



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

"Avaliação dos mecanismos bioquímicos, celulares e moleculares na cicatrização de lesões cutâneas em ratos utilizando cremes à base de extrato hidroalcoólico e óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*"

Candidato: **Lucas Fernando Sérgio Gushiken**

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

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

Botucatu – SP

2017



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

"Avaliação dos mecanismos bioquímicos, celulares e moleculares na cicatrização de lesões cutâneas em ratos utilizando cremes à base de extrato hidroalcoólico e óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*"

Candidato: **Lucas Fernando Sérgio Gushiken**

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

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

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

Linha de pesquisa: Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal

Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu

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

Botucatu – SP

2017

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 9/5651

Gushiken, Lucas Fernando Sérgio.

Avaliação dos mecanismos bioquímicos, celulares e moleculares na cicatrização de lesões cutâneas em ratos utilizando cremes à base de extrato hidroalcoólico e óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* / Lucas Fernando Sérgio Gushiken. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Cláudia Helena Pellizzon

Coorientador: Arianne Leite Rozza

Capes: 90300009

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

Abreviações:

°C: graus Celsius

µL: microlitros

µm: micrometros

µm²: micrômetros quadrados

ANOVA: análise de variância

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

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

COX-2: ciclooxigenase-2

Ct: *threshold cycle*

ddCt: delta *threshold cycle*

DNase: desoxirribonuclease

EGF: fator de crescimento epidermal

EH: extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii*

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EUA: Estados Unidos da América

F: *forward primer*

FGF: fator de crescimento de fibroblasto

FGF-2: fator de crescimento de fibroblasto-2

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

HE: hematoxilina-eosina

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

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

IBB: Instituto de Biociências de Botucatu

IFN-γ: interferon-γ

IL-10: interleucina-10

IL-1β: interleucina-1β

IL-2: interleucina-2

IL-3: interleucina-3

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

TNF- α : fator de necrose tumoral- α

UI: unidade internacional

UNESP: Universidade Estadual Paulista

USP: Universidade de São Paulo

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. - Pele e cicatrização de feridas

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

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

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

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

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

2010). Diversos estudos têm demonstrado que a angiogênese é um processo importante para a cicatrização tecidual e que a expressão de VEGF é essencial nessa fase (GREAVES et al., 2013).

O processo de reepitelização promove o reestabelecimento da integridade tecidual. Dessa forma, os queratinócitos adjacentes à borda da lesão apresentam uma reorganização de suas moléculas de adesão, o que os permite alterar as conexões com a membrana basal e com os queratinócitos vizinhos, possibilitando que tais células migrem pela superfície da lesão, colaborando para o fechamento da ferida cutânea (GURTNER et al., 2008; TZIOTZIOS; PROFYRIS; STERLING, 2012).

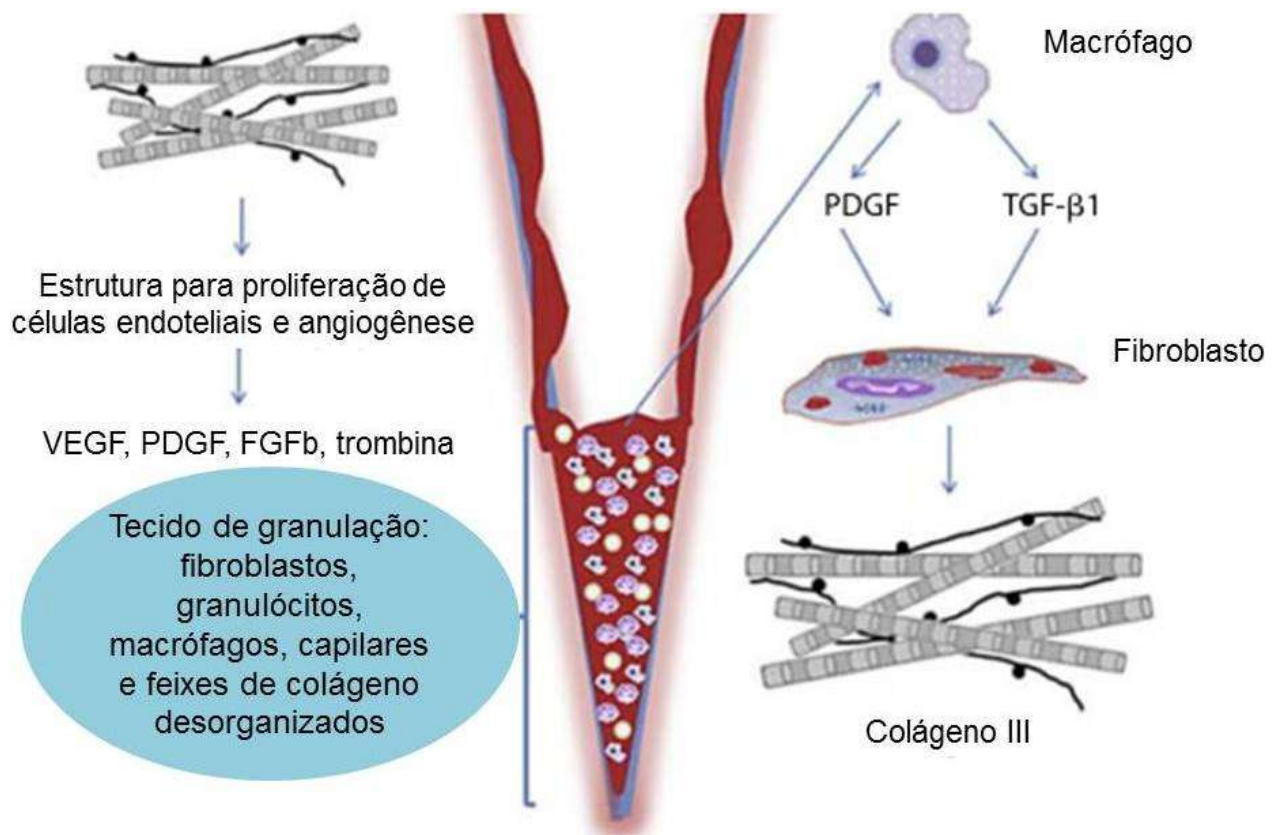


Figura 2: Fase proliferativa da cicatrização de lesão de pele. Figura modificada de REINKE; SORG (2012).

A última etapa do processo é fase de remodelamento, na qual a formação do tecido de granulação cessa e a matriz extracelular provisória é remodelada. Esse processo é importante para evitar a formação de cicatrizes hipertróficas e queloides. Com a maturação do tecido, a composição da matriz extracelular sofre alterações. O colágeno tipo III depositado durante a fase

proliferativa é lentamente degradado por metaloproteinases secretadas por macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e da epiderme, sendo substituído por colágeno I, mais resistente e orientado em feixes paralelos (KONDO; ISHIDA, 2010). Além disso, há a completa reepitelização da epiderme e o tecido sofre uma resposta contrátil através da ação dos miofibroblastos, fibroblastos que adquirem fenótipo contrátil. Em virtude de seus múltiplos pontos de ligação ao colágeno, essas células se contraem, reduzindo a superfície da área lesada (TZIOTZIOS; PROFYRIS; STERLING, 2012).

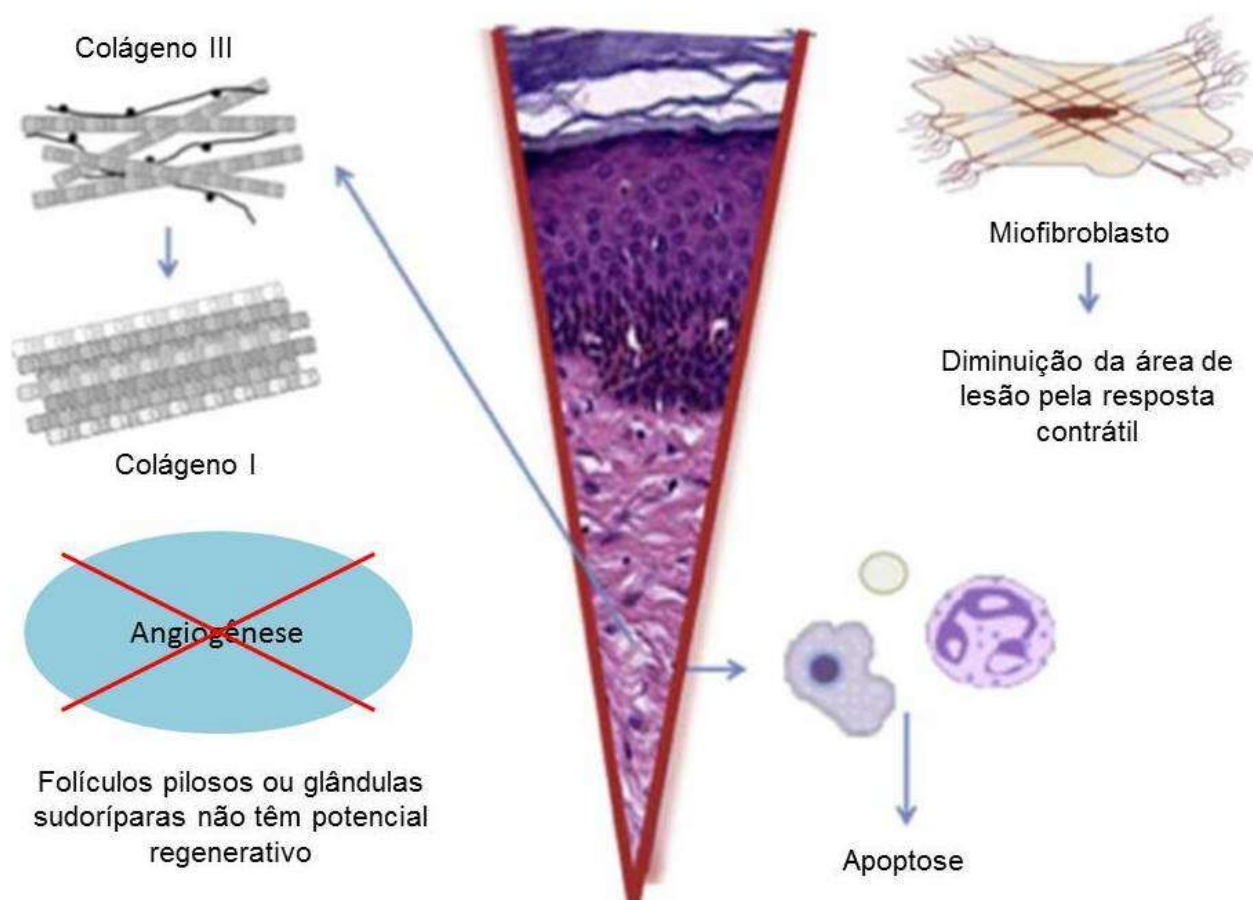


Figura 3: Fase de remodelamento de matriz extracelular da cicatrização de lesão de pele. Figura modificada de REINKE; SORG (2012).

1.2. - Fatores endógenos na cicatrização

Todos os mecanismos envolvidos nessas fases da cicatrização dependem da exposição do tecido a fatores sistêmicos e locais como idade, imobilidade, estado nutricional, doenças associadas, uso contínuo de medicamentos, localização anatômica da ferida, presença de infecção e tecido desvitalizado podem interferir no processo de cicatrização da pele e retardar sua recuperação, representando um desafio clínico a ser superado (PAUL; SHARMA, 2004). Além disso, os mecanismos moleculares e celulares recebem influência de fatores endógenos para a correta mediação da cicatrização.

Dentre os fatores endógenos, apenas alguns dos diversos fatores de crescimento e citocinas que mediam a cicatrização na pele já foram identificados. Fatores de crescimento, como o FGF, PDGF, EGF e TGF- β 1, liberados no local da lesão, são considerados cruciais para a cicatrização cutânea (SUN et al., 2013). O TGF- β 1 está envolvido em quase todos os estágios da cicatrização na pele, amplificando a migração de células inflamatórias para o local da lesão, estimulando a angiogênese, a formação do tecido de granulação e a reepitelização, além de aumentar a deposição de colágeno III na fase proliferativa e a força tensora do tecido através da deposição de colágeno I (CAIADO et al., 2011; ROSENSTEEL et al., 2010). Sendo assim, tem sido demonstrado que a cicatrização acelerada de feridas cutâneas está relacionada ao aumento da expressão de TGF- β 1 (ATIBA et al., 2011; GANESHKUMAR et al., 2012). O EGF sintetizado pelas plaquetas, macrófagos, fibroblastos e queratinócitos tem efeito parácrino sobre a migração dos queratinócitos. A expressão de EGF é maior durante a fase de reepitelização e contração da ferida, estimulando o recobrimento da superfície lesada e a formação do tecido de granulação (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). A síntese de VEGF pelos macrófagos, células endoteliais e fibroblastos é crucial para a angiogênese, sendo que falhas nesse processo retardariam a cicatrização (OBERRINGER et al., 2008).

Tabela 1: Fatores de crescimento que atuam na cicatrização de lesões de pele. Tabela modificada de BENNETT et al. (2003).

Fator de crescimento	Mecanismo envolvido	Célula secretora	Efeito na cicatrização
PDGF	Inflamação, síntese e remodelamento de matriz extracelular	Plaquetas, macrófagos	Atração de neutrófilos e fibroblastos/ Proliferação de células endoteliais e fibroblastos
FGF-2	Síntese e remodelamento de matriz extracelular	Fibroblastos, células endoteliais	Proliferação de fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos
KGF	Reepitelização	Fibroblastos	Proliferação e migração de queratinócitos
EGF	Reepitelização	Queratinócitos e macrófagos	Proliferação de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais
TGF- β 1	Inflamação, síntese e remodelamento de matriz extracelular	Plaquetas, macrófagos, fibroblastos, neutrófilos e queratinócitos	Estímulo da angiogênese e síntese de matriz extracelular/ Proliferação e diferenciação de fibroblastos
VEGF	Síntese de matriz extracelular	Neutrófilos, plaquetas, células endoteliais	Estímulo da angiogênese

Os mediadores inflamatórios também são fatores cruciais para a cicatrização e reconstrução do tecido, uma vez que células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos são importantes para a remoção do tecido morto e evitar a disseminação de um processo infeccioso para outras regiões do corpo, além das funções reguladoras das citocinas inflamatórias na sequência do mecanismo cicatricial (DOVI; HE; DIPIETRO, 2003; MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004). Entretanto, o desequilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios poderá determinar o atraso do processo cicatricial e a consequente formação de feridas crônicas que dificultam a qualidade de vida dos pacientes (MORIN et al., 2012). Sendo assim, a compreensão da ação das citocinas no processo de cicatrização na pele pode levar a novas e efetivas estratégias terapêuticas (ALZOGHAIBI et al., 2014).

Tabela 2: Principais citocinas envolvidas na cicatrização de feridas de pele. Tabela modificada de HARDING; STECHMILLER; SCHULTZ (2016).

Citocina	Célula secretora	Efeito biológico
Citocinas pró-inflamatórias		
TNF- α	Macrófagos	Citotoxicidade de PMNs/ Síntese de MMPs
IL-1 β	Macrófagos, queratinócitos	Quimiotaxia de fibroblastos e queratinócitos/ Síntese de MMPs
IL-6	Macrófagos, queratinócitos, PMNs	Proliferação de fibroblastos
IL-8	Macrófagos, fibroblastos	Quimiotaxia de macrófagos e PMNs/ Síntese de colágeno
IL- γ	Macrófagos, linfócitos T	Ativação de macrófagos e PMNs/ Diminuição de colágeno/ Síntese de MMPs
Citocinas anti-inflamatórias		
IL-4	Linfócitos T, basófilos, mastócitos	Redução de TNF- α , IL-1 e IL-6/ Proliferação de fibroblastos/ Síntese de colágeno
IL-10	Linfócitos T, macrófagos, queratinócitos	Redução de TNF- α , IL-1 e IL-6/ Inibe ativação de macrófagos e PMNs

PMNs: células polimorfonucleares

MMPs: metaloproteinases de matriz extracelular

As metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs – *matrix metalloproteinases*) constituem uma família de enzimas responsáveis pela degradação de vários componentes da matriz extracelular, como por exemplo, a membrana basal, colágeno intersticial, matrilisinas, fibronectina e várias proteoglicanas (VOELKEL; TUDER, 2000). A atividade excessiva ou desequilibrada das MMPs tem sido associada ao desenvolvimento inicial da ferida, bem como nas fases de angiogênese, epitelização e remodelação da cicatriz. O padrão de atuação MMPs no processo de cicatrização de feridas é complexo e sua atividade varia de acordo com a fase do processo de cicatrização (ARMSTRONG; JUDE, 2002).

Um efetivo processo cicatricial também envolve adequada biossíntese, deposição e subsequente maturação do colágeno, componente essencial e principal da matriz extracelular. Os

níveis do colágeno tipo III são maiores na fase proliferativa, quando ele será sintetizado. O colágeno tipo III tem função de agregação plaquetária e é importante na formação da rede hemostática. Na fase seguinte (de remodelamento), o colágeno III é substituído por colágeno I (MAEHATA et al., 2007), sendo que o sucesso do remodelamento do colágeno é fator determinante para a força tensora das regiões cicatrizadas (HAIFEI et al., 2014).

Tabela 3: Principais metaloproteinases envolvidas na cicatrização de lesões de pele. Tabela modificada de MARTINS; CALEY; O'TOOLE (2013).

Classe de MMP	Substrato	Atividade biológica
Colagenases		
MMP-1	Colágenos I, II, III, VII e X; macroglobulina- α 2; calicreína; quimase	Remodelamento de matriz extracelular/ Auxilia na migração de queratinócitos/ Superexpressão em queratinócitos causa atraso na reepitelização
MMP-8	Colágenos I, II e III; macroglobulina- α 2	Remodelamento de matriz extracelular
MMP-13	Colágenos I, II, III, IV, IX, X e XIV; fibronectina	Auxilia na retração da lesão
Gelatinases		
MMP-2	Colágenos I, III, IV, V, VII e X; laminina; agrecan; fibronectina	Migração de queratinócitos (reepitelização)/ Migração de fibroblastos e células endoteliais pela matriz extracelular
MMP-9	Colágenos I, III, IV, V e VII; elastina; agrecan; fibrilina	Migração celular e reepitelização (exceto na córnea)

1.3. - Fármacos utilizados no tratamento de feridas cutâneas e o uso de produtos naturais

A partir dos mecanismos e mediadores envolvidos no processo cicatricial, os fármacos utilizados no tratamento das feridas de pele podem atuar como agentes anti-inflamatórios, antimicrobianos, promover o debridamento do tecido lesado, influenciar a reepitelização ou remodelar a matriz extracelular do tecido. Entretanto, alguns tratamentos existentes no mercado podem não ser eficientes dependendo do tipo e local da ferida (WARD; SAFFLE, 1995) e,

embora existam no mercado inúmeras opções de curativos e tratamentos, a maioria desses produtos possui custos elevados para o paciente, tendo em vista a duração prolongada de alguns tratamentos (FERREIRA et al., 2003). A maioria dos cremes e pomadas utilizados no tratamento de feridas cutâneas, por exemplo, têm seu valor de mercado por volta de R\$40,00 (30 g) e as biomembranas possuem valores ainda muito elevados. Além disso, as feridas cutâneas têm impacto significativo na saúde pública e no investimento de recursos públicos, devido ao fato de que as feridas podem levar a algum tipo de deficiência física, psicossocial ou até a morte (BAYAT; MCGROUTHER; FERGUSON, 2003; GUO; DIPIETRO, 2010). Estima-se que a morbidade associada a feridas não cicatrizadas aumente a cada ano. No Brasil, não há dados oficiais, mas as feridas crônicas afetam em torno de 6,5 milhões de pessoas nos Estados Unidos, atingindo um custo de \$37 bilhões de dólares por ano para o tratamento das lesões, com gasto de aproximadamente \$5.700 por pessoa aos cofres públicos (GURTNER; CHAPMAN, 2016). Além disso, o déficit financeiro relacionado às lesões crônicas representa um problema socioeconômico, havendo a perda de um alto número de dias de trabalho pelos trabalhadores norte-americanos todos os anos (SEN et al., 2009).

Desse modo, considerando que existem feridas resistentes às terapias convencionais, pesquisadores e indústrias tem tentado explorar novas estratégias terapêuticas para acelerar a redução das feridas (RENNERT et al., 2013), incluindo o uso de plantas e produtos naturais (GÁL et al., 2009). As plantas têm sido usadas para o tratamento de várias doenças e problemas de saúde há milhares de anos e a dependência humana dos produtos derivados de plantas para seu tratamento de diferentes afecções é crescente (GANESHKUMAR et al., 2012). As plantas são importantes fontes de produtos biologicamente ativos, sendo consideradas um promissor caminho para a descoberta de novos medicamentos, atuando como fitoterápicos ou tendo seus princípios ativos utilizados como matérias-primas de fármacos ou adjuvantes (SIMÕES; SCHENKEL, 2002). Cerca de 3% dos medicamentos industrializados existentes destinam-se a tratar feridas e outros problemas cutâneos. Entretanto, praticamente um terço das plantas medicinais atualmente utilizadas pelo conhecimento popular destinam-se a estes tratamentos (MANTLE; GOK; LENNARD, 2001). Algumas espécies de plantas ou produtos naturais derivados de plantas vêm sendo testados com sucesso na cicatrização de feridas experimentais em pesquisas recentes (CETIN et al., 2013; MORIN et al., 2012; ROY et al., 2012; TARAMESHLOO et al., 2012; UPADHYAY et al., 2013; XIMENES et al., 2013).

1.4. - *Copaifera langsdorffii* e seu uso na cicatrização de lesões de pele

Por conta dessa necessidade do desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de lesões cutâneas e devido à grande diversidade de espécies botânicas pelo mundo cujas atividades biológicas ainda são desconhecidas, existem pesquisas na tentativa de comprovar a eficácia e os mecanismos de ação de produtos naturais (FIKRU et al., 2012; GANESHKUMAR et al., 2012; HAJIAGHAALIPOUR et al., 2013; PAIVA et al., 2002).

A *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae), popularmente conhecida como copaíba, copaíva ou pau-de-óleo, é uma árvore nativa das regiões tropicais da América Latina e África Ocidental, que cresce nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, principalmente nos Estados do Amazonas, Pará e Ceará (PAIVA et al., 2002).

Desde o século XVI, a óleo-resina obtida de sua casca tem sido usado pelos índios brasileiros para o tratamento de várias doenças (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). O conhecimento popular relata a utilização da planta como agente anti-inflamatório, antimicrobiano e na cicatrização de feridas da óleo-resina e extrato de copaíba (CASCON; GILBERT, 2000; PAIVA et al., 2002). Entre as inúmeras propriedades das óleo-resinas de espécies de copaíba, já foram estudadas as atividades anti-inflamatória (BASILE et al., 1988; CARVALHO et al., 2005), antinociceptiva (GOMES et al., 2007), antitumoral (LIMA et al., 2003), antioxidante (PAIVA et al., 2004), tratamento de inflamações de garganta e doenças gastrointestinais (PAIVA et al., 2004), distúrbios pulmonares e no trato urinário (SACHETTI et al., 2011), urolitíase (BRANCALION et al., 2012), ação antimicrobiana (KANG et al., 1992), anti-ulcerogênica, e analgésica (PAIVA et al., 2002, 2004; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

A análise fitoquímica da óleo-resina revelou a presença de sesquiterpenos e diterpenos (70%), principalmente ácidos caurenóicos e polialticos (PAIVA et al., 2002, 2004). O extrato hidroalcoólico é composto, predominantemente, por quercetina (Quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl) e afzelin (Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl), entre outros compostos fenólicos (BRANCALION et al., 2012; FURTADO et al., 2015). Desse modo, a presença de diferentes metabólitos na óleo-resina da casca e extrato hidroalcoólico das folhas pode representar uma alteração nos mecanismos de ação de cada composto nos tratamentos das diferentes afecções.

A maioria dos estudos do gênero *Copaifera* utiliza a óleo-resina da casca - incluindo o uso popular da óleo-resina na cicatrização de lesões de pele - existindo poucos estudos com as partes aéreas (ALVES et al., 2013). Entretanto, os compostos aromáticos e fenólicos presentes nas partes aéreas de *Copaifera langsdorffii* demonstram sua importância na indústria farmacêutica e de cosméticos (STUPP et al., 2008), além da utilização do extrato hidroalcoólico das folhas para o tratamento de urolitíase (BRANCALION et al., 2012). Além disso, as partes aéreas da planta fornecem maior biomassa para o estudo da atividade cicatricial quando comparada à óleo-resina. Em virtude da maior biomassa proveniente das partes aéreas da copaíba e, baseando-se em estudos anteriores utilizando o extrato hidroalcoólico das folhas (FAPESP 2012/15092-5), realizamos a comparação entre as duas formulações da planta para verificar o potencial cicatricial de ambas.

2. OBJETIVOS

Avaliar o potencial cicatrizante de duas diferentes formulações à base de *Copaifera langsdorffii* (extrato hidroalcoólico das folhas e óleo-resina da casca) na cicatrização de lesões cutâneas de ratos, assim como os mecanismos celulares, bioquímicos e moleculares envolvidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. - Material Biológico para obtenção do extrato hidroalcoólico de copaíba

A obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas e 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 USP, dentro do projeto FAPESP 2011/13630-7 - VALIDAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS E PRINCÍPIOS ATIVOS DE ESPÉCIES DE COPAIFERA.

3.2. - Preparo das formulações contendo extrato das folhas e óleo-resina da casca de copaíba

Com a intenção de produzir uma formulação eficiente que permitisse a incorporação tanto da óleo-resina da casca quanto do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera langsdorffii*, foram testadas diversas formulações, sendo que a formulação que melhor incorporou os princípios ativos foi um creme iônico (creme lanette), composto de álcool cetosteárilico, óleo mineral, propilenoglicol, nipagin, nipasol, lauril sulfato de sódio e água. O creme lanette foi usado como veículo para o preparo dos cremes à base de *Copaifera langsdorffii* nas concentrações de 1%, 5% e 10% tanto da óleo-resina quanto do extrato hidroalcoólico das folhas da planta.

Também foi sintetizado um creme à base de Collagenase 1.2 UI (nome utilizado para designar o creme comercial à base de collagenases) a partir do veículo (creme lanette) a fim de utilizar um controle positivo semelhante ao medicamento de referência no mercado para comparação com os tratamentos à base de copaíba. A Collagenase foi utilizada como controle positivo por ser o fármaco de referência utilizado na clínica para o tratamento de feridas cutâneas, tendo como mecanismos de ação o debridamento e remodelamento do tecido lesado e acelerando a reepitelização (HANSBROUGH et al., 1995; PALMIERI; MAGRI, 1998). As metaloproteinases de matriz extracelular presentes na Collagenase 1.2 UI (principalmente MMP-

1, MMP-2 e MMP-9) degradam o tecido necrosado e as conexões dos queratinócitos e entre os queratinócitos e membrana basal, acelerando o debridamento tecidual e a reepitelização (MARTINS; CALEY; O'TOOLE, 2013).

Os cremes foram preparados em colaboração com a Farmácia-Escola da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, sendo manipulados pelo farmacêutico Maurilio Polizello Junior.

3.3. - Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos com peso entre 200 e 250 g, provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados no biotério setorial do Departamento de Morfologia - IBB UNESP, em gaiolas individuais, por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro controlados de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*. Todas as práticas experimentais foram executadas de acordo com os protocolos experimentais (Protocolo nº 413-CEUA de 19 de junho de 2012) já aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu.

3.4. - Modelo de excisão circular de feridas cutâneas

Os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com quetamina (0,08 mg/100 g) e xilazina (0,04 mg/100 g). Posteriormente à anestesia, os animais tiveram o dorso tricotomizado e foi feita uma lesão na região dorsal com o auxílio de um *punch* de 2 cm de diâmetro. Imediatamente após a indução das feridas, foi feita a administração por via cutânea de cada tratamento, sendo que foram utilizadas somente as quantidades suficientes para recobrir as lesões (dia 1). Na sequência, os animais foram monitorados para recuperação total e acondicionados em gaiolas individuais.

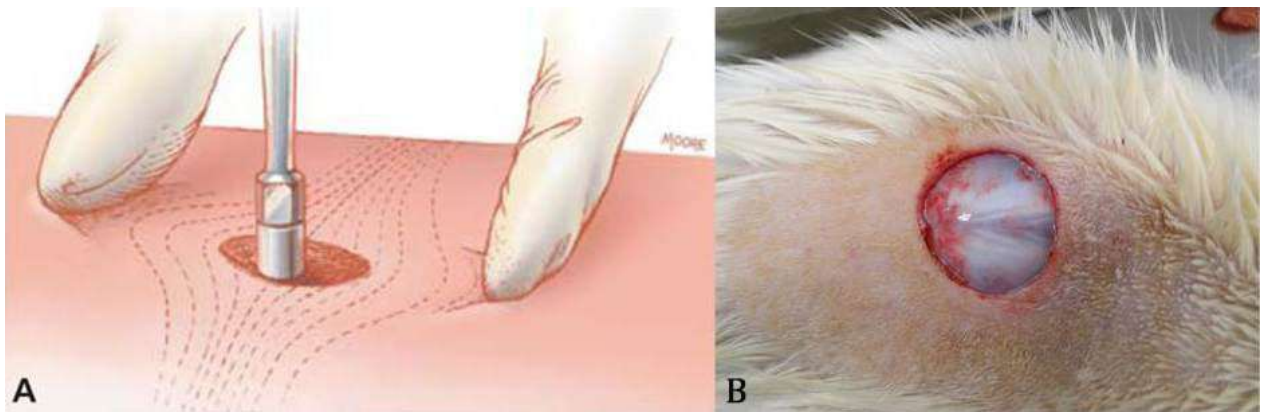


Figura 4: Esquema (A) e fotografia (B) ilustrando o modelo de excisão de lesão cutânea de segunda intenção utilizando *punch* de 2 cm de diâmetro. Imagem (A) modificada de ZUBER (2002).

3.5. - Grupos experimentais e doses empregadas

Os animais foram divididos em 8 grupos experimentais ($n = 8$): creme base lanette (controle negativo), creme de Collagenase 1.2 UI (controle positivo), extrato hidroalcoólico das folhas de copaíba (EH) nas concentrações de 1; 5 ou 10% ou óleo-resina da casca de copaíba (OR) nas concentrações 1; 5 ou 10%. A estabilidade da composição de todos os cremes foi realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP pelo grupo do Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos.

3.6. - Tempos de tratamento

Os animais foram tratados diariamente, 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 64 animais), de acordo com as fases da cicatrização de lesões cutâneas descritas na literatura (TZIOTZIOS; PROFYRIS; STERLING, 2012).

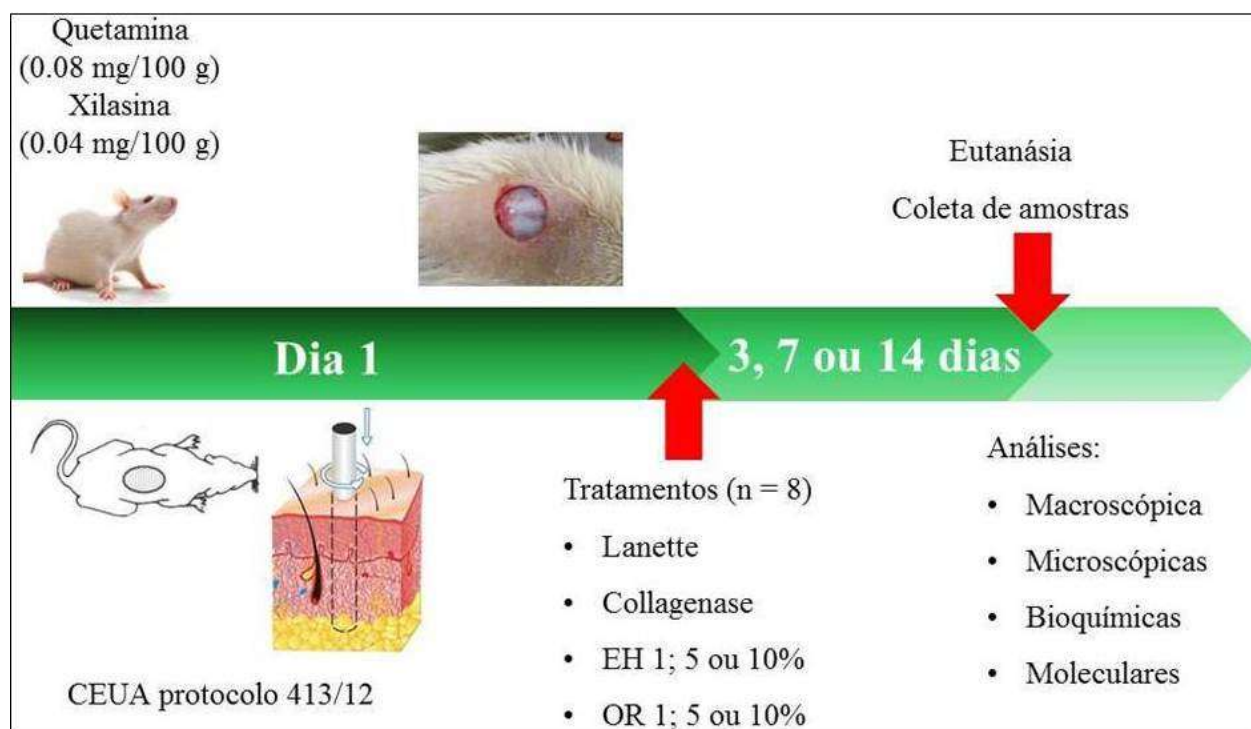


Figura 5: Deliniamento do modelo experimental da lesão de pele por excisão circular para cicatrização de segunda intenção, períodos de tratamento e formulações tópicas empregadas.

