



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Av. Pará, 1720 Bloco 2B, Sala 254 - “Campus Umuarama”

Uberlândia - MG - Tel.(034) 3218 2240 CEP: 38.400-902

Francielle Borges Rosa de Moura

**Efeito do uso tópico do extrato etanólico de folhas de *Maytenus ilicifolia*  
no reparo de feridas cutâneas**

Uberlândia

Fevereiro de 2017

Francyelle Borges Rosa de Moura

**Efeito do uso tópico do extrato etanólico de folhas de *Maytenus ilicifolia*  
no reparo de feridas cutâneas**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Tatiana Carla Tomiosso

Co-orientador: Dr<sup>a</sup>. Andrea Aparecida de Aro

Uberlândia-MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M929e  
2017      Moura, Francielle Borges Rosa de, 1990  
            Efeito do uso tópico do extrato etanólico de folhas de *Maytenus*  
            *ilicifolia* no reparo de feridas cutâneas / Francielle Borges Rosa de  
            Moura. - 2017.  
            78 p. : il.

            Orientadora: Tatiana Carla Tomiosso.  
            Coorientadora: Andrea Aparecida de Aro.  
            Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
            Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.  
            Inclui bibliografia.

            1. Citologia - Teses. 2. Espinheira-santa - Teses. 3. Plantas  
            medicinais - Teses. 4. Cicatrização de feridas - Teses. I. Tomiosso,  
            Tatiana Carla. II. Aro, Andrea Aparecida de. III. Universidade Federal  
            de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
            Estrutural Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 576.3





### **Dedicatória**

Dedico este trabalho a minha orientadora,  
Prof<sup>ª</sup> Dra<sup>a</sup> Tatiana, ao meu esposo Danilo e  
a minha mãe Nalda Borges

“Muitas das falhas da vida ocorrem quando não  
percebemos o quão próximos estaríamos do sucesso na  
hora em que desistimos”

**Thomas Edison**

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível, devido à colaboração, paciência, ensinamentos e amizade de um conjunto de pessoas aos quais tenho muito a agradecer!

✚ Gostaria de agradecer primeiramente a **Deus**, por ter me dado força, principalmente neste período final para conseguir me erguer e finalizar este trabalho.

✚ Agradeço a minha orientadora e amiga, Prof<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup> **Tatiana**, que acreditou em mim e me deu a oportunidade em realizar este trabalho. Por elucidar as diversas dúvidas e ter paciência todas as vezes que eu lotei o seu WhatsApp de mensagens (rsrsrs). Agradeço pelos ensinamentos durante estes dois anos e pela oportunidade em continuarmos juntas nas próximas etapas.

✚ Agradeço a minha co-orientadora, professora Dra<sup>a</sup> **Andrea** e a professora Dra<sup>a</sup> **Fernanda** por terem contribuído com este trabalho, através de sugestões e parceria. Por tentarem me direcionar sempre ao melhor caminho.

✚ Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da UFU, em especial a Dra<sup>a</sup> **Renata Zanon**, Dra<sup>a</sup> **Daniele Lisboa** e ao Dr. **Alberto Moraes** por estarem sempre dispostos a contribuírem com a realização deste trabalho.

✚ Agradeço aos técnicos **Estér, Fabrício, Mariane e Rosiane** por esclarecer as minhas dúvidas e contribuírem da melhor forma possível para as avaliações histológicas.

✚ Agradeço aos que contribuíram com o meu aprendizado, que fizeram com que eu enfrentasse este trabalho de forma mais preparada. Aos professores Dr. **Foued** e Dra<sup>a</sup> **Neire** e em especial as minhas primeiras “mães científicas” **Alice e Hélien** que se dispuseram a me ensinar quando eu comecei a dar os meus primeiros passos na pesquisa.

✚ Agradeço aos responsáveis pelo Cebea, **Loyane e Murilo** e do biotério, **Mário** pelas infinitas vezes que tiveram que auxiliar durante o desenvolvimento do experimento.

✚ A **CAPES** pelo auxílio financeiro ao longo dos dois anos de pós-graduação

✚ A secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular (PPGBC), **Renata**, por apoiar os discentes em todas as atividades e necessidades durante os dois anos de mestrado.

✚ Agradeço as pessoas que tenho imenso carinho, as grandes amizades que conquistei nestes dois anos no Programa de Biologia Celular, aos **colegas de laboratório** e a todos os **amigos da pós-graduação**, em especial aos que contribuíram para este trabalho:

✚ Em especial, ao **Breno**, o meu grande amigo de laboratório e de vida, que passou dias na Universidade me auxiliando e persistindo para que a zimografia desse certo. A sua companhia sempre foi muito agradável e tornou os dias muito mais fáceis.

✚ A **Júlia**, guerreira e amiga muito fiel, que sempre aparecia para me ajuda as 20:00 quando tentava terminar o meu experimento, finalizando com um cafezinho do Celi Café.

✚ A minha amiga **Nadjania**, por me auxiliar quando eu tinha dúvidas e procurava para discutir sobre métodos e resultados. Pela parceria e tantos momentos de risadas que passamos durante este tempo.

✚ Aos meus grandes amigos **Simone, Bruno e Natália**, aos quais sem a participação, sem duvida, este trabalho não poderia ser realizado. Aos que me apóiam de perto com sugestões, correções, experimentos e por comemorarem a cada dia as nossas vitórias. Torço por cada um de vocês! A nossa amizade faz com que eu tenha força para seguir em frente e não abandonar o barco.

✚ Agradeço aos meus amigos “equipe” top de laboratório, que sempre estão juntos para “qualquer parada” **Jeranice, Elusca e José Augusto**. Por compreenderem quando precisei estar ausente! A companhia de vocês foi e continua sendo muito importante. Espero que juntos, possamos alcançar e comemorar grandes vitórias!

✚ Agradeço a minha família, em especial a minha tia **Clideucia** e a minha avó, **Maria Aparecida**, por estarem do meu lado e me incentivarem a levantar a cabeça e seguir a vida sempre a diante. Ao consolo em suas palavras, ao colo da avó para aliviar o estresse e por me darem tanto carinho e dedicação desde sempre. Ao **Roney** continuar acreditando e me apoiando nos meus estudos.

✚ A minha irmã, **Lohayne Borges**, uma grande guerreira que persiste e acredita sempre em seus sonhos e nos meus sempre que eu penso em desistir. Sempre foi além de irmã, uma grande amiga que Deus me deu de presente. Acredito em seus sonhos e espero estar do seu lado em muitas conquistas.

✚ Ao meu esposo, **Danillo** por ter a força de vontade em solucionar “quase todos os meus problemas” hahaha. Pelo carinho, companheirismo e por estar sempre ao meu lado, sendo o meu maior incentivador. Por me dar apoio para alcançar os meus objetivos e almejar o meu grande sonho de profissão.

✚ A minha mãe, **Nalda Borges**. Tem coisas na vida que nunca iremos entender e só nos resta aceitar. Tenha certeza que o meu maior sonho é que estivesse aqui comigo neste momento.

A todos,  
o meu MUITO OBRIGADA!!!

## RESUMO

*Maytenus ilicifolia* ou espinheira-santa (ES) é amplamente difundida como antiulcerogênica, analgésica, anti-séptica, cicatrizante e anti-inflamatória. No entanto, as comprovações científicas são direcionadas ao efeito antiulcerogênico. Desta forma, este estudo avaliou o efeito do uso tópico do extrato etanólico de folhas de ES no reparo de feridas cutâneas, com 3 e 7 dias de tratamento. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética (062/2016) e quatro feridas foram realizadas no dorso de 64 camundongos BALB/C. Os tratamentos foram: (vaselina/lanolina) para o grupo controle (CO) e pomada com ES nas concentrações de 2% (ES 2%), 4% (ES4%) e 6% (ES6%). Avaliações morfológicas e bioquímicas foram realizadas para verificar a evolução do fechamento e a resolução do processo inflamatório. Os resultados foram apresentados como média e erro padrão, ANOVA, two-way e pós-teste Bonferroni, com  $p \leq 0.05$ . Todas as concentrações melhoraram o fechamento da ferida, exceto ES 2% no quinto dia. Considerando diferença estatística entre os tratamentos e o grupo CO, Com 3 dias de tratamento foi observado aumento do número de mastócitos em ES 4% e ES 6% e redução na atividade de neutrófilos. A atividade de macrófagos foi reduzida em ES 2% e ES 4%. A hemoglobina, o colágeno total e colágeno solúvel foram aumentados em ES 4%. A pro-MMP2 e a MMP2 foram observadas apenas em feridas de 3 dias. A pro-MMP9 e MMP9 foram aumentadas em ES 4% e ES 6% com 3 dias de tratamento. No sétimo dia, foi observado aumento do número de mastócitos em 6% ES, aumento sobre a atividade de neutrófilos em todos os tratamentos e atividade de macrófago aumentada em ES 4%. Neste período foi observado também redução na dosagem de hemoglobina em ES 4% e ES 6%. Com 7 dias, o colágeno solúvel foi maior no grupo ES 4%. Não houve diferença sobre o colágeno do tipo I e III em 3 e 7 dias. Em conclusão, a pomada contendo 4% de *M. ilicifolia* pode ser considerada mais eficaz, sendo capaz de otimizar o reparo em feridas cutâneas. Esta concentração apresentou um efeito anti-inflamatório (redução da atividade de neutrófilos e macrófagos), além de aumentaram a deposição de colágeno e pro-MMP9 e MMP9. O aumento de colágeno reforça a resistência da matriz, além de promover a migração e proliferação de células essenciais para a resolução da ferida, processo que conta também com a participação das MMPs.

**Palavras-Chave:** espinheira-santa, cicatrização, pele, MMP9, colágeno

## ABSTRACT

*Maytenus ilicifolia*, commonly known as espinheira-santa (ES), is widely used as analgesic, antiseptic, curative, anti-inflammatory and antiulcerogenic, being the last one the most highlighted characteristic by scientific studies. The current analysis evaluated the effect of topical use of the ethanol extract from the leaves of ES in the repair of cutaneous wounds, after 3 and 7 days, being approved by the Ethics Committee (062/2016) of the Federal University of Uberlandia. Four wounds were performed in back of 64 BALB/c mice, being further treated with vaseline/lanolin in the control group and an ointment with 2% (ES 2%), 4% (ES 4%) and 6% (ES 6%). Morphological and biochemical evaluations were performed to verify the evolution of the closure and a resolution of the inflammatory process. The results were used as standard error, ANOVA, two-way and Bonferroni post-test, with  $p \leq 0.05$ . All concentrations improved or wound closure except ES 2% on the fifth day. In 3 days of treatment, an increase in the number of mast cells in ES 4% and ES 6% and reduction in neutrophil activity. Macrophages activity was reduced in ES 2% and ES 4%. Hemoglobin, total collagen and soluble collagen increased in ES 4%. Pro-MMP2 and MMP2 were observed only on 3-day wounds. Pro-MMP9 and MMP9 were increased in ES 4% and ES 6% with 3 days of treatment. On the seventh day, there was an increase in the number of mast cells in ES 6%, increase on the activity of neutrophils in all treatments and macrophage activity increased in ES 4%. In this period, it was also observed a reduction in the hemoglobin dosage in ES 4% and ES 6%. At 7 days, the soluble collagen was higher in the ES 4% group. There was no difference in type I and III collagen in 3 and 7 days. In conclusion, the ointment containing 4% of *M. ilicifolia* can be considered more effective, being able to optimize the repair in cutaneous wounds. This concentration had an anti-inflammatory effect (reduced neutrophil and macrophage activity), and increased collagen deposition and pro-MMP9 and MMP9. Collagen increase reinforces the matrix resistance, besides promoting a migration and proliferation of cells essential for a wound healing, which also count on with the participation of MMPs

**Key words:** espinheira-santa, skin, MMP9, collagen

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo das camadas da epiderme-----	20
<b>Figura 2.</b> Corte histológico da pele corado com H.E. -----	21
<b>Figura 3.</b> Cicatrização de feridas por primeira e segunda intenção-----	23
<b>Figura 4.</b> Fases da cicatrização e a deposição dos componentes da MEC-----	24
<b>Figura 5.</b> Etapas da cicatrização de feridas cutâneas -----	24
<b>Figura 6.</b> Estrutura das MMP 2 e 9 (Gelatinases)-----	32
<b>Figura 7.</b> Estrutura molecular do hemidesmossomo-----	34
<b>Figura 8.</b> Espinheira-santa ( <i>Maytenus ilicifolia</i> )-----	35
<b>Figura 9.</b> Indução de feridas na região dorsal com um punch de 5 mm-----	38
<b>Figura 10.</b> Tratamento com veículo (lanolina 30%/vaselina70%)-----	39
<b>Figura 11.</b> Medida dos diâmetros com paquímetro digital-----	41
<b>Figura 12.</b> Gráfico do fechamento de feridas nos dias 0, 3,5 e 7 dias de tratamento-----	46
<b>Figura 13.</b> Fechamento de feridas em animais dos grupos CO, ES 2%, ES 4% e ES 6%-----	46
<b>Figura 14.</b> Fotomicrografias coradas com Hematoxilina e Eosina de feridas-----	47
<b>Figura 15.</b> Quantificação de mastócitos em lâminas coradas com Azul de Toluidina.-----	48
<b>Figura 16.</b> Fotomicrografias coradas com Azul de Toluidina de feridas-----	49
<b>Figura 17.</b> Atividade da MPO-----	50
<b>Figura 18.</b> Atividade de NAG-----	51
<b>Figura 19.</b> Dosagem de hemoglobina-----	52
<b>Figura 20.</b> Quantificação de colágeno total por densidade de área ( $\mu\text{m}$ ) em lâminas coradas com Picrosirius Red-----	53
<b>Figura 21.</b> Fotomicrografias em coloração de Picrosirius Red demonstrando a deposição de Colágeno total em ferida -----	54
<b>Figura 22.</b> Dosagem de colágeno solúvel-----	55
<b>Figura 23. (A)</b> Quantificação de colágeno do tipo I em feridas-----	56
<b>Figura 23. (B)</b> Quantificação de colágeno do tipo III em ferida-----	56
<b>Figura 24.</b> Fotomicrografias obtidas com a objetiva de 20 x em filtro de polarização, em coloração de Picrosirius Red, demonstrando o colágeno dos tipos I e III em feridas -----	57
<b>Figura 25. (A)</b> Gel de zimografia para atividade da pro-MMP9 com 3 e 7 dias de tratamento-----	58
<b>Figura 25. (B)</b> Gel de zimografia para atividade da MMP9 com 3 e 7 dias de tratamento-----	58



<b>Figura 25. (C)</b> Densitometria da atividade da Pro-MMP9 com 3 e 7 dias de tratamento-----	
-----	58
<b>Figura 25. (D)</b> Densitometria da atividade da MMP9 com 3 e 7 dias de tratamento-----	
-----	58
<b>Figura 26. (A)</b> Gel de zimografia para atividade da pro-MMP2 e MMP2 com 3 dias de tratamento-----	
-----	59
<b>Figura 26. (B)</b> Densitometria da atividade da Pro-MMP9 e MMP9 com 3 dias de tratamento--	
-----	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AT-** Azul de Toluidina

**CPQBA-** Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

**EGF-** Fator de crescimento epidérmico

**ERNs-** Espécies reativas de nitrogênio

**EROs-** Espécies reativas de oxigênio

**ES-** Espinha-santa

**FGF-** fator de crescimento dos fibroblastos

**GAGs-** glicosaminoglicanas

**H.E-** Hematoxilina e Eosina

**ICAM-1-** Molécula de adesão celular

**IGF-1-** fator de crescimento semelhante à insulina

**IL-1-** Interleucina-1

**KGF-** fator de proliferação de queratinócitos

**MEC-**Matriz extracelular

**MMPs-** Metaloproteinases

**MPO-** Mieloperoxidase

**NAG-** N-acetil- $\beta$ -D glicosaminidase

**NFG-** Fator de crescimento nervoso

**P.R-** Picrosirius Red

**PDGF-** Fator de crescimento derivado de plaqueta

**PGC-** Proteoglicanos

**PMN-** polimorfonucleadas

**PNPIC-** Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

**PNPMF-** Política Nacional de Plantas Medicinais e fitoterápicos

**RDC-** Resolução da Diretoria Colegiada

**SELE-** E-selectina

**SUS-** Sistema único de Saúde

**T.G-** Tricômico de Gomori

**TFG- $\beta$ -** Fator transformador do crescimento beta

**TIMPs-** Inibidores de metaloproteinases

**TNF- $\alpha$ -** Fator de necrose tumoral alfa

**TNF- $\beta$ -** Fator de necrose tumoral beta

**UV-** ultravioleta

**VCAM-1-** molécula de adesão de células vascular

**VEGF-** fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	17
<b>3. OBJETIVO</b>	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos específicos	18
<b>4. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	19
4.1 Pele	19
4.2 Tipos de cicatrização	22
4.3 Reparo tecidual	23
4.3.1 Hemostasia	25
4.3.2 Inflamação	26
4.3.3 Proliferação	28
(a) re-epitelização	28
(b) formação do tecido de granulação	29
<i>Fibroplasia</i>	30
<i>Angiogênese</i>	30
4.4 MMP 2 e MMP9	32
4.5 <i>Maytemus ilicifolia</i>	34
4.5.1 Conhecimento popular e científico	35
4.5.2 Fitoquímica	36
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	37
5.1 Animais	37
5.2 Obtenção da pomada	38
5.3 Indução da ferida	38
5.4 Tratamento	39
5.5 Fechamento da ferida e coleta das amostras	40
5.6 Avaliação morfológica	41
5.7 Conteúdo de hemoglobina	42
5.8 Atividade da mieloperoxidase (MPO)	42
5.9 Atividade da N-acetil- $\beta$ -D0 glicosaminidase (NAG)	43
5.10 Dosagem de colágeno solúvel	43
5.11 Dosagem de proteínas totais	44

5.12 Zimografia-----	45
5.11 Análise estatística-----	45
<b>6. RESULTADOS -----</b>	<b>45</b>
6.1 Fechamento da ferida-----	45
6.2 Quantificação de mastócitos-----	48
6.3 Atividade de neutrófilos-----	50
6.4 Atividade de macrófagos-----	51
6.5 Dosagem de hemoglobina -----	51
6.6 Deposição de colágeno total-----	52
6.7 Colágeno solúvel -----	55
6.8 Colágeno I e III-----	55
6.9 pro MMP9 e MMP9-----	58
6.10 pro MMP2 e MMP2-----	59
<b>7. DISCUSSÃO-----</b>	<b>60</b>
<b>8. CONCLUSÃO-----</b>	<b>64</b>
<b>9. ANEXO- Comissão de Ética na Utilização de Animais-----</b>	<b>65</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----</b>	<b>66</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo e constitui 15% do peso corporal total. É responsável por funções vitais ao organismo, servindo como barreira protetora contra agentes externos tais como microrganismos, substâncias químicas e lesões mecânicas. Além disso, é responsável pela termorregulação, secreção, proteção imunológica e impede a perda excessiva de água (GARTNER et al., 1999; KANITAKIS, 2001). Por estabelecer a primeira interface entre o organismo e o ambiente externo, a pele é um órgão suscetível a frequentes lesões provocadas por patógenos, traumas e radiação ultravioleta (UV), além de ser também um local comum para o aparecimento de tumores (MACLEOD; HAVRAN, 2011). Após uma injúria, o restabelecimento da integridade do tecido, ocorre pela cicatrização, um processo complexo (GUO; DIPIETRO, 2010) que consiste em uma sequência de quatro fases que ocorrem de forma sobreposta e integrada: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento/maturação (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; GREAVES et al., 2013). Neste processo, o reparo resulta na interação entre plaquetas, células (neutrófilos, monócitos/ macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos) e componentes da matriz extracelular (MEC) (RAGHOW, 1994; MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004).

Somando-se a importância do reparo da pele lesionada, diversos estudos têm buscado alternativas para o tratamento a partir de intervenções terapêuticas com o uso de compostos vegetais. Estes apresentam vantagens como baixo custo, poucos relatos sobre hipersensibilidade e efeitos colaterais, além de serem mais acessíveis a população, devido a grande biodiversidade da flora brasileira (LEACH, 2004; RAINA et al., 2008). Desta forma, o estudo sobre os princípios bioativos tem possibilitado a identificação, caracterização e aplicação em doenças cutâneas, feridas, cortes e queimaduras (KUMAR et al., 2007; FERREIRA et al., 2008). A propriedade cicatrizante vem sendo associada a uma diversidade de espécies como para mostarda selvagem (*Cleome viscosa*) (UPADHYAY et al., 2014) cânfora (*Blumea balsamifera*) (PANG et al., 2014), salvia (*Salvia miltiorrhiza*) (ZHANG et al., 2014), brahmi (*Bacopa monnieri*) (MURTHY et al., 2013), uva (*Vitis Vinifera*) (NAYAK et al., 2010), noni (*Morinda citrifolia*) (NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2009) e romã (*Punica granatum*) (NAYAK et al., 2013).

Entre as plantas com efeito medicinal, *Maytenus ilicifolia* popularmente conhecida como “espinheira-santa” (ES) é amplamente difundida como antiulcerogênica, analgésica, anti-séptica, cicatrizante e anti-inflamatória (COIMBRA; AS SILVA, 1958; CARLINI; GARTEN, 1988; COULAUD-CUNHA; OLIVEIRA; WAISSMANN, 2004; JORGE et al., 2004; CAR-

VALHO et al., 2008). No entanto, estas propriedades farmacológicas são direcionadas a comprovação científica sobre o seu efeito antiulcerogênico, não avaliando o processo de cicatrização cutâneo. Desta forma, torna-se necessário avaliar o efeito da *M. ilicifolia* no tratamento de feridas cutâneas como uma alternativa terapêutica a fim de otimizar o reparo tecidual.

## 2. JUSTIFICATIVA

O uso de plantas medicinais foi, durante muito tempo, o principal recurso terapêutico utilizado como tratamento na saúde das pessoas e de suas famílias (BADKE et al., 2011). Muitas propriedades terapêuticas das plantas são descritas pela população e utilizadas como fonte etnofarmacológica para estudos científicos posteriores. A importância desse estudo deve-se ao fato de que essas propriedades medicinais propiciam o desenvolvimento e elaboração de vários medicamentos, sejam eles obtidos a partir de molécula protótipo; isolamento ou como uso fitoterápico (NOLDIN; ISAIAS; FILHO, 2006). Nos últimos anos, o uso de produtos naturais para ações terapêuticas tem sido incentivado pelo Ministério da Saúde brasileiro com o objetivo de promover a inserção de práticas complementares no sistema oficial de saúde. Sendo reforçado pela implementação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006a) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (BRASIL, 2006b), ambas de 2006. Estas visam estimular o acesso às práticas complementares e às plantas medicinais, no cuidado com a saúde, garantindo a eficácia e segurança. Outras publicações que ressaltam a importância do estudo sobre plantas medicinais, é a Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), lançada em 2009, contendo 71 plantas medicinais que devem ser objeto de pesquisa e implementação dos setores e serviços de saúde públicos brasileiros (BRASIL, 2009). Além disso, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 10, de 2010, lista, atualmente, 66 plantas medicinais com ações comprovadas na saúde humana. Dentre estas, várias espécies sendo indicadas para a cicatrização, o que implica em grande avanço da saúde pública brasileira na valorização e utilização de novas terapias com a participação de plantas medicinais (BRASIL, 2010).

Na cicatrização de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos, composto presente em *M. ilicifolia*, tem a propriedade de contribuir na recuperação por formar uma camada protetora sobre a mucosa ou a pele, protegendo e favorecendo a recuperação natural do tecido (SANTOS; MELLO, 2004). Enquanto a presença de metabólitos fenólicos, é uma característica promissora para a atividade anti-inflamatória e antiúlcera de *M. ilicifolia*, como já descritos para, taninos condensados (GONZALEZ et al., 1982) flavonóides (LEITE et al., 2001), e tri-

terpenos (ITOKAWA et al, 1991; SHIROTA et al, 1994). A atividade anti-inflamatória associada a *M. ilicifolia* é uma propriedade comum de muitos triterpenóides (SAFAVHI; SAILER, 1997; GONZALES et al., 1982; FREIRE et al., 1991; NIKIEMA et al., 2001; COSTA et al., 2003) assim como, para a presença de flavonóides (GALATI et al., 1994; PELZER et al., 1998). A atividade anti-inflamatória de *M. ilicifolia* já foi descrita no potencial de redução na formação de mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas, leucotrienos, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (ROBAK; GRYGLEWSKI, 1996). Em ensaios *in vivo*, extratos hexânicos e de acetato de etila desta planta demonstraram atividade anti-inflamatória, avaliada pelo método de indução por carragenina e antiinociceptivo, através de modelo experimental induzido por injeção de solução de formaldeído. Além de apresentarem redução na gravidade de lesões gástricas induzidas pelo método de estresse-contenção frio (JORGE et al., 2004). No entanto, a avaliação científica da ação cicatrizante de *M. ilicifolia* está voltada principalmente para sua atividade anti-ulcerogênica e não associada ao uso tópico em feridas cutâneas. Desta forma, torna-se relevante a avaliação da utilização de *M. ilicifolia*, como uso tópico para cicatrização de feridas cutânea, podendo tornar o processo de reparo cutâneo mais eficaz.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Avaliar o efeito do uso tópico de uma pomada formulada a partir do extrato etanólico de folhas (EETF) de *M. ilicifolia* no tratamento de feridas cutâneas em dois períodos, 3 e 7 dias.

#### **3.2 Objetivos específicos**

-Avaliar o efeito do tratamento de *M. ilicifolia* em dois períodos, após 3 e 7 dias através da avaliação dos componentes envolvidos no reparo, em especial nas etapas de inflamação e proliferação.

- Caracterizar a MEC de cada tratamento por meio da quantificação de colágeno total, colágeno solúvel e colágeno dos tipos I e III em lâminas coradas com Picrosirius Red

-Caracterizar o perfil geral da ferida através da coloração por Hematoxilina e Eosina

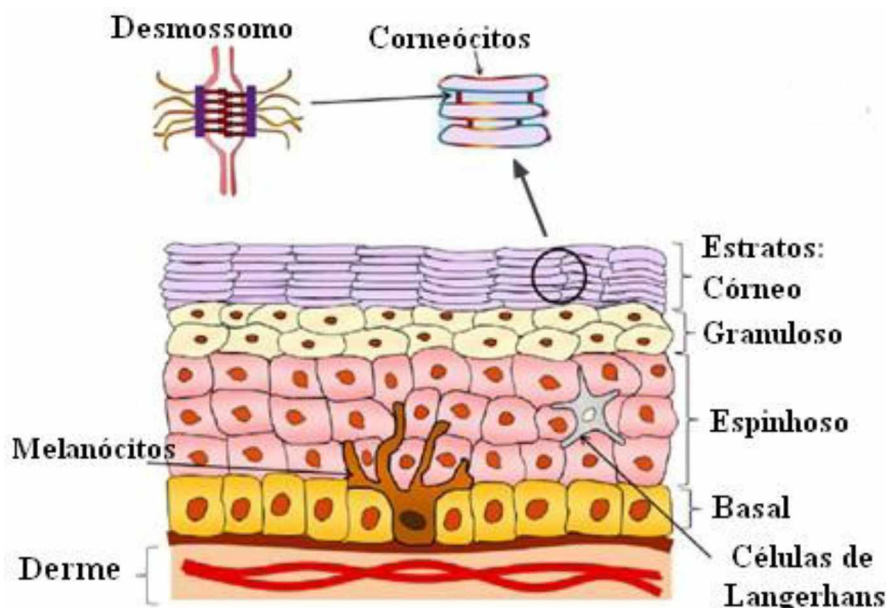


- Avaliar a atividade de neutrófilos e macrófagos por ensaios bioquímicos e o número de mastócitos em lâminas coradas com Azul de Toluidina
- Avaliar a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) por meio de análise bioquímica do conteúdo de hemoglobina.
- Analisar o comportamento das pro-metaloproteinases 2 e 9 e MMPs 2 e 9 ativas através de zimografia.

## **4. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **4.1 Pele**

A pele é constituída por três camadas de tecido, epiderme, derme e hipoderme ou camada subcutânea (GUIRRO, 2002). Na epiderme, a camada mais externa são encontrados os queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e de Merkel (REHDER et al 2004; SOUTO et al., 2006; KHAN et al., 2012). Os queratinócitos são as células predominantes na epiderme, constituindo 80% das células desta camada. Os melanócitos correspondem a 13% da população celular e são responsáveis pela produção de melanina, enquanto, as células de Langerhans são responsáveis pelo sistema imune cutâneo representando 4% do número total. As células de Merkel são receptoras para o tato e correspondem a 3% da população celular epidérmica (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVROT, 1998; HARRIS, 2009). A epiderme apresenta estratos que recebem o nome de acordo com o formato de suas células, sendo classificados da derme em direção ao meio externo (epiderme) como estratos basal, espinhoso, granuloso e córneo (**Figura 1**) (LUCAS, 2004).



**Figura 1.** Esquema representativo das camadas da epiderme

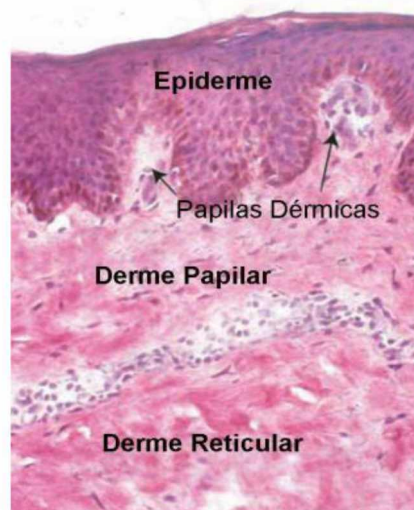
Modificado de (VISSCHER; NARENDRAN, 2014)

O estrato basal ou germinativo é o mais basal e constituído por uma camada de células que se multiplica continuamente. Na medida em que novas células da camada basal são formadas, elas substituem as produzidas anteriormente “direcionando-as” em sentido à camada mais externa. Desta forma a camada basal se compromete em renovar os estratos da epiderme formando então os estratos epidermais subsequentes (SAMUELSON, 2011). Ao evoluírem em direção à superfície, os queratinócitos sofrem um processo denominado de queratinização ou corneificação para originar a camada córnea. Isso porque no citoplasma dos queratinócitos é sintetizada uma proteína fibrosa de alto peso molecular, resistente e impermeável denominada queratina, que desempenha atividade impermeabilizante, promovendo barreira mecânica e evitando a dessecação do organismo (FOSSUM, 2002). Na última camada, encontram-se os corneócitos que são células planas. Os corneócitos são conectados entre si, através dos desmossomos. Estas junções impedem que ocorra o deslizamento entre as camadas (**Figura 1**) (HARRIS, 2005).

A derme constitui a porção mais espessa da pele e localiza-se logo abaixo da epiderme. Esta camada - altamente vascularizada e inervada – tem a vital função de nutrir a camada epidérmica. A epiderme é avascular e recebe nutrientes através da permeação procedentes da derme por capilaridade (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVROT, 1998; HARRIS, 2009). O principal tipo celular da derme são os fibroblastos, essas células possuem prolongamentos citoplasmáticos, são dotados de motilidade e capacidade de adaptação. Sendo assim, podem se

diferenciar em miofibroblastos, células especializadas que se caracterizam por expressar a mesma proteína contrátil presente nas fibras musculares lisas, a  $\alpha$ -actina. Os miofibroblastos exercem um papel importante, especialmente na fase de remodelamento onde ocorre o processo de contração da ferida (RITTIÉ, 2016). Além disso, os fibroblastos desempenham uma função fundamental na deposição da MEC, por meio da síntese de colágeno, elastina e da substância fundamental amorfa. A substância fundamental consiste em uma estrutura gelatinosa, incolor e homogênea, onde os elementos dérmicos encontram-se mergulhados. Esta substância é formada por complexos de GAGs e proteoglicanos associados à glicoproteínas estruturais (LUCAS, 2004; CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2008).

A derme é dividida estruturalmente em duas camadas: a camada papilar e a camada reticular (**Figura 2**). A camada papilar encontra-se intimamente ligada à epiderme, emitindo projeções chamadas de papilas dérmicas em direção à camada epidérmica. Estas papilas, além de estabelecerem forte união entre a derme e epiderme, são ricas em vasos sanguíneos, os quais fornecem os nutrientes necessários para a epiderme (RITTIÉ, 2016). Esta é constituída por tecido conjuntivo frouxo, fibroblastos, colágeno tipo III e vasos sanguíneos de menor espessura e calibre. Já a camada reticular, posiciona-se logo abaixo da derme papilar e caracteriza-se pelo predomínio de feixes dérmicos constituídos por colágeno tipo I e permeados por colágeno tipo III, além de vasos sanguíneos calibrosos (SOUSA; VARGAS, 2004; FITZPATRICK; EISEN; WOLF, 2005).



**Figura 2.** Corte histológico da pele corado com H.E  
(modificada de SORREL; CAPLAN, 2004)

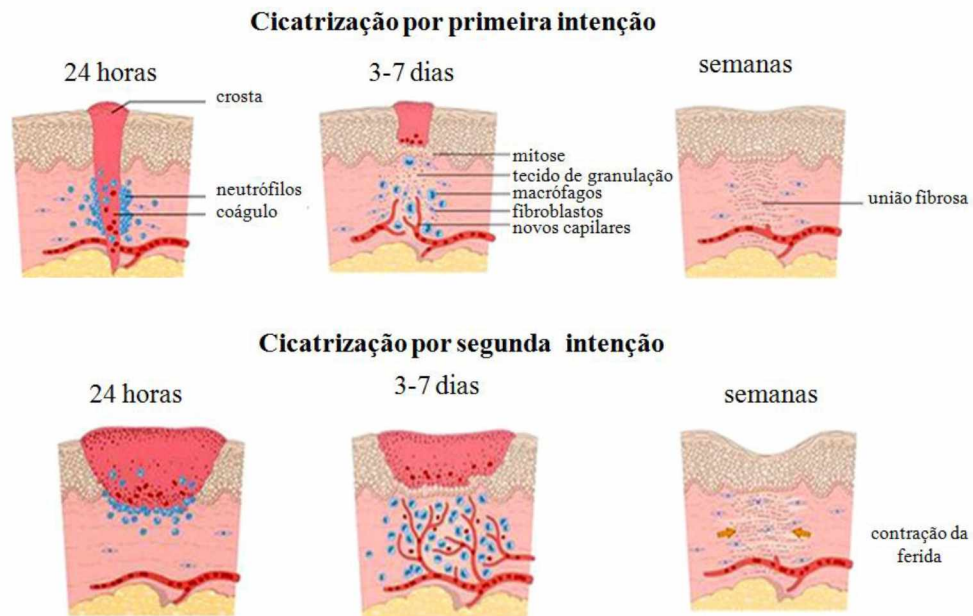
O colágeno é o componente mais abundante da MEC e confere resistência tênsil à pele (BRINK; STALLING; NICOLL, 2005; CUTTLE; NATAATMADJA; FRASER, 2004). Na

pele adulta saudável seu percentual alcança 90% de colágeno tipo I e 10% colágeno tipo III (BRINK et al., 2005). Os fibroblastos são as células com maior contribuição na síntese dos elementos da MEC (colágeno, fibronectina, GAGs, proteoglicanos e ácido hialurônico). A formação da MEC é um passo importante, pois fornece um andaime para a adesão celular e regula e organiza criticamente o crescimento, movimento e diferenciação das células (ECKES; NISCHT; KRIEG, 2010; BARKER, 2011). O movimento e diferenciação celular estão relacionadas com a estimulação da adesão e migração das células durante o processo de cicatrização, assim como com a mediação das interações entre as células, entre as células e a matriz, ou entre as proteínas da MEC (SHULTZ; WYSOCKI, 2009; SHULTZ et al., 2011; AGREN; WERTH'EN, 2007; RAMAN; SASISEKHARAM, 2005).

#### 4.2 Tipos de cicatrização

Uma vez ferido, o tecido passa por um processo de cicatrização, até que ocorra o seu fechamento. Existem três formas pelas quais uma ferida pode cicatrizar, e isso depende de fatores como, quantidade de tecido lesado ou danificado e da presença ou ausência de infecção no local. Desta forma pode ser classificada como ferida ocasionada por primeira, segunda ou terceira intenção (MARIA DE FÁTIMA et al., 2008).

Na cicatrização por primeira intenção, as bordas do local lesionado são aproximadas através de sutura, neste caso, ocorre perda mínima de tecido, ausência de infecção e uma quantidade mínima de edema e tecido de granulação. Como exemplo, podemos citar os ferimentos onde é possível realizar suturas cirúrgicas (MADDEN; AREM; SABISTON, 1991; MARIA DE FÁTIMA et al., 2008) (**figura 3**). De outro modo, quando não é possível a aproximação das bordas da ferida, com uma grande perda cutânea, esta é classificada como cicatrização por segunda ou terceira intenção. Na presença de infecção e sem a necessidade de assepsia prévia, ela é caracterizada como cicatrização por segunda intenção (MADDEN; AREM; SABISTON, 1991; MARIA DE FÁTIMA et al., 2008). As feridas de segunda intenção se fecharão por meio de contração e epitelização (MADDEN; AREM; SABISTON, 1991; MARIA DE FÁTIMA et al., 2008). Quando existir a necessidade de erradicar a infecção e suturar a ferida, esta é então denominada de cicatrização por terceira intenção. Neste caso, a aproximação das margens da ferida (pele e subcutâneo) somente ocorre após o tratamento aberto inicial (MARIA DE FÁTIMA et al., 2008).



**Figura 3.** Cicatrização de feridas por primeira e segunda intenção

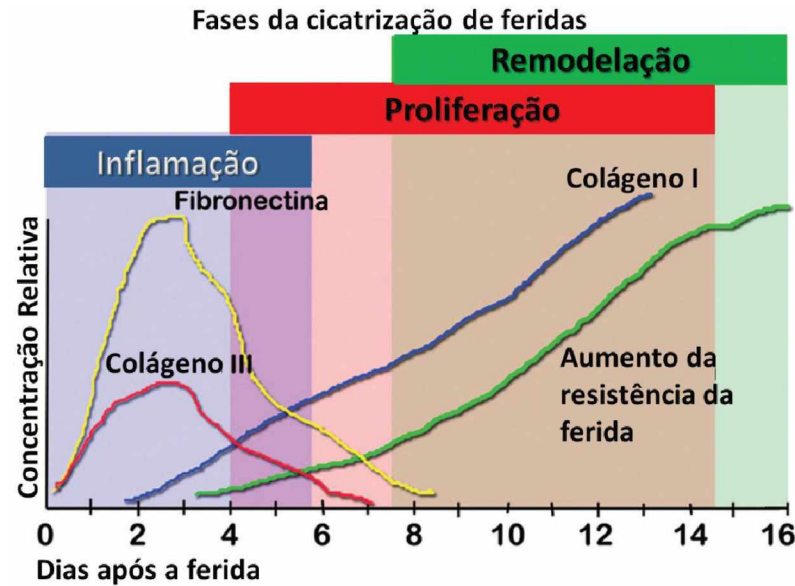
© Elsevier. KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013 Robbins Basic Pathology 8e.

[www.studentconsult.com](http://www.studentconsult.com)

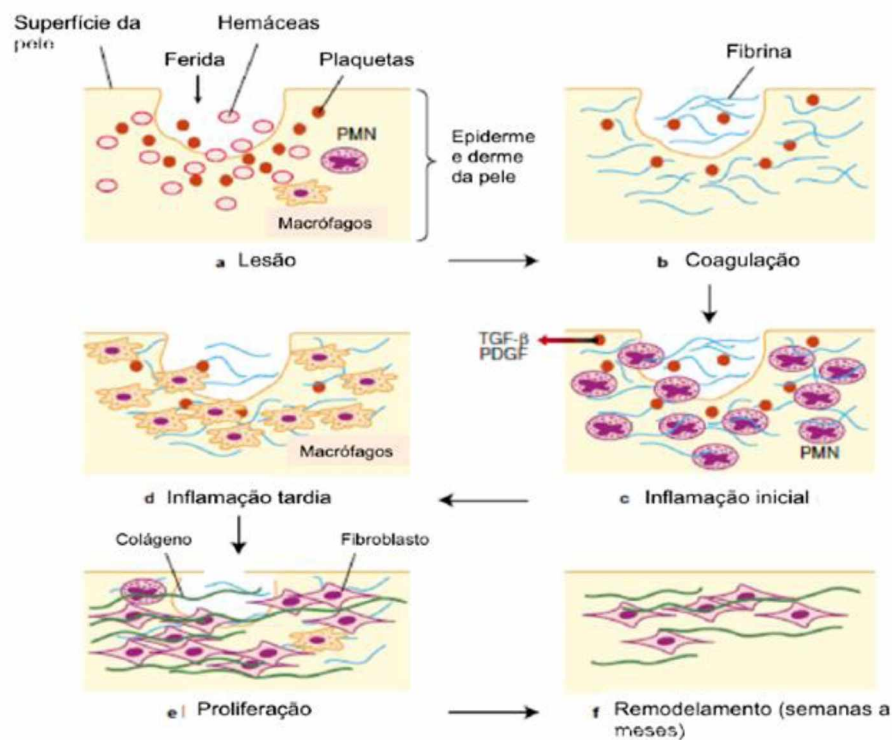
### 4.3 Reparo tecidual

O reparo tecidual é dividido em 4 etapas. Essa divisão foi criada por razões práticas e fins didáticos, pois a divisão em si tem um caráter arbitrário. As etapas acontecem de forma subsequente e sobrepostas e são denominadas de: hemostasia (0-muitas horas após a injúria), inflamação (1-4 dias), proliferação (4 -12 dias) e remodelamento (8 dias- 1 ano) (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; GURTNER et al., 2008; REINKE; SORG, 2012; WU; CHEN, 2014) (**figura 4**). Eventos celulares e bioquímicos específicos ocorrem em cada etapa e a duração dessas fases pode variar conforme a localização e a extensão da lesão ou doença que acomete o tecido (**figura 5**) (WOO *et al.*, 1999; LIN; CARDENAS; SOSLOWSKY, 2004; MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER., 2004; LUO; CHEN, 2005; SHARMA; MAFFULLI, 2006).





**Figura 4.** Fases da cicatrização e a deposição dos componentes da MEC durante o reparo (Adaptado de BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006)



**Figura 5:** Etapas da cicatrização de feridas cutâneas. (A) Uma vez que a pele é lesionada, elementos sanguíneos e aminas vasoativas extravasam dos vasos sanguíneos situados na derme danificada. A permeabilidade vascular é temporariamente aumentada, permitindo que neutrófilos (células polimorfonucleares - PMN), plaquetas e proteínas do plasma infiltrem na região da ferida. Em seguida acontece vasoconstrição em resposta a fatores liberados por essas células. (B) Quando plaquetas se agregam com fibrina é formado um coágulo rico em fibrina,

que é depositada na ferida após sua conversão do fibrinogênio. (C) As plaquetas liberam diversos fatores, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) que atraem PMNs para ferida, dando início a etapa de inflamação. (D) Em seguida, os macrófagos substituem as PMNs, e tornam-se a principal célula inflamatória presente na lesão. Esses dois tipos celulares juntos removem os restos celulares da ferida, liberam fatores de crescimento e inicia-se a reorganizar da MEC. (E) A fase proliferativa começa com os fibroblastos, estas células, são recrutadas para ferida pelos fatores de crescimento liberados pelas células inflamatórias, iniciando a síntese de colágeno. (F) A síntese de colágeno é reduzida após aproximadamente três semanas. No entanto, a reorganização do colágeno pode ocorrer por meses e até anos após a lesão na fase de remodelamento do reparo (Adaptado de BEANES et al., 2003).

### 4.3.1 Hemostasia

A hemostasia é o primeiro evento do processo de cicatrização de feridas e começa logo após o aparecimento de uma lesão (YUSSOF et al., 2012). Inicialmente, ocorre a contração dos vasos danificados, induzido por fatores vasoconstritores, tais como serotonina, tromboxano A<sub>2</sub> e adrenalina, assim como a adesão, agregação e ativação plaquetária, no local da lesão (WU; CHEN, 2014). As plaquetas são agentes moduladores iniciais que atuam sobre o processo de cicatrização (DIELGELMANN; EVANS, 2004). O processo de adesão, agregação e ativação plaquetária ocorre após o extravasamento sanguíneo proveniente da injúria, quando as plaquetas entram em contato com elementos da MEC, como colágeno, proveniente dos vasos sanguíneos (WU; CHEN, 2014). Quando as plaquetas são ativadas, a sua superfície torna-se um local de ativação da protrombina, levando à sua conversão em trombina pela ação catalítica da tromboplastina. A trombina é um fator chave da coagulação que catalisa a transformação de fibrinogênio sérico em monômeros de fibrina, e este último se polimeriza pela ação do fator XIII, formando assim um coágulo (BRASS, 2003; KIERZENBAUM, 2004; HOFFMAN et al., 2006; REINKE; SORG, 2012). O coágulo, além de reter a perda de sangue também ajuda a preencher o local da ferida, servindo também como uma matriz provisória, garantindo um leito para que ocorra a migração e diferenciação de células diferenciadas (WU; CHEN, 2014).

A fibrina é a molécula principal presente na MEC temporária, que também contém muito ácido hialurônico e fibronectina do plasma, os quais são acumulados na ferida durante as primeiras 24 horas após a lesão (REINKE; SORG, 2012). A polimerização de moléculas de fibronectina resulta em uma propriedade adesiva que permite a interação com numerosos receptores celulares de integrina, estimulando a migração e adesão de fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais (LAURENS; KOOLWIJK; MAAT, 2006).

Após 5 a 10 minutos da vasoconstrição, os vasos sanguíneos são dilatados e inicia-se a migração de leucócitos para dentro da matriz provisória (REINKE; SORG, 2012). As plaquetas presentes no tampão plaquetário rico em fibrina que compõem a matriz provisória liberam uma diversidade de mediadores químicos provenientes dos grânulos alfa. Neste processo destacam-se os fatores PDGF e TGF- $\beta$ , que neste instante tem como função, atrair neutrófilos e monócitos, enquanto o EGF (fator de crescimento epidérmico) é mais ativo na fase proliferativa (BARRIENTOS et al., 2008). Mediante a liberação de mediadores químicos (PDGF e TGF- $\beta$ ) e recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos) inicia-se a resposta inflamatória (DIEGELMANN; EVANS, 2004; YANG et al., 2011).

#### 4.3.2 Inflamação

A fase inflamatória é caracterizada pelo surgimento dos sinais cardinais que apresentam alguns sintomas característicos, tais como, vermelhidão, calor no local da lesão, inchaço, dor ao redor do local ferido e perda de função (BUSTI et al., 2005). Esta resposta tem início imediatamente em que ocorre a lesão, e seu principal objetivo é promover a assepsia do local (remoção do agente nocivo, debridamento de corpos apoptóticos e tecidos mortos) e preparar o tecido para as etapas posteriores do reparo. As primeiras células inflamatórias a migrarem para o local da lesão são os neutrófilos. Estas células são recrutadas a partir da circulação sanguínea, então, sofrem diapedese e migram para o local injuriado em resposta a quimiocinas, complemento e subprodutos da degradação bacteriana (REINKE; SORG, 2012; SINNO; PRAKASH, 2013).

No processo de diapedese, os neutrófilos precisam atravessar os vasos locais. Para isso, as células endoteliais, em resposta a citocinas como IL-1 (Interleucina-1) e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral- $\alpha$ ) passam a expressar (ICAM-1) moléculas de adesão celular, (VCAM1) molécula de adesão de célula vascular e (SELE) E-selectina. Estas moléculas são importantes por mediar a aderência de neutrófilos com a parede dos vasos sanguíneos (VESTWEBER, 2015). A IL-1 e TNF- $\alpha$  são secretados por macrófagos e pelo próprio endotélio, sendo que a IL-1 também é expressa por queratinócitos (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014). Após estas modificações no endotélio, e por consequência da adesão celular e a exposição à quimiocinas, o citoesqueleto dos neutrófilos é modificado, impulsionando o extravasamento destas células para o local injuriado (VESTWEBER, 2015).

Os neutrófilos são a primeira linha de defesa contra infecções. Estas células realizam a fagocitose a fim de remover patógenos e detritos celulares (YUSSOF et al., 2012; WU;



CHEN; 2014; WILGUS; ROY; MCDANIEL, 2013). Neutrófilos atuam com a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) e liberação de proteases no local lesionado (elastase, collagenase e catepsina G) (WITTE; BARBUL, 2002; YONEDA; COUCHMAN, 2003; TAYLOR et al, 2004). Estas células podem intensificar o processo inflamatório, devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- $\alpha$  (WU; CHEN, 2014). Cerca de 2-5 dias após a diapedese, os neutrófilos sofrem apoptose e são gradualmente substituídas por monócitos (YUSSOF et al., 2012; WILGUS; ROY; MCDANIEL, 2013; WU; CHEN, 2014).

Assim como os neutrófilos, os monócitos migram dos capilares sanguíneos em direção a MEC por estímulo quimiotático. Já neste ambiente, passam por uma transformação, sendo agora denominados como macrófagos. As modificações necessárias para que estas células sejam consideradas macrófagos são influenciadas por mediadores inflamatórios, como TGF- $\beta$  (fator de necrose tumoral- $\beta$ ) e produtos de degradação de fibrina e fibronectina, proveniente da matriz "temporária" (GUO; DIPIETRO, 2010). Os macrófagos participam da fagocitose e eliminação de bactérias e/ou remoção de células e tecidos mortos, através da secreção de MMPs da matriz, como, collagenase, elastase (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; EMING et al., 2007; EMING et al, 2009; GUO; DIPIETRO, 2010; YUSSOF et al., 2012). Dentre os fatores de crescimento produzidos por macrófagos estão o EGF, FGF (fator de crescimento dos fibroblastos), PDGF, TGF- $\beta$  e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (KIERSZENBAUM, 2004). O EGF e FGF têm como uma das funções, promoverem a quimiotaxia e proliferação de fibroblastos, sendo que FGF também atua positivamente na migração e proliferação de queratinócitos, e TGF- $\beta$  na deposição de componentes da matriz pelos fibroblastos. O VEGF e o FGF são potentes fatores angiogênicos (SINGER; CLARK, 1999; KIERSZENBAUM, 2004; GURTNER et al., 2008; TOWNSEND et al., 2012). Os macrófagos também participam do processo de remodelamento da MEC através de secreção das proteases e seus inibidores, tais como MMPs de matriz e inibidores de metaloproteinases (TIMPs) (KOH; DIPIETRO, 2011; STERNLICHT; WERB, 2001; VÉROLLET et al., 2011).

A ausência de neutrófilos e redução de macrófagos no local da ferida indica o fim da etapa inflamatória e o início da fase proliferativa (DIEGELMANN; EVANS, 2004). Portanto, a remoção de neutrófilos é pré-requisito para feridas avançar para a fase proliferativa. Esta remoção é feita, principalmente, pelos macrófagos por induzirem a apoptose dos neutrófilos (MESZAROS; REICHNER; ALBINA, 2000). Além disso, a fagocitose dos neutrófilos é um fenômeno para induzir a mudança do fenótipo dos macrófagos do tipo M1 que é pró-inflamatória para um fenótipo reparativo, o M2 (FADOK et al., 1998).

Diante da importância dos neutrófilos e macrófagos, marcadores como MPO e NAG são utilizados para mensurar a atividade destas células durante o processo de cicatrização. A mieloperoxidase (MPO) é uma proteína catiônica, principal constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, com peso molecular de 144 kD. Apresenta dois dímeros idênticos ligados por uma ponte de bissulfeto, sendo que cada dímero é composto de uma subunidade de cadeia leve e uma pesada, com grupos heme funcionalmente idênticos. Esta enzima é liberada após ativação por diferentes agonistas, contribuindo para a defesa imune inata do organismo (ARNHOLD, 2004; HANSSON; OLSSON; NAUSSEF, 2006; LAU; BALDUS, 2006). A N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) é utilizada para detectar o acúmulo/ativação de macrófagos teciduais. É uma enzima lisossômica hidrolítica de alto peso molecular (~140 kDa) presente em altos níveis em lisossomos de macrófagos ativados (BELO et al., 2004).

#### **4.3.3 Proliferação**

A terceira etapa do processo de reparo recebe o nome de proliferação que se inicia ao redor do quarto dia após a lesão, atingindo um pico proliferativo em 2-3 semanas e seu decréscimo em 4-6 semanas (RITTIÉ, 2016). Neste instante, o processo de reconstrução do tecido danificado é intensificado e caracterizado pela síntese de matriz pelos fibroblastos (GUO; DIPIETRO, 2010; RITTIÉ, 2016). Ocorre um aumento no número de células no leito da ferida, devido ao processo de migração e proliferação de fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014).

A proliferação pode ser subdividida em dois eventos importantes: (a) re-epitelização e (b) formação do tecido de granulação

##### **(a) Re-epitelização**

A re-epitelização consiste na reconstituição dos estratos que compõe a epiderme. Esta etapa objetiva primordialmente concretizar o fechamento da ferida de modo a reestabelecer a função vital de barreira protetora (DIEGELMANN; EVANS, 2004). Um processo que compreende o desprendimento celular do estrato basal, a migração destas células para a área da ferida e a proliferação e diferenciação em queratinócitos (DIEGELMANN; EVANS, 2004). Os mediadores que estimulam a migração e proliferação das células epiteliais são fatores de crescimento como EGF, KGF e TGF- $\alpha$ . Somente as células que se encontram diretamente sobre a membrana basal, são dotadas da capacidade de proliferação (REINKE; SORG, 2012).

As diversas camadas que constituem o epitélio, como já mencionado, recebem o nome de queratinócitos. As células-tronco do estrato basal se desprendem da membrana basal, se diferenciam em queratinócitos ativos que migram para formar os estratos subsequentes (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014). O processo de desprendimento das células do estrato basal da membrana basal é desempenhado por enzimas conhecidas como MMPs 2 e 9. Estas MMPs degradam o colágeno tipo IV da membrana basal e o colágeno tipo VII que cria fibrilas de ancoragem do epitélio com a membrana basal (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014). Há também a participação de outras MMPs, como a MMP-1 (colagenase intersticial) que suporta a migração de queratinócitos por uma rede de colágenos dos tipos I e III, enquanto a estromelisina-1 e a estromelisina-2 garantem a migração destas células por uma rede de fibronectina, lamininas e GAGs (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014).

Existem três fontes para o fornecimento de queratinócitos que repõe os estratos da epiderme: à partir da borda da ferida, dos anexos cutâneos como os folículos pilosos e glândulas sudoríparas que contém células-tronco epidermais e do estrato basal que é rico em células troco da epiderme (LAU et al., 2009). Primeiramente, cerca de algumas horas -1 dia, os queratinócitos presentes nas bordas da ferida são ativados por fatores de crescimento epidérmico e migram para o centro da ferida (LAU et al., 2009). A partir do segundo ou terceiro dia, após a lesão, começam a migrar queratinócitos provenientes do estrato basal, e dos anexos cutâneos. Este processo garante, além da migração, um aumento do número de células para cobrir a ferida (LAU; PAUS et al., 2009). O processo de re-epitelização é influenciado por uma diversidade de sinais relacionados com a ferida, como, óxido nítrico, sintetizado principalmente por macrófagos (WITTE; BARBUL, 2002), citocinas e fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo (IGF-1) e fator de crescimento nervoso (NGF), provenientes de vários tipos celulares presentes no local da ferida (BARRIENTOS et al., 2008).

#### (b) Formação do tecido de granulação

O tecido de granulação é composto por colágeno recém-sintetizado e vasos sanguíneos recém-formados, o que confere a esse tecido, uma aparência vermelha e heterogênea. A formação do tecido de granulação é dependente de dois eventos: fibroblasia e angiogênese.

### *A fibroplasia*

Durante a fibroplasia, ocorre a migração e proliferação de fibroblastos e consequentemente a síntese de novos componentes da MEC (SINGER; CLARK, 1999). Os fibroblastos são células fusiformes e possuem núcleo elíptico (KIERSZENBAUM, 2004) e, em geral, constituem o maior número de células do tecido conjuntivo, além de sintetizarem grande parte da matriz extracelular que o compõe (GRAY, et al, 1995). Os fibroblastos iniciam o processo de migração cerca 48-72 horas a partir do momento em que a lesão aparece (BUSTI et al., 2005).

O processo de migração e proliferação dos fibroblastos ocorre a partir das margens livres da ferida e de células mesenquimais residentes na derme (SINGER; CLARK, 1999), as quais se diferenciam em fibroblastos, após serem influenciadas pela participação de citocinas e fatores de crescimento derivados de plaquetas, neutrófilos e macrófagos (CAPLAN, 2004; GUO; DIPIETRO, 2010; SORRELL; LI; WANG, 2011). Por outro lado, os principais estímulos quimioatraentes e mitogênicos para os fibroblastos, são o EGF e o PDGF (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

A MEC temporária produzida durante a hemostasia com predomínio de fibrina e fibronectina é agora substituída, dando origem ao tecido de granulação (MIDWOOD; WILLIAMS, SCWARZBAUER, 2004). As moléculas de ácido hialurônico, característica da MEC provisória, são GAGs com uma alta capacidade de associação a água, o que garante a característica viscosa e espaçada. Desta forma, criam uma estrutura tecidual inicial que permite que mais células que se aproximem e penetrem na área da ferida (KO'ZMA et al., 1998). Cerca de três dias após a lesão, a concentração do ácido hialurônico dentro da área da ferida é reduzido rapidamente (HINZ, 2007). O tecido de granulação contém uma grande quantidade de fibroblastos, granulócitos, macrófagos, vasos sanguíneos, (SCHULTZ; WY SOCKIW, 2009), além de componentes da MEC como colágeno do tipo I e III, elastina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e proteínas não colágenas. Os componentes da MEC são sintetizados principalmente por fibroblastos que tem sua atividade regulada por PDGF e TGF- $\beta$ . Todos estes elementos juntos têm como finalidade recuperar parcialmente a estrutura e função da pele ferida.

A formação deste tecido ocorre antes do término da angiogênese e substitui temporariamente a derme (KO'ZMA et al., 1998; TOMASEK et al., 2002; WIPFF; RKIN; MEISTER et al., 2007; SCHULTZ; WY SOCKIW, 2009). O termo "granulação" surgiu devido ao aspecto granuloso característico da estrutura de tecido conjuntivo recém-formado "entrelaçado" por muitos capilares (NOWAL; OLEJEK, 2004) que aparece durante a fase de proliferação ao

mesmo tempo que começa a surgir os primeiros indícios característicos da etapa remodelamento (NAUTA; GURTNER; LONGAKER, 2011) .

O tecido de granulação é então formado a fim de substituir temporariamente a derme até que o processo de maturação possa reestruturar esta camada, na fase de remodelamento (KO'ZMA et al.,1998). Este tecido possui um metabolismo mais rápido, em comparação com a derme, o que indica que as células presentes possuem uma alta demanda energética. Isto porque neste tecido, a migração celular, divisão e biossíntese de proteína são intensificadas (KO'ZMA et al.,1998).

### *Angiogênese*

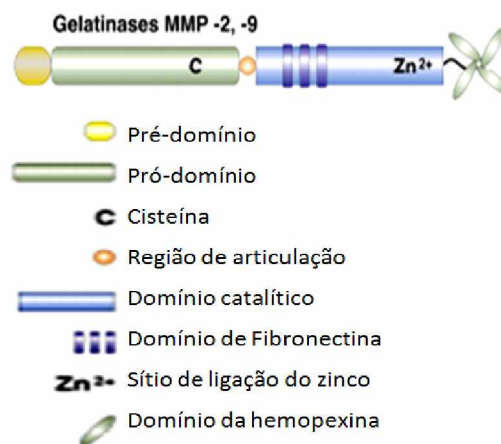
Angiogênese é o processo de criação de novos vasos sanguíneos (ARNOLD; WEST, 1991; LI; ZHANG; KIRSNER, 2003; BAUER; BAUER; VELAZQUEZ, 2005; BUSTI et al., 2005; DULMOVITS; HERMAN, 2012) Este processo é importante, por restaurar a circulação no local danificado, impedindo o desenvolvimento de necrose isquêmica, ao mesmo tempo estimula o processo de reparo nos tecidos. A angiogênese assim como os processos do reparo, é influenciada por fatores locais, como baixa tensão de oxigênio, pH reduzido e/ou concentração elevada de ácido láctico (TONNESEN; FENG; CLARK, 2000; GURTNER et al., 2008) Além disso, existe a participação de mediadores solúveis, tais como bFGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, angiogenina e angiotropina, que são advindos de células epiteliais, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos e apresenta uma forte atividade pro-angiogênica (BUSTI et al., 2005; SINNO; PRAKAS, 2013).

O primeiro passo formação de novos vasos é a ligação dos fatores e seus receptores nas células endoteliais de vasos existentes. Essa ligação promove uma cascata de sinalização intracelular. As células endoteliais ativadas segregam enzimas proteolíticas que rompem a lâmina basal (SORG; KRUEGER; VOLLMAR, 2007) permitindo a proliferação e migração de células endoteliais para o leito da ferida. As células endoteliais contam com a liberação de MMPs de matriz, promovendo a lise do tecido circundante e direção a proliferação endotelial. Os ramos recém formados formam pequenos canais tubulares que se interligam uns aos outros, dando origem a vasos de maior calibre (SORG; KRUEGER; VOLLMAR, 2007).

#### 4.4 MMP2 e MMP9

As Metaloproteases de matriz (MMPs) constituem uma família de proteases dependentes de  $Zn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ . A família das MMPs incluem cerca de 25 proteínas, as quais podem ser classificadas como: collagenases (MMP-1, 8 e 13), gelatinases (MMP-2 e 9), estromelisinases (MMP-3, 7 e 10), matrilisinas (MMP-7 e 26), MMPs tipo membrana (MMP-14, 15, 16, 17 e 24) e outras MMPs secretadas por vertebrados (STERNLICHT; WERB, 2001; VISSE; NAGASE, 2003). As MMPs são conhecidas, por participarem em diversos eventos biológicos por influenciarem o comportamento celular através de diversas ações tais como, como clivagem de proteínas que fazem a adesão célula-célula, liberação de moléculas bioativas na superfície celular ou por clivagem de moléculas presentes na superfície celular, as quais transmitem sinais no ambiente extracelular (DE SOUZA ARAÚJO et al., 2011).

As MMPs são sintetizadas e posteriormente secretadas como pro-MMP inativa, na maioria das vezes (NAGASE,WOESSNER, 1999). Apesar de uma pequena variação entre as diferentes classificações de MMP, estas apresentam certa homologia, diferindo-se uma em relação às outras de acordo com suas especificidades com o substrato e controle transcricional (VISSE; NAGASE, 2003; HANNAS, 2007). Todas as MMPs apresentam de três a cinco domínios. O pré-domínio tem como função, manter a enzima como zimogênio inativo até que seja removido por proteólise, o domínio catalítico apresenta o Zn no sítio ativo. Existe ainda, o domínio hemopexina/vitronectina que promove a interação entre enzimas e as TIMPS, além da associação a receptores celulares e um domínio rico em cisteína. MMP 2 e MMP9 são gelatinases e neste caso apresentam o domínio da fibronectina, necessário para a ligação e quebra do colágeno (**Figura 6**) (VISSE; NAGASE,2003; HANNAS, 2007).



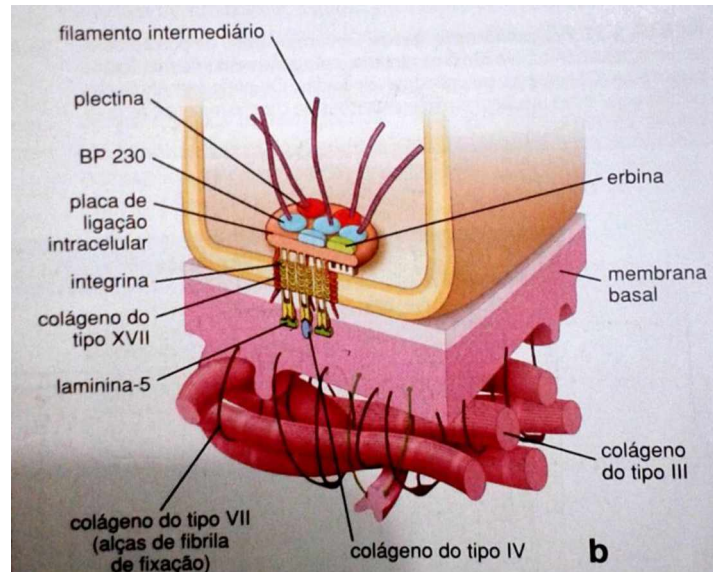
**Figura 6. Estrutura das MMP 2 e 9 (Gelatinases).** A MMP 2 e 9 possuem um pré-domínio, um pró-domínio contendo cisteína, uma região de articulação, um domínio catalítico com sítio de ligação ao zinco e o domínio de fibronectina, com forte afinidade a gelatina (NAGASE et al., 2006; HANNAS, 2007)

As MMPs 2 e 9, gelatinase A e B, respectivamente são dois membros semelhantes da família MMPs que degradam colágeno desnaturado ou gelatinas (VISSIE; NAGASE, 2003). A presença de MMP2 e MMP9 em feridas levantou evidencia de que estas gelatinases poderiam estar associadas com o processo de cicatrização (SALO et al., 1994). Durante o reparo, na fase inflamatória, que ocorre após o extravasamento de componentes do plasma, como fibrina e células de defesa é também observado altos níveis de MMP-9 (SOUZA; LINE, 2002). No processo inflamatório, o nível elevado de MMP-9 é resultado da presença destas enzimas nos grânulos de macrófagos e neutrófilos que é liberada no local da lesão (WANG et al., 2002). A atividade das MMPs pode ser controlada por outras MMPs e sua expressão é controlada por parte de moléculas endógenas, como citocinas inflamatórias ou fatores de crescimento (SOUZA; LINE, 2002).

Os fibroblastos presentes na pele são as principais células responsáveis pela síntese de MMP-2 (KOIVUKANGAS et al., 1994). Além disso, recentes trabalhos têm demonstrado que as MMPs, particularmente a MMP-2 e MMP-9, apresentam um papel fundamental durante o processo de angiogênese. Justificado porque, a invasão de células endoteliais é um evento essencial durante a formação de novos vasos e que depende da degradação da membrana basal. Desta forma, estas MMPs estão envolvidas nos casos de angiogênese fisiológica como no desenvolvimento placentário e angiogênese patológica como no desenvolvimento de tumores sólidos, além de participarem no processo de reparo tecidual (FU et al., 2005).

As MMPs desempenham também papel fundamental no processo de re-epitelização. A migração de queratinócitos durante a cicatrização de feridas depende da liberação dos hemidesmossomos de queratinócitos epidérmicos basais. Este rompimento que ocorre pela ação das MMPs na degradação dos colágenos dos tipos IV e VII, interrompem o seu contato com a membrana basal, permitindo assim a migração através da matriz da ferida (**figura 7**) (CALEY; MARTINS; O'TOOLE, 2016).





**Figura 7. Estrutura molecular do hemidesmossomo**

Fonte: Hist. Texto e Atlas , Ross, M.H e Pawlina, W. 5 ed. 2008

#### 4.5 *Maytenus ilicifolia*

*M. ilicifolia* Mart é conhecida popularmente como “espinheira-santa”, “cancerosa”, “cancorosa-de-sete-espinhos” e “maiteno” (**figura 8**) (LORENZI; MATOS, 2002; BRANDÃO et al., 2006). Pertence à família Celastraceae que é constituída por 55 gêneros e 850 espécies encontradas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (MOSSI et al., 2004). *M. ilicifolia* é encontrada principalmente na região sul do Brasil, nos estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo. É característica de interior de mata nativa e mata ciliar, onde o solo é rico em matéria orgânica e bem drenada. Encontrada também nos países vizinhos, Paraguai, Uruguai e Leste da Argentina (CORRÊA JUNIOR, MING; SCHEFFER, 1994; RADOMSKI, 1998).



**Figura 8. Espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*)**



(A) Folhas de *M. ilicifolia* com a característica espinhosa que denominou a planta como espinheira-santa e (<http://www.safarigarden.com.br/muda-de-espinheira-santa-maytenus-ilicifolia>)

(B) Folhas e frutos de *M. ilicifolia* (<https://blog.plantei.com.br/2016/06/03/os-beneficios-da-espinheira-santa/>)

*M. ilicifolia* é descrita entre as plantas medicinais aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fazendo parte de um pequeno grupo de 34 plantas isentas da necessidade de testes de eficácia e de toxicidade para o registro e comercialização como fitoterápicos (BRASIL, 2004). *M. ilicifolia* é bastante conhecida devido a suas atividades terapêuticas e o primeiro relato escrito conhecido sobre o seu uso medicinal é da década de 20 (CUNHA, 2003).

#### 4.5.1 Conhecimento popular e científico

Na medicina popular, *Maytenus ilicifolia* apresenta ação tônicas, analgésicas, anti-sépticas, cicatrizantes, