ponta da língua. Quando cresci, acabamos nos tornando muito mais que pai e filho, nos tornamos melhores amigos. Contigo aprendi a amar os esportes, principalmente o futebol e nosso Palmeiras. Escutávamos juntos os jogos pelo rádio, assistíamos e sofriamos na televisão. Contigo aprendi a debater ciência, política, economia, filosofia. E como passávamos horas debatendo, mesmo já tendo saído de Tupã, com chamadas de mais de uma hora pelo celular. Foi você que me ensinou a contestar tudo, a buscar mais informações, formar minha própria opinião. Adquiri meu gosto cada vez maior pelo conhecimento por sua “culpa”. E quando decidi seguir a carreira acadêmica e desistir de medicina, você e a mãe foram as duas pessoas que mais me apoiaram. Homem irônico e boêmio, contigo também aprendi a viver a vida sem tanta preocupação ou me importando com o que os outros venham a pensar sobre mim...uma filosofia do *“carpe diem”* de quem não apenas veio a este mundo para sobreviver, mas sim para viver plenamente. Então, um dia, sem mais nem menos, você se foi. Achei que tivesse perdido para sempre meu melhor amigo. Fiquei com raiva, indignado, sentindo-me sozinho. Demorou um tempo para que você me ensinasse uma última lição: de que você nunca me deixou, nem nunca deixará. O ser humano que sou hoje teve influência do seu legado. Eu carrego seu legado. Por isso você sempre estará comigo. Por isso essa tese também é sua, assim como todas as minhas conquistas. Enquanto eu viver, você também viverá através de mim. Assim como diz Fernando Anitelli na música “O anjo mais velho”, *“...só enquanto eu respirar, vou me lembrar de você, só enquanto eu respirar...”*. Te amo e sempre te amarei, pai. Muito obrigado por tudo e estou certo de que nos encontraremos novamente um dia.

Um agradecimento especial também à minha mãe Isabel Cristina Sérgio Gushiken, pelo amor infinito e apoio incondicional em todas as decisões que tomei até hoje. Falar de nossas mães é sempre piegas, afinal mães são seres especiais. Sofremos juntos, sorrimos juntos. Você sempre esteve comigo durante todos os momentos, mesmo aí em Tupã, pois sempre trarei você em meu coração e mente até meu último dia. Exemplo de fortaleza e a pessoa mais esforçada e batalhadora que já conheci na vida, passando fome muitas vezes quando pequena, trabalhando desde criança para ajudar o vô e a vó, andando e pedalando quilômetros para estudar. Pessoa que tenho como referência de esforço, não havendo um só dia que acorde sem motivação ao lembrar das histórias pelas quais você passou. Minha formatura do colegial também foi a sua formatura, minha graduação em biomedicina também foi sua, meu mestrado e agora o doutorado também são seus. Fica até difícil colocar em palavras o que você significa pra mim. Creio que não existam tantas letras, palavras, gramática para isso. Mãe, essa tese é mais uma das nossas realizações, mais uma das nossas conquistas. Mas saiba que o amor e a admiração sua e do pai sempre serão as minha maiores realizações. Te amo, mãe.

À minha irmã Paula, por todo o amor, carinho, companheirismo, compreensão que sempre teve comigo. Brigávamos muito quando pequenos, você hiperativa e desorganizada, eu introvertido e metódico. Mas você sempre estava lá quando eu precisava. Quando adultos, nos unimos e nos tornamos bons amigos, cúmplices. Nem sempre estive próximo para comemorar suas conquistas, ou te apoiar e dar carinho nos momentos difíceis, mas sempre estava mandando todo o meu amor e positividade de longe. Contudo, nem precisaria te apoiar tanto assim, pois você se tornou uma mulher forte, trabalhadora, decidida, objetiva e que tenho um imenso orgulho. Você cuidou e continua cuidando de mim até hoje. Saiba que confio em ti e que pode contar comigo sempre. Beijos e abraços do fundo do coração de um irmão que não sabe muito bem demonstrar o carinho tamanho que sente pela irmã mais nova, mas que te ama muito.

À querida Tia Sônia, minha “segunda mãe”, também dedico mais essa conquista. Uma pessoa maravilhosa, que tive a sorte de ter em minha vida. Parente não de sangue, mas que a Paula e eu aprendemos a amar e respeitar como nossa “segunda mãe”. Sem seus cuidados, dedicação e imenso zelo para cuidar de mim desde bebê, eu certamente não teria mais essa conquista. Sempre vou me lembrar da senhora em todas as minhas realizações e conquistas, Tia Sônia.

À minha namorada Juliana Magri, por ter sido a única mulher a me aturar. Ironia à parte, não consigo descrever o quanto eu preciso agradecê-la por todo o amor, carinho, afeto, companheirismo e cumplicidade nesses dois anos. Você sabe que não acredito em destino, mas que “maravilhoso acaso” foi trabalhar em Bauru, pois foi assim que conheci uma mulher forte,

decidida, esforçada e inteligente que escolheu estar ao meu lado. Pode ter certeza que teremos muitas fotos mais em nosso “livro de aventuras”, que você vai guardar ainda mais pétalas de flores que te dou, que vamos limpar ainda mais a casa com nosso TOC por limpeza. Te amo, Juliana.

À Professora Doutora Cláudia Helena Pellizzon, tenho tantos agradecimentos que não sei ao certo por onde começar. Primeiramente, agradeço-lhe como minha orientadora por todos os ensinamentos acadêmicos-científicos. Foi você, chefe, que me ensinou tudo o que sei sobre pesquisa e ensino. Por outro lado, creio que há alguns bons anos já temos uma relação maior que orientadora-aluno, mas de amigos. Quer seja partilhando nosso pessimismo em relação à política nacional, conversando sobre Star Wars ou compartilhando um gosto “peculiar” por café expresso sem açúcar, tive a sorte de encontrar uma amiga excepcional. Muito mais que fatores de impacto elevadíssimos e índices H estratosféricos, jamais esquecerei sua sensibilidade e humanidade durante o momento mais difícil de minha vida. Nem todos os artigos do mundo me farão esquecer todas as vezes que tive crises de ansiedade e você me levava ao médico, até mesmo no meio da noite. Quando me perguntam o motivo de eu nunca ter mudado de orientadora, saiba Professora Cláudia, que tenho sempre a resposta na ponta da língua: porque muito mais que uma profissional fantástica, eu sempre tive como “chefe” um ser humano fantástico. Isso, para mim, é o mais importante.

Agradecer também aos meus avós, tios, tias, primos e primas da família Sérgio; em especial àqueles que estive mais próximo: avô Antônio, avó Armelinda, tio Fran, tia Olga, tia Conceição, tia Tereza, tia Valéria, tio Ademir, tio Carlos, tio Toninho, tia Clizeide, Rafael, Rebeca, Leonardo, “tata” Érica, Maiara, Welington, Yan, Lorena e Lisieh. Vocês sempre ajudaram em minha formação pessoal e profissional, me apoiando em todos os momentos difíceis e comemorando meus sucessos desde a infância. Todas as minhas realizações também são de vocês.

Aos meus tios, tias, primos e primas da família Gushiken; especialmente tia Kinuye e tia Izaura, tio Ruy, tia Youko, tio Takechi, tio Makoto, tia Izilda, tio Noboru, tia Akiko, Haroldo, Eliane, Makotinho, Ana Laura e Ana Carolina; com quem tive mais contato. Tenham certeza que todos da família fazem parte dessa conquista. Vocês foram, são e sempre serão parte de mim e, enquanto eu viver, tentarei passar a diante todo o legado que vocês me passaram.

A todos os professores, funcionários e colegas do colégio Objetivo de Tupã onde estudei dos cinco aos 18 anos. Sempre vou me lembrar com carinho dos meus momentos no colégio Objetivo de Tupã e todos com quem pude partilhar momentos maravilhosos durante quase

quatorze anos. Se me apaixonei pelos estudos, conhecimento e ciência, foi por vocês terem proporcionado as melhores condições para tal.

Aos meus queridos amigos Lucas Costa Yoshinaga da Silva, João Rafael Petrillo Obregon e Nathan Guastalli Andriani. Sou muito grato a vocês pela grande amizade desde a infância, compartilhando momentos engraçados e “nerdisses” como o hovercraft, violão e canto no fundo da sala de aula e jogatina de Nintendo DS. Meus queridos amigos, vocês sempre estarão em todas as recordações de uma parte tão feliz de minha vida e sempre desejarei toda a felicidade do mundo a vocês, mesmo à distância.

À Roseli e José Bardella e família, pela maravilhosa receptividade, atenção e cuidado que tiveram comigo quando era um recém-chegado “perdido” em Botucatu. Espero que um dia possa retribuir todo o carinho e ajuda com as caronas, conselhos sobre a cidade e auxílio para encontrar um bom apartamento.

Meu muito obrigado também a todos os professores do Instituto de Biociências de Botucatu durante minha graduação e pós-graduação. Em um país que desvaloriza e, por vezes, discrimina cientistas e professores, foram a paciência e qualidade na transmissão do conhecimento de todos os meus professores do IBB que me proporcionaram bom conhecimento técnico para prosseguir na carreira acadêmica.

A todos os colegas do Laboratório de Experimentação em Produtos Naturais (LEPN), Fernando Beserra, Maria Fernanda, Mariana Conceição, Murilo Gonzaga, Marina Miyashita, Rafaella Bergstrom, André Felipe e Mariana Oliveira. É até injusto ter somente meu nome nessa tese, pois ela também pertence a cada um de vocês. Vocês estavam comigo desde os momentos de “brainstorming”, quando eu ficava alucinado querendo fazer todos os experimentos que ainda nem tinham sido inventados; até botar a mão na massa sem medo nem preguiça, lavando caixas de ratos, ficando até as 20 horas com análises de ELISA ou enzimas de estresse oxidativo...e que estresse. Muito obrigado a todos. Logicamente teria um adendo para o Fernando, ou melhor Tocantins; um grande amigo que tive a felicidade de ter como colega de laboratório, quem eu me orgulho de dizer que tenho como exemplo de dedicação, conhecimento e intelecto. Você me ajudou muito durante meu caminho na pós-graduação, Toca. Posso sem dúvidas escrever que você é um de meus exemplos.

Aos servidores técnico-administrativos do IBB, especialmente Renata e Nivaldo (seção de graduação), Davi (seção de pós-graduação), Murilo e Cláudia (diretoria técnica de informática) e todos os servidores do STAEPE e ERAPI. Minha graduação, mestrado e doutorado só foram possíveis graças ao esforço e trabalho incessante de todos.

Aos queridos companheiros do Encontro Nacional de Biomedicina com quem pude trabalhar entre os anos de 2011 a 2016, por todo o companheirismo e aprendizado do trabalho em grupo. Minha participação no ENBM e convivência com todos vocês possibilitou um crescimento pessoal que nunca imaginaria nos primeiros anos de faculdade. Por isso, sempre serei muito grato aos meus veteranos, colegas e pupilos do ENBM.

Aos servidores do departamento de Morfologia do IBB, Luciana, José Eduardo, Vivian, Ricardo, Keila, Helton e Renato; pelo constante auxílio e em todos os momentos de necessidade em meus experimentos, desde o biotério, técnicas de preparo de amostras para microscopia, coloração de lâminas e preparo de soluções.

Aos Professores Luis Fernando Barbisan, Rafael Henrique Nóbrega, Carlos Alberto Hussni e Dr. Emanuel Ricardo Monteiro Martinez, por terem me ensinado as técnicas cirúrgicas, morfométricas, histoquímicas e moleculares para a realização do meu projeto de doutorado, bem como terem cedido equipamentos e materiais para a realização dos experimentos.

Aos meus três primeiros professores no ambiente laboratorial Marta Sarzi, Victor Souza e Florian Fontana, pelos ensinamentos técnicos e cuidados em relação ao trabalho em laboratório de histologia e, principalmente, pelas maravilhosas conversas e conselhos sobre a Unesp.

A todos os colegas do departamento de Morfologia, principalmente Gabriel Bacil, Guilherme Romualdo e equipe do Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental, pela constante ajuda com uso de equipamentos e materiais para a realização de meus experimentos, troca de informações científicas e todas as conversas nerds sobre futebol, HQs e Star Wars. Essa tese certamente não teria sido finalizada sem a participação de vocês, meus amigos.

A todos os loucos da República Ninguém Sai e agregados, nunca cansaria de agradecer-los por todos os momentos que vivemos, Arthur “Vidente”, Chico “Preserva”, Samuel “Pé de pano”, Richard “Francês”, Roney “Perobo”, Thiago “Nordestino”, Aron “Mamik”, Felipe “Pirulitão”, Ângelo “Tilambu”, Fernando “Mikey”, Mauro Chiozzi, Gustavo “Gus”, Angelo “Italiano”, Chiara “Italiana”, Eric “Mexicano”, Fernando “Leitinho”, Caio “Sem pele”, Reymar “Boliviano”, Laura, Cotô, Amanda, Meri, Giselle, Rocio, Toguê, Felipe “Raj”, Vinicius “UFC” e tantos outros que passaram pela casa. Esses dez anos que estou em Botucatu, na Unesp tem essa tese como fim. Mas eu sigo um modo de pensar que diz: *“tão importante quanto o término, são os meios que você utiliza para chegar ao fim”*. Vocês todos são parte desse “meio”, estando presentes em todas as minhas dificuldades e comemorando comigo todos os momentos felizes...e como vocês fizeram vários momentos serem felizes. Saí de casa aos dezoito anos

como um adolescente imaturo, deixando pai, mãe e irmã – minha família de sangue – para construir o que jamais pensei ser capaz: uma família de alma. Família sim, pois mesmo eu sendo antissocial e pouco emotivo, posso dizer sem qualquer dúvida, que vocês são parte da minha vida e que hoje sou um pouco melhor como biomédico, pesquisador e ser humano graças a vocês.

Também gostaria de agradecer ao Instituto de Biociências de Botucatu/Unesp, instituição pela qual tenho enorme carinho, pois foi minha “segunda casa” desde 2011 e que forneceu as melhores condições para meu desenvolvimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que forneceu minha bolsa de estudos de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento da pesquisa que originou o projeto de doutorado com os processos 2011/13630-7, 2017/17600-1 e 2017/04138-8.

Tantos para agradecer que tenho até receio de se injusto. Todas as pessoas e instituições citadas acima foram essenciais para a conclusão dessa tese, mas gostaria de agradecer a todos que já passaram pela minha vida. Todos sem distinção. Se hoje me tornei aquilo que sou, se finalizei essa tese, tudo foi consequência de todas as pessoas que passaram pela minha vida, todas as situações que me aconteceram, boas ou ruins. Agora, iniciarei outra jornada, conhecerei mais pessoas e passarei por novas experiências. Terei ainda mais pessoas e motivos para ser grato.

## PRÓLOGO

O projeto de doutorado possibilitou o aprimoramento técnico e científico do aluno na área de “Biotecnologia”, subárea “biotecnologia aplicada à saúde humana e animal”, mediante estudos *in vivo* de atividade cicatricial do  $\beta$ -cariofileno e do óleo-resina de copaíba. Durante o período do doutorado, o aluno realizou as seguintes produções acadêmico-científicas:

### Artigos completos publicados em periódicos científicos

1. **Gushiken, Lucas Fernando Sérgio**; Beserra, Fernando Pereira; Bastos, Jairo Kenupp; Jackson, Christopher John; Pellizzon, Cláudia Helena. Cutaneous Wound Healing: An Update from Physiopathology to Current Therapies. *Life*, v. 11, p. 665, 2021.
2. De Oliveira, Marta H; **Gushiken, Lucas F S**; Pellizzon, Cláudia H; Mancera, Paulo F A. Mathematical modelling, parameter estimation and computational simulation for skin wound healing under *Copaifera langsdorffii* treatments. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, v. 199, p. 105915, 2021.
3. Pereira Beserra, Fernando; **Gushiken, Lucas Fernando Sérgio**; Vieira, Ana Júlia; Augusto Bérghamo, Danilo; Luísa Bérghamo, Patrícia; Oliveira de Souza, Mariana; Alberto Hussni, Carlos; Kiomi Takahira, Regina; Henrique Nóbrega, Rafael; Monteiro Martinez, Emanuel Ricardo; John Jackson, Christopher; Lemos de Azevedo Maia, Gabriela; Leite Rozza, Ariane; Helena Pellizzon, Cláudia. From inflammation to cutaneous repair: topical application of lupeol improves skin wound healing in rats by modulating the cytokine levels, NF- $\kappa$ B, Ki-67, growth factor expression, and distribution of collagen fibers. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, p. 4952, 2020.
4. Pessin, Adriana Bueno Benito; Martins, Regina Helena Garcia; **Gushiken, Lucas Fernando Sérgio**; Pellizzon, Cláudia Helena. Sectorial analysis of the fibrous matrix of vocal folds in the elderly. *Journal of Voice*, v. -, p. S0892-1997(20)3, 2020.
5. Kauer, Débora Perrone; Alonso, Juliana De Moura; **Gushiken, Lucas Fernando Sérgio**; Lemos, Marivane; Padovani, Carlos Roberto; Rodrigues, Celso Antonio; Alves, Ana Liz Garcia; Watanabe, Marcos Jun; Bastos, Jairo Kenupp; Pellizzon, Cláudia Helena; Hussni,

Carlos Alberto. Experimental skin wound treatment with *Copaifera langsdorffii* Desf Kuntze (Leguminosae) extract and oil-resin in horses. *Brazilian Journal Veterinary Res. and Animal Science*, v. 57, p. E166095, 2020.

6. Beserra, Fernando Pereira; **Gushiken, Lucas Fernando Sérgio**; Hussni, Maria Fernanda; Ribeiro, Victor Pena; Bonamin, Flávia; Jackson, Christopher John; Pellizzon, Cláudia Helena; Bastos, Jairo Kenupp. Artepillin C as an outstanding phenolic compound of Brazilian green propolis for disease treatment: a review on pharmacological aspects. *Phytoterpy Research*, v. 2020, p. 1-13, 2020.

7. Beserra, Fernando Pereira; Vieira, Ana Júlia; **Gushiken, Lucas Fernando Sérgio**; De Souza, Eduardo Oliveira; Hussni, Maria Fernanda; Hussni, Carlos Alberto; Nóbrega, Rafael Henrique; Martinez, Emanuel Ricardo Monteiro; Jackson, Christopher John; De Azevedo Maia, Gabriela Lemos; Rozza, Ariane Leite; Pellizzon, Cláudia Helena. Lupeol, a dietary triterpene, enhances wound healing in streptozotocin-induced hyperglycemic rats with modulatory effects on inflammation, oxidative stress, and angiogenesis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, p. 1-20, 2019.

8. Costa, Philipe; Somensi, Lincon Bordignon; Da Silva, Rita De Cássia Melo Vilhena De Andr; Mariano, Luísa Nathalia Bolda; Boeing, Thaise; Longo, Bruna; Perfol, Ellen; De Souza, Priscila; **Gushiken, Lucas Fernando Sérgio**; Pellizzon, Cláudia Helena; Rodrigues, Débora Munhoz; Bastos, Jairo Kenupp; De Andrade, Sérgio Faloni; Da Silva, Luísa Mota. Role of the antioxidant properties in the gastroprotective and gastric healing activity promoted by Brazilian green propolis and the healing efficacy of Artepillin C. *Inflammopharmacology*, v. 28, p. 1009-1025, 2019.

9. Kemper, Bernardo; Brandão, Cláudia V S; Rossetto, Victor J V; **Gushiken, Lucas F S**; Padovani, Carlos R; Pellizzon, Claudia H. Autologous and homologous skin grafts treated with platelet-rich plasma (PRP): experimental study in rabbits. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 38, p. 1818-1823, 2018.

10. Souza, M O; **Gushiken, L F S**; Beserra, F P; Pellizzon, C H. Evaluation of the gastroprotective and antioxidant effects of caffeine and caffeic acid on ethanol-induced gastric ulcer. *JSM Hepatitis*, v. 2, p. 1-5, 2017.

11. **Gushiken, Lucas Fernando Sérgio**; Hussni, Carlos Alberto; Bastos, Jairo Kenupp; Rozza, Ariane Leite; Padovani, Carlos R; Takahira, Regina K; Pellizzon, Cláudia Helena. Hydroalcoholic extract from *Copaifera langsdorffii* has skin wound healing activity in rats. International Journal of Complementary and Alternative Medicine, v. 6, p. 00178, 2017.

12. **Gushiken, Lucas Fernando Sérgio**; Hussni, Carlos Alberto; Bastos, Jairo Kenupp; Rozza, Ariane Leite; Beserra, Fernando Pereira; Vieira, Ana Júlia; Padovani, Carlos Roberto; Lemos, Marivane; Polizello Junior, Maurilio; Silva, Jonas Joaquim Mangabeira Da; Nóbrega, Rafael Henrique; Martinez, Emanuel Ricardo Monteiro; Pellizzon, Cláudia Helena. 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, 2017.

### **Capítulos de livros publicados**

1. Beserra, F P; **Gushiken, L F S**; Hussni, M F; Pellizzon, C H. Regulatory mechanisms and chemical signaling of mediators involved in the inflammatory phase of cutaneous wound healing. In: Kamil Hakan Dogan. (Org.). Wound Healing - Current Perspectives. 4ed. London: IntechOpen, 2018, p. 1-19.

### **Trabalhos apresentados em eventos científicos**

1. Oliveira, Marta H; Pellizzon, Cláudia H; **Gushiken, Lucas Fernando Sérgio**; Mancera, Paulo F A. Modelagem matemática da difusão celular de feridas cutâneas em ratos. In: VI ERMAC - Encontro de Matemática Aplicada e Computacional, 2019, Bauru, Brasil.

2. **Gushiken, Lucas Fernando Sérgio**; Beserra, Fernando Pereira; Hussni, Maria Fernanda; Pires, V C M; Gonzaga, M T; Ribeiro, V P; Takahira, R K; Hussni, Carlos Alberto; Gaspari, P D M; Bastos, J K; Pellizzon, Cláudia Helena. Atividade antioxidante e anti-inflamatória do  $\beta$ -cariofileno em lesões cutâneas de ratos. In: V Workbiotech, 2019, Botucatu, Brasil.

3. Butignoli Junior, G; Montrezor, L H; Borges, J R; Amaral, A C; Achcar, J A; Barros, M A; Morais, B P; Pellizzon, C H; **Gushiken, L F S**; Ervolino, E; Anselmo-Franci, J A.

Mesenchymal stem cells and testosterone in osteochondral repair in rats induced to osteoarthritis. In: 54° Congresso Anual da SBFIS, 2019, Ribeirão Preto, país.

4. Oliveira, M H; Pellizzon, C H; **Gushiken, L F S**; Mancera, P F A. Modelagem matemática da interação entre células e citocinas essenciais à cicatrização de feridas na pele. In: 3° Encontro de Biomatemática, 2019, Campinas, Brasil.

5. Oliveira, M H; Pellizzon, C H; **Gushiken, L F S**; Mancera, P F A. Modelagem do mecanismo celular na cicatrização de feridas da pele normal e anormal em ratos. In: XXXIX Congresso Nacional de Matemática Aplicada e Computacional, 2019, Uberlândia, Brasil.

6. Beserra, F P; Rozza, A L; Azevedo, G L; Vieira, A J; **Gushiken, L F S**; Meilang, X; Jackson, C; Pellizzon, C H. Lupeol, a dietary triterpene, inhibits inflammation and promotes migration and angiogenesis via Pi3k/Akt and Mapk pathways. In: The Symposium on Advanced Wound Care, 2018, Charlotte, USA.

7. Hussni, M F; **Gushiken, L F S**; Beserra, F P; Takahira, R K; Hussni, C A ; Pellizzon, C H. Initial trial to development of new use drug aiming the skin wound treatment for clinical application in horses. In: 50° Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2018, Ribeirão Preto, Brasil.

8. **Gushiken, L F S**; Beserra, F P; Hussni, M F; Pellizzon, C H. Atividade cicatrizante de Copaifera e própolis vermelha. In: IV Workbiotech, 2018, Botucatu, Brasil.

9. **Gushiken, L F S**; Hussni, C A; Rozza, A L; Lemos, M; Júnior, M P; Silva, J J M; Bastos, J K; Pellizzon, C H. *Copaifera langsdorffii* Desf. Kuntze (Leguminosae) promotes skin wound healing in rats through decrease of wound area and extracellular matrix remodeling. In: 21° International Congress Phytopharm, 2017, Graz, Austria.

10. Beserra, F P; Vieira, A J; Souza, E O; **Gushiken, L F S**; Hussni, C A; Maia, G L A; Rozza, A L; Pellizzon, C H. Lupeol, a triterpene isolated of *Bowdichia virgilioides* Kunth. (steam bark) accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats. In: 21° International Congress Phytopharm, 2017, Graz, Austria.

11. Beserra, F P; Vieira, A J; Bergamo, D A; Bergamo, P L; **Gushiken, L F S**; Hussni, C A; Maia, G L A; Rozza, A L; Pellizzon, C H. Histomorphometric characteristics of cutaneous lesions of rats after topical treatment with Lupeol, a triterpene isolated from *Bowdichia virgilioides* Kunth. In: III Workbiotech - Workshop da Pós Graduação em Biotecnologia da UNESP, 2017, Botucatu, Brasil.

12. **Gushiken, Lucas Fernando Sérgio**; Hussni, Carlos Alberto; Bastos, J K; Lemos, M; Júnior, M P; Rozza, Ariane Leite; Pellizzon, Cláudia Helena. *Copaifera langsdorffii* ointments induce skin wound healing by regulation of collagen-1, EGF and TGF- $\beta$ 1 gene expression. In: XVII Workshop de Genética, 2017, Botucatu, Brasil.

### **Participação em eventos científicos**

1. V Workbiotech - Workshop da Pós Graduação em Biotecnologia da UNESP. 2019.
2. IV Workbiotech - Workshop da Pós Graduação em Biotecnologia da UNESP. 2018.
3. XVII Workshop de Genética. 2017.
4. III Workbiotech - Workshop da Pós Graduação em Biotecnologia da UNESP. 2017.

### **Participação em bancas de comissões julgadoras**

1. **Gushiken, Lucas Fernando Sérgio**; Beserra, Fernando Pereira; Pellizzon, Cláudia Helena. Participação em banca de André Felipe da Silva. Determinação do desempenho de programas computacionais no processo de cicatrização de feridas. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Física Médica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

2. **Gushiken, Lucas Fernando Sérgio**; Beserra, Fernando Pereira; Pellizzon, Cláudia Helena. Participação em banca de Murilo Tireli Gonzaga. Avaliação do potencial de formulações tópicas contendo o  $\beta$ -cariofileno em lesões cutâneas de ratos. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Física Médica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

### **Orientações e supervisões**

1. Mirella Miconi Neves. Avaliação do estresse oxidativo de feridas cutâneas tratadas com bagging de ozônio ou óleo de girassol ozonizado em ratos. 2021. Iniciação científica (Graduando em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. (Co-orientador).
2. Marina Naomi Miyashita. Revisão dos estudos em modelos de cisteamina para lesão úlceras duodenais com tratamento de produtos naturais. 2021. Iniciação Científica. (Graduando em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. (Co-orientador).
3. Rafaella Gomes Bergstrom. Revisão dos estudos em modelos de indometacina para lesão de úlceras gástricas com tratamento de plantas medicinais. 2020. Iniciação Científica. (Graduando em Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. (Co-orientador).
4. Maria Fernanda Hussni. Emulgel CCF2017: testes iniciais para o desenvolvimento de novo fármaco visando tratamento de lesões cutâneas para uso clínico em equinos. 2018. Iniciação Científica. (Graduando em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. (Co-orientador).

### **Atuação Profissional**

2018 – 2018: Professor bolsista na disciplina de “Biologia Celular” no curso de Ciências Biológicas (Bacharelado/Licenciatura) da Faculdade de Ciências da UNESP – Bauru

2018 – 2018: Professor bolsista na disciplina de “Histologia Básica e Comparada” no curso de Ciências Biológicas (Bacharelado/Licenciatura) da Faculdade de Ciências da UNESP – Bauru.

### **Disciplinas cursadas**

1. Bioestatística – 4 créditos
2. Bioética e Biossegurança – 2 créditos
3. Biologia Celular – 3 créditos
4. Biologia Molecular – 4 créditos

5. Bioquímica Avançada – 4 créditos
6. Carcinogênese Experimental – 3 créditos
7. Empreendedorismo - Plano de Negócios – PIPE – 4 créditos
8. Microscopia Eletrônica e Ultraestrutura Celular – 4 créditos
9. Propriedade Intelectual e Empreendedorismo – 2 créditos
10. Seminários II - Pesquisa em Andamento – 2 créditos
11. Sinalização Celular – 4 créditos
12. Tópicos Especiais em Biotecnologia: Conhecimento para aprimorar a descoberta e o desenvolvimento de fármacos e biomarcadores – 1 crédito
13. Tópicos Especiais em Biotecnologia: Ferramentas de Informática aplicadas à pesquisa - Introdução ao uso do software Mendeley Reference Manager – 1 crédito

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

<b>Figure 1.</b> Phases of physiological wound healing.....	9
<b>Figure 2.</b> Factors that affect wound healing. Common situations that delay skin wound healing.....	14

### Capítulo II

<b>Figure 1.</b> Wound contraction (%) in FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel and Car treatments during 3, 7 and 14 days.....	42
<b>Figure 2.</b> Concentrations of IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$ (pg/mg protein) in cutaneous wounds at 3, 7 and 14 days.....	44
<b>Figure 3.</b> Concentrations of CAT, GPx, GSH and SOD in skin wounds at 3, 7 and 14 days.....	45
<b>Figure 4.</b> Thickness of epidermis ( $\mu\text{m}$ ) of FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	46
<b>Figure 5.</b> Quantification of collagen ( $\mu\text{m}^2$ ) at the border and center of wounds of FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	46
<b>Figure 6.</b> Immunolabeling of $\alpha$ -SMA, Dsg3 and Lam $\gamma$ 2 in wounds of FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	48
<b>Supplementary materials 1.</b> Quantification of cells ( $\mu\text{m}^2$ ) in the epidermis, border and center of the dermis in wounds of FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	57
<b>Supplementary materials 2.</b> HE photomicrographs of the epidermis in FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	58
<b>Supplementary materials 3.</b> HE photomicrographs of the border of the wounds in the dermis of FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	59
<b>Supplementary materials 4.</b> HE photomicrographs of the center of wounds in the dermis of FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	60
<b>Supplementary materials 5.</b> Number of blood vessels in the border and center of the dermis in wounds of FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	61

<b>Supplementary materials 6.</b> Masson's trichrome photomicrographs of the border of the wounds in the dermis of FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	62
<b>Supplementary materials 7.</b> Masson's trichrome photomicrographs of the center of the wounds in the dermis of FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	63
<b>Supplementary materials 8.</b> Photomicrographs of the immunolabeling of $\alpha$ -SMA in wounds of FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	64
<b>Supplementary materials 9.</b> Photomicrographs of the immunolabeling of Dsg3 in wounds of FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	65
<b>Supplementary materials 10.</b> Photomicrographs of the immunolabeling of Lam $\gamma$ 2 in wounds of FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	66
<b>Supplementary materials 11.</b> Ki-67 immunolabeling of proliferating cells in the epidermis, border and center of the dermis in FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	67
<b>Supplementary materials 12.</b> Photomicrographs of the immunolabeling of Ki-67 in the epidermis of FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	68
<b>Supplementary materials 13.</b> Photomicrographs of the immunolabeling of Ki-67 of the border of the wounds in the dermis of FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	69
<b>Supplementary materials 14.</b> Photomicrographs of the immunolabeling of Ki-67 of the center of the wounds in the dermis of FST, NeBa, Dex, Col, Emulgel, Car and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	70

### **Capítulo III**

<b>Figure 1.</b> Wound retraction (%) in FST, NeBa, Dex, Col and NLC treatments during 3, 7 and 14 days.....	83
<b>Figure 2.</b> Quantification of collagen area ( $\mu\text{m}^2$ ) at the edges and center of the dermis in wounds of FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	84
<b>Figure 3.</b> Immunolabeled area of desmoglein-3, lamminin- $\gamma$ 2 ( $\mu\text{m}^2$ ) and number of positive $\alpha$ -SMA cells in the epidermis of wounds of FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	85

<b>Figure 4.</b> Photomicrographs of the immunolabeling of $\alpha$ -SMA in the dermis of wounds of FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	86
<b>Figure 5.</b> Photomicrographs of the immunolabeling of desmoglein-3 in the epidermis of wounds of FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	87
<b>Figure 6.</b> Photomicrographs of the immunolabeling of laminin- $\gamma$ 2 in the epidermis of wounds of FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	88
<b>Figure 7.</b> Concentrations of IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$ (pg/mg protein) in skin wounds of rats treated for 3, 7 and 14 days.....	90
<b>Figure 8.</b> Concentration and enzyme activities of CAT, GPx, GSH and SOD in skin wounds of rats treated for 3, 7 and 14 days.....	91
<b>Supplementary materials 1.</b> Quantification of the area ( $\mu\text{m}^2$ ) of cells in the epidermis, border and center of the dermis in wounds of FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	102
<b>Supplementary materials 2.</b> HE photomicrographs of the epidermis in FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	103
<b>Supplementary materials 3.</b> HE photomicrographs of the border of the wounds in the dermis of FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	104
<b>Supplementary materials 4.</b> HE photomicrographs of the center of wounds in the dermis of FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	105
<b>Supplementary materials 5.</b> Epidermis thickness ( $\mu\text{m}$ ) of FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	105
<b>Supplementary materials 6.</b> Number of blood vessels in the border and center of the dermis in wounds of FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	106
<b>Supplementary materials 7.</b> Masson's trichrome photomicrographs of the border of the wounds in the dermis of FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	107
<b>Supplementary materials 8.</b> Masson's trichrome photomicrographs of the center of the wounds in the dermis of FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	108
<b>Supplementary materials 9.</b> Ki-67 immunolabeling quantification of proliferating cells in the epidermis, border and center of the dermis in wounds of FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	109

<b>Supplementary materials 10.</b> Photomicrographs of the immunolabeling of Ki-67 in the epidermis of wounds of FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	110
<b>Supplementary materials 11.</b> Photomicrographs of the immunolabeling of Ki-67 of the border of the wounds in the dermis of wounds from FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	111
<b>Supplementary materials 12.</b> Photomicrographs of the immunolabeling of Ki-67 of the center of the wounds in the dermis of wounds from FST, NeBa, Dex, Col, NLC and Control groups during 3, 7 and 14 days.....	112

#### **Capítulo IV**

<b>Figura 1.</b> Mecanismos de ação dos fármacos Car e NLC em lesões cutâneas <i>in vivo</i> .....	115
<b>Anexo A - Certificado de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética no Uso de Animais</b> .....	116

## **LISTA DE TABELAS**

### **Capítulo I**

**Table 1.** Main cytokines involved in the inflammatory phase of skin wound healing..... 10

**Table 2.** Growth factors involved in skin wound healing..... 11

### **Capítulo II**

**Table 1.** Systemic toxicity analysis data for liver (AST, ALT,  $\gamma$ -GT) and renal (creatinine, urea) parameters in the serum of rats treated for 14 days.....42

### **Capítulo III**

**Table 1.** Systemic toxicity analysis data for liver (AST, ALT,  $\gamma$ -GT) and renal (creatinine, urea) parameters in the serum of rats treated for 14 days.....92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C: graus Celsius

AgNO<sub>3</sub>: nitrato de prata

ALT: alanina aminotransferase

ATP: adenosina trifosfato

ANOVA: análise de variância

AST: aspartato aminotransferase

Car: grupo com lesão tratado com emulgel contendo  $\beta$ -cariofileno a 1%

CAT: catalase

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

Col: grupo com lesão tratado com colagenase 1.2 UI

Control: grupo sem lesão e sem tratamento

Dex: grupo com lesão tratado com dexpanthenol 5%

dL: decilitro

DNA: ácido desoxirribonucleico

Dsg3: desmogleína-3

EGF: fator de crescimento epidermal

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FCFRP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FGF: fator de crescimento de fibroblasto

FGF-2: fator de crescimento de fibroblasto-2

FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

FST: grupo com lesão não tratado

g: gramas

Gel: grupo com lesão tratado com emulgel

GPx: glutathione peroxidase

GR: glutathione reductase

GSH: glutathione reduzida

HE: hematoxilina-eosina

HRP/DAB: peroxidase de raiz forte/diaminobenzidina

IBB: Instituto de Biociências de Botucatu

IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$   
IGF-1: fator de crescimento de insulina – 1  
IL-10: interleucina-10  
IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$   
IL-4: interleucina-4  
IL-6: interleucina-6  
IL-8: interleucina-8  
IU: unidade internacional  
kg: quilograma  
KGF: fator de crescimento de queratinócitos  
L: litro  
Lamy2: laminina- $\gamma$ 2  
mg: miligramas  
min: minuto  
mL: mililitro  
MMPs: metaloproteinases de matriz extracelular  
MPO: mieloperoxidase  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida  
NeBa: grupo com lesão tratado com neomicina 5 mg/g + bacitracina 250 UI/g  
NLC: grupo com lesão tratado com emulsão de carreadores nanoestruturados contendo óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* 1%  
nmol: nano mol  
NSAIDs: anti-inflamatório não estereoidal  
PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta  
pg: pictogramas  
RNA: ácido ribonucleico  
ROS: espécies reativas de oxigênio  
rpm: rotações por minuto  
SNP: polimorfismos de nucleotídeo único  
SOD: superóxido dismutase  
TIMPs: inibidores de metaloproteinases de matriz extracelular  
TGF- $\beta$ 1: fator de crescimento transformador- $\beta$ 1  
TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral- $\alpha$   
UNESP: Universidade Estadual Paulista

USA: Estados Unidos da América

USP: Universidade de São Paulo

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

$\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -actina de músculo liso

$\gamma$ -GT:  $\gamma$ -glutamil transferase

$\mu$ L: microlitro

$\mu$ m: micrômetro

$\mu$ m<sup>2</sup>: micrômetro quadrado

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>PREFÁCIO</b> .....	3
<b>Capítulo I</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	7
<b>1. Introduction</b> .....	8
<b>2. Physiology of skin wound healing</b> .....	8
<b>3. Pathological healing</b> .....	12
<b>4. Factors that affect the wound healing</b> .....	13
4.1. <i>Hypoxia</i> .....	14
4.2. <i>Nutrition</i> .....	14
4.3. <i>Infection</i> .....	15
4.4. <i>Stress</i> .....	15
4.5. <i>Age</i> .....	15
4.6. <i>Sex hormones</i> .....	16
4.7. <i>Chronic diseases</i> .....	16
4.8. <i>Medication</i> .....	16
4.9. <i>Smoking</i> .....	17
4.10. <i>Alcohol</i> .....	17
4.11. <i>Genetic predisposition</i> .....	17
<b>5. Wound treatments</b> .....	18
5.1. <i>Surgical procedures</i> .....	18
5.2. <i>Non-surgical therapies</i> .....	19
5.2.1. <i>Topical formulations</i> .....	19
5.2.2. <i>Dressings</i> .....	21
5.2.3. <i>Skin substitutes</i> .....	22
<b>6. Conclusions</b> .....	23
<b>References</b> .....	25
<b>Capítulo II</b> .....	34
<b>Abstract</b> .....	36

<b>1. Introduction</b> .....	37
<b>2. Materials and Methods</b> .....	37
2.1. Chemicals and reagents .....	37
2.2. Extraction and isolation of $\beta$ -caryophyllene .....	38
2.3. Formulation of emulgel and 1% $\beta$ -caryophyllene emulsion.....	38
2.4. Animals .....	39
2.5. Experimental protocol of excision wound .....	39
2.6. Wound contraction analysis .....	39
2.7. Hepatic and renal toxicity .....	39
2.8. Inflammatory and oxidative stress mediators .....	40
2.9. Histological parameters .....	40
2.10. Immunohistochemistry .....	40
2.11. Statistical analysis.....	41
<b>3. Results</b> .....	41
3.1. Emulgel and 1% $\beta$ -caryophyllene emulsion stability test.....	41
3.2. Wound contraction analysis .....	41
3.3. Hepatic and renal toxicity .....	42
3.4. Quantification of inflammatory mediators .....	43
3.5. Oxidative stress analysis .....	44
3.6. Histological parameters .....	45
3.7. Immunohistochemistry .....	47
<b>4. Discussion</b> .....	48
<b>5. Conclusions</b> .....	51
<b>References</b> .....	52
<b>Supplementary Materials</b> .....	57
<b>Capítulo III</b> .....	71
<b>Abstract</b> .....	73
<b>Introduction</b> .....	76
<b>Materials and Methods</b> .....	77
Extraction of oleoresin.....	77
Preparation and characterization of nanostructured lipid carriers with <i>C. langsdorffii</i> oleoresin.....	77

Preparation and characterization of the topical formulation containing copaiba oleoresin-loaded nanostructured lipid carriers .....	78
Animals .....	78
Excision wound model and experimental protocol.....	79
Macroscopic analysis .....	79
Histopathological analysis .....	79
Immunohistochemical analysis .....	80
ELISA .....	80
Oxidative stress assays.....	81
Toxicological analysis .....	81
Statistical analysis .....	81
<b>Results</b> .....	81
Characterization of the topical formulation containing copaiba oleoresin-loaded nanostructured lipid carriers .....	82
Macroscopic analysis .....	82
Histopathological analysis .....	83
Immunohistochemical analysis .....	84
ELISA .....	88
Oxidative stress assays.....	91
Toxicological analysis .....	92
<b>Discussion</b> .....	92
<b>Conclusion</b> .....	96
<b>References</b> .....	97
<b>Supplementary materials</b> .....	102
<b>Capítulo IV</b> .....	113
<b>Conclusões gerais</b> .....	114
<b>Anexo A – Certificado de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética no Uso de Animais</b> .....	116

## RESUMO

A pele é fundamental para manter a integridade do organismo. A descontinuidade desse sistema promove o mecanismo cicatricial, que pode ser dividido em fases inflamatória, proliferativa e remodeladora. As lesões cutâneas têm grande importância na saúde pública devido à possibilidade de deficiência física ou até mesmo levar à morte. Como consequência de estudos anteriores referentes à atividade cicatricial da *Copaifera langsdorffii*, o sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno e a óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* nanoencapsulada foram selecionados para analisar o potencial cicatricial das formulações e seus mecanismos de ação. Para isso, foram utilizados ratos *Wistar* machos divididos em grupos experimentais (n = 5): Controle, FST, Gel, Col, Dex, NeBa, Car e NLC. Os animais foram submetidos à lesão dorsal de 3 cm de diâmetro, tratadas duas vezes por dia durante 3, 7 e 14 dias. As áreas das lesões foram medidas diariamente para verificar a redução macroscópica das lesões e amostras foram retiradas para análises de atividade anti-inflamatória, histopatológicas e imunohistoquímicas. Macroscopicamente foi possível observar a retração das lesões nos tratamentos Car e NLC comparados com FST e Gel. Os resultados de ELISA mostraram o potencial anti-inflamatório dos tratamentos Car e NLC pela redução de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. Os resultados das análises bioquímicas para estresse oxidativo mostraram o aumento de GPx nos grupos NeBa, Car e NLC. As análises histopatológicas e imunohistoquímicas mostraram o aumento da imunomarcagem de laminina- $\gamma$ 2 e  $\alpha$ -SMA, bem como a redução de desmogleína-3 em Car e NLC. Foi observado o aumento da deposição de colágeno nos tratamentos Car e NLC comparados a FST. Sendo assim, a partir dos resultados analisados, confirmou-se a atividade cicatricial do  $\beta$ -cariofileno e da óleo-resina de copaíba em lesões cutâneas, estimulando os mecanismos de retração da lesão mediado por miofibroblastos, o remodelamento da matriz extracelular e a reepitelização mediada por laminina- $\gamma$ 2; além de inibir a atividade inflamatória e o estresse oxidativo local.

**Palavras-chave:** cicatrização; pele;  $\beta$ -cariofileno; *Copaifera langsdorffii*; carreadores lipídicos nanoestruturados

## ABSTRACT

Skin is essential to keep the organism integrity. The discontinuity of this system promotes the healing mechanism, which can be divided into inflammatory, proliferative and remodeling phases. Skin lesions are very important in public health due to the possibility of physical disability or even death. As consequence of previous studies regarding *Copaifera langsdorffii* healing activity, the sesquiterpene  $\beta$ -caryophyllene and the nanoencapsulated *Copaifera langsdorffii* oleo-resin were selected to analyze the healing potential of the formulations and their mechanisms of action. For this, male *Wistar* rats were divided into experimental groups (n = 5): Control, FST, Gel, Col, Dex, NeBa, Car and NLC. The animals were submitted to 3 cm diameter dorsal lesion, treated twice a day for 3, 7 and 14 days. Wound areas were measured daily to verify the macroscopic reduction of the lesions and samples were taken for analysis of anti-inflammatory, histopathological and immunohistochemical activities. Macroscopically, it was possible to observe wound retraction in treatments Car and NLC compared to FST and Gel. ELISA results showed the anti-inflammatory potential of Car and NLC treatments by reducing pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 and increasing the anti-inflammatory cytokine IL-10. Results of biochemical analyzes for oxidative stress showed the increase of GPx in NeBa, Car and NLC groups. Histopathological and immunohistochemical analyzes showed an increase in laminin- $\gamma$ 2 and  $\alpha$ -SMA immunolabeling, as well as a reduction in desmoglein-3 in Car and NLC. An increase in collagen deposition was observed in Car and NLC treatments compared to FST. Thus, from the analyzed results, the healing activity of  $\beta$ -caryophyllene and copaiba oleo-resin was confirmed in skin lesions, stimulating the mechanisms of wound retraction mediated by myofibroblasts, extracellular matrix remodeling and reepithelialization mediated by laminin- $\gamma$ 2; besides inhibiting inflammatory activity and local oxidative stress.

**Keywords:** healing; skin;  $\beta$ -caryophyllene; *Copaifera langsdorffii*; nanostructured lipid carriers

## PREFÁCIO

O **CAPÍTULO 1** da tese contém o artigo de revisão no formato da edição especial da revista *Life - Mechanisms Underlying Skin Pathologies*, intitulado: “*Cutaneous wound healing: an update from physiopathology to current therapies*”. O presente capítulo traz uma abordagem geral sobre os mecanismos fisiológicos da cicatrização de lesões cutâneas e as principais moléculas envolvidas nas três fases da cicatrização: inflamatória, proliferativa e de remodelamento. Além disso, o capítulo também aborda os mecanismos patológicos da cicatrização de feridas, os fatores de risco para erros no reparo tecidual e os principais tratamentos utilizados atualmente para o tratamento de feridas cutâneas, envolvendo procedimentos cirúrgicos e não cirúrgicos.

O **CAPÍTULO 2** traz o artigo do projeto de doutorado do aluno no formato padrão da edição especial da revista *Oxidative Medicine and Cellular Longevity – Mechanisms, Biomarkers, and Therapeutics involved in Inflammatory Disorders and Tissue Repair 2021*, intitulado: “*Beta-caryophyllene has antioxidant, anti-inflammatory and re-epithelialization activities in a rat skin wound excision model*”. Os resultados desse artigo foram obtidos a partir do auxílio aprovado pela FAPESP (Processo n°: 2017/17600-1). Este capítulo mostra o potencial cicatricial *in vivo* da formulação tópica emulgel contendo o sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno a 1% em lesões cutâneas de ratos, comparando o novo fármaco com três medicamentos do mercado com diferentes mecanismos de ação. O estudo mostrou a atividade anti-inflamatória e antioxidante local do fármaco, bem como sua influência acelerando a reepitelização, contração da ferida e remodelamento do tecido.

O **CAPÍTULO 3** representa o segundo artigo do projeto de doutorado do aluno no formato da revista *Journal of Herbal Medicine*, intitulado “*Copaifera langsdorffii oleoresin-loaded nanostructured lipid carrier emulgel improves cutaneous healing by anti-inflammatory and re-epithelialization mechanisms*”. Os resultados desse artigo foram obtidos a partir do auxílio aprovado pela FAPESP (Processo n°: 2017/17600-1). O estudo mostrou o efeito do emulgel à base de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* a 1% em feridas cutâneas de ratos, comparando o novo fármaco com três medicamentos do mercado com diferentes mecanismos de ação. Os resultados do estudo comprovaram o efeito anti-inflamatório do fármaco testado, bem como o estímulo à reepitelização, contração da ferida e remodelamento da matriz extracelular.

O **CAPÍTULO 4** consiste nas considerações finais da tese, apresentando as conclusões dos resultados obtidos durante o doutorado do aluno.

## **Conclusões gerais**

# Capítulo IV

## Conclusões gerais

A análise dos resultados obtidos durante o projeto de doutorado permite concluir que:

- Os fármacos testados à base de  $\beta$ -cariofileno e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo óleo-resina de copaíba nas concentrações de 1% estimularam a cicatrização de feridas cutâneas *in vivo* em modelo de excisão circular;
- Ambos os fármacos testados aceleraram o mecanismo de retração macroscópica das lesões nos três períodos estudados, sendo mediada pelo aumento dos miofibroblastos na fase inicial da cicatrização (aumento da imunomarcação para  $\alpha$ -actina de músculo liso);
- As duas formulações testadas apresentaram atividade anti-inflamatória local verificada pela diminuição das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10;
- Houve a redução do estresse oxidativo local pelos dois fármacos do projeto, sendo a atividade antioxidante mediada pelo aumento da enzima GPx;
- Os resultados imunohistoquímicos confirmam a aceleração do mecanismo de reepitelização das feridas por ambas as formulações testadas, mediada pela redução da desmogleína-3 e aumento de laminina- $\gamma$ 2;
- Ambos os fármacos testados no projeto estimularam a síntese de colágeno nos três primeiros dias da cicatrização, acelerando o remodelamento de matriz extracelular no início do processo;
- Tanto o emulgel contendo  $\beta$ -cariofileno a 1%, quanto a formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo 1% de óleo-resina de copaíba apresentaram resultados semelhantes ou melhores que os três medicamentos comerciais em todos os mecanismos estudados.