3.7. - Análise macroscópica

Para determinar a redução do tamanho das feridas a partir da cicatrização de segunda intenção, os limites das bordas foram diariamente demarcados através de fotografias com uma câmera semi-profissional para documentação e em filmes plásticos transparentes, com auxílio de uma caneta marcadora. Posteriormente, estas medidas foram submetidas à análise de planimetria com paquímetro digital. A área de porcentagem de retração das lesões foi calculada por meio da fórmula:

$$\% \text{ de retração} = \{(\text{área inicial da lesão} - \text{área da lesão no dia}) / \text{área inicial da lesão}\} * 100.$$

Ao final de cada período de 3, 7 ou 14 dias, os ratos foram eutanasiados em câmara de CO₂ pré-saturada. As amostras das lesões foram retiradas e destinadas às análises histológicas, bioquímicas e moleculares. Todas essas amostras foram congeladas a -80 °C até a realização das análises.

3.8. - Atividade anti-inflamatória

As citocinas inflamatórias são fatores cruciais para a cicatrização e reconstrução do tecido (MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004). Desse modo, a compreensão da ação das citocinas no processo de cicatrização na pele pode levar a novas e efetivas estratégias terapêuticas (ALZOGHAIBI et al., 2014). Após a análise macroscópica, foram selecionadas as concentrações de 10% para EH e OR para as análises de atividade anti-inflamatória, em virtude de seus efeitos como doses efetivas na cicatrização de lesões de pele, juntamente com o controle do creme Lanette (n = 8). O tratamento com o fármaco de referência (Collagenase) não foi comparado com os demais grupos para verificar o mecanismo anti-inflamatório, pois este não faz parte da atividade cicatricial do fármaco.

3.8.1. - Quantificação de proteínas totais

Este método se baseia na reação do azul de Coomassie com grupos proteicos, originando um complexo colorido que foi analisado em espectrofotômetro a 545 nm. Proteínas totais foram

determinadas para que os dados dos parâmetros analisados a seguir, sejam expressos em relação à quantidade de proteínas da amostra em miligramas (BRADFORD, 1976).

3.8.2 - Determinação dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10

As amostras de pele (n = 8) foram homogeneizadas e, em seguida, centrifugadas. Após o processamento segundo o protocolo do kit comercial (R&D Systems, Minneapolis, EUA), o sobrenadante foi processado para determinar os níveis das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 e da citocina anti-inflamatória IL-10 através de ELISA usando kits comerciais (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Os resultados foram expressos em pg de TNF- α , IL-1 β , IL-6 ou IL-10/mg de proteína.

3.9. - Análise da expressão gênica

Para o completo entendimento dos mecanismos de ação envolvidos na cicatrização de feridas cutâneas, foram realizadas análises de expressão de genes envolvidos no processo cicatricial (colágeno tipo 1, colágeno tipo 3, EGF, FGF-2 e TGF- β 1). Após a análise macroscópica, foram selecionadas as concentrações de 10% para EH e OR para as análises moleculares, em virtude de seus efeitos como melhor dose efetiva na cicatrização de lesões de pele, juntamente com os controles dos cremes Lanette e Collagenase (n = 8).

3.9.1 - Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total das amostras de pele (*Rattus norvegicus*) foi extraído utilizando-se o método do Trizol/clorofórmio. As amostras de RNA total foram tratadas com TURBO DNase (Ambion, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico. A concentração e pureza do RNA total foram analisadas por espectrofotometria. Em seguida, foi realizada a síntese de cDNA por transcrição reversa com o kit Super Script II, de acordo com procedimentos descritos no kit (Thermo Fischer Scientific, USA).

3.9.2. - PCR quantitativo (RT-qPCR)

A reação de PCR quantitativo foi realizada utilizando-se *primers* específicos (*forward* e *reverse*) para avaliar a expressão dos genes para colágeno 1-alfa-1, colágeno 3-alfa-1, EGF, FGF-2 e TGF- β 1 (tabela 1), entre os diferentes tratamentos utilizados, comparando níveis diferentes de cicatrização dos tratamentos. Para cada gene de interesse, os níveis de RNAm (Cts) foram normalizados pelo gene de referência, β -actina (tabela 1), e em seguida expressos com valores relativos à média dos Cts (ponto a partir do qual o sistema inicia a quantificação do material genético a partir do limiar da fase exponencial) de cada grupo (ddCt – Ct normalizado pelas médias dos respectivos grupos da β -actina). Os Cts foram determinados através de sistema de amplificação e leitura de PCR quantitativo em reações de 10 μ l. Todas as análises de expressão gênica foram realizadas no laboratório e tiveram o suporte científico do Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega, do Departamento de Morfologia, IBB-UNESP e Dr. Emanuel Ricardo Monteiro Martinez do Departamento de Morfologia, IBB-UNESP.

Tabela 4: Sequência dos *primers* usados

Gene	Sequência do <i>primer</i>	Produto	Temp. de Melting	Número de acesso*
β -actina	F: 5'-CCCTGGCTCCTAGCACCAT-3' R: 5'-GATAGAGCCACCAATCCACACA-3'	80 pb	60°C	NM_031144.3
Colágeno 1-alfa-1	F: 5'-CATGTTCAGCTTTGTGGACCT-3' R: 5'-GCAGCTGACTTCAGGGATGT-3'	94 pb	60°C	NM_053304.1
Colágeno 3-alfa-1	F: 5'-GGGATCCAATGAGGGAGAAT-3' R: 5'-CCTTGCGTGTTTGATATT-3'	128 pb	60°C	NM_032085.1
EGF	F: 5'-CTCAGGCCTCTGACTCCGAA-3' R: 5'-ATGCCGACGAGTCTGAGTTG-3'	93 pb	60°C	NM_012842.1
FGF-2	F: 5'-GATCCCAAGCGGCTCTACTG-3' R: 5'-TAGTTTGACGTGTGGGTCGC-3'	105 pb	60°C	NM_019305.2
TGF- β 1	F: 5'-GGGCTACCATGCCAACTTCTG-3' R: 5'-GAGGGCAAGGACCTTGCTGTA-3'	82 pb	60°C	NM_021578.2

F(*forward*) e R (*reverse*)

*Fonte: *National Center for Biotechnology Information - Nucleotide*

3.10. - Análises histológicas

Após a análise macroscópica, foram selecionadas as concentrações de 10% para EH e OR para as análises histológicas, em virtude de seus efeitos como doses efetivas na cicatrização de lesões de pele. Para cada um dos períodos de tratamento, as amostras foram fixadas com formalina tamponada a 4% e processadas para inclusão em paraplast.

Nas amostras coradas por hematoxilina-eosina (HE) foram analisados o número total de células e de vasos sanguíneos ($n = 8$). Para todas as lâminas, foram analisadas 3 regiões distintas: a região da pele sem lesão, a borda da lesão e o centro da lesão induzida por meio cirúrgico. Foram analisadas 15 fotomicrografias de cada amostra sob a objetiva de 40 vezes no sistema de análise de imagens CellSens Standard (Olympus, EUA), sendo 5 fotomicrografias da região de pele normal, 5 para a borda das lesões e 5 da região central das lesões. O número total de células presentes nessas regiões foi quantificado por meio da contagem de área marcada, totalizando uma área de $100.000 \mu\text{m}^2/\text{lâmina}$. O número de vasos sanguíneos foi obtido a partir da contagem dos vasos presentes nas fotomicrografias utilizando contador manual.

Para as análises imunohistoquímicas, foram utilizados os anticorpos colágeno I (1:100 μL), colágeno III (1:100 μL), COX-2 (1:100 μL), EGF (1:200 μL), FGF-2 (1:500 μL), MIF (1:300 μL), MMP-2 (1:100 μL), MMP-9 (1:100 μL), PCNA (1:200 μL), TGF- β 1 (1:300 μL) e VEGF (1:100 μL). As amostras ($n = 3$) foram fixadas com formalina tamponada a 4% e processadas para inclusão em paraplast. Posteriormente, foram preparadas lâminas de 5 μm de espessura para as reações imunohistoquímicas. As lâminas foram submetidas à recuperação antigênica por pressão (20 psi/125 °C) e a reação imunohistoquímica foi realizada com kit de polímeros. Para todas as lâminas, foram analisadas 3 regiões distintas: a região da pele sem lesão, a borda da lesão e o centro da lesão induzida por meio cirúrgico. Foram analisadas 15 fotomicrografias de cada amostra sob aumento de 400 vezes: 5 para a região de pele normal, 5 para a borda das lesões e 5 da região central das lesões. A área que apresentou imunomarcação foi quantificada, totalizando uma área de $100.000 \mu\text{m}^2/\text{lâmina}$. As fotomicrografias foram obtidas com o auxílio de software de captura de imagens e as medições foram feitas por meio do software AVSoftBioView.

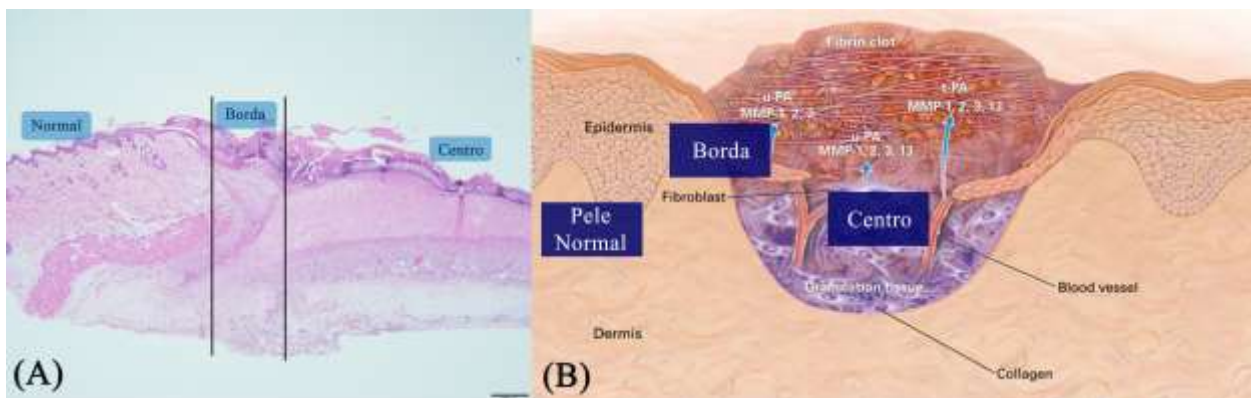


Figura 6: Fotomicrografia (A) e esquema (B) representativo da lesão cutânea demonstrando as três regiões de pele das análises microscópicas: pele normal (sem lesão), borda e centro da lesão. (B) Imagem modificada de SINGER; CLARK (1999).

3.11. - Análise estatística

Os dados foram expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão da média e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA). Os dados referentes à quantificação das citocinas inflamatórias foram submetidos à ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Os demais dados foram submetidos à ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls. As análises foram feitas pelo software GraphPad Prism, com nível de significância mínimo de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. - Análise macroscópica

Em um primeiro momento, realizamos a análise das lesões de 2 cm no dorso dos animais e submetidas aos respectivos tratamentos durante 3, 7 e 14 dias. Os tratamentos à base de EH e OR nas concentrações de 1%, 5% e 10% foram escolhidas baseadas na concentração efetiva (4%) utilizada no trabalho de Paiva et al. (2002), e a partir da biomassa dos compostos obtida pelo grupo do Professor Doutor Jairo Kenupp Bastos. A partir de experimentos macroscópicos realizados com as três concentrações, obtivemos os melhores resultados com os tratamentos 10% EH e 10% OR.

As lesões analisadas ao longo de 3 dias de tratamento não demonstraram 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 EH e OR possuíam lesões com crosta aderida e sem a presença do exsudato, diferentemente do observado nos grupos Lanette e Collagenase. As lesões analisadas ao longo de 14 dias demonstraram retração estatisticamente significativa das lesões dos grupos tratados com 10% EH e 10% OR (figura 7). Nos animais do grupo Lanette e Collagenase, observamos 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 (figura 8).

Em função dos dados obtidos na análise macroscópica, definimos os grupos 10% EH e 10% OR como as melhores concentrações para a continuidade dos estudos.

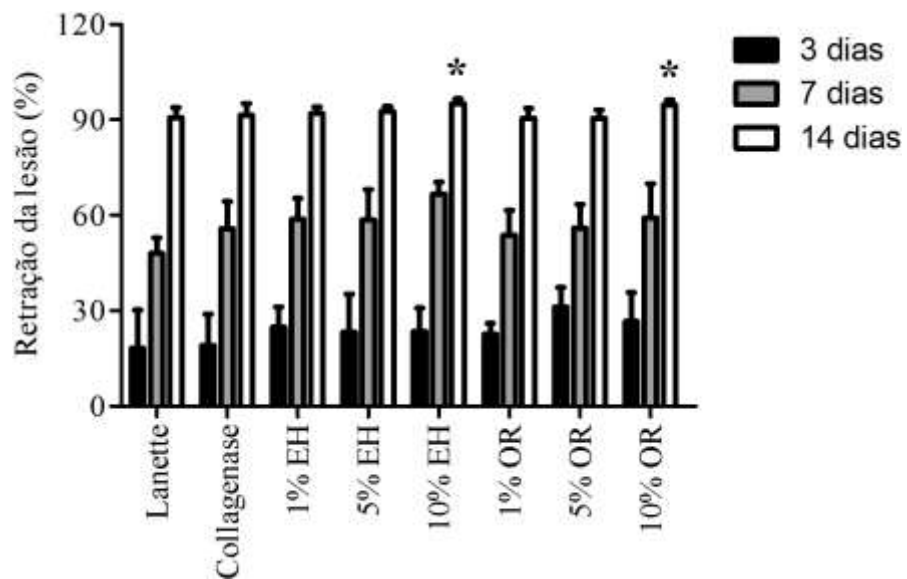


Figura 7: Retração das lesões (%) dos animais tratados com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10 % OR durante 3, 7 e 14 dias. * $p < 0.05$ comparado ao grupo Lanette por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls ($n = 8$).

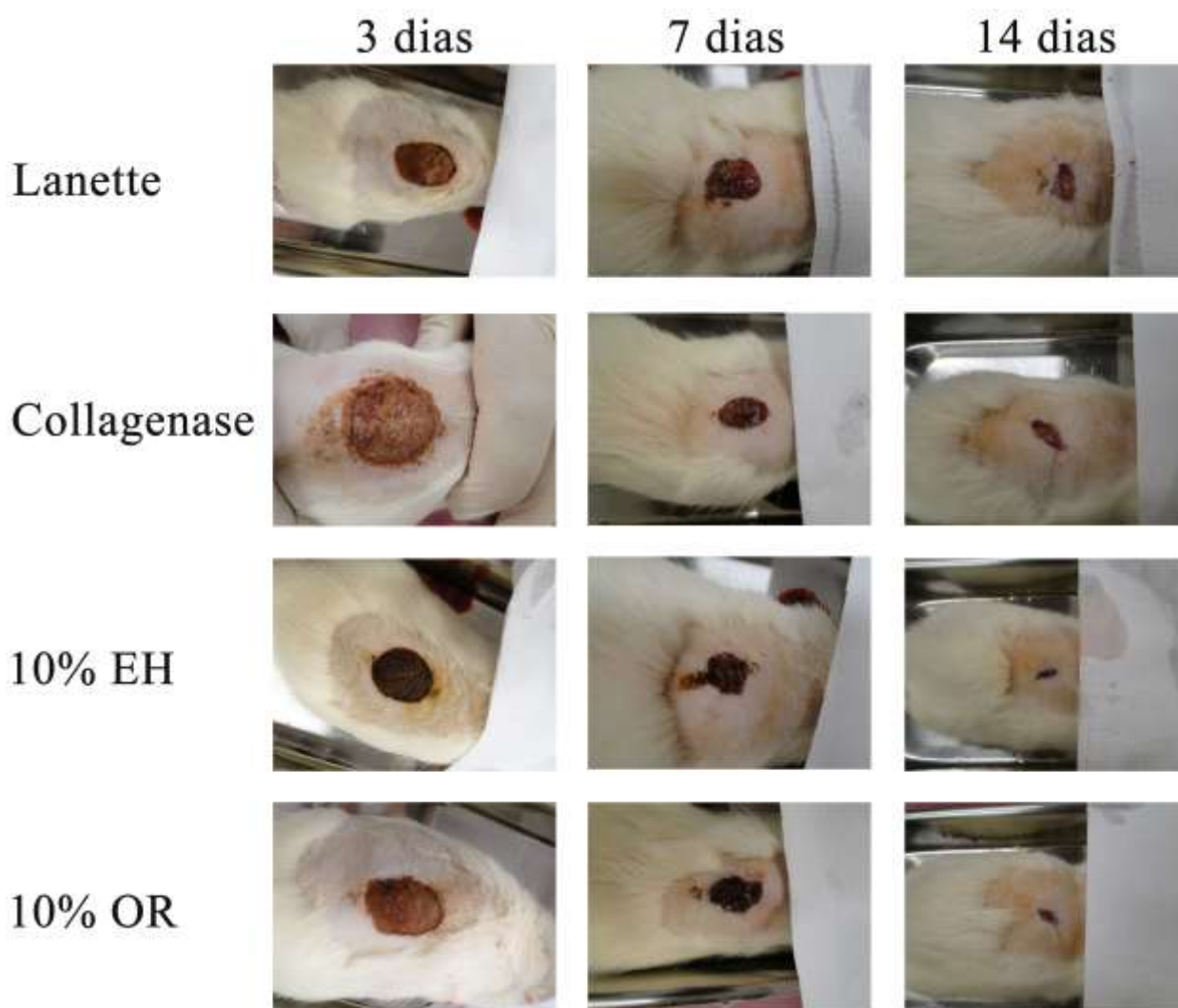


Figura 8: Fotografia das lesões dos animais tratados com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10 % OR durante 3, 7 e 14 dias de experimentação.

4.2. – Atividade anti-inflamatória

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 (figura 9).

Os resultados obtidos na análise de IL-1 β demonstram a redução da concentração dessa interleucina nos tratamentos 10% EH e 10% OR após 3 dias. As análises dos períodos de 7 e 14 dias não demonstraram 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 Lanette após 3 dias de tratamento. Não houve alteração na concentração de IL-6 durante 7 e 14 dias. 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 da interleucina nos grupos 10% EH e 10% OR em comparação ao grupo Lanette. Após 14 dias não houve diferença significativa entre os tratamentos (figura 9).

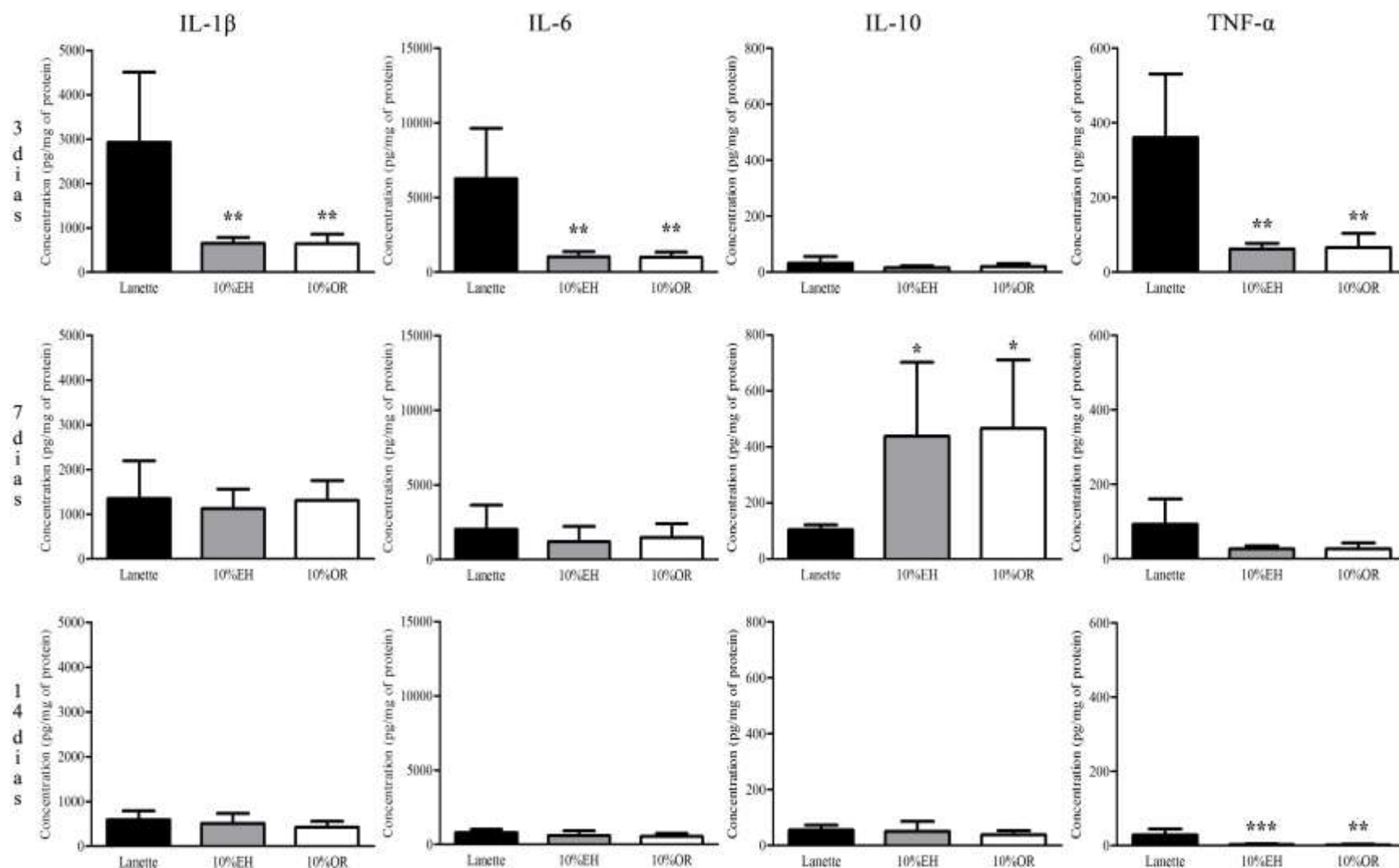


Figura 9: Gráfico das concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 (pg/mg de proteína) nas lesões de pele de ratos tratados por 3, 7 ou 14 dias com cremes Lanette, 10% EH ou 10% OR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ em relação ao grupo Lanette, segundo ANOVA seguida por teste de Tukey ($n = 8$).

4.4. - Análise molecular

As análises moleculares para determinar a expressão de genes para colágeno 1-alfa-1, colágeno 3-alfa-1, EGF, FGF-2 e TGF- β 1 podem ser observadas na figura 10.

Após 3 dias houve aumento da expressão do gene colágeno 1-alfa-1 nos grupos 10% EH e 10% OR em relação ao tratamento Lanette. Após 7 e 14 dias de tratamento, não houve diferenças para o gene entre os grupos testados. A expressão de colágeno 3-alfa-1 não demonstrou diferença estatística entre os tratamentos em nenhum dos períodos estudados. Não houve diferença significativa entre os tratamentos na expressão de EGF após 3 dias. Após 7 dias, os grupos 10% EH e 10% OR demonstraram aumento da expressão de EGF comparados ao grupo Lanette. Após 14 dias, os tratamentos com Collagenase, 10% EH e 10% OR mostraram aumento do gene quando comparado ao grupo Lanette. A análise de expressão de FGF-2 não demonstrou diferença estatística entre os tratamentos em nenhum dos períodos estudados. O gene TGF- β 1 teve sua expressão aumentada após 3 e 7 dias nos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR comparados ao grupo Lanette. Após 14 dias, 10% EH e 10% OR tiveram aumento do gene, quando comparados aos grupos Lanette e Collagenase.

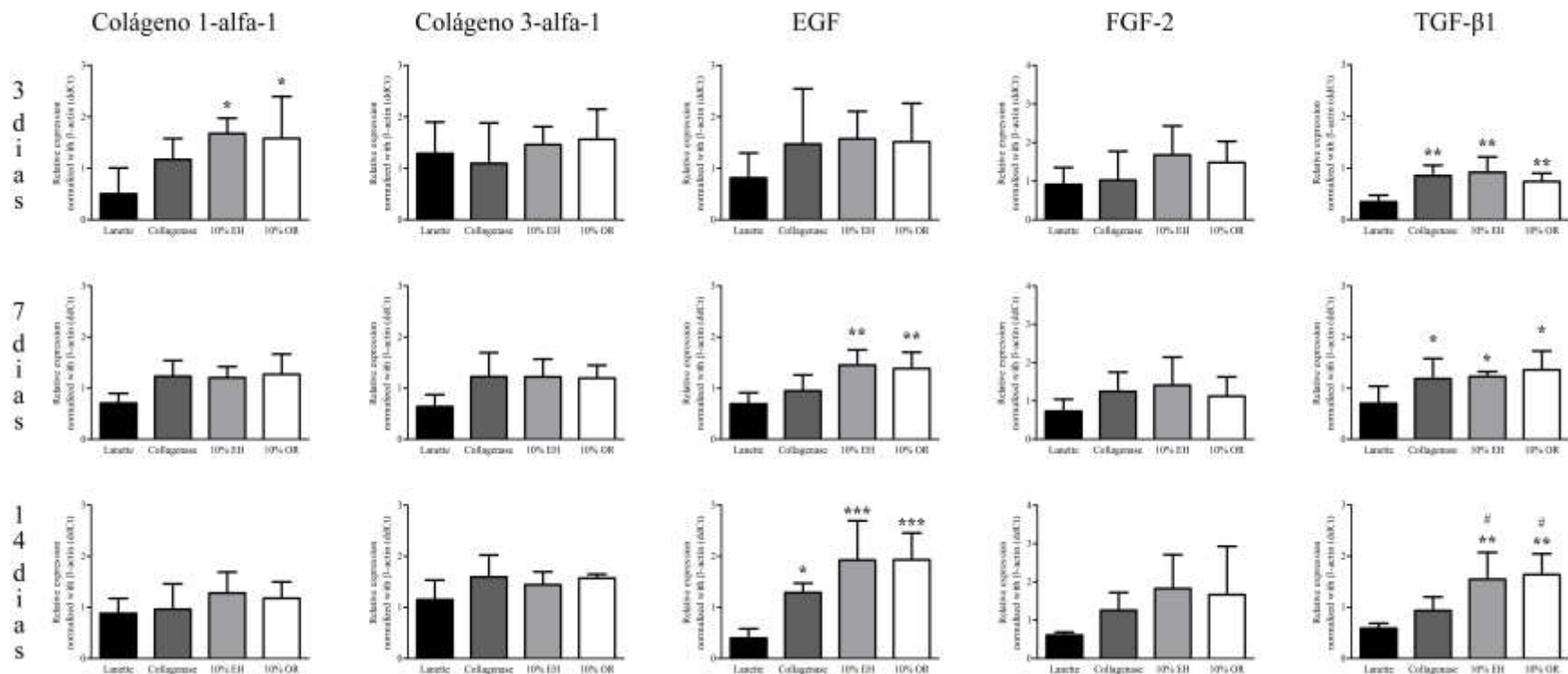


Figura 10: Gráficos da expressão dos genes (RT-qPCR) colágeno 1-alfa-1, colágeno 3-alfa-1, EGF, FGF-2 e TGF-β1 em lesões cutâneas de ratos tratados por 3, 7 ou 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. A expressão dos genes de interesse foi normalizada a partir da expressão da β-actina. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 em relação ao grupo Lanette. #p<0.05 em relação ao grupo Collagenase utilizando ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls (n = 8).

4.5. - Análises histológicas

As amostras histológicas foram coradas em HE para realizar a contagem do número total de células e dos vasos sanguíneos nas regiões das bordas e centro das lesões e de pele normal (figuras 11, 12A-C e 13).

Quando analisamos a borda das lesões, observamos após 3 e 7 dias o aumento significativo do número de células totais dos grupos 10% EH e 10% OR em relação aos grupos Lanette e Collagenase. Na região central das lesões, o número de células dos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR está reduzido comparado ao Lanette após 7 dias da lesão. Na região de pele normal não houve alteração no número total de células entre os grupos em nenhum dos três períodos de tratamento (figura 11). As fotomicrografias mostram a diferença entre os grupos testados na região da derme (figura 12A-C). Em relação ao número de vasos, observamos o aumento da vascularização dos grupos 10% EH e 10% OR na borda das lesões após 14 dias comparados aos grupos Lanette e Collagenase. Na região central observamos aumento no número de vasos nos grupos 10% EH e 10% OR em relação ao Lanette e Collagenase somente após 3 dias de tratamento. Não houve alteração na vascularização da pele normal dos grupos testados em nenhum dos três períodos estudados (figura 13).

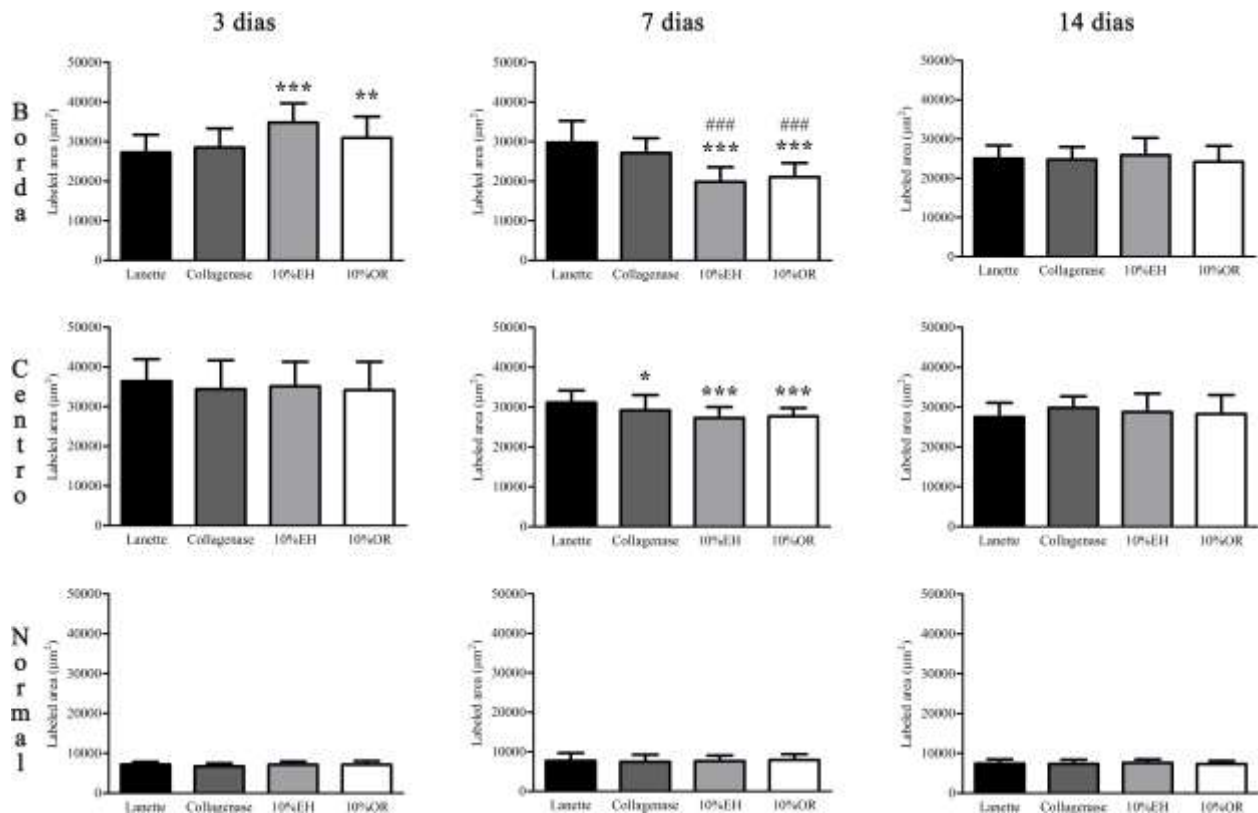


Figura 11: Área μm^2) representativa do número total de células coradas em HE das três regiões de lesão de pele de ratos tratados com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR por 3, 7 e 14 dias. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ em relação ao grupo Lanette. ### $p < 0.001$ em relação ao grupo Collagenase, utilizando ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls ($n = 8$).

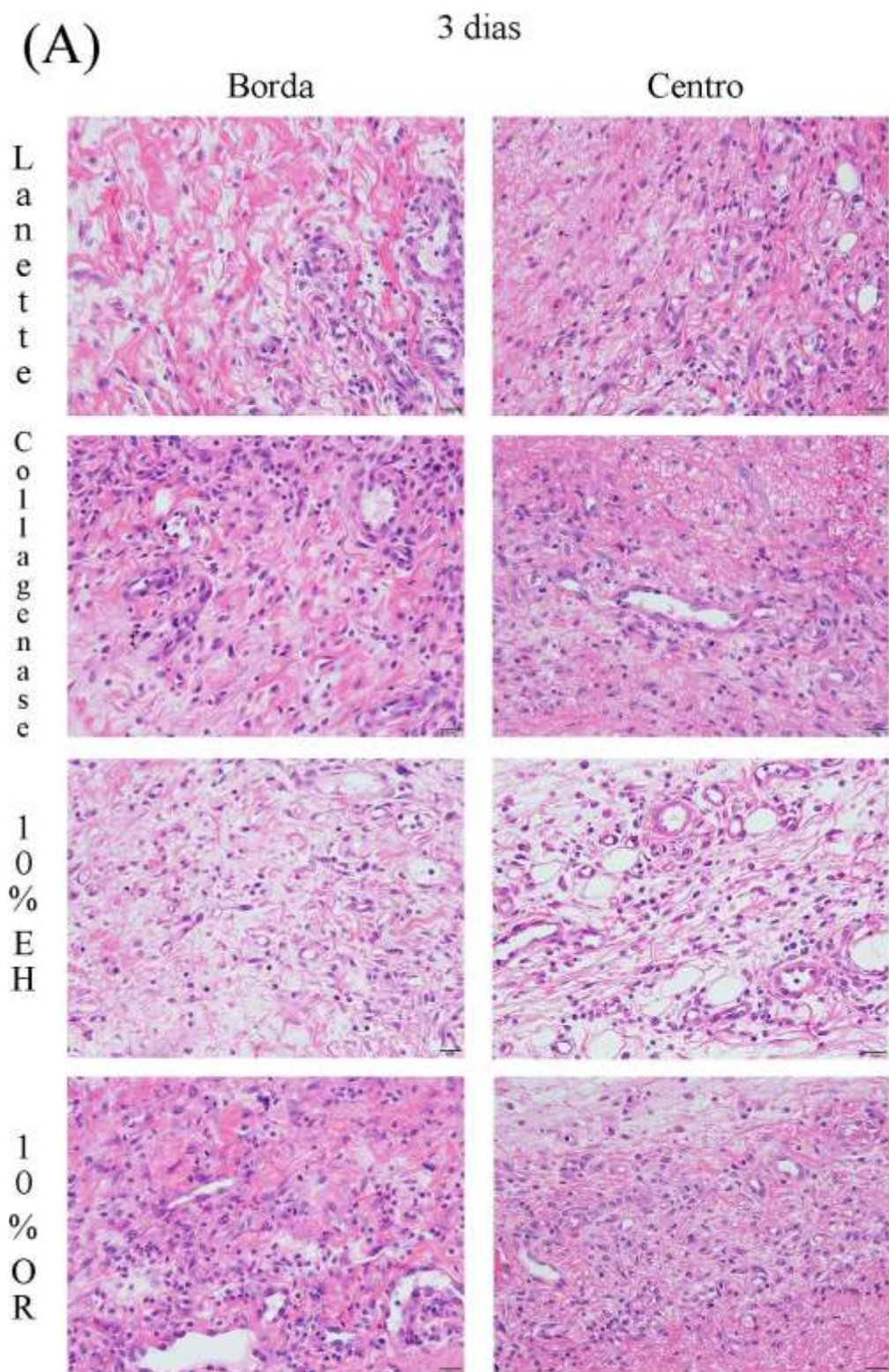


Figura 12 (A): Fotomicrografia em HE das lesões de pele de ratos tratados com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR por 3 dias. Barra representa 20µm.

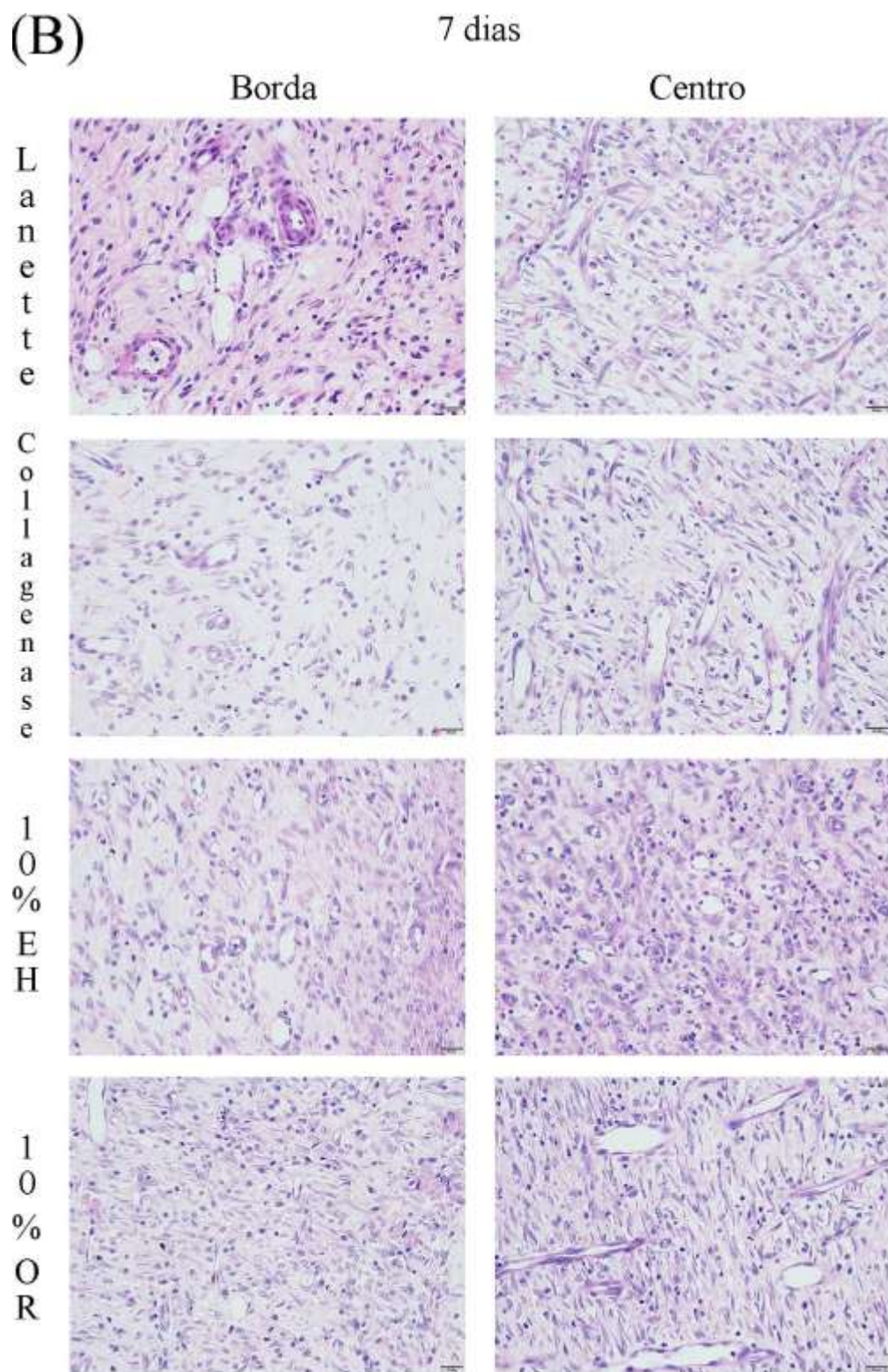


Figura 12 (B): Fotomicrografia em HE das lesões de pele de ratos tratados com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR por 7 dias. Barra representa 20µm.

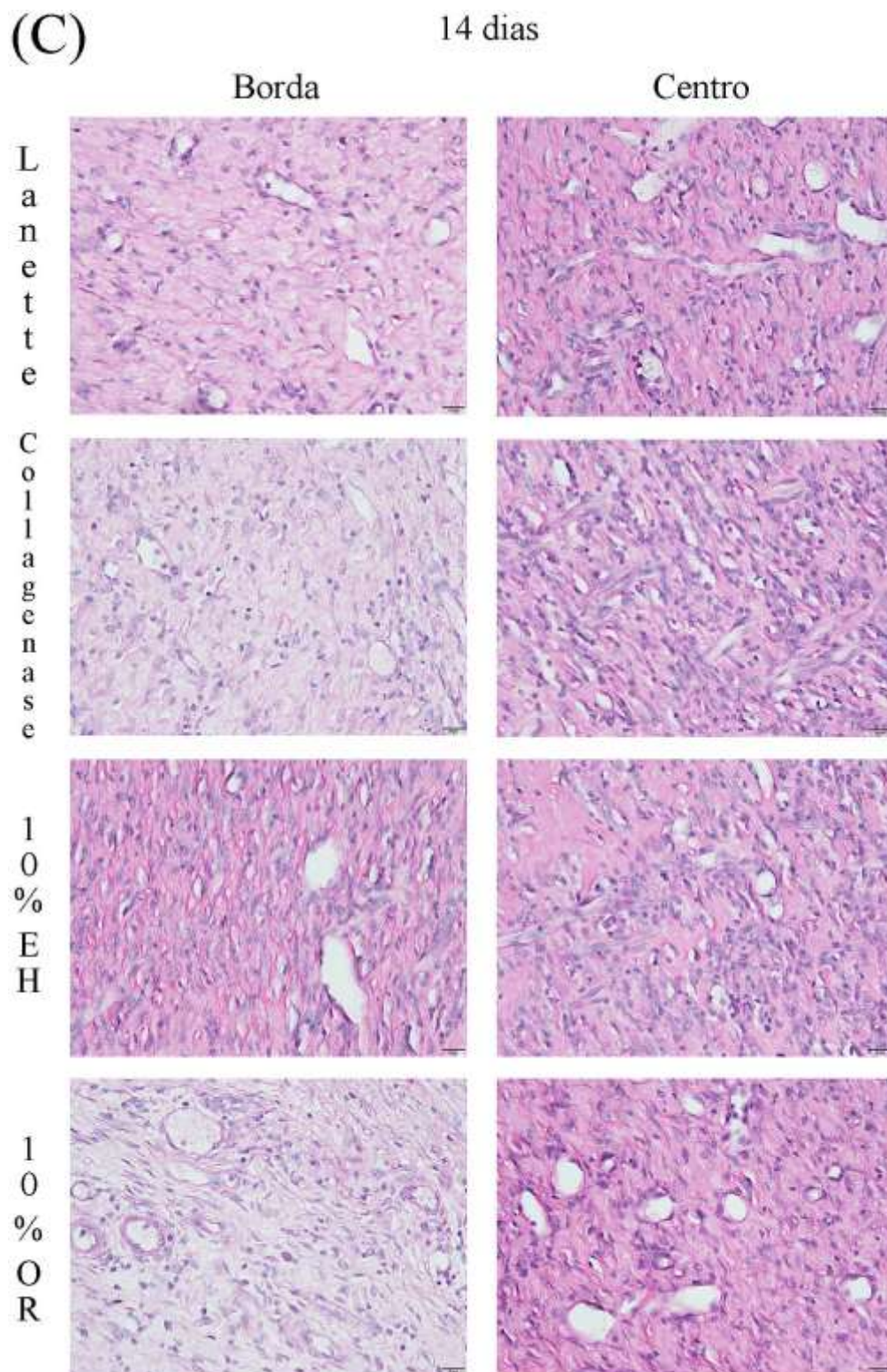


Figura 12 (C): Fotomicrografia em HE das lesões de pele de ratos tratados com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR por 14 dias. Barra representa 20µm.

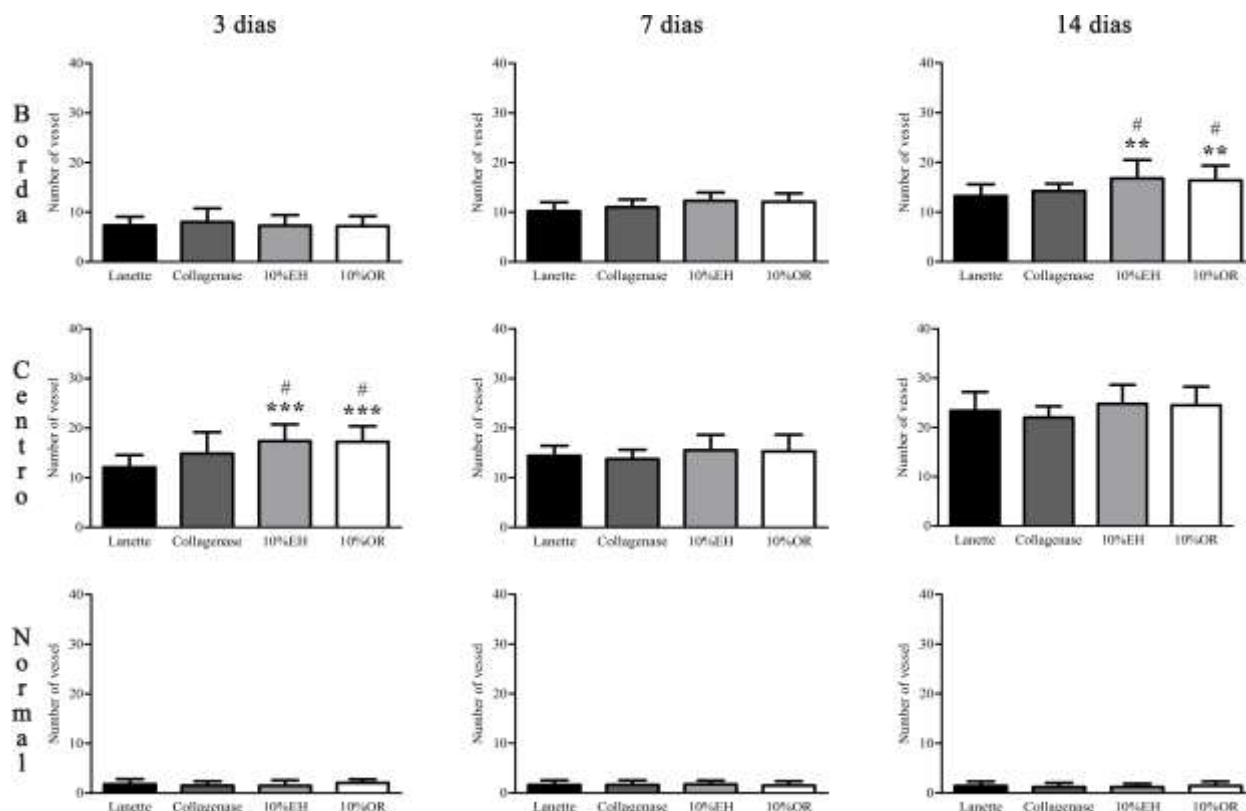


Figura 13: Contagem do número de vasos das três regiões de lesão de pele de ratos tratados com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR por 3, 7 e 14 dias. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ em relação ao grupo Lanette. # $p < 0.05$ em relação ao grupo Collagenase utilizando ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls ($n = 8$).

A análise imunohistoquímica para colágeno I mostrou a área marcada (μm^2) das regiões de borda, centro da lesão e pele normal. Na região da borda das lesões, observamos a maior quantidade da imunomarcagem dessa proteína nos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR comparados ao grupo Lanette após 7 e 14 dias de tratamento. No centro das lesões, há maior área positivamente marcada nos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR comparados ao grupo Lanette em todos os períodos de tratamento, destacando-se o período de 7 dias, no qual houve diferença estatisticamente significativa dos grupos 10% EH e 10% OR em relação ao fármaco de referência. Na região de pele normal, não houve nenhuma diferença entre os tratamentos em nenhum período estudado (figuras 14 e 15A-C).

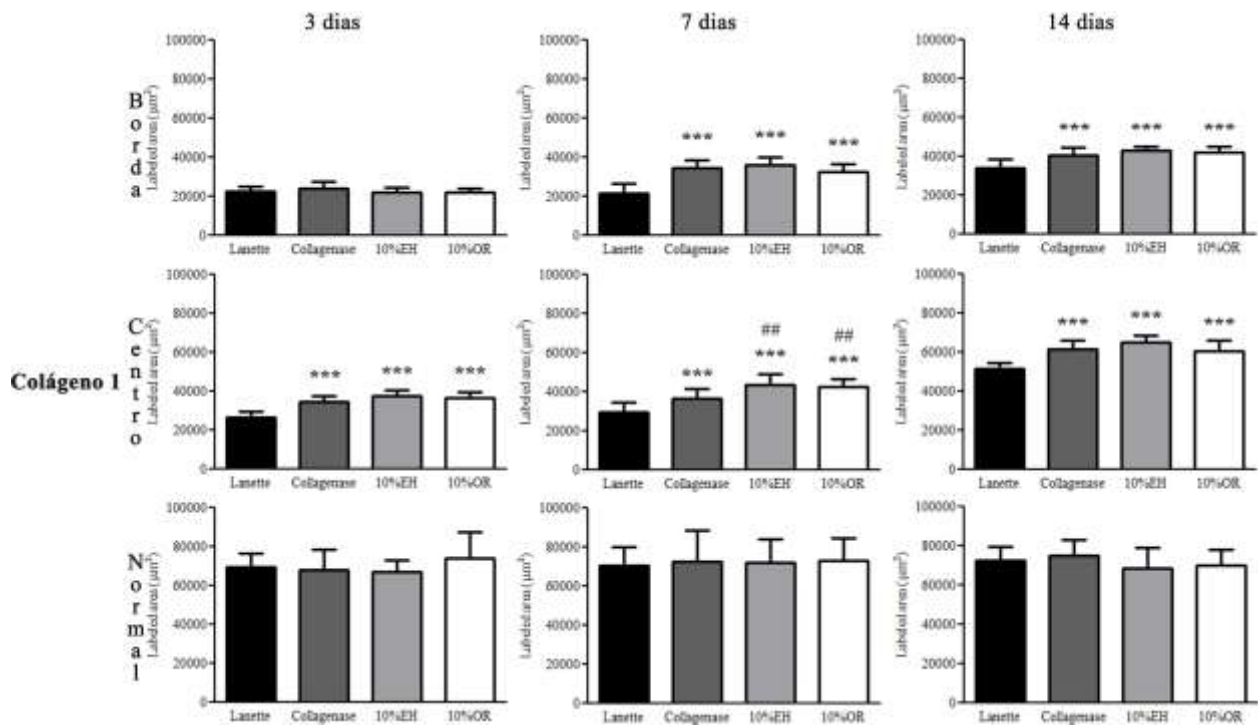


Figura 14: Área imunomarcada (μm^2) pelo anticorpo colágeno 1 das três regiões de lesão da pele de ratos tratados por 3, 7 ou 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. *** $p < 0.001$ em relação ao grupo Lanette. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ em relação ao grupo Collagenase utilizando ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls ($n = 8$).

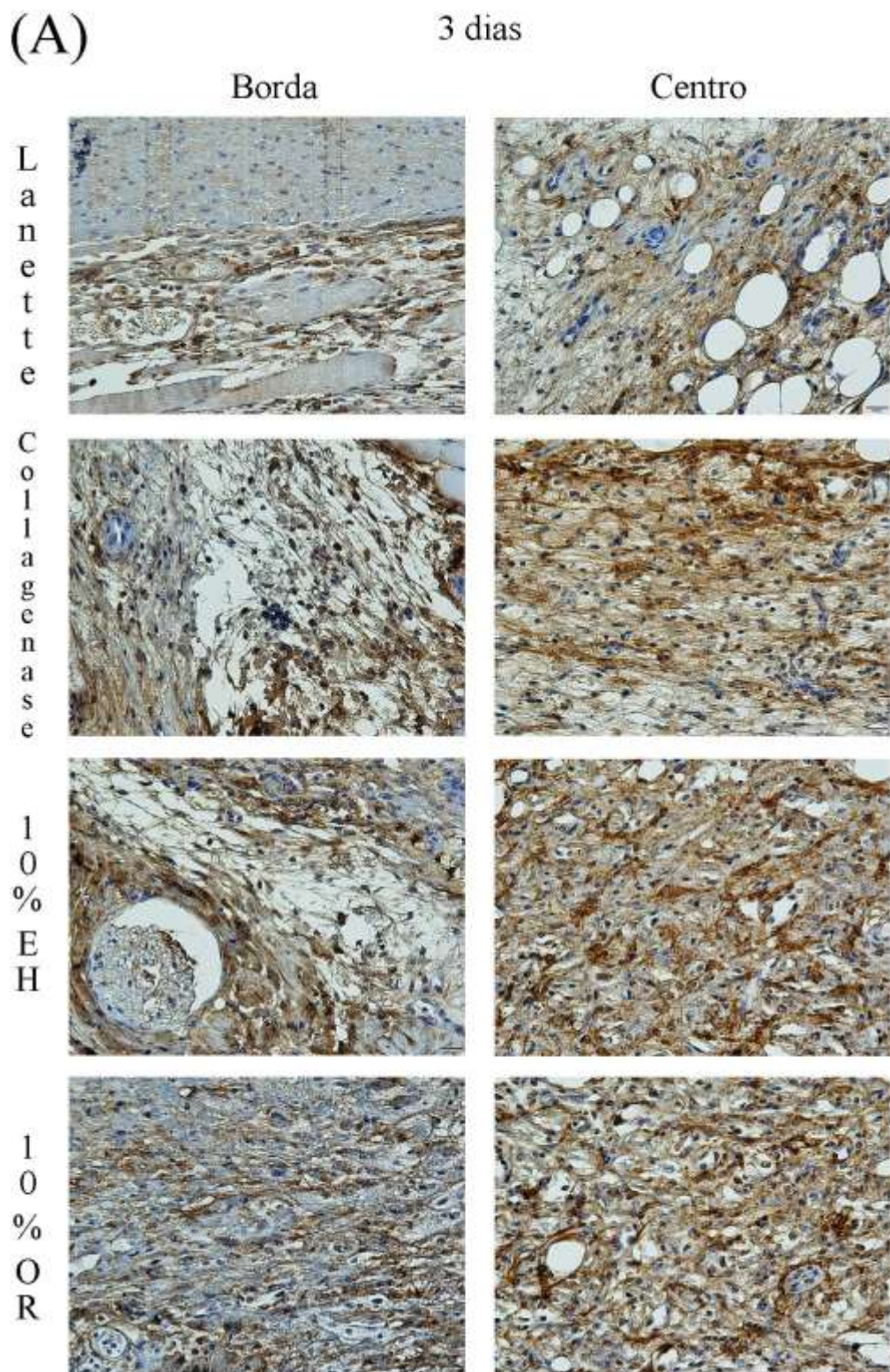


Figura 15 (A): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo colágeno 1 das lesões de pele dos ratos tratados por 3 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

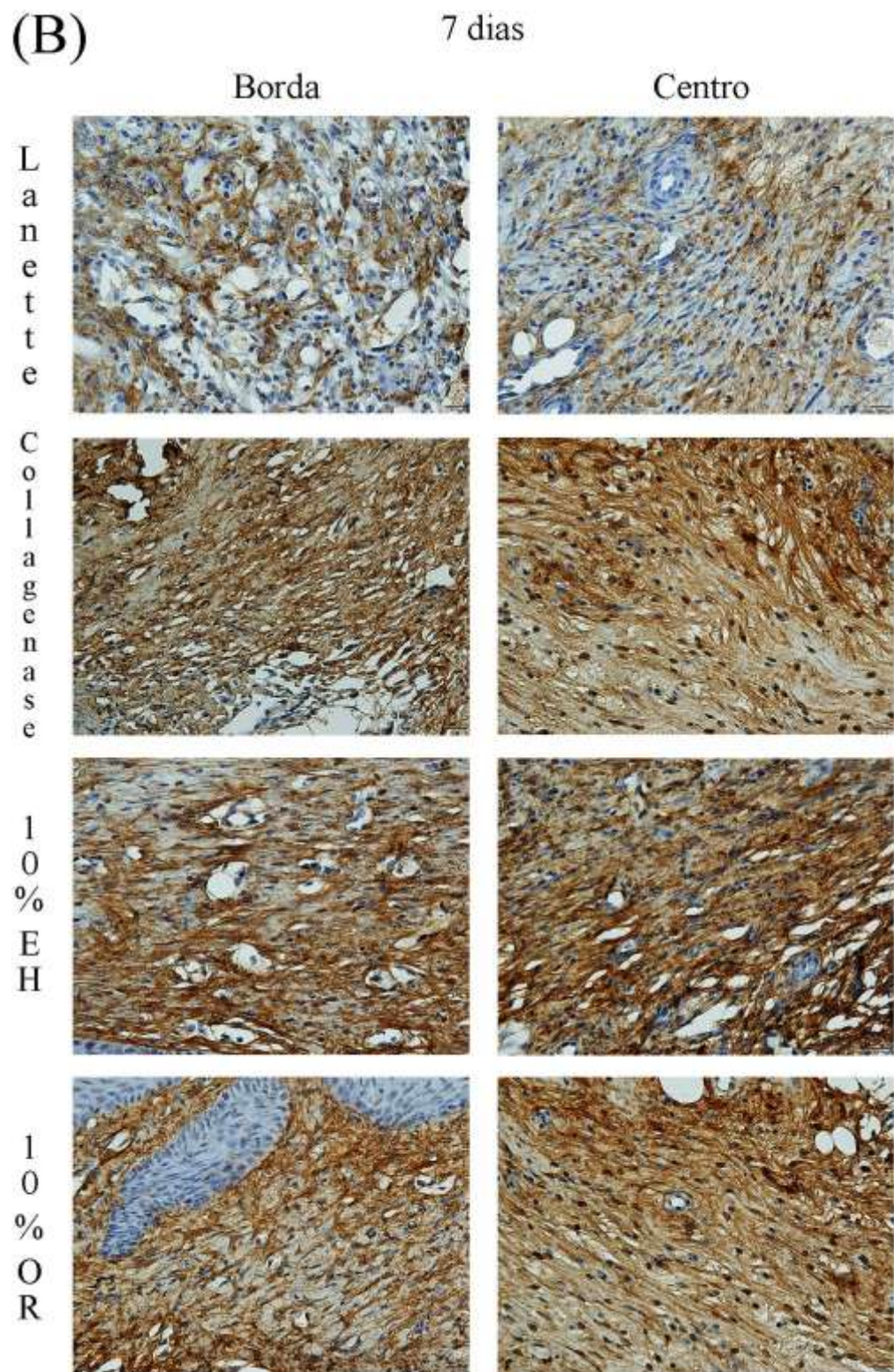


Figura 15 (B): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo colágeno 1 das lesões de pele dos ratos tratados por 7 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

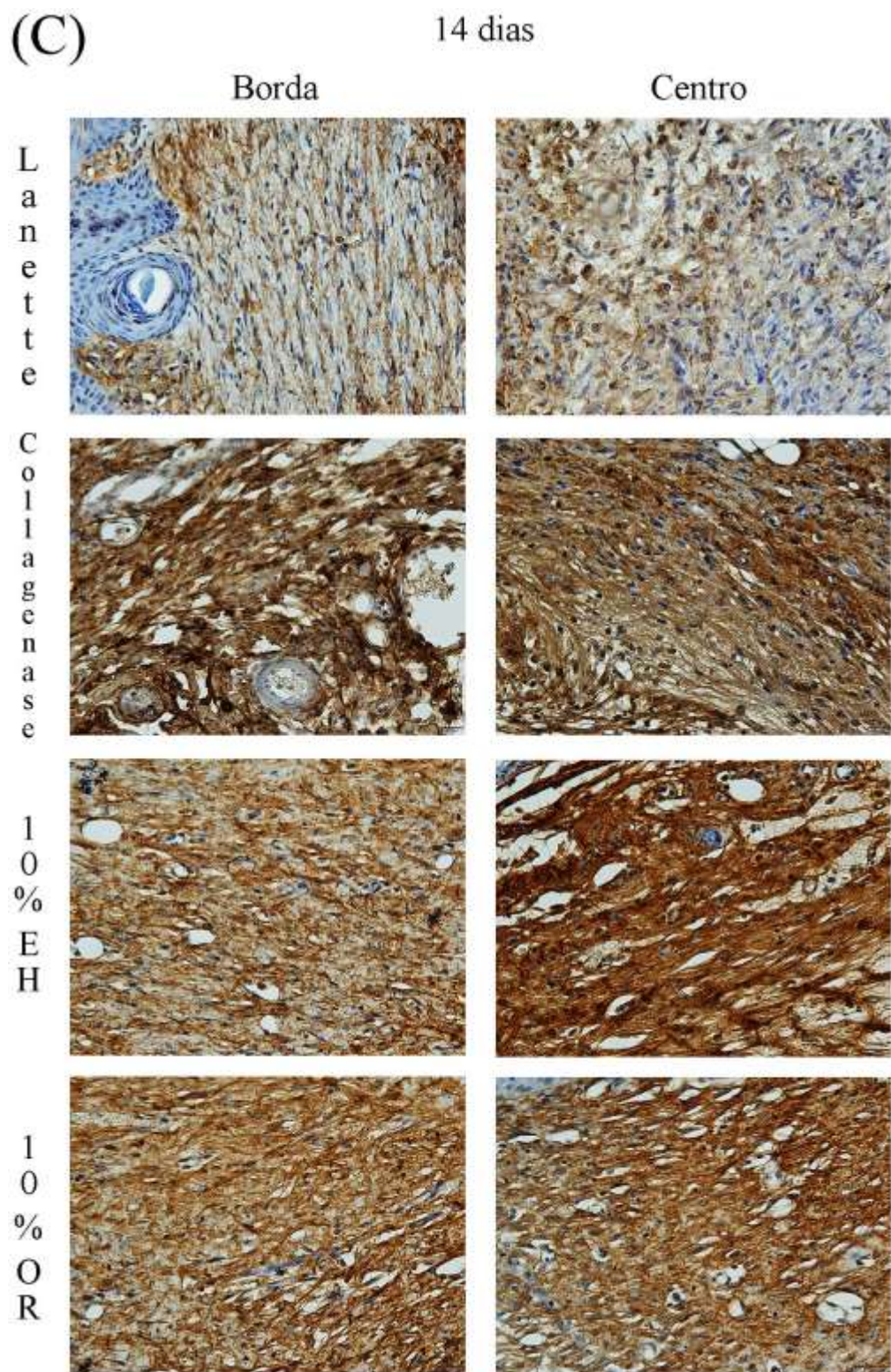


Figura 15 (C): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo colágeno 1 das lesões de pele dos ratos tratados por 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

A análise imunohistoquímica para colágeno III mostrou a área marcada (μm^2) das regiões de borda, centro da lesão e pele normal para a quantificação da principal proteína presente na matriz extracelular provisória da cicatrização de feridas. Não houve diferença na imunomarcagem das bordas das lesões após 3 e 7 dias. Em 14 dias, observamos menor área de marcação de colágeno III nos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR comparados ao Lanette. No centro das lesões, após 7 dias, houve aumento da imunomarcagem dessa proteína nos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR em relação ao Lanette. Com 14 dias de tratamento, observamos a diminuição da área marcada nos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR em relação ao grupo Lanette. A região de pele normal não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados (figuras 16 e 17A-C).

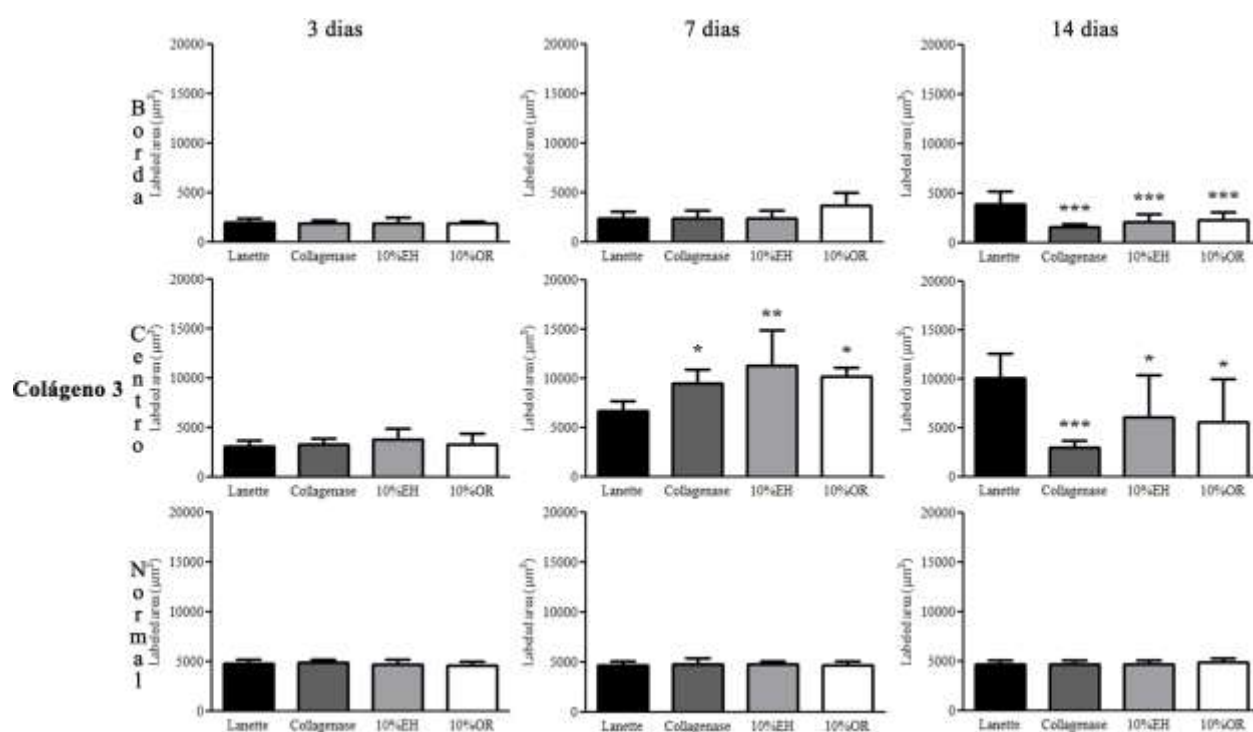


Figura 16: Área imunomarcada (μm^2) pelo anticorpo colágeno 3 das três regiões de lesão da pele de ratos tratados por 3, 7 ou 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ em relação ao grupo Lanette utilizando ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls ($n = 8$).

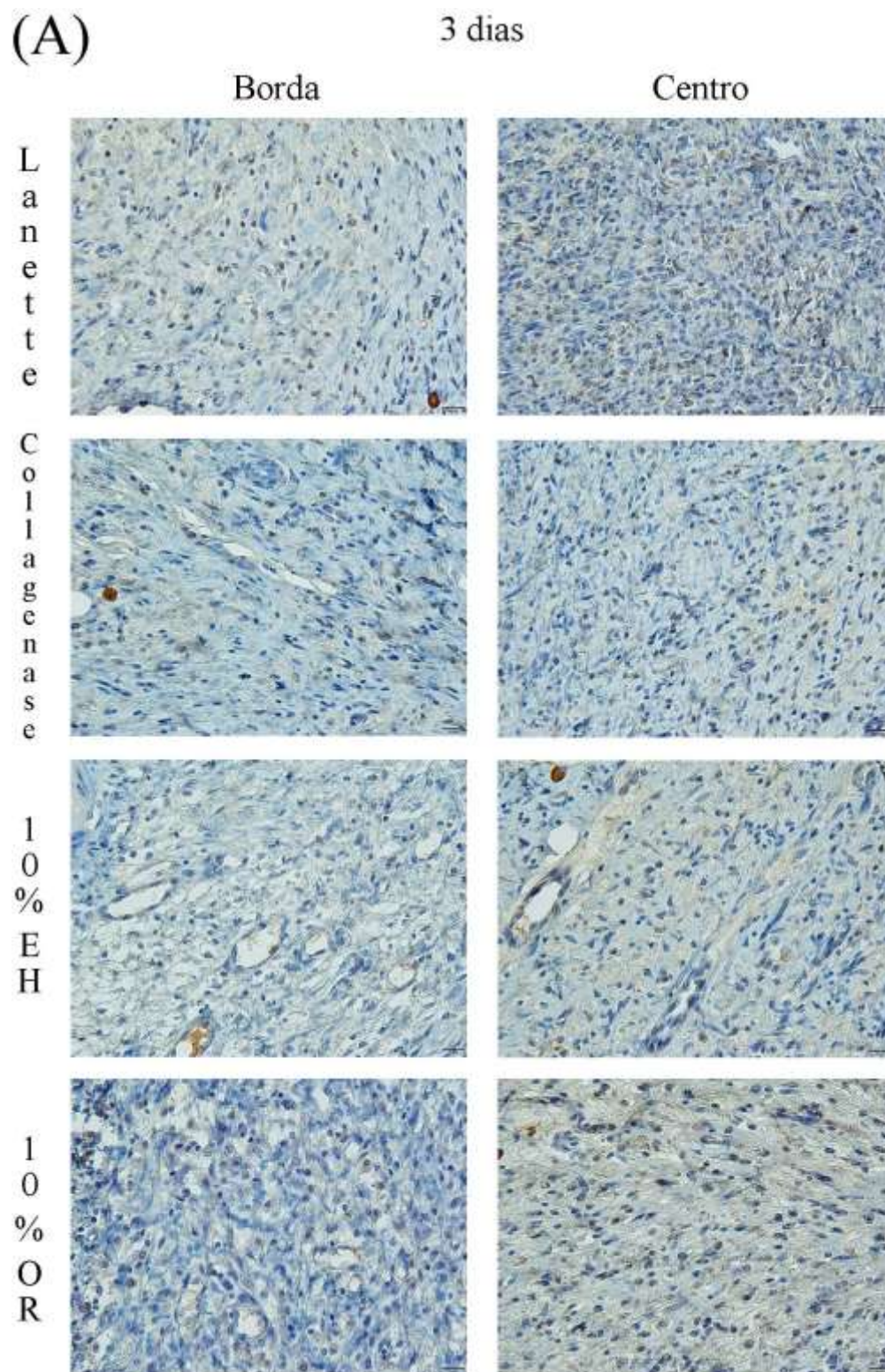


Figura 17 (A): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo colágeno 3 das lesões de pele dos ratos tratados por 3 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

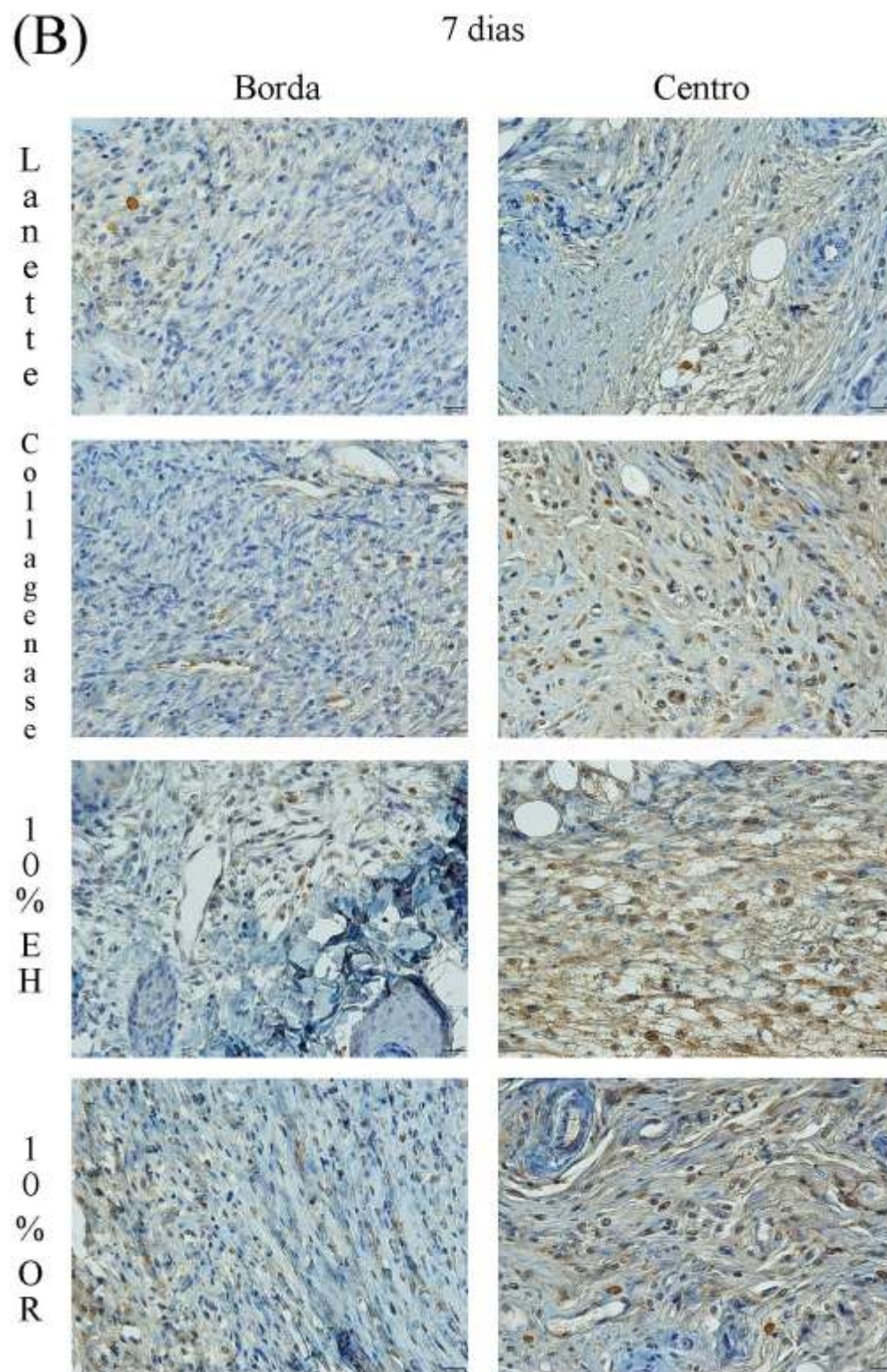


Figura 17 (B): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo colágeno 3 das lesões de pele dos ratos tratados por 7 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

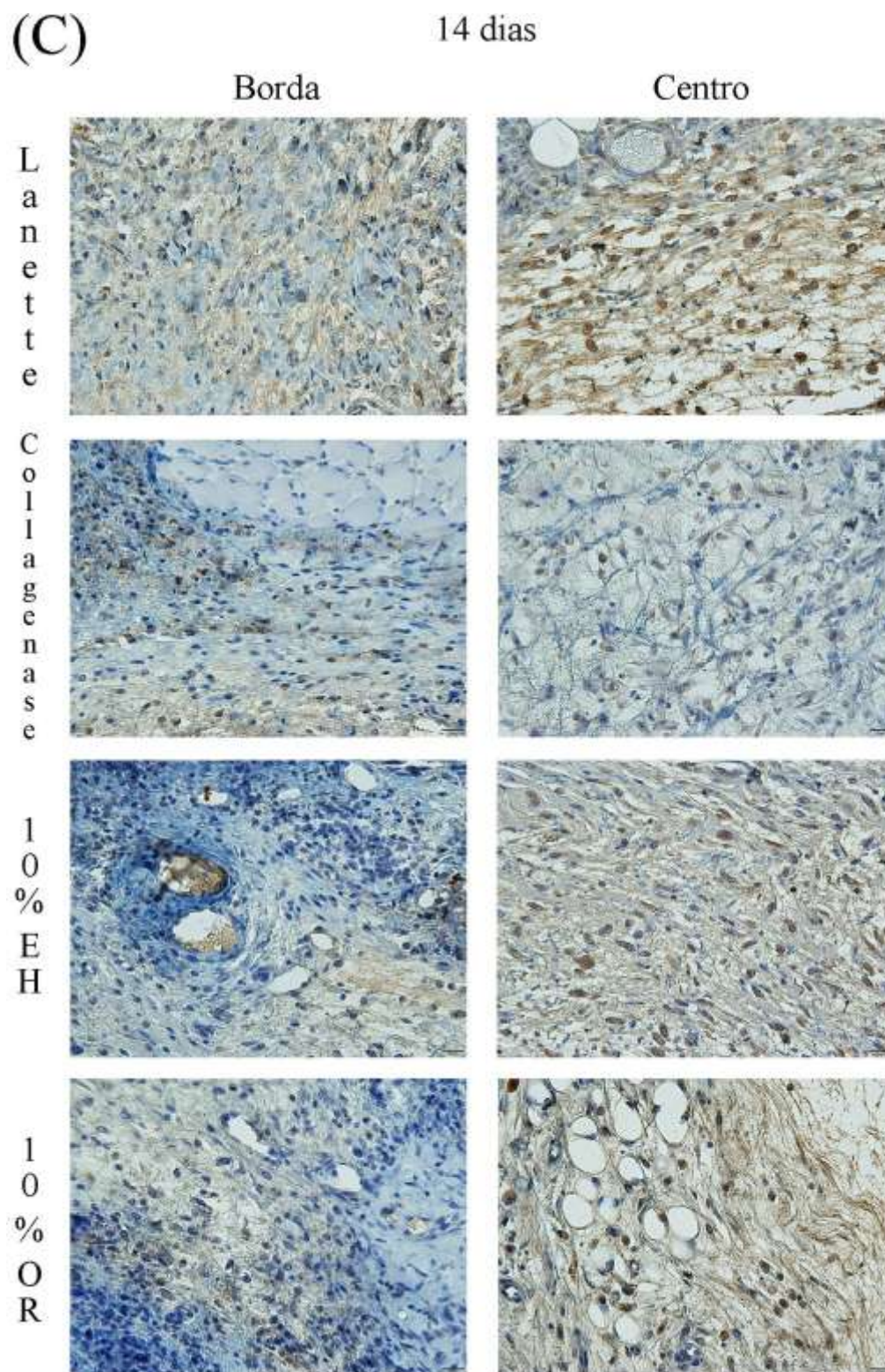


Figura 17 (C): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo colágeno 3 das lesões de pele dos ratos tratados por 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

Na análise imunohistoquímica para COX-2 foi quantificada a área marcada (μm^2) pelo anticorpo nas regiões de borda, centro da lesão e pele normal. As análises não demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos tratados em nenhuma das 3 regiões (figuras 18 e 19A-C).

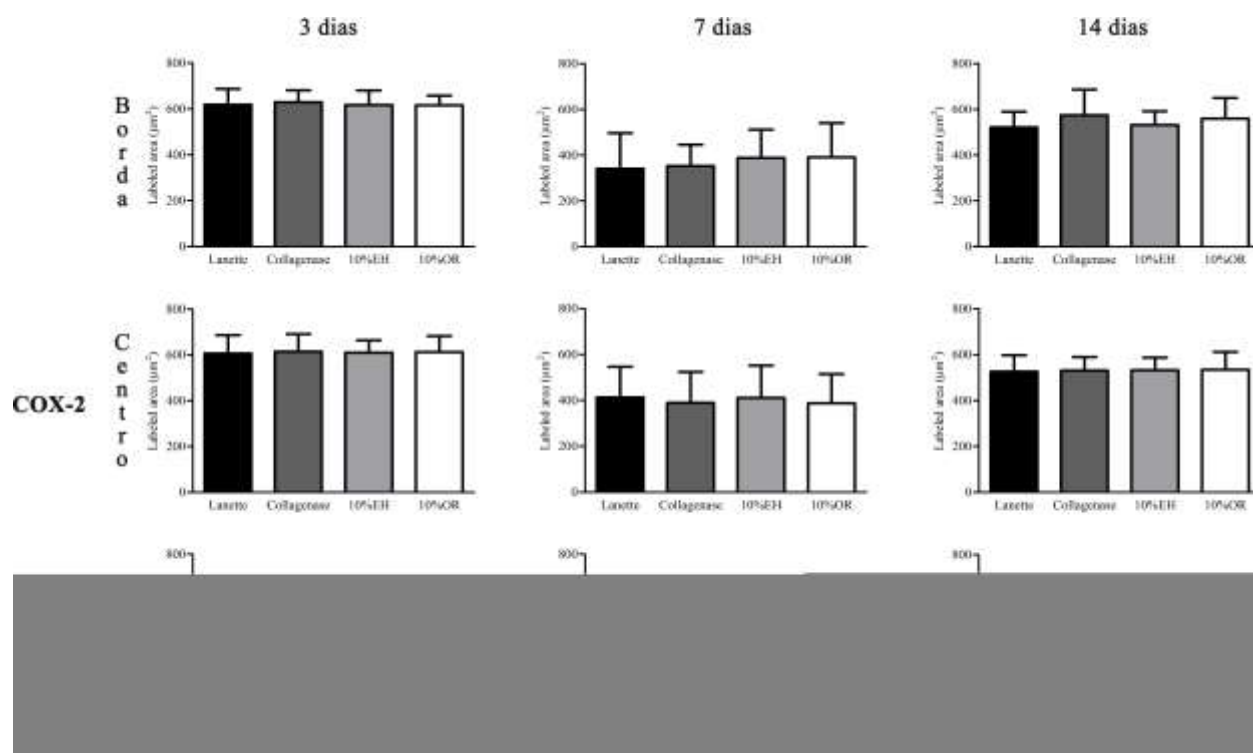


Figura 18: Área imunomarcada (μm^2) pelo anticorpo COX-2 das três regiões de lesão da pele de ratos tratados por 3, 7 ou 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR utilizando ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls ($n = 8$).

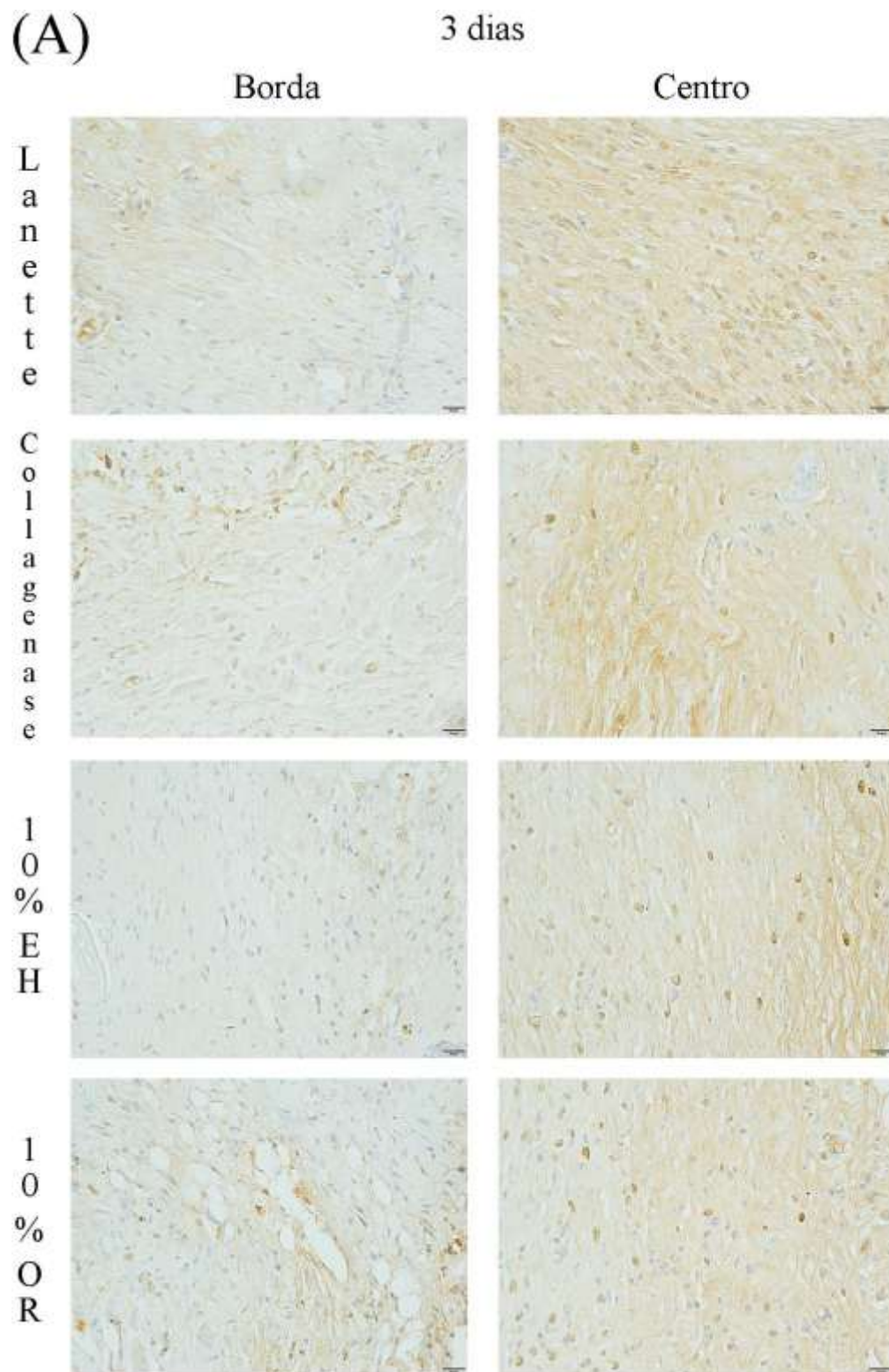


Figura 19 (A): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo COX-2 das lesões de pele dos ratos tratados por 3 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

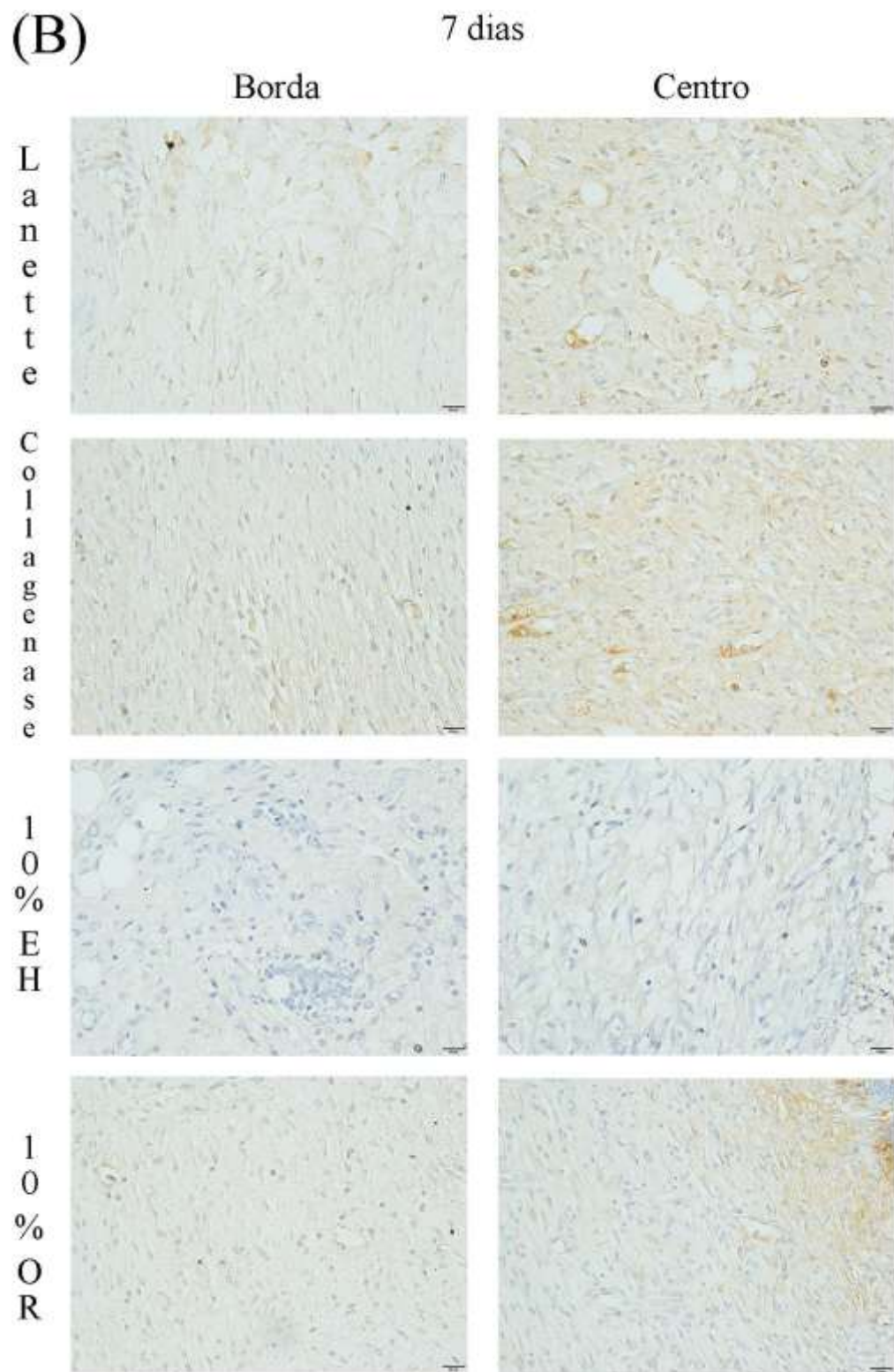


Figura 19 (B): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo COX-2 das lesões de pele dos ratos tratados por 7 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

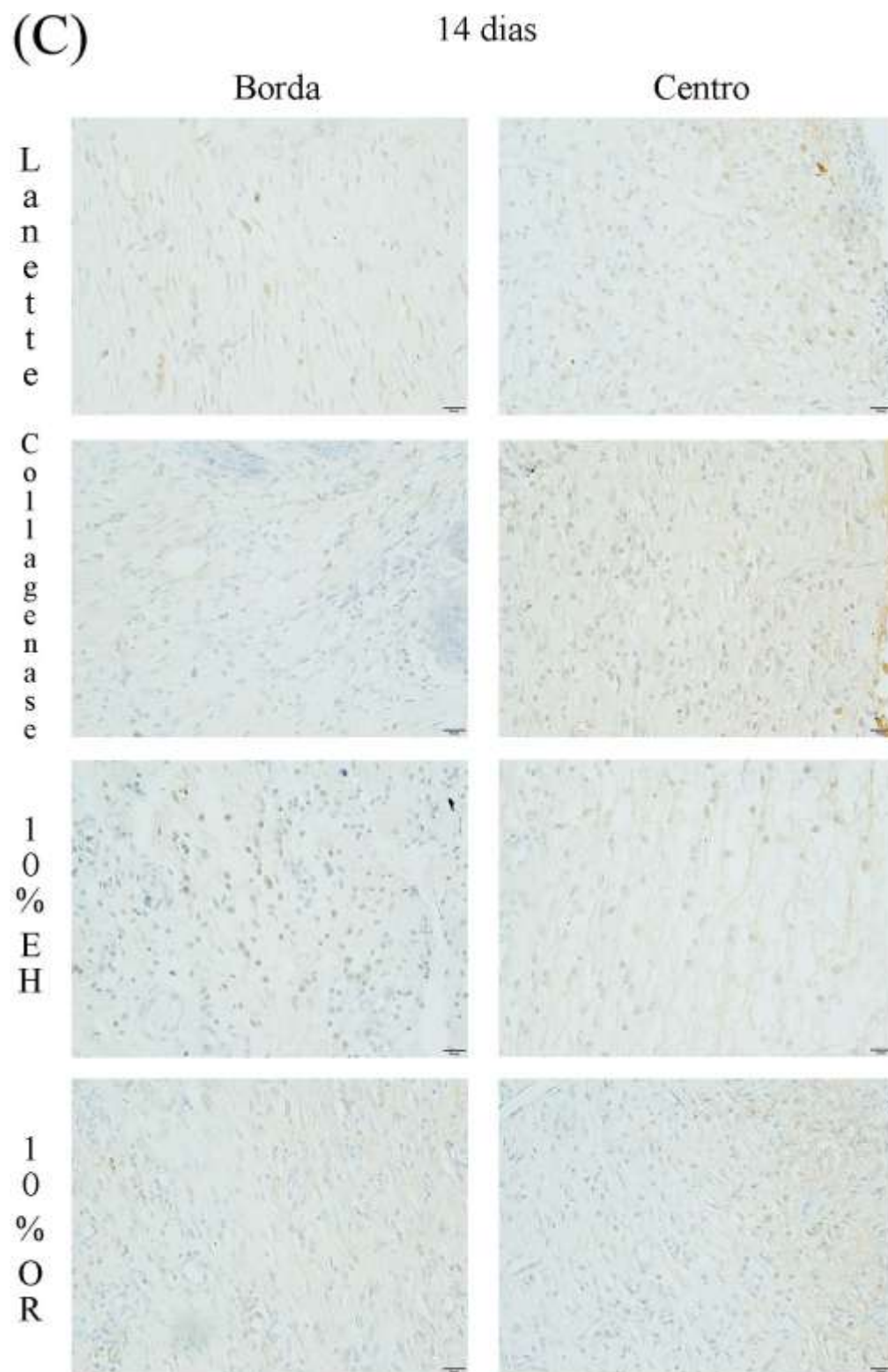


Figura 19 (C): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo COX-2 das lesões de pele dos ratos tratados por 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

A imunomarcção para EGF mostrou a área (μm^2) marcada nas regiões de borda das lesões e pele normal. Na borda das lesões houve aumento da área marcada pelo anticorpo em 3 e 14 dias nos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR em relação ao grupo Lanette. Na região de pele normal não observamos diferença estatística entre os tratamentos (figuras 20 e 21). A região central das lesões não foi quantificada, pois as feridas do grupo Lanette não se encontravam completamente reepitelizada, sendo inviável a marcação do centro das lesões.

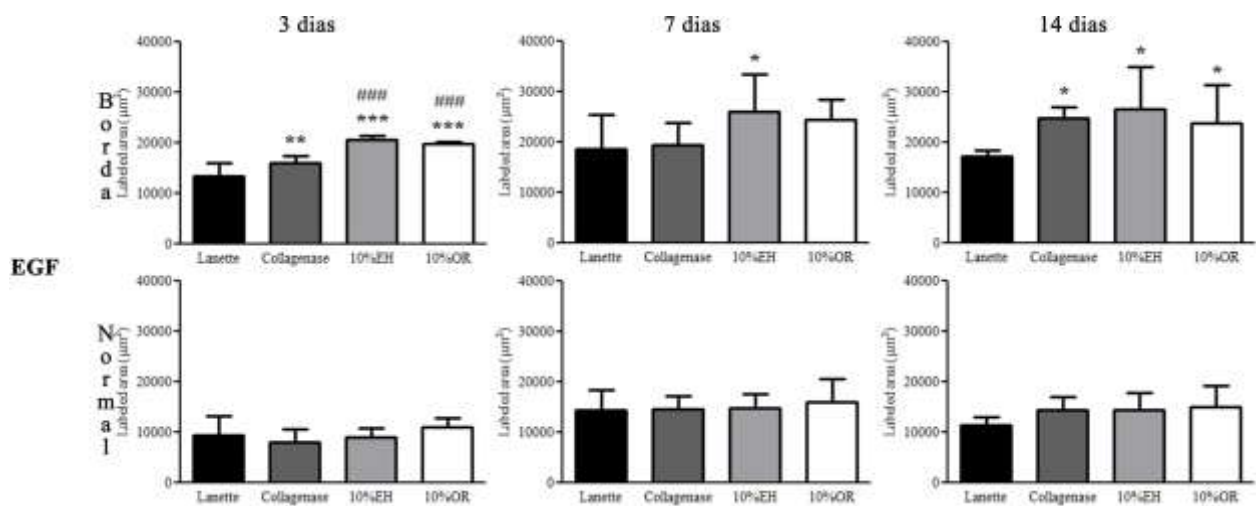


Figura 20: Área imunomarcada (μm^2) pelo anticorpo EGF da borda de lesão e pele normal de ratos tratados por 3, 7 ou 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ em relação ao grupo Lanette. ### $p < 0.001$ em relação ao grupo Collagenase utilizando ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls ($n = 8$).

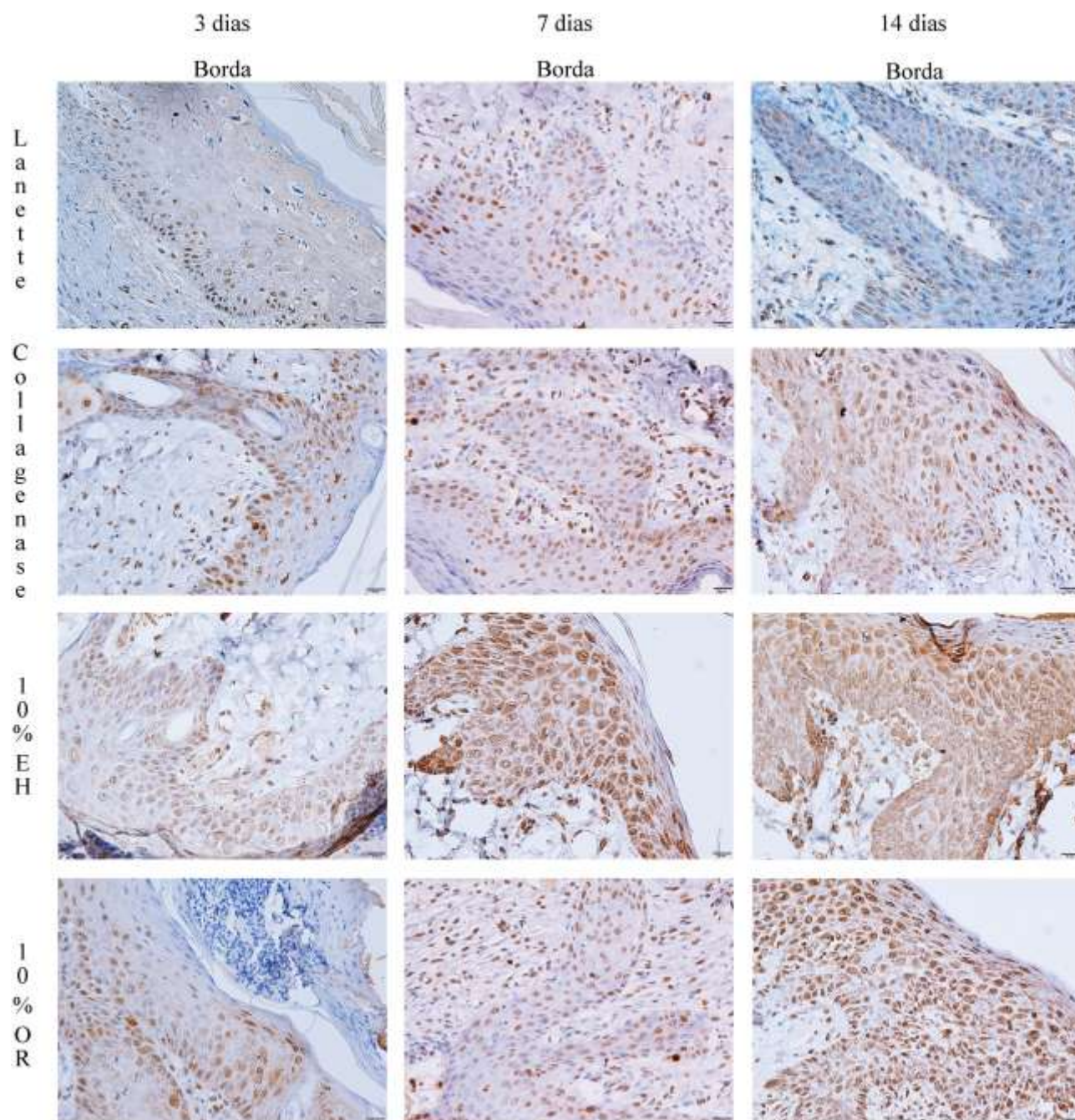


Figura 21: Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo EGF da borda das lesões de pele dos ratos tratados por 3, 7 ou 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20 μ m.

A análise imunohistoquímica para FGF-2 mostrou a área marcada (μ m²) das regiões de borda, centro da lesão e pele normal para a quantificação do fator de crescimento que estimula a

proliferação de fibroblastos e a síntese de matriz extracelular. Não houve diferença na imunomarcção após 3 e 7 dias. Em 14 dias, observamos aumento da imunomarcção do anticorpo nas bordas e centro das lesões do tratamento 10% OR, em relação aos grupos Lanette e Collagenase. A região de pele normal não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados (figuras 22 e 23A-C).

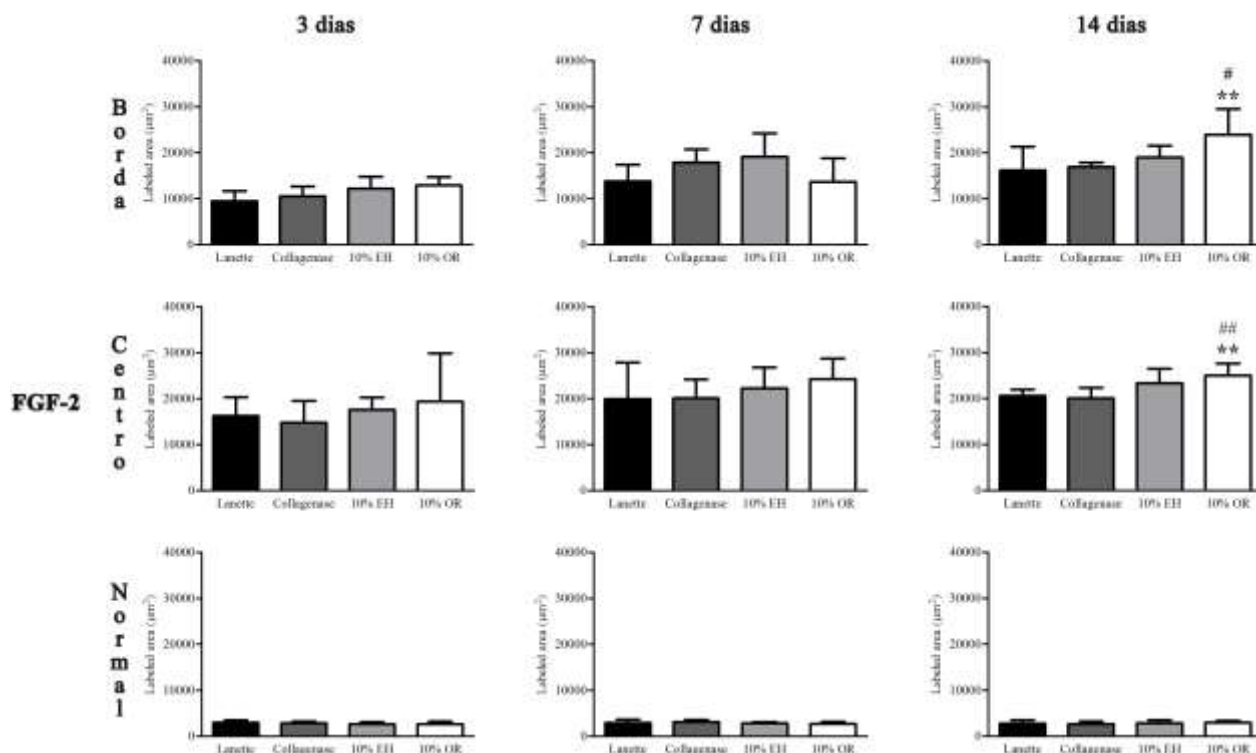


Figura 22: Área imunomarcada (μm^2) pelo anticorpo FGF-2 das três regiões de lesão da pele de ratos tratados por 3, 7 ou 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. ^{**} $p < 0.01$ em relação ao grupo Lanette. [#] $p < 0.05$ em relação ao grupo Collagenase, utilizando ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls ($n = 8$).

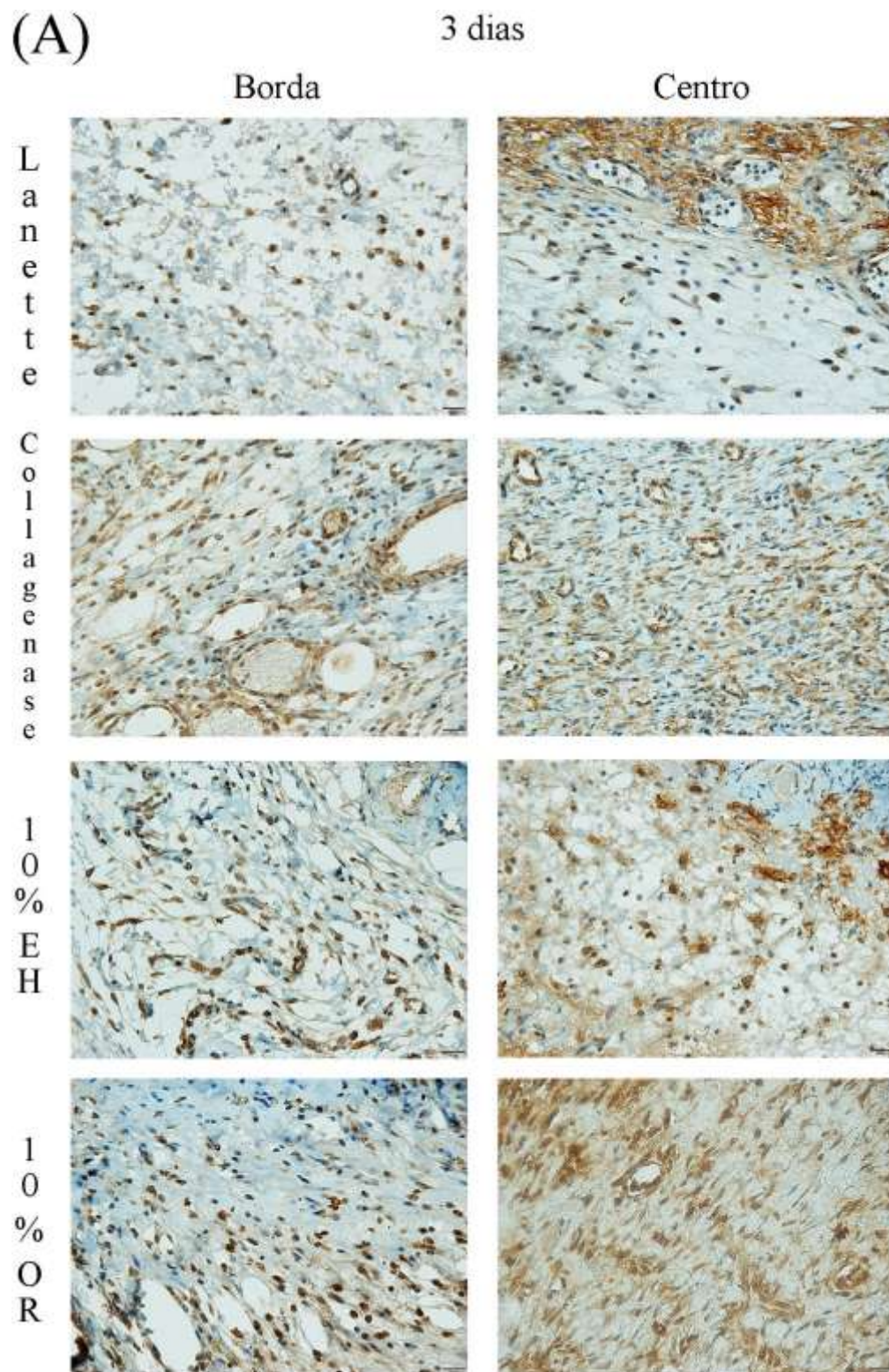


Figura 23 (A): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo FGF-2 das lesões de pele dos ratos tratados por 3 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

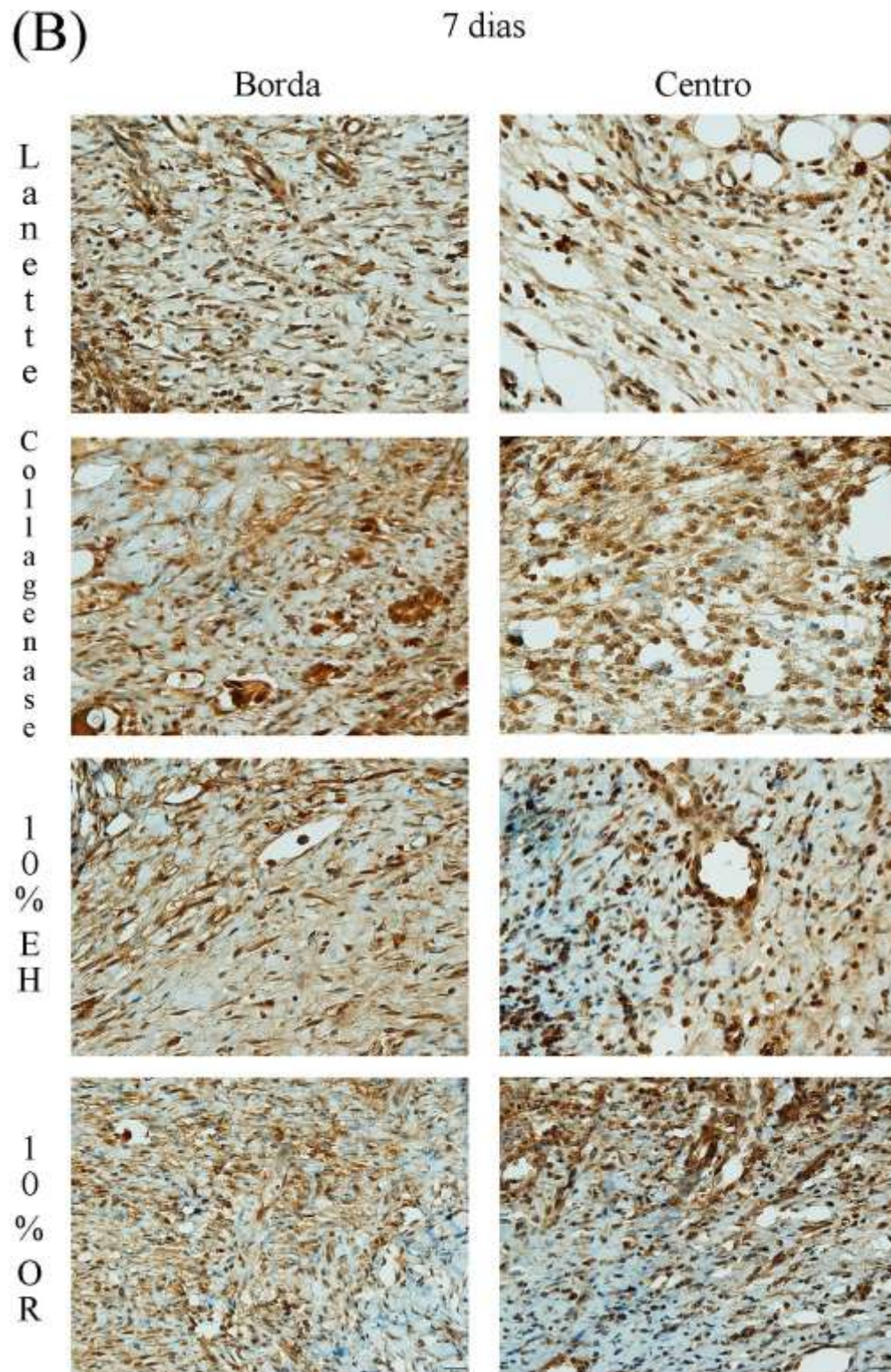


Figura 23 (B): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo FGF-2 das lesões de pele dos ratos tratados por 7 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

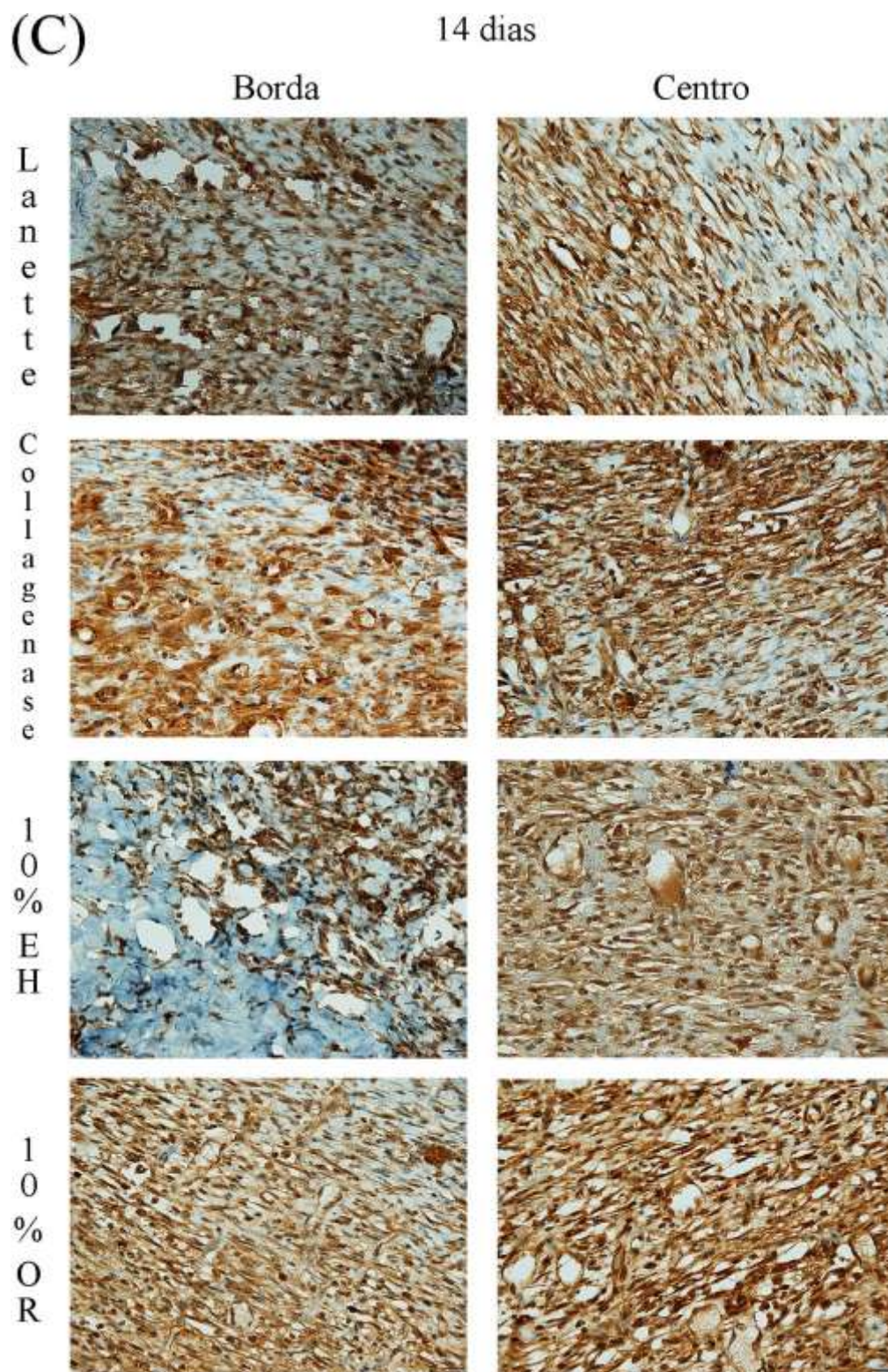


Figura 23 (C): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo FGF-2 das lesões de pele dos ratos tratados por 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

A imunomarcção para MIF mostrou a área (μm^2) marcada nas regiões de borda, centro da lesão e pele normal. Na borda das lesões, após 14 dias de tratamento, houve aumento da imunomarcção para o MIF nos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR comparados ao grupo Lanette. Observamos também que o grupo 10% EH demonstrou aumento da área marcada em relação aos grupos Collagenase e 10% OR. No centro das lesões, após 3 dias de tratamento, observamos o aumento da imunomarcção nos grupos 10% EH e 10% OR em relação ao grupo Lanette. Após 14 dias, houve aumento significativo da área marcada nos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR em relação ao grupo Lanette. Destaca-se nesse período o grupo 10% EH, com maior imunomarcção comparado ao tratamento Collagenase. Não houve alterações significativas entre os tratamentos na região de pele normal (figuras 24 e 25A-C).

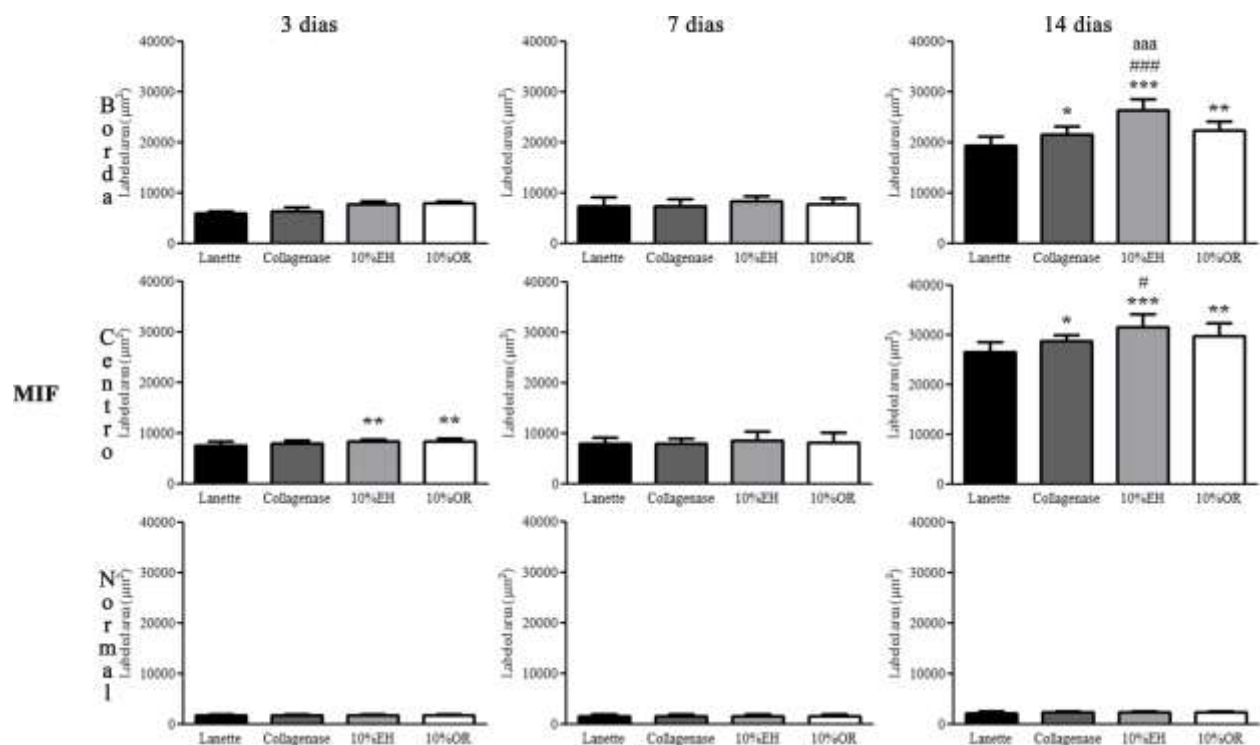


Figura 24: Área imunomarcada (μm^2) pelo anticorpo MIF das três regiões de lesão da pele de ratos tratados por 3, 7 ou 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ em relação ao grupo Lanette. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ em relação ao grupo Collagenase. aaa $p < 0.05$ em relação ao grupo 10% OR utilizando ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls ($n = 8$).

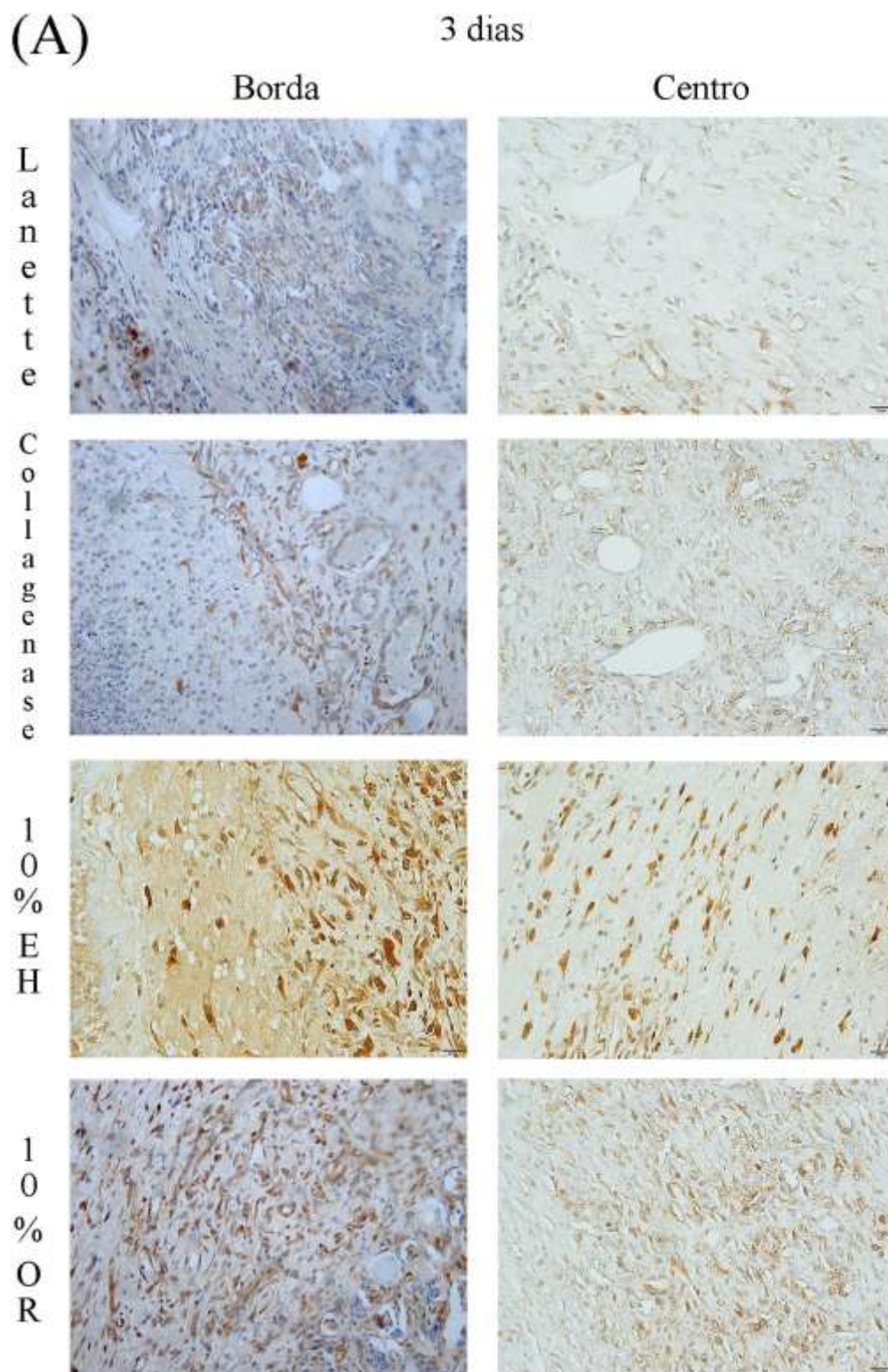


Figura 25 (A): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo MIF das lesões de pele dos ratos tratados por 3 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

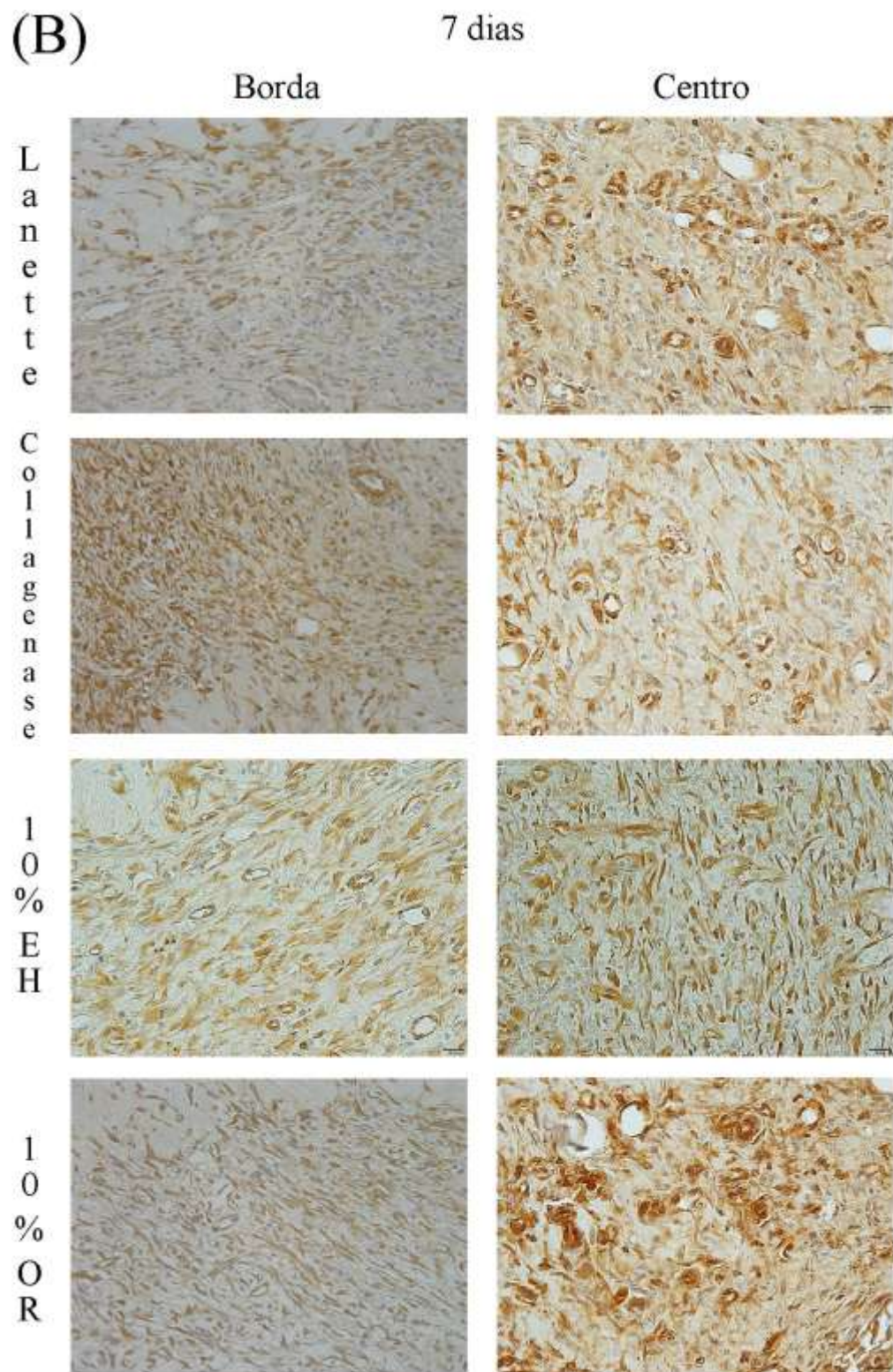


Figura 25 (B): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo MIF das lesões de pele dos ratos tratados por 7 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

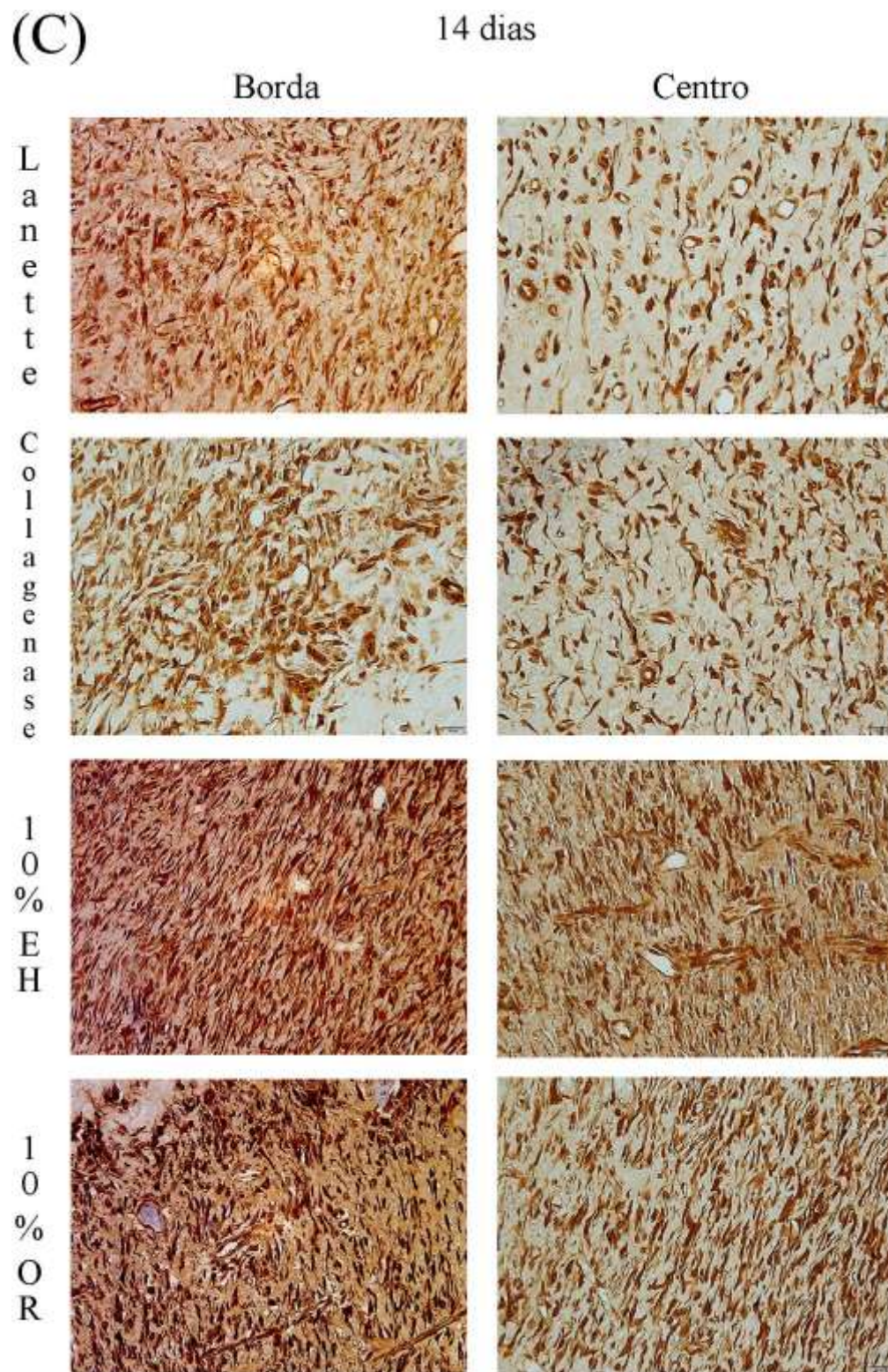


Figura 25 (C): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo MIF das lesões de pele dos ratos tratados por 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

A análise imunohistoquímica para MMP-2 (pró-MMP-2) mostrou a área marcada (μm^2) das regiões de borda, centro da lesão e pele normal. Na borda das lesões, observamos aumento da área marcada no grupo Collagenase em relação ao Lanette em 3 dias. Após 7 dias, a imunomarcação da enzima estava aumentada nos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR comparados ao Lanette. Destaca-se nesse período o tratamento Collagenase, o qual apresentou maior atividade que os grupos 10% EH e 10% OR. Em 14 dias, houve aumento de MMP-2 nos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR comparados ao Lanette. No centro das lesões, houve aumento da área marcada para MMP-2 nos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR em relação ao grupo Lanette após 3, 7 e 14 dias de tratamento. Não houve alterações significativas entre os tratamentos na região de pele normal (figuras 26 e 27A-C).

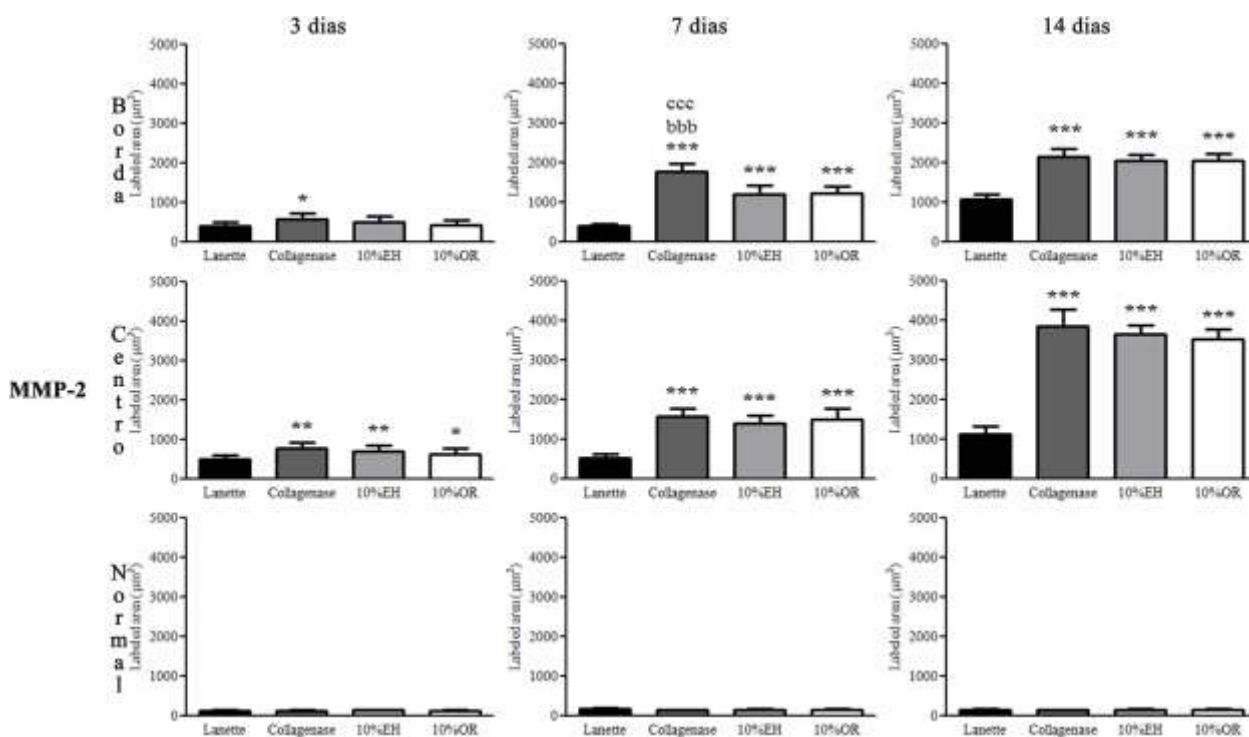


Figura 26: Área marcada (μm^2) pelo anticorpo MMP-2 (pró-MMP-2) das três regiões de lesão da pele de ratos tratados por 3, 7 ou 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ em relação ao grupo Lanette. ^{bbb} $p < 0.001$ em relação ao grupo 10% EH. ^{ccc} $p < 0.05$ em relação ao grupo 10% OR utilizando ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls ($n = 8$).

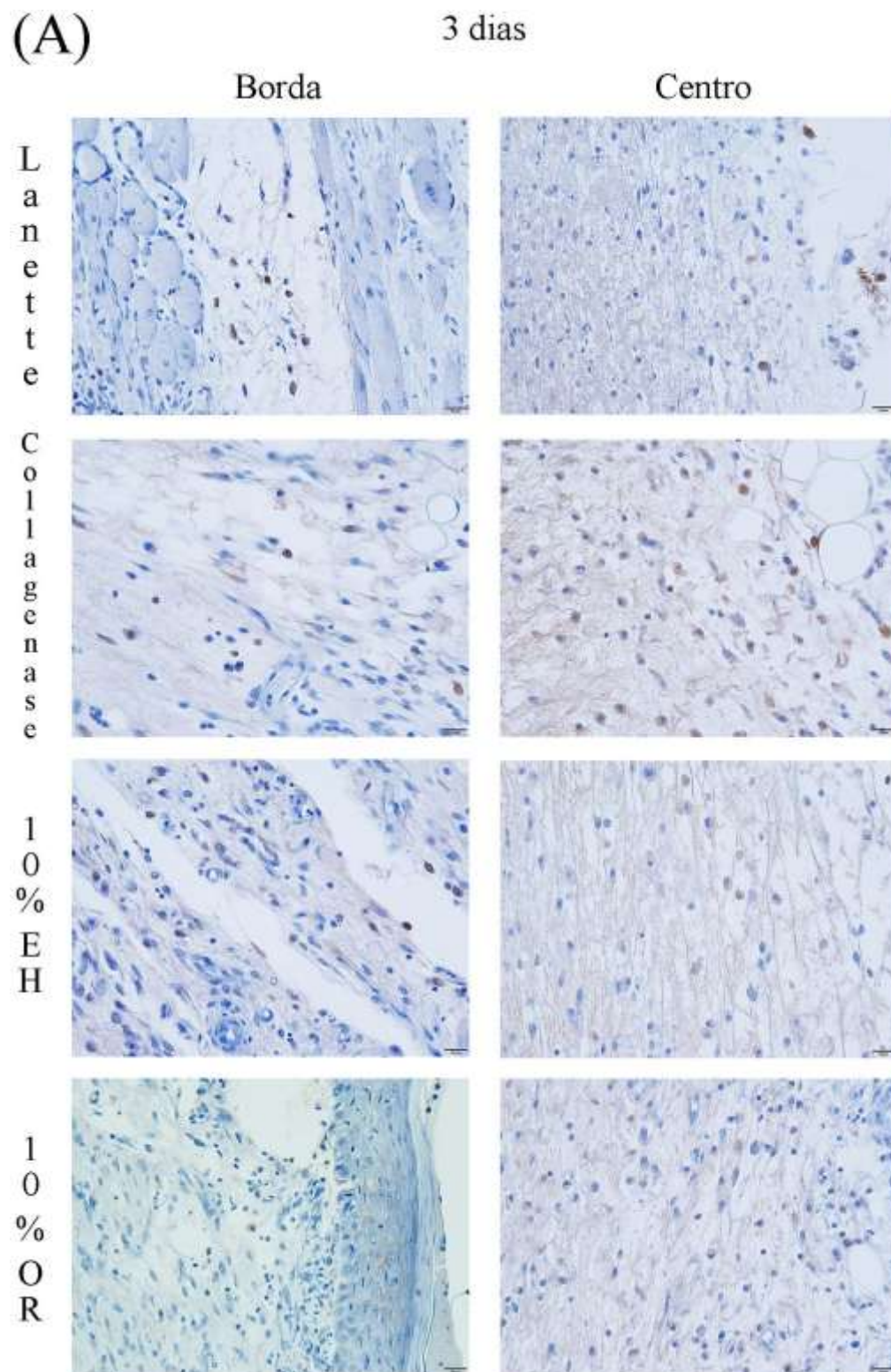


Figura 27 (A): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo MMP-2 (pró-MMP-2) das lesões de pele dos ratos tratados por 3 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

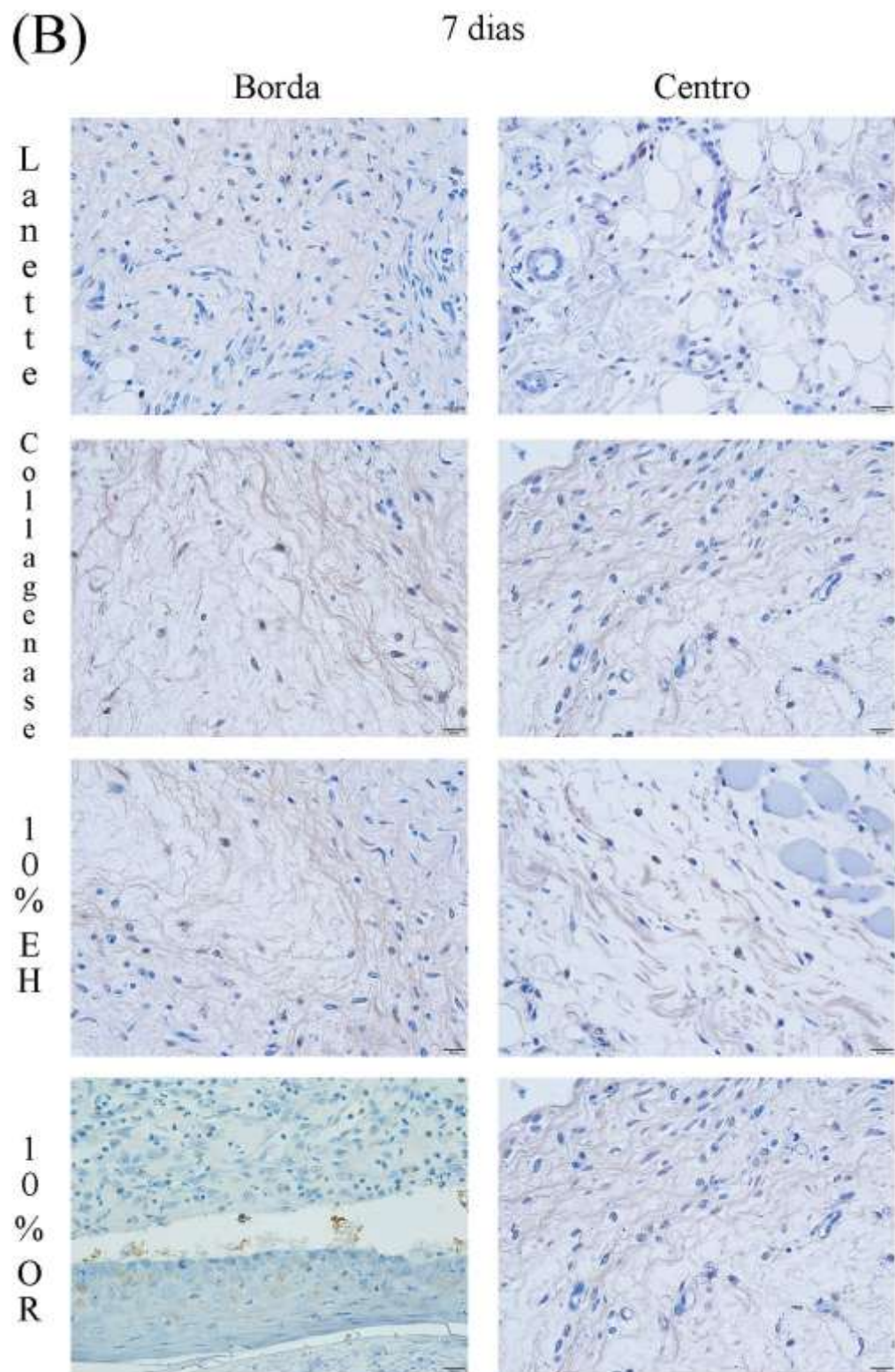


Figura 27 (B): Fotomicrografia de imunomarcação para anticorpo MMP-2 (pró-MMP-2) das lesões de pele dos ratos tratados por 7 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

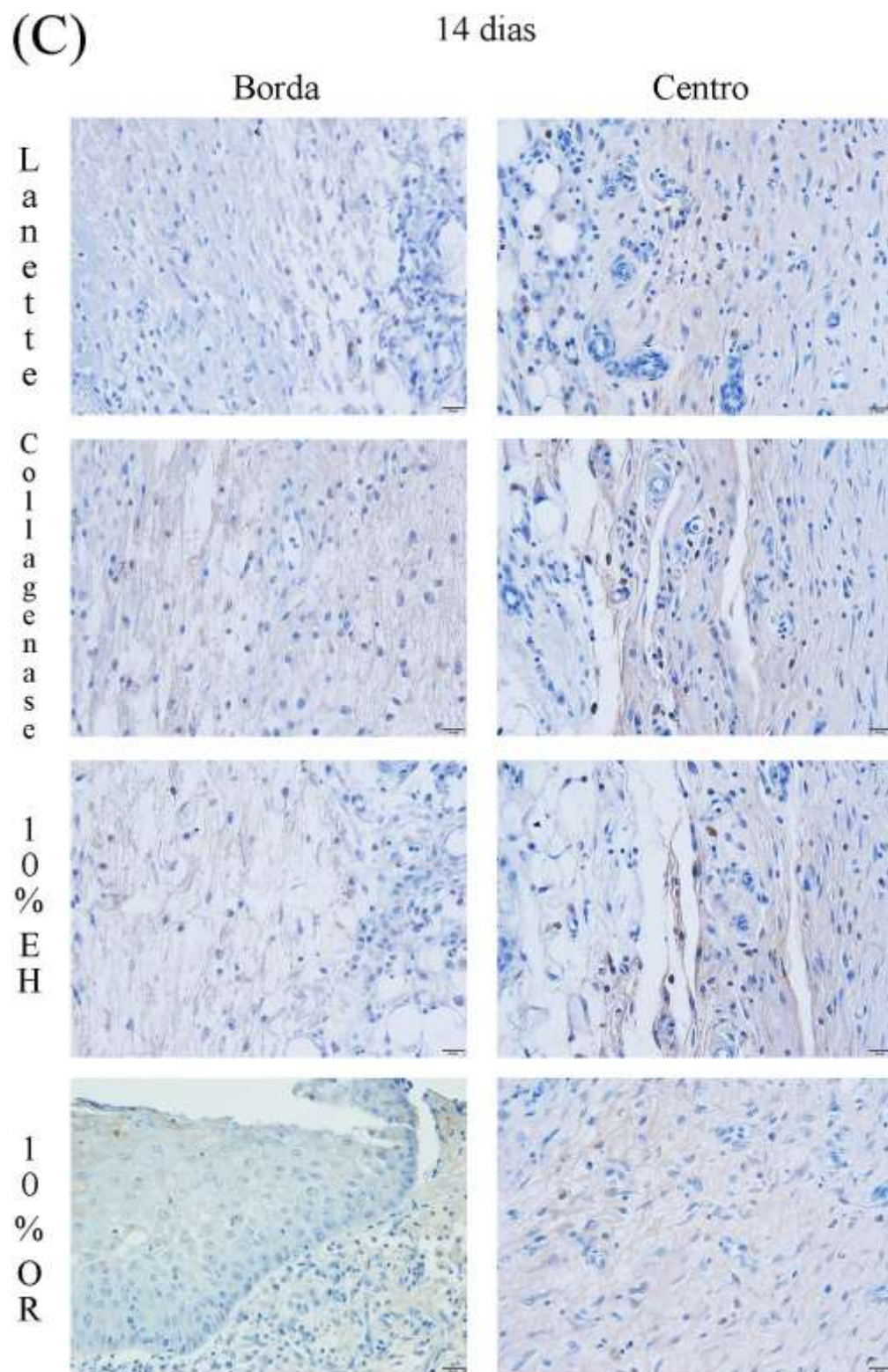


Figura 27 (C): Fotomicrografia de imunomarcação para anticorpo MMP-2 (pró-MMP-2) das lesões de pele dos ratos tratados por 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

A análise imunohistoquímica para MMP-9 (pró-MMP-9) mostrou a área marcada (μm^2) das regiões de borda, centro da lesão e pele normal. Na borda das lesões, observamos um aumento da área marcada da proteína nos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR comparados ao Lanette após 3 dias. Destaca-se o tratamento Collagenase, com maior área marcada em relação aos grupos 10% EH e 10% OR e o tratamento 10% EH com maior imunomarcação comparado ao grupo 10% OR. Após 14 dias, o tratamento Collagenase demonstrou aumento da marcação de MMP-9 em relação ao grupo Lanette. No centro das lesões, os grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR tiveram aumento da área marcada de MMP-9 comparados ao grupo Lanette. Não houve alterações significativas entre os tratamentos na região de pele normal (figuras 28 e 29A-C).

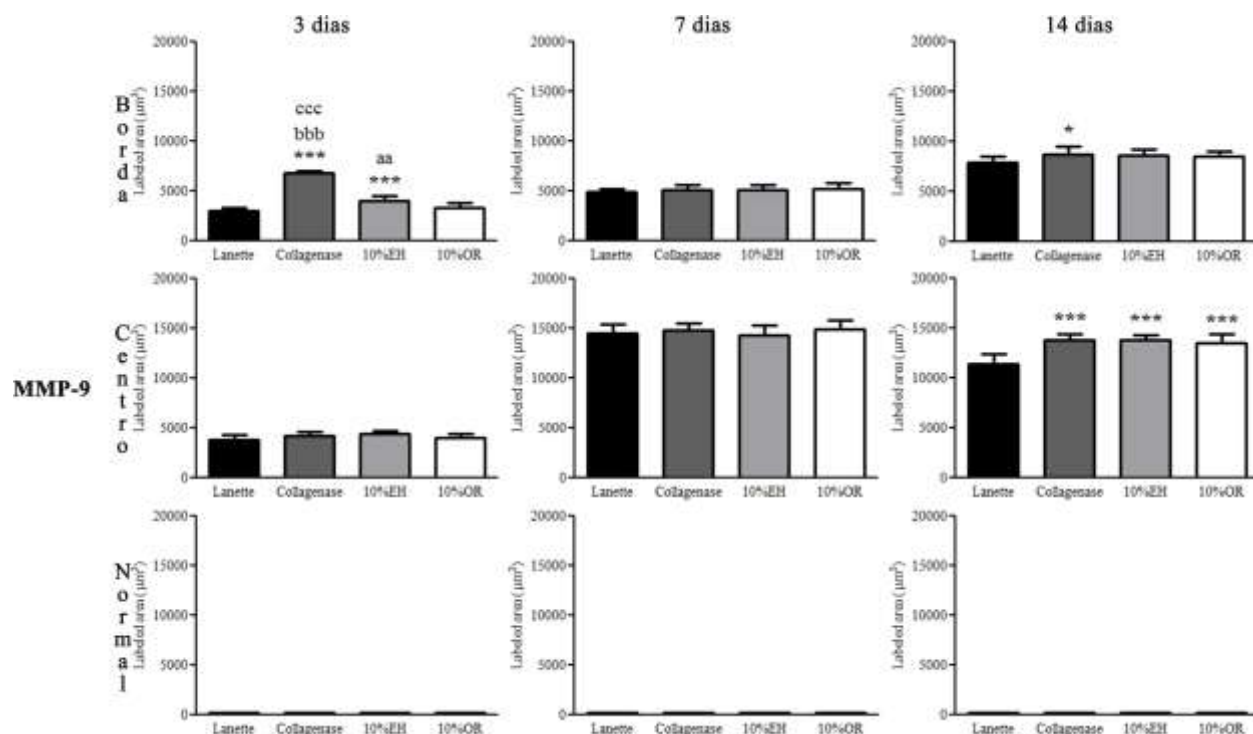


Figura 28: Área imunomarcada (μm^2) pelo anticorpo MMP-9 (pró-MMP-9) das três regiões de lesão da pele de ratos tratados por 3, 7 ou 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ em relação ao grupo Lanette. ^{bbb} $p < 0.001$ em relação ao grupo 10% EH. ^{ccc} $p < 0.05$ em relação ao grupo 10% OR. ^{aa} $p < 0.01$ em relação ao grupo 10% OR utilizando ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls ($n = 8$).

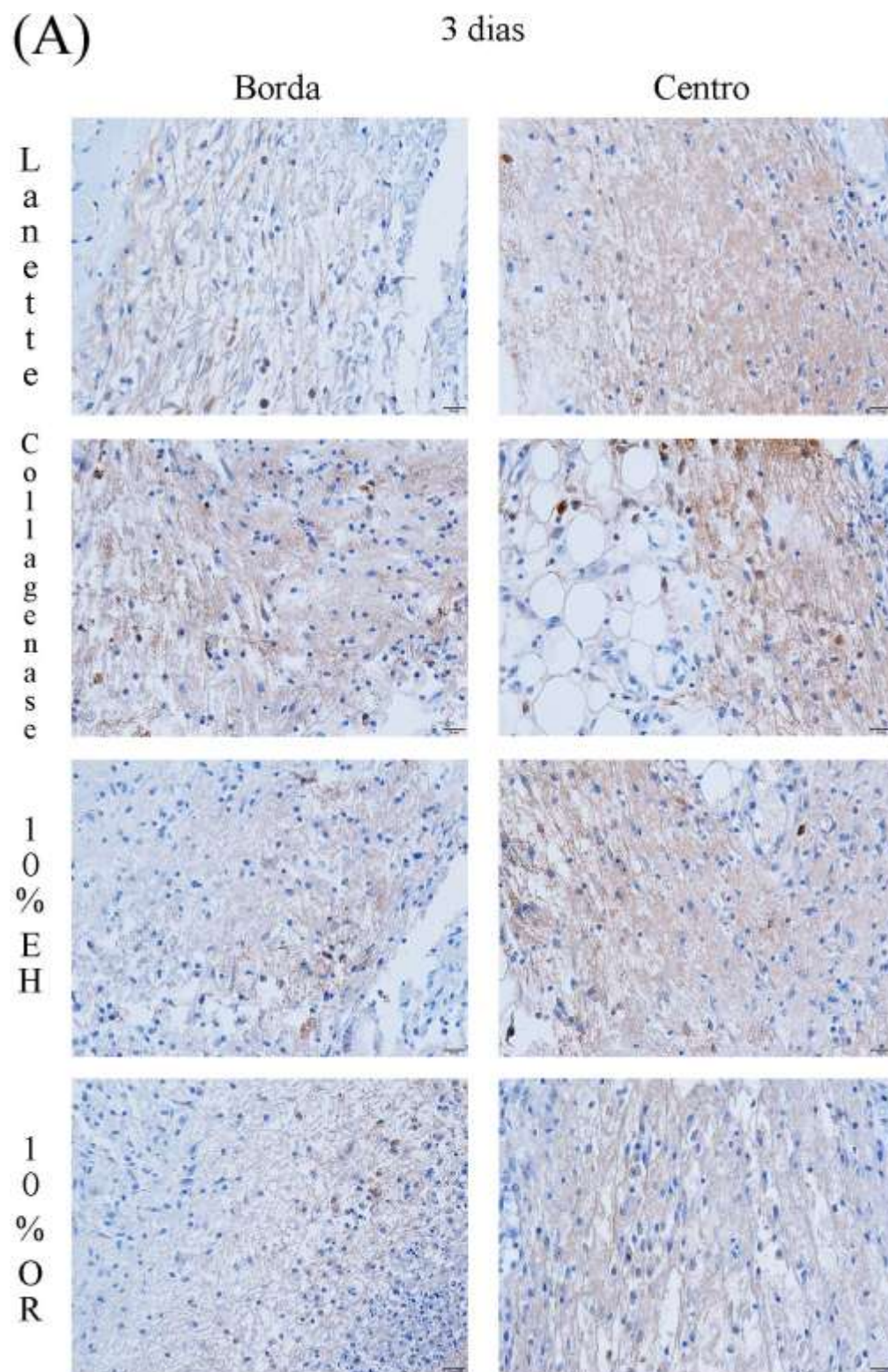


Figura 29 (A): Fotomicrografia de imunomarcação para anticorpo MMP-9 (pró-MMP-9) das lesões de pele dos ratos tratados por 3 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

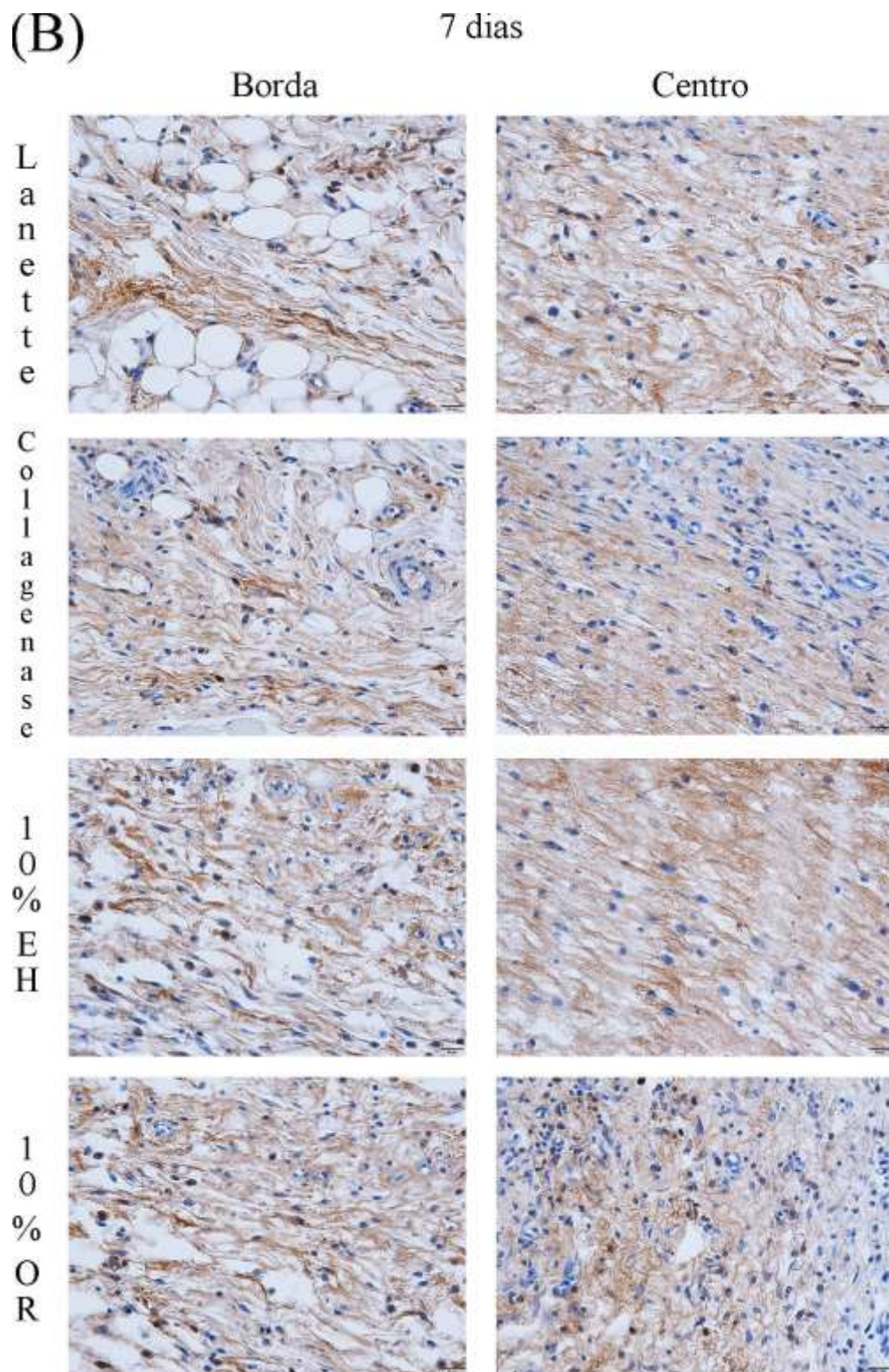


Figura 29 (B): Fotomicrografia de imunomarcação para anticorpo MMP-9 (pró-MMP-9) das lesões de pele dos ratos tratados por 7 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

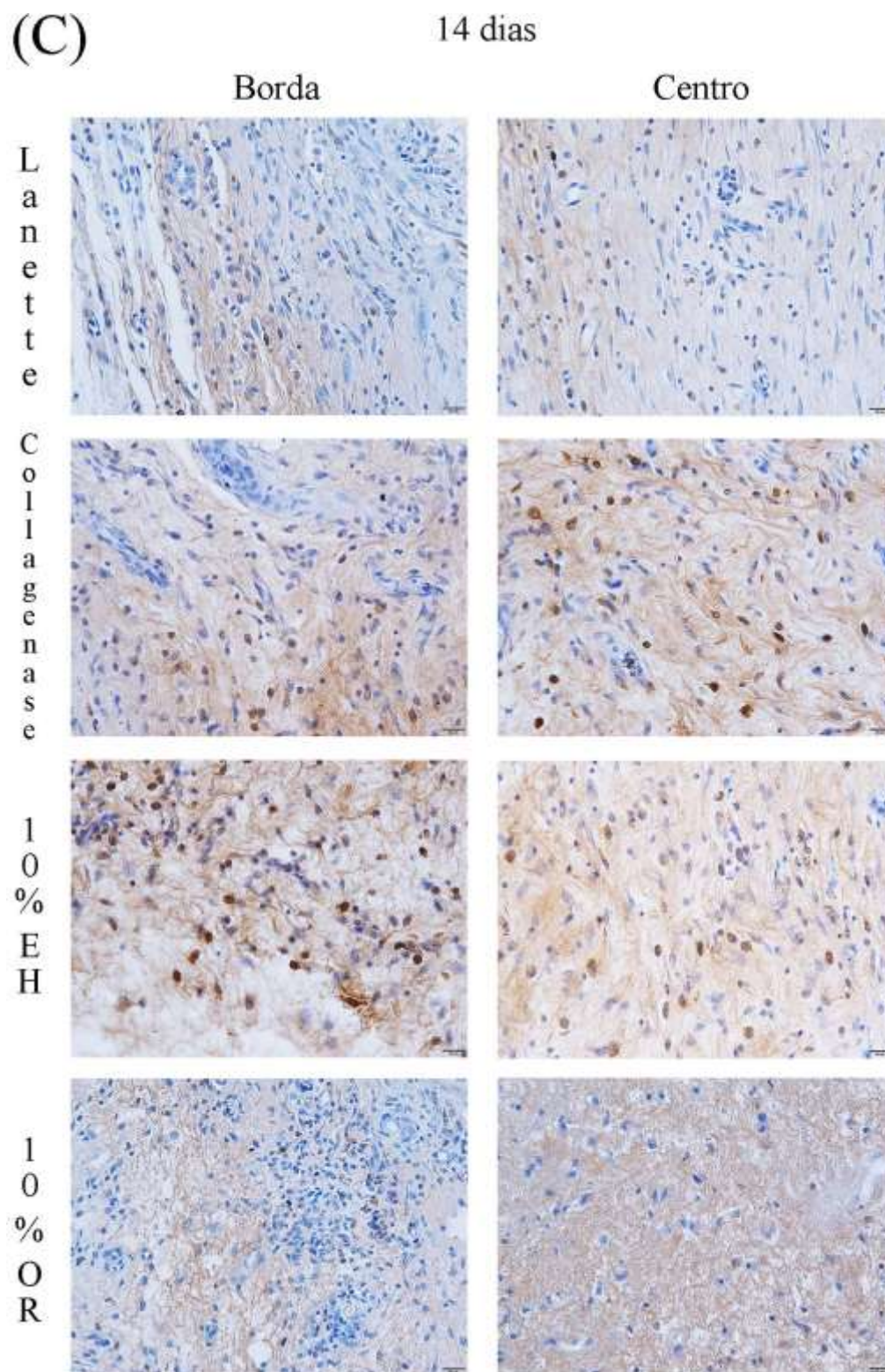


Figura 29 (C): Fotomicrografia de imunomarcação para anticorpo MMP-9 (pró-MMP-9) das lesões de pele dos ratos tratados por 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

A marcação imunohistoquímica para PCNA foi analisada nas regiões de borda, centro da lesão e pele normal. Na borda das lesões, observamos aumento da imunomarcção do anticorpo PCNA nos grupos 10% EH e 10% OR em relação aos grupos Lanette e Collagenase após 3 dias. Durante o tratamento por 14 dias, houve aumento da área marcada nos grupos 10% EH e 10% OR comparados ao Lanette. No centro das lesões, observamos aumento significativo da área marcada pelo anticorpo nos tratamentos 10% EH e 10% OR comparados ao grupo Lanette após 14 dias. Não houve alterações significativas entre os tratamentos na região de pele normal (figuras 30 e 31A-C).

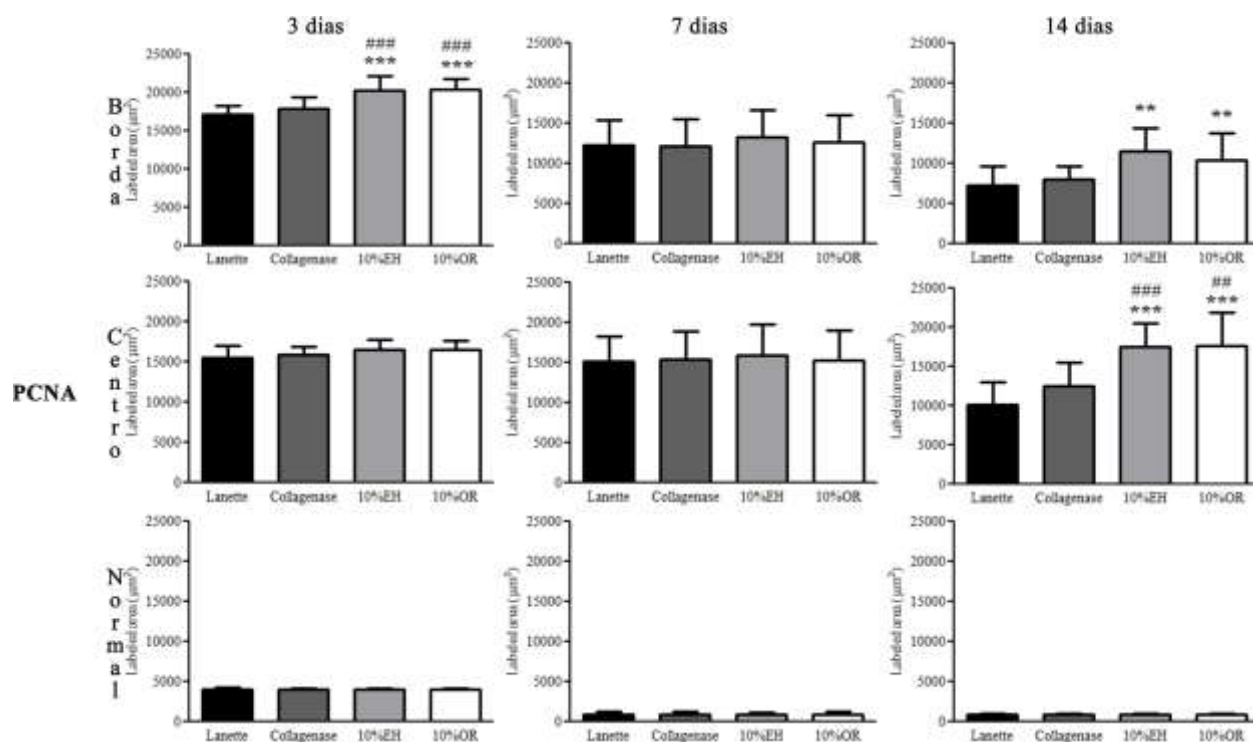


Figura 30: Área imunomarcada (μm^2) pelo anticorpo PCNA das três regiões de lesão da pele de ratos tratados por 3, 7 ou 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ em relação ao grupo Lanette. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ em relação ao grupo Collagenase utilizando ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls ($n = 8$).

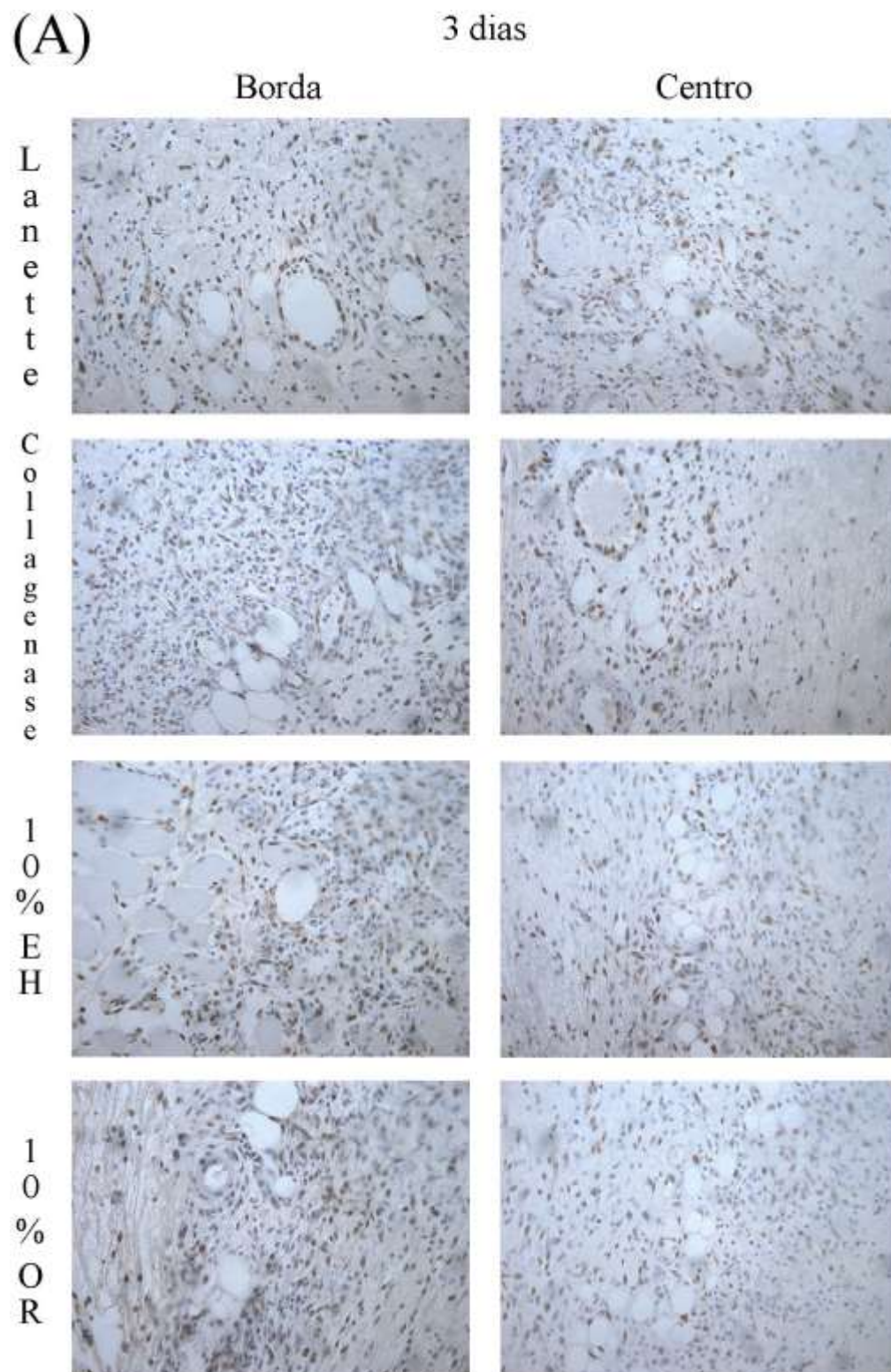


Figura 31 (A): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo PCNA das lesões de pele dos ratos tratados por 3 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

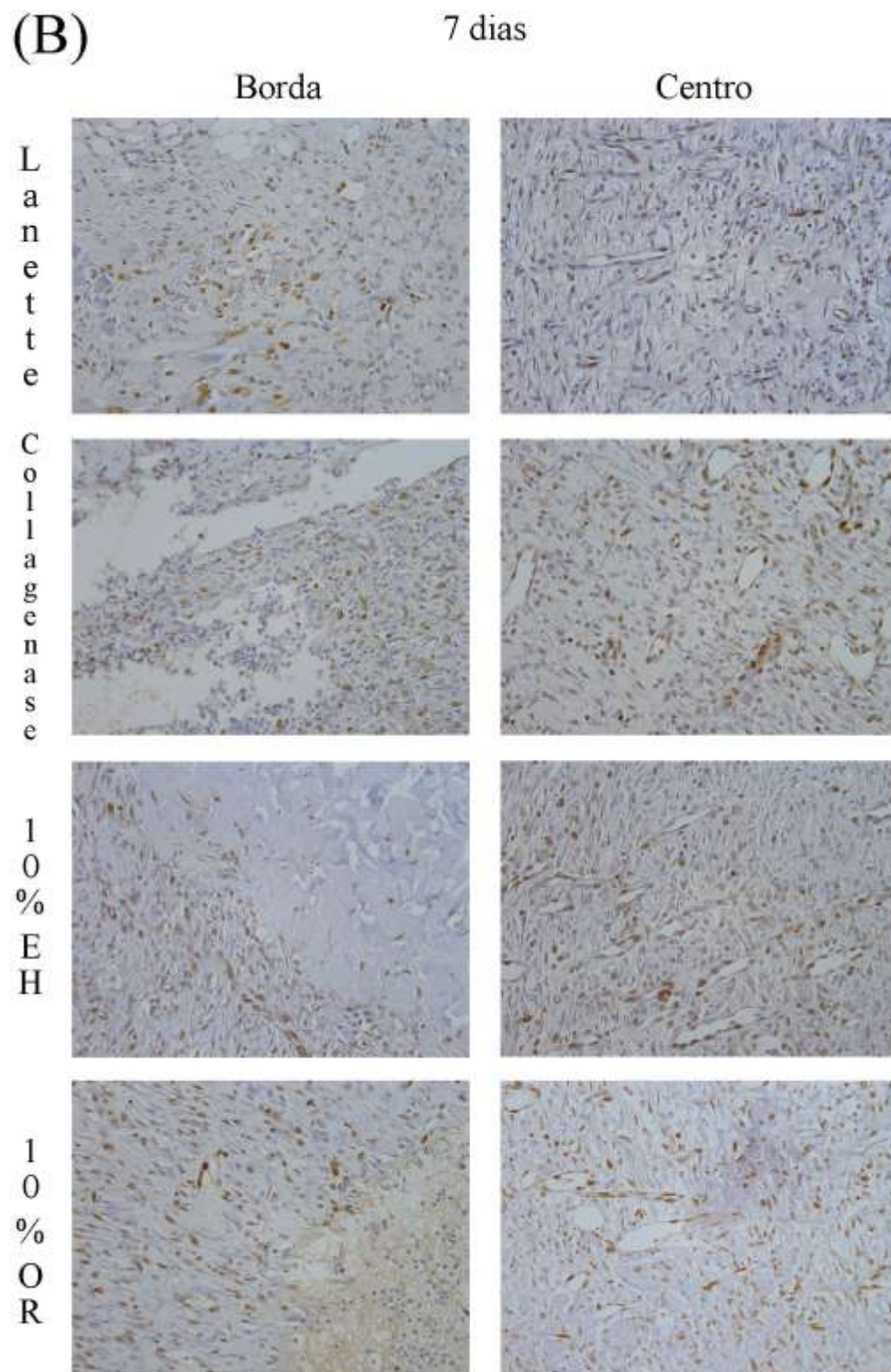


Figura 31 (B): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo PCNA das lesões de pele dos ratos tratados por 7 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

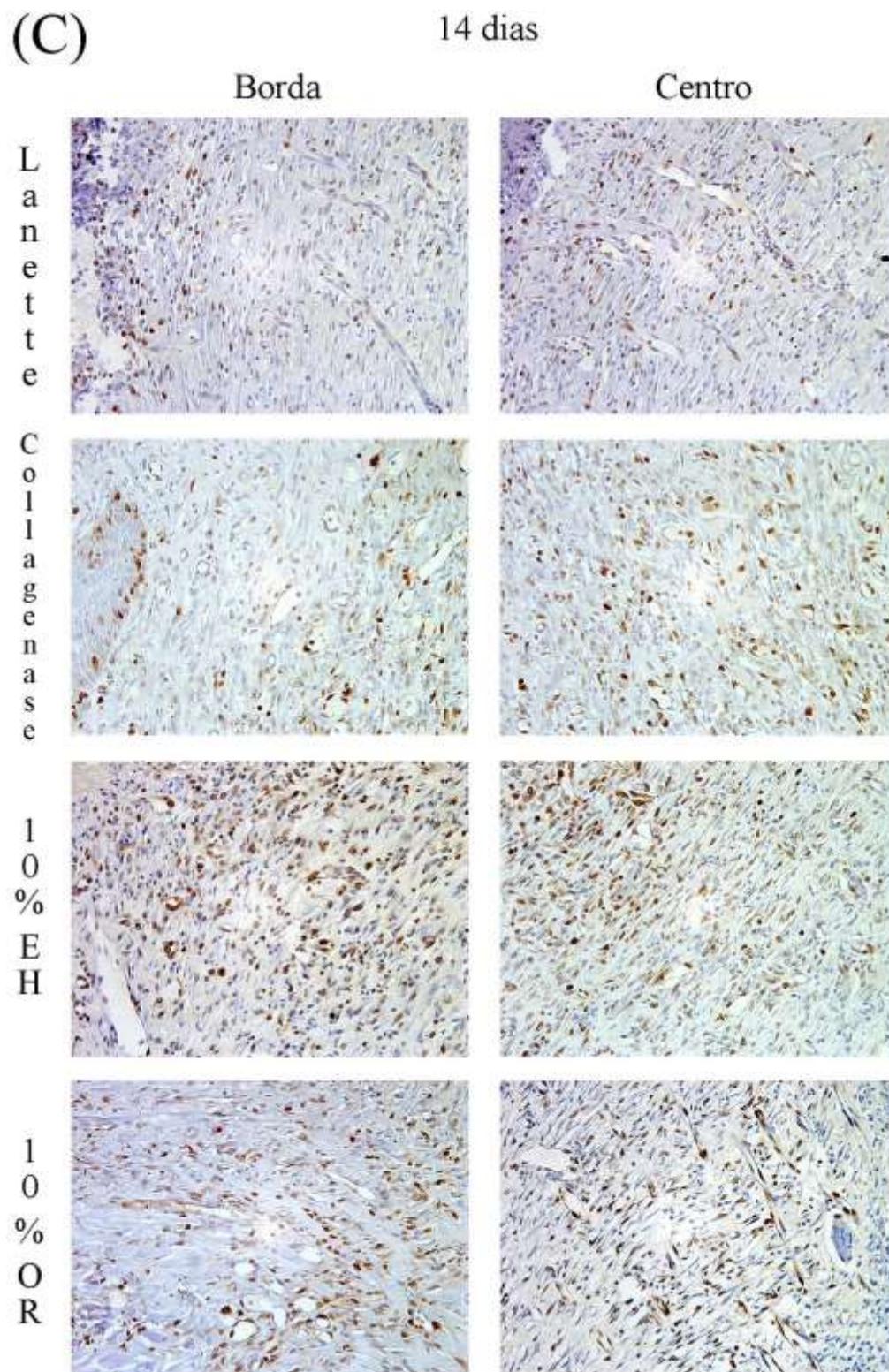


Figura 31 (C): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo PCNA das lesões de pele dos ratos tratados por 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

A marcação imunohistoquímica para TGF- β 1 foi analisada nas regiões de borda, centro da lesão e pele normal. Na região da borda das feridas, observamos aumento da imunomarcção desse fator de crescimento nos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR comparados ao Lanette após 3 e 14 dias. Os tratamentos 10% EH e 10% OR destacaram-se pelo aumento significativo da área marcada pelo anticorpo em relação aos grupos Lanette e Collagenase após 7 dias. Na região central, houve aumento da marcação de TGF- β 1 nos grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR comparados ao Lanette nos três períodos estudados. Não houve alterações significativas entre os tratamentos na região de pele normal (figuras 32 e 33A-C).

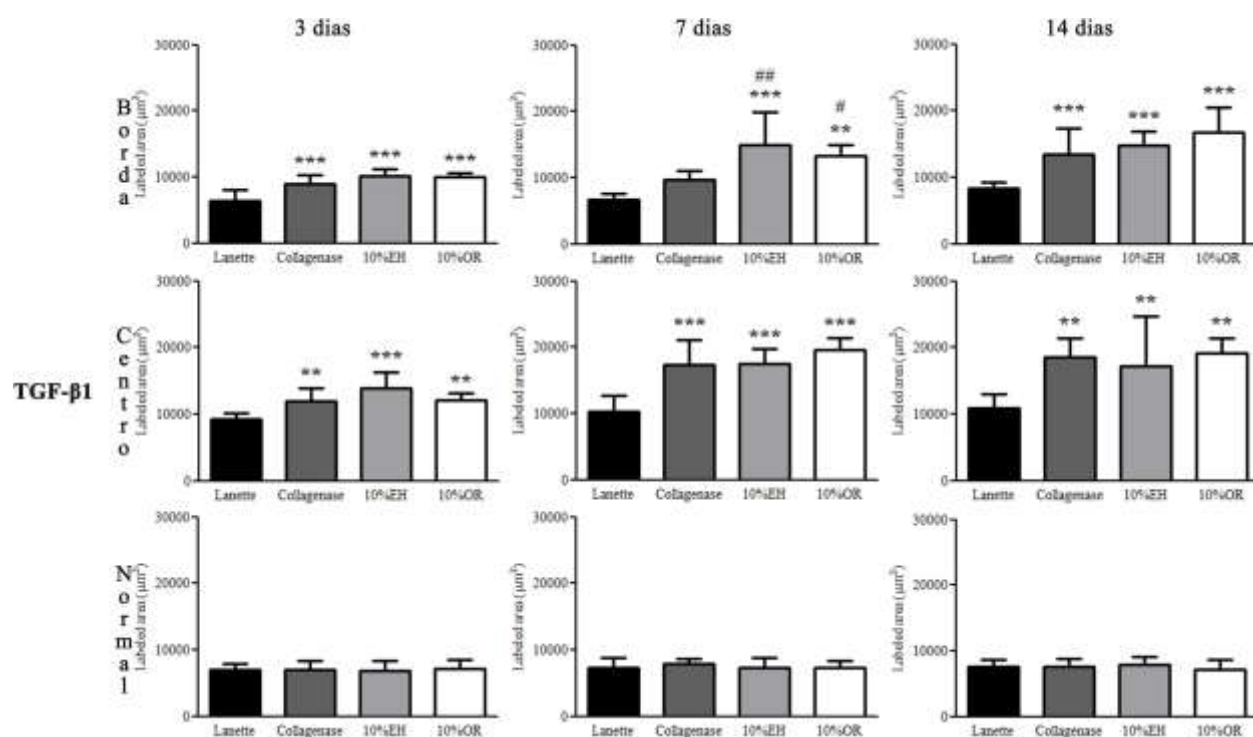


Figura 32: Área imunomarcada (μm^2) pelo anticorpo TGF- β 1 das três regiões de lesão da pele de ratos tratados por 3, 7 ou 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ em relação ao grupo Lanette. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ em relação ao grupo Collagenase utilizando ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls ($n = 8$).

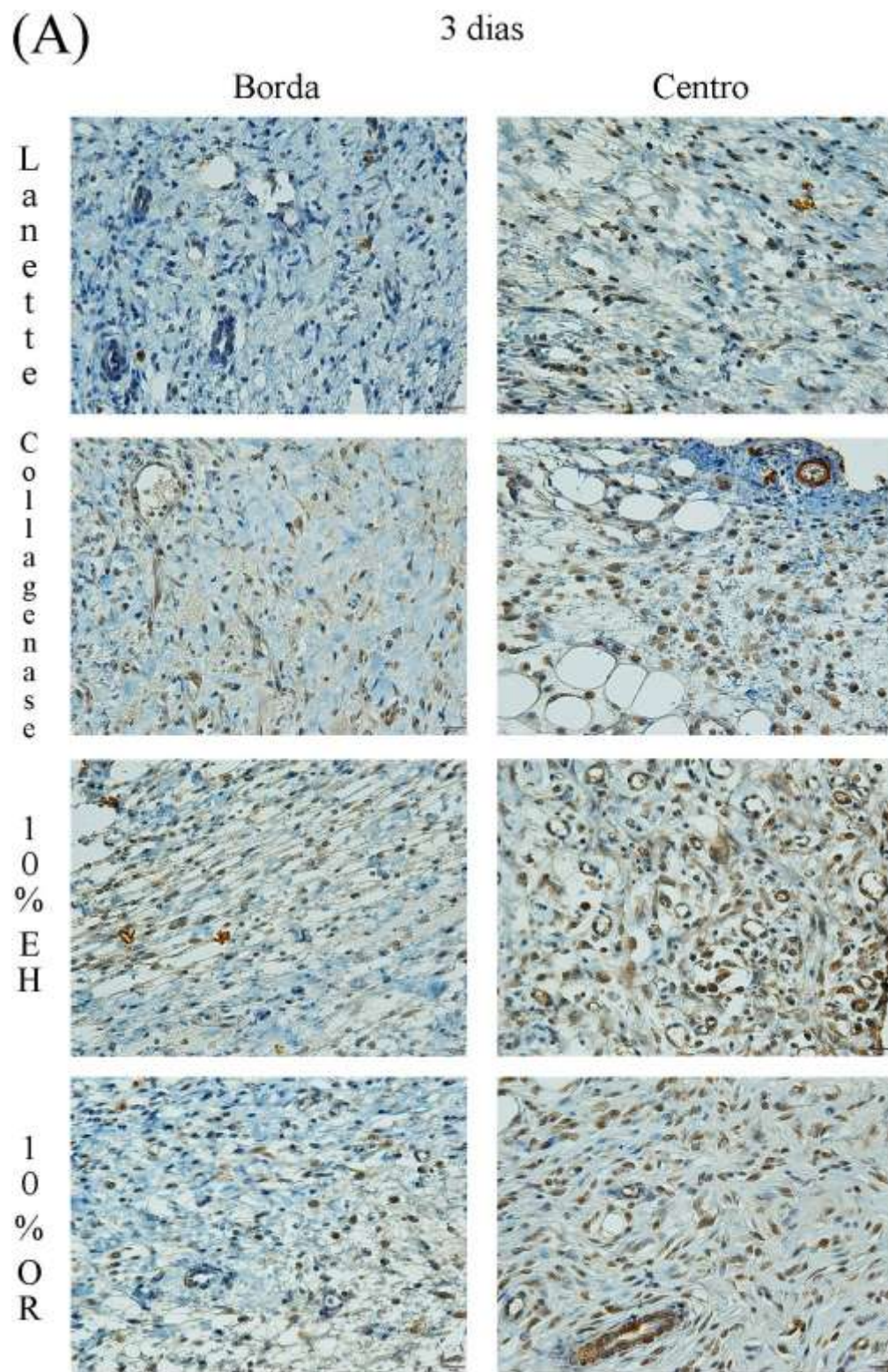


Figura 33 (A): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo TGF- β 1 das lesões de pele dos ratos tratados por 3 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20 μ m.

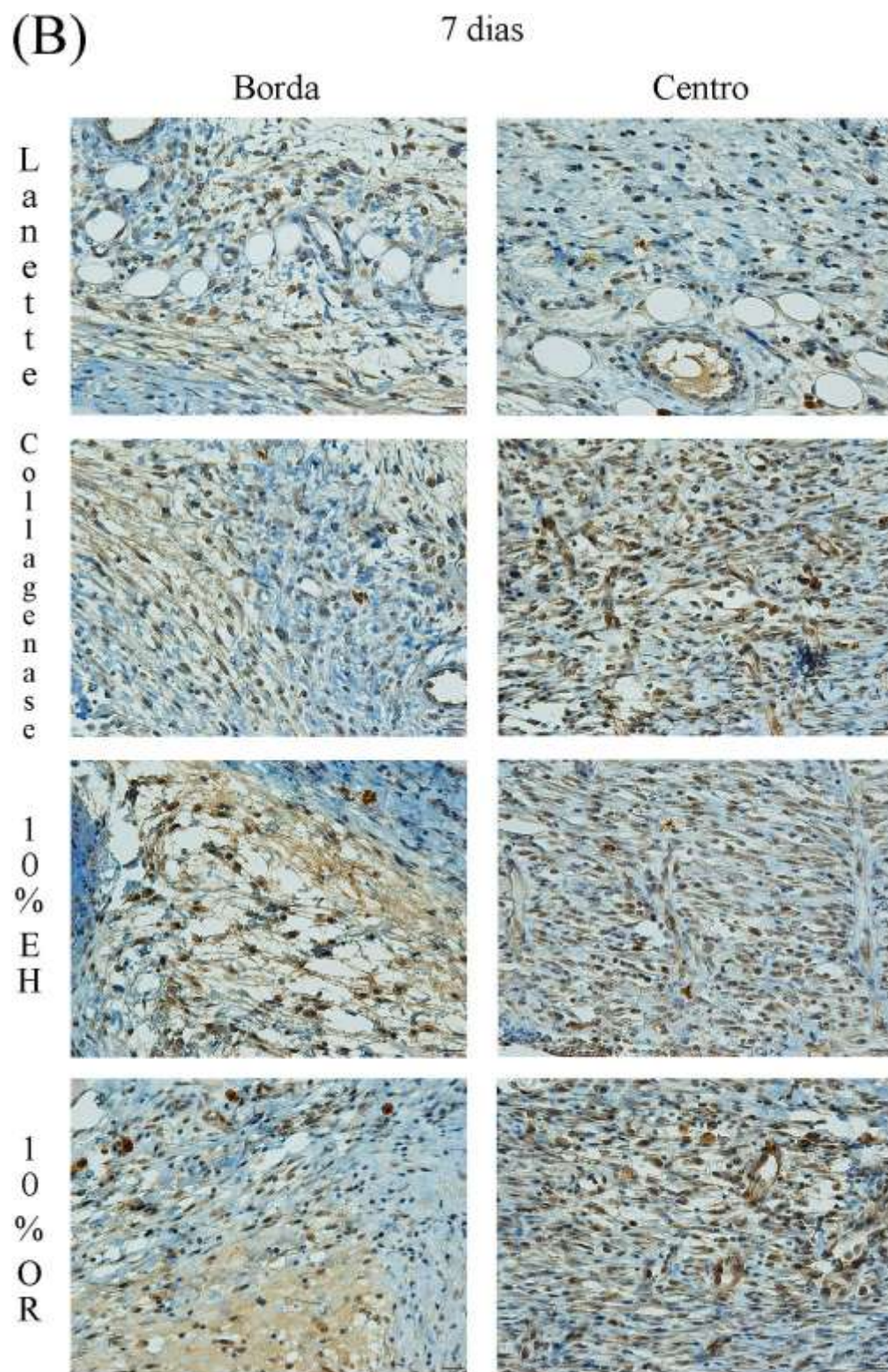


Figura 33 (B): Fotomicrografia de imunomarcação para anticorpo TGF- β 1 das lesões de pele dos ratos tratados por 7 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20 μ m.

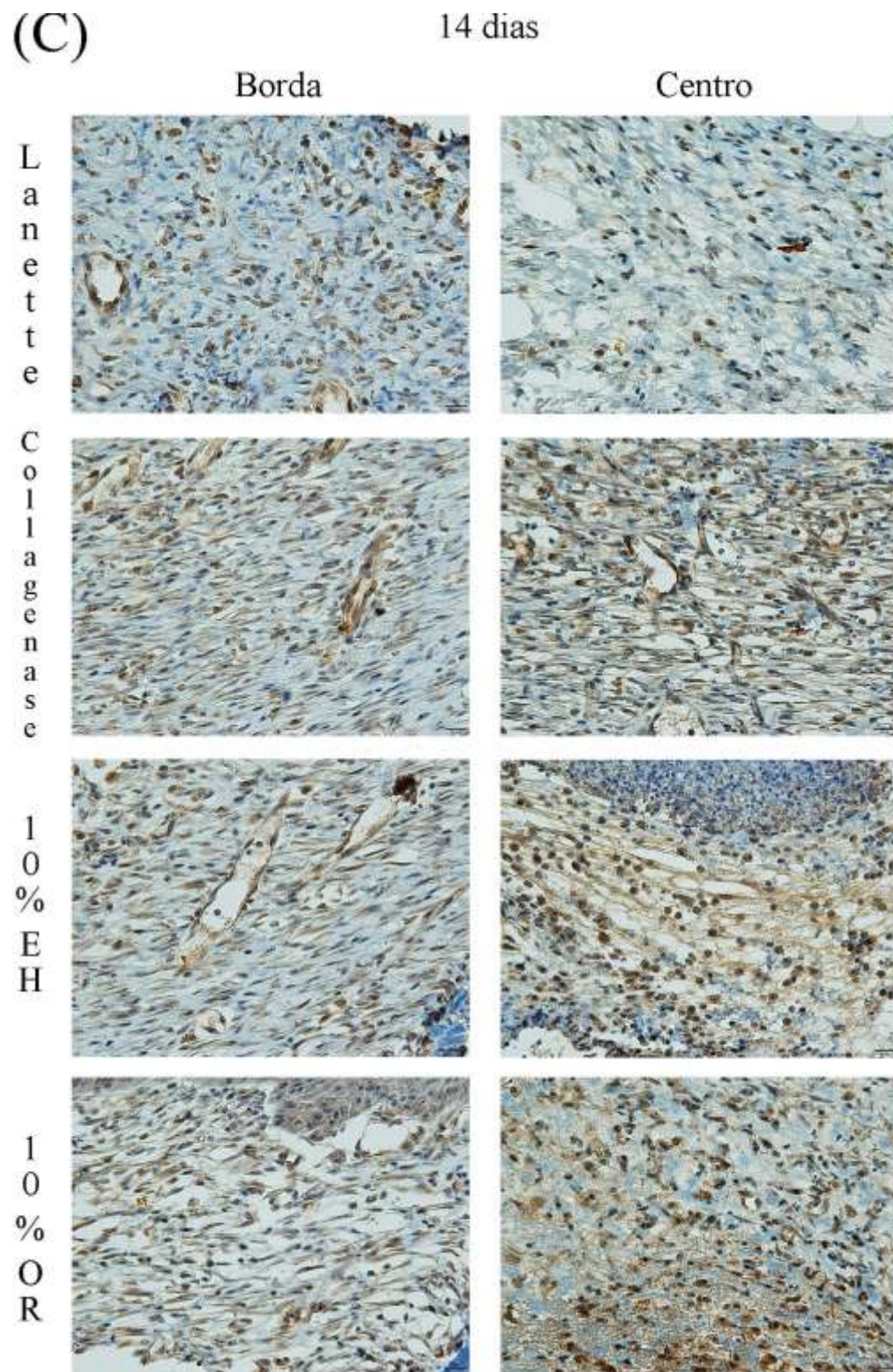


Figura 33 (C): Fotomicrografia de imunomarcação para anticorpo TGF- 1 das lesões de pele dos ratos tratados por 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20 m.

A marcação imunohistoquímica para VEGF foi analisada nas regiões de borda, centro da lesão e pele normal. Na borda das lesões, houve aumento da imunomarcação em 10% EH comparado ao grupo Lanette após 3 dias. Após 14 dias, observamos o aumento da marcação do VEGF nos grupos 10% EH e 10% OR comparados ao tratamento Lanette. O grupo 10% EH também se destacou pela diferença significativa em relação ao fármaco de referência (Collagenase) em 14 dias. No centro das lesões, os grupos Collagenase, 10% EH e 10% OR tiveram aumento da marcação da proteína comparados ao Lanette após 3 dias de tratamento. Não houve alterações significativas entre os tratamentos na região de pele normal (figuras 34 e 35A-C).

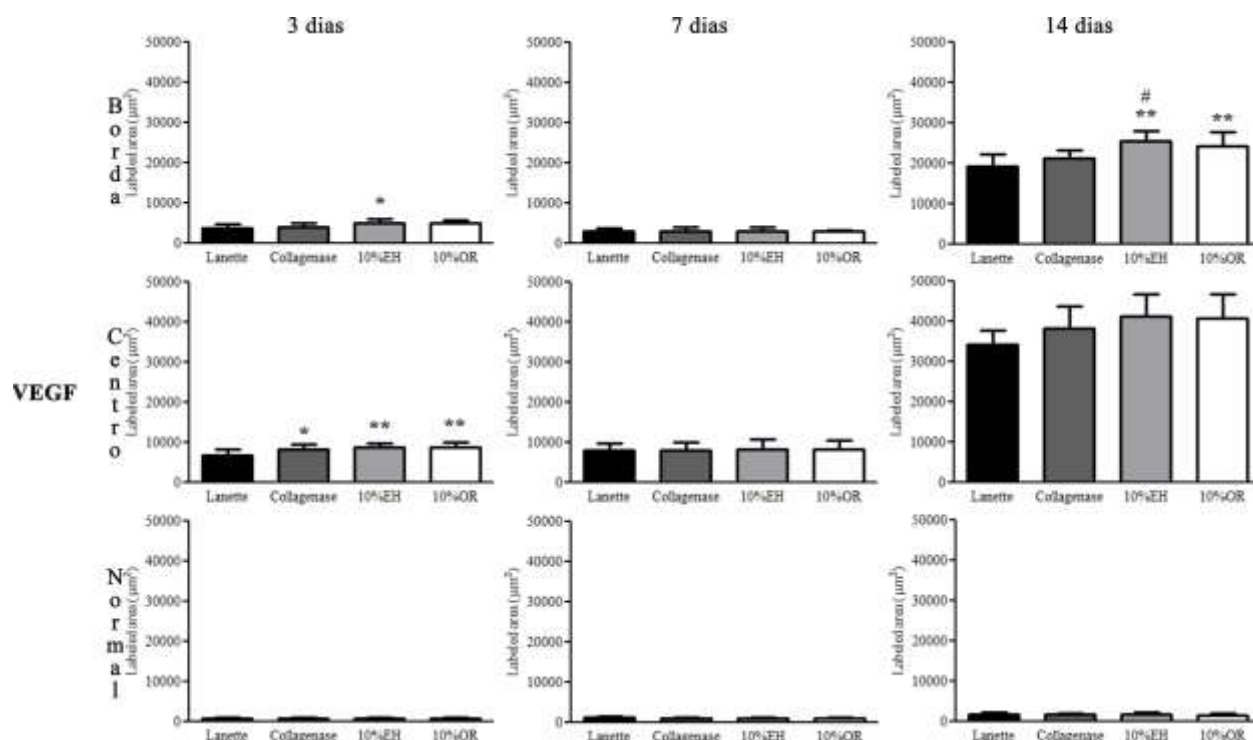


Figura 34: Área imunomarcada (μm^2) pelo anticorpo VEGF das três regiões de lesão da pele de ratos tratados por 3, 7 ou 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ em relação ao grupo Lanette. # $p<0.05$ em relação ao grupo Collagenase utilizando ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls ($n = 8$).

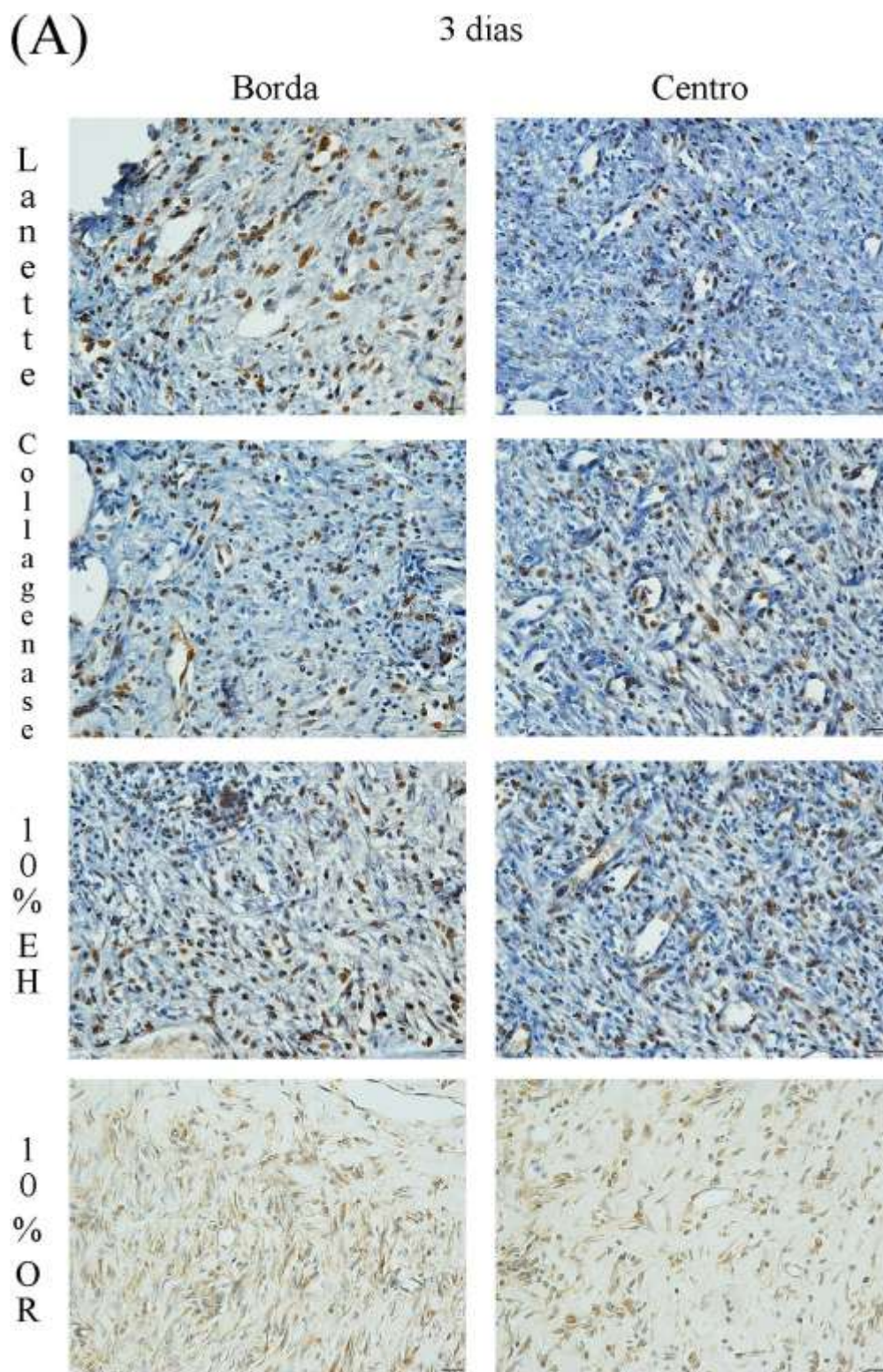


Figura 35 (A): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo VEGF das lesões de pele dos ratos tratados por 3 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

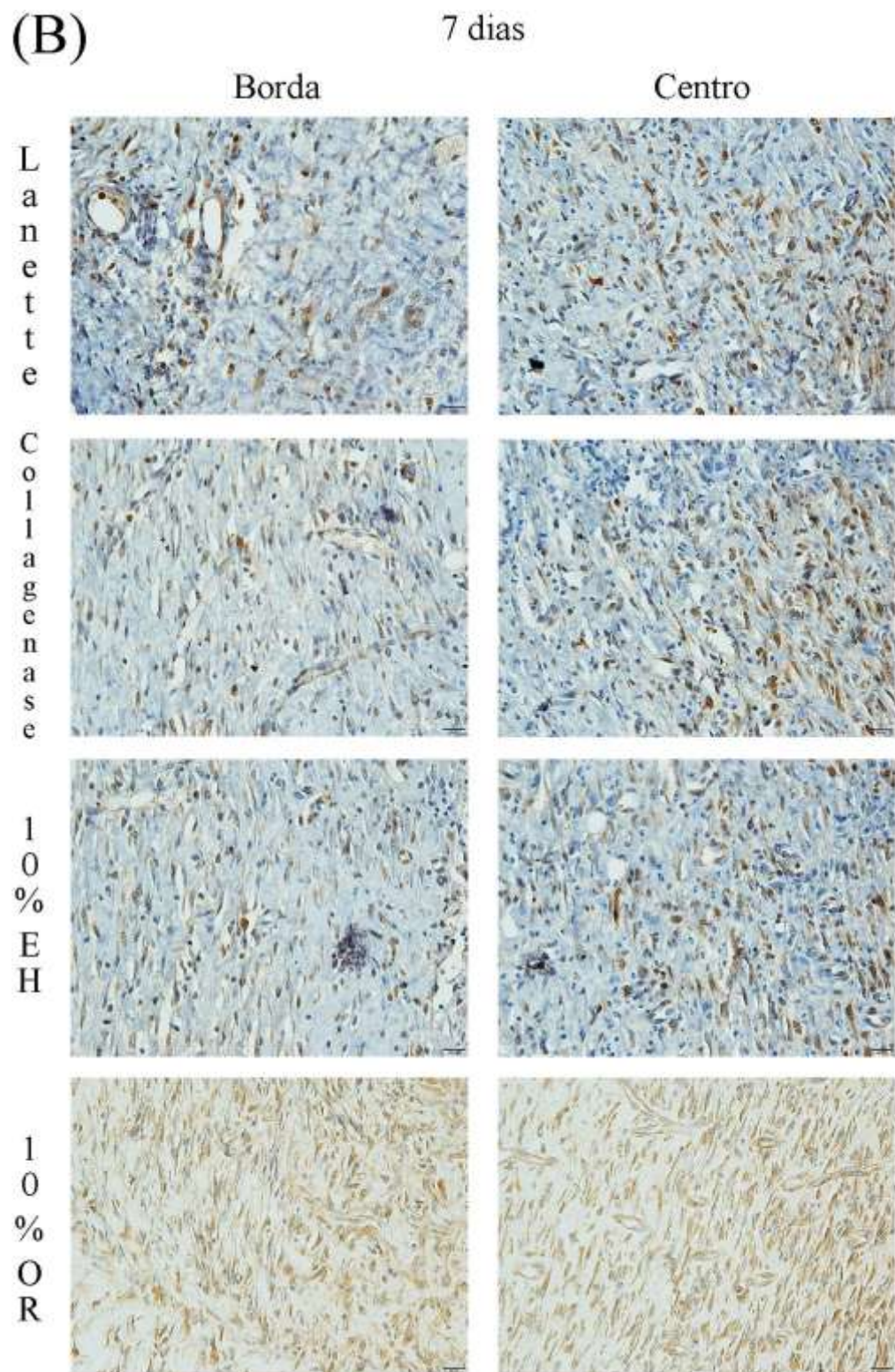


Figura 35 (B): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo VEGF das lesões de pele dos ratos tratados por 7 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

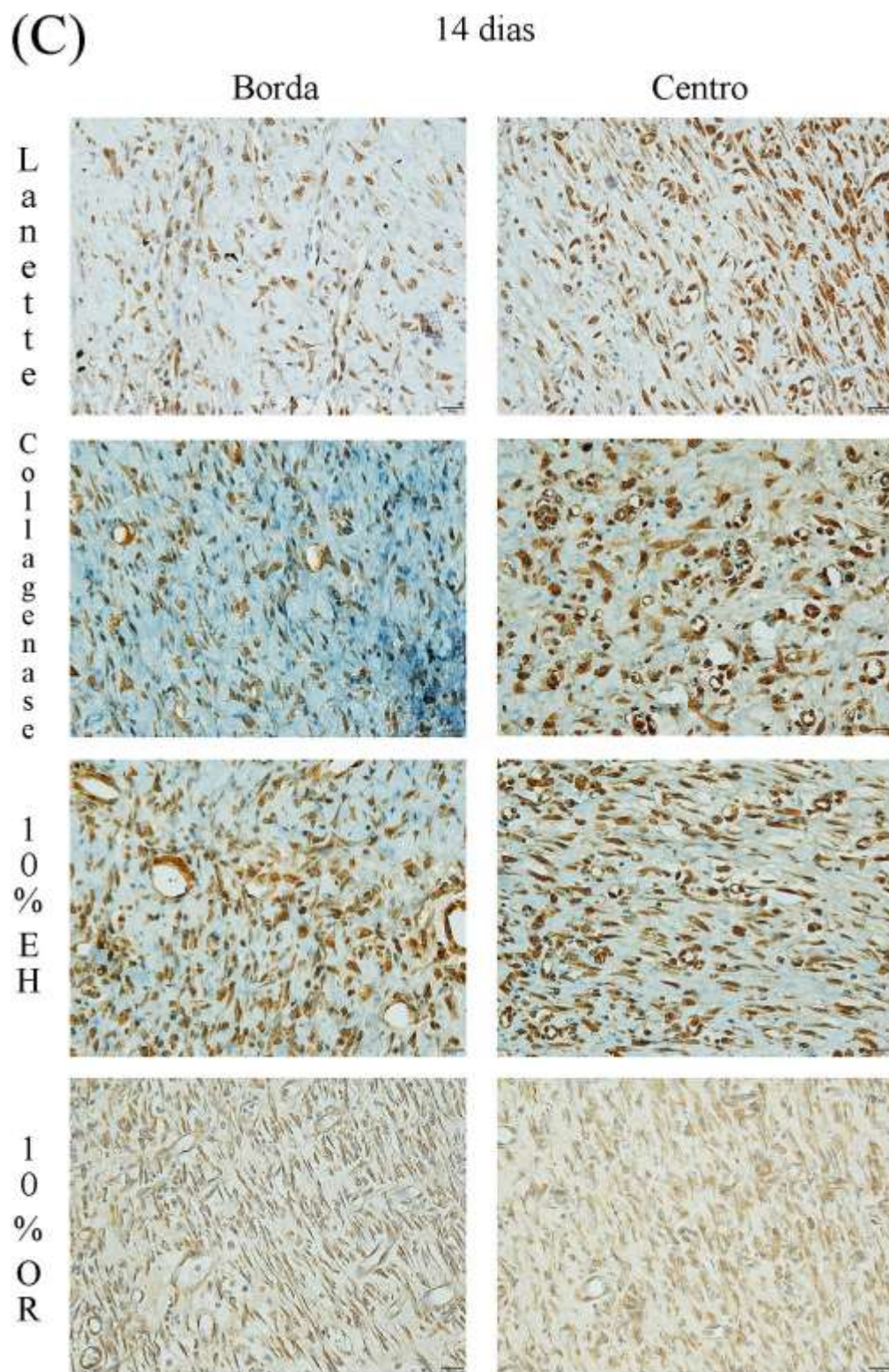


Figura 35 (C): Fotomicrografia de imunomarcção para anticorpo VEGF das lesões de pele dos ratos tratados por 14 dias com cremes Lanette, Collagenase, 10% EH ou 10% OR. Barra representa 20µm.

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados comprovam 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. Desse modo, há possibilidade da utilização tanto da óleo-resina (uso popular) da casca quanto do extrato hidroalcoólico das folhas, uma nova formulação mais viável com relação à sua biomassa.

Após a síntese do coágulo hemostático no local da ferida, as plaquetas e células da região secretam citocinas, como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α , que estimulam a infiltração de leucócitos para o local, iniciando a resposta inflamatória cicatricial (REINKE; SORG, 2012). Primeiramente, há a migração de neutrófilos que iniciam o debridamento do tecido lesado e a fagocitose de antígenos deletérios. Em seguida, macrófagos migram para o local da lesão para auxiliar no debridamento e fagocitose de antígenos do local, além de secretar citocinas e fatores de crescimento importantes para as fases subsequentes da cicatrização de feridas, como a síntese do tecido de granulação, proliferação de fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais (GAUTAM et al., 2015; SINGER; CLARK, 1999). Estudos indicam que, tanto fatores pró-inflamatórios como o TNF- α , IL-1 β e IL-6 quanto fatores anti-inflamatórios como a IL-10 estão envolvidos em mecanismos que compreendem as três fases do processo cicatricial (AHANGER et al., 2010; GANESHKUMAR et al., 2012; KIERAN et al., 2013; LIM; LEVY; BRAY, 2006; MORI et al., 2002; SENAPATI et al., 2011). Entretanto, a resposta inflamatória deve ocorrer rapidamente para a correta cicatrização das lesões, pois a secreção contínua de citocinas e o debridamento da região da ferida por leucócitos levam à inflamação crônica, causando atraso no mecanismo cicatricial, com potencial perda de função tecidual. Desse modo, o controle das quantidades de moléculas pró e anti-inflamatórias é necessário para o mecanismo cicatricial correto, sendo que estudos têm demonstrado a utilização de plantas na redução da inflamação de lesões a partir da redução do infiltrado inflamatório e dos mediadores envolvidos na inflamação (AKKOL et al., 2012; GÜVENÇ et al., 2012; KANT et al., 2014; PARENTE et al., 2012; TUMEN et al., 2011). A contagem do número total de células coradas em HE mostrou o aumento inicial da quantidade de células na borda das lesões dos grupos 10% EH e 10% OR no período de 3 dias, com destaque para o mecanismo de proliferação celular mostrado no aumento da marcação para PCNA. Após 7

dias, não existe diferença entre os grupos na proliferação celular, sendo que a queda do número total de células em 10% EH e 10% OR pode mostrar a redução do infiltrado inflamatório no local, caracterizando a atividade anti-inflamatória dos tratamentos a nível celular.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória sintetizada por macrófagos, neutrófilos, linfócitos ativados e queratinócitos da região da lesão, sendo expressa em maiores quantidades na fase inflamatória do processo cicatricial. Quando expresso em grande quantidade, pode reduzir a síntese de colágeno I além de promover a inflamação crônica, determinando o atraso na cicatrização de lesões (REGAN et al., 1993). Contudo, quando expresso em pequenas quantidades, o TNF- α leva ao recrutamento de leucócitos no local da injúria para o debridamento e remoção de patógenos, além de auxiliar na síntese de TGF- β 1 e VEGF, moléculas essenciais para a síntese e deposição de colágeno e angiogênese na região (MORI et al., 2002; WERNER; GROSE, 2003). Nossos resultados obtidos por ELISA demonstram que os cremes à base de *Copaifera langsdorffii* 10% EH e 10% OR apresentaram efeito anti-inflamatório, reduzindo as concentrações de TNF- α na pele lesada após 3 e 14 dias. Sendo assim, o efeito anti-inflamatório demonstrado pelos tratamentos é essencial para evitar alterações patológicas decorrentes da inflamação crônica na cicatrização, além de manter a concentração de TNF- α baixa após 14 dias, podendo ser uma das vias que auxilia no aumento da síntese de TGF- β 1 e VEGF em 10% EH e 10% OR após 14 dias, com a consequente síntese de colágeno I e vascularização do local da lesão.

A IL-1 β é uma citocina pleiotrópica produzida por diversos tipos celulares (macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, queratinócitos), sendo responsável por mediar processos do sistema imune inato, inflamação e resposta a injúrias (ARAI et al., 1990). Na fase inflamatória da cicatrização, durante a qual atinge a maior concentração, é capaz de estimular a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-6, além de promover a migração de macrófagos e neutrófilos para a região (NETEA et al., 2010). Os resultados obtidos demonstram a ação anti-inflamatória dos tratamentos 10% EH e 10% OR após 3 dias de tratamento, evitando a permanência do processo inflamatório (inflamação crônica) decorrente da permanência de leucócitos e superexpressão de citocinas pró-inflamatórias mediados pela IL-1 β .

Além das duas primeiras citocinas citadas, a IL-6 é uma citocina que possui efeito na inflamação, resposta imune e hematopoese. Juntamente com o TNF- α e a IL-1 β , a IL-6 atua como fator pró-inflamatório, mediando a migração de neutrófilos e macrófagos para a área de lesão

(SCHELLER et al., 2011; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). Desse modo, a redução da concentração de IL-6 após 3 dias nos grupos 10% EH e 10% OR comprova a ação anti-inflamatória desses tratamentos sobre essa citocina.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória com importante atividade imunomoduladora, pois suprime a síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IFN- γ e TNF- α , evitando a inflamação crônica no processo cicatricial e a fibrose tecidual (KIERAN et al., 2013). Além de modular a síntese de citocinas pró-inflamatórias, a IL-10 também reduz a infiltração de neutrófilos e macrófagos na região da injúria pela diminuição dos níveis de *monocyte chemoattractant protein* (MCP-1) e *macrophage inflammatory protein* (MIP-1 α) (proteína inflamatória de macrófago-1 α) (MOORE et al., 2001), o que faz dessa citocina um importante alvo do mecanismo anti-inflamatório da cicatrização de lesões. Nossos resultados demonstram o potencial anti-inflamatório das formulações 10% EH e 10% OR a partir do aumento dos níveis de IL-10 após 7 dias de tratamento em relação ao controle negativo. Desse modo, 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 fibrose tecidual e o atraso na cicatrização das lesões.

A partir da síntese do coágulo de fibrina, as células da região lesada estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Em resposta a esse estímulo, ocorre a síntese de COX-2, enzima pró-inflamatória que atua no recrutamento de leucócitos para o local da ferida e na biossíntese de prostaglandinas, eicosanoide com função na migração e proliferação celular (RAJAKARIAR; YAQOOB; GILROY, 2006). Desse modo, a COX-2 pode ser caracterizada como um marcador inflamatório importante e uma molécula alvo para o tratamento de distúrbios inflamatórios. Entretanto, caso a concentração dessa enzima permaneça elevada por um longo período, haverá o estabelecimento de processo inflamatório crônico e o atraso na cicatrização das lesões (BAI; WAN; SHI, 2008). A expressão local de COX-2 tem início após a injúria e alcança a máxima concentração no segundo dia da lesão, sendo que os níveis da enzima diminuem consideravelmente após o segundo dia (FUTAGAMI et al., 2002). Nossos resultados indicam que, ao terceiro, sétimo e décimo quarto dias de tratamento, os níveis de COX-2 nas análises imunohistoquímicas apresentaram os mesmos padrões de expressão entre os grupos. Esses dados

corroboram com os resultados obtidos pela análise proteica de Futagami et al. (2002), que mostram baixa quantidade da proteína após o terceiro dia da lesão e diminuição da presença de RNAm da COX-2 após 24 horas da lesão (BAI; WAN; SHI, 2008).

Juntamente com a formação do coágulo hemostático e a inflamação no local da lesão, as células da região sintetizam fatores de crescimento como o PDGF, FGF e TGF- β 1. Esses fatores estimulam a migração e proliferação de macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, que sintetizam a matriz extracelular provisória responsável pelo preenchimento local e manutenção dos mecanismos cicatriciais até a remodelação para a matriz extracelular permanente (SINGER; CLARK, 1999). Sendo assim, a proliferação das células presentes no tecido lesado é essencial para a síntese do tecido de granulação e, consequentemente, para a correta resposta cicatricial.

Um exemplo de fator de crescimento responsável pela migração e proliferação de fibroblastos e células endoteliais no local da injúria é o FGF-2. A partir da migração e proliferação dessas células, há o estímulo da síntese de matriz extracelular e a consequente formação do tecido de granulação (ATIBA et al., 2011). Embora os resultados moleculares não tenham apresentado diferenças na expressão do gene FGF-2 entre os tratamentos, observamos o aumento desse fator de crescimento na análise imunohistoquímica para o grupo 10% OR após 14 dias, comparado aos grupos Lanette e Collagenase. Desse modo, o tratamento 10% OR aumentou os níveis de FGF-2, estimulando a proliferação e migração de fibroblastos e o consequente estímulo para o remodelamento de matriz extracelular na fase final da cicatrização.

Outro fator de crescimento liberado durante a cicatrização de feridas, o TGF- β 1 é um dos mediadores cicatriciais que apresenta maior espectro de atividades, participando de todas as fases da cicatrização (OBERRINGER et al., 2008). Essa proteína atua na migração e proliferação de células da região lesada, participando da angiogênese, reepitelização, síntese de tecido de granulação e remodelação de fibras colágenas (PENG et al., 2012). Além disso, estudos têm demonstrado a influência do tratamento com produtos naturais na expressão e síntese do TGF- β 1 e o resultado dessas alterações no processo cicatricial (PENG et al., 2012; WU et al., 2012). Desse modo, o aumento de TGF- β 1 nas análises moleculares e imunohistoquímicas nos grupos 10% EH e 10% OR durante os três períodos de tratamento, juntamente com a imunohistoquímica para o marcador de proliferação celular PCNA, demonstram o efeito do TGF- β 1 na proliferação de células na região da lesão, mediando a síntese de tecido de granulação e a vascularização da região.

A reconstrução da rede vascular do local da injúria é essencial para a cicatrização correta de lesões, pois os vasos da região fornecem a oxigenação e nutrientes necessários para a síntese do tecido de granulação, proliferação celular e remodelação da matriz extracelular local. A partir de mediadores secretados pelas células da região, como as angiopoetinas, o VEGF e TGF- β 1, há o estímulo para a proliferação, migração e estruturação de células endoteliais (GREAVES et al., 2013). O VEGF é um dos principais mediadores do mecanismo de angiogênese, atuando na proliferação e migração de células endoteliais e estimular a sobrevivência dessas células a partir da expressão de Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica (LI; ZHANG; KIRSNER, 2003). Desse modo, os resultados obtidos pela contagem dos vasos nas bordas e centro das lesões dos grupos tratados por 3, 7 e 14 dias, juntamente com a imunomarcagem para VEGF 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 na angiogênese, pois este atua na migração e estruturação de células endoteliais mediante supra-regulação de receptores de integrinas (LI; ZHANG; KIRSNER, 2003).

Outro mecanismo essencial na cicatrização de feridas cutâneas, a reepitelização tem início algumas horas após a injúria, mas apresenta atividade mais evidente na fase proliferativa da cicatrização, com finalização durante a remodelação da matriz extracelular (SINGER; CLARK, 1999). O processo inicia-se com a dissolução das moléculas de adesão entre os queratinócitos e entre queratinócitos e a membrana basal, com posterior migração dos queratinócitos das bordas da lesão através do tecido de granulação recém formado (KONDO; ISHIDA, 2010). A partir da injúria cutânea, os queratinócitos presentes na borda da lesão secretam fatores de crescimento que estimulam a proliferação e migração dessas células para o recobrimento da área lesada. Um desses fatores, o EGF é uma molécula que apresenta atividade mitogênica e migratória sobre os queratinócitos da borda das lesões (WERNER; GROSE, 2003). Para que ocorra o recobrimento da lesão mediante a migração dos queratinócitos, as metaloproteinases de matriz extracelular 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) - enzimas que degradam componentes da matriz extracelular - dissolvem as moléculas de adesão entre os queratinócitos e entre queratinócitos e membrana basal (MARTINS; CALEY; O'TOOLE, 2013). Sendo assim, nossos resultados de imunomarcagem demonstram o aumento dos níveis de EGF dos tratamentos 10% EH e 10% OR na borda das lesões ao longo dos três períodos de estudo, além da eficácia do fármaco de referência e dos

tratamentos 10% EH e 10% OR na via da MMP-2 e MMP-9, caracterizando a influência do EGF, MMP-2 e MMP-9 no mecanismo de reepitelização das lesões.

O último estágio da cicatrização de lesões de pele é a fase de remodelação, na qual a matriz extracelular provisória é remodelada, a área lesada é completamente reepitelizada e ocorre uma resposta contrátil da injúria mediada por miofibroblastos. Em virtude de seus múltiplos pontos de ligação com o colágeno, os miofibroblastos se ligam às fibras colágenas e se contraem, reduzindo a área de lesão (GILLIVER et al., 2011). O fator inibidor de migração de macrófago (MIF) é uma proteína altamente expressa na pele, com funções na fase inflamatória da cicatrização e na diferenciação de fibroblastos a miofibroblastos (ABE et al., 2000; ZHAO et al., 2009). A diferenciação de fibroblastos a miofibroblastos é essencial para a cicatrização correta da lesão de pele evitando o atraso no fechamento das lesões e a fibrose tecidual (GABBIANI, 2003). A diferenciação ocorre primeiramente nas bordas da lesão, com subsequente migração para o centro, auxiliando na retração da ferida (HINZ, 2007). A partir do estímulo do TGF- β 1, têm início alterações fenotípicas dos fibroblastos presentes na borda da lesão, os quais sintetizam α -actina de músculo liso, receptores de adesão celular, entre outras proteínas contráteis, caracterizando a diferenciação para miofibroblastos (HINZ et al., 2004; SERINI et al., 1998). Os resultados obtidos na imunomarcção para MIF mostram a atividade dos tratamentos 10% EH e 10% OR, potencializando essa via tanto na borda quanto no centro das feridas cutâneas após 14 dias de tratamento, período do processo cicatricial em que há maior diferenciação de fibroblastos a miofibroblastos e consequente retração das lesões. O aumento da marcação de células nos tratamentos 10% EH e 10% OR na região central das feridas após 3 dias de tratamento pode significar a possível antecipação da diferenciação em miofibroblastos, auxiliando a cicatrização de lesões cutâneas. Além disso, a retração das lesões após 14 dias pode ser influenciada pela síntese de α -actina de músculo liso e outras proteínas contráteis a partir da diferenciação de miofibroblastos mediada por TGF- β 1, explicando a quantidade elevada desse fator de crescimento na borda e centro das lesões tratadas com 10% EH e 10% OR após 14 dias.

Além da retração da lesão mediada por miofibroblastos, a fase de remodelação caracteriza-se pela maturação da matriz extracelular do local. A síntese do tecido de granulação passa através de apoptose e o colágeno tipo 3, sintetizado na fase proliferativa como proteína de matriz extracelular para o preenchimento da região lesada, é substituído por colágeno tipo 1, principal fibra colágena presente na pele e que apresenta maior resistência à tração mecânica

(MAEHATA et al., 2007; REINKE; SORG, 2012). Os principais mediadores responsáveis pela degradação do colágeno 3 nessa fase são as metaloproteinases 1 e 8 (MARTINS; CALEY; O'TOOLE, 2013), enquanto a síntese de colágeno 1 ocorre a partir do estímulo dos mediadores TGF- β 1 e FGF-2 (REINKE; SORG, 2012). Nossos resultados das análises imunohistoquímicas para colágeno 1 e colágeno 3 demonstram a influência dos tratamentos Collagenase, 10% EH e 10% OR na síntese dessas proteínas, sendo que um dos mecanismos envolvidos pode estar relacionado à atividade aumentada do TGF- β 1, estimulando a síntese de colágeno 3 nos estágios iniciais da cicatrização e remodelação do colágeno 1 na fase final.

Tabela 5: Comparação dos mecanismos envolvidos na cicatrização de lesões cutâneas entre os grupos Lanette, Collagenase, 10% EH e 10% OR.

Mecanismo	Grupos		
	Collagenase	10% EH	10% OR
Inflamação	-	↓	↓
Proliferação celular	-	↑	↑
Angiogênese	-	↑	↑
Reepitelização da lesão	↑	↑	↑
Retração da área de lesão	-	↑	↑
Remodelamento de matriz extracelular	↑	↑	↑

↑: aumento em comparação ao grupo Lanette

↓: diminuição em comparação ao grupo Lanette

- : não efetivo

6. CONCLUSÕES

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

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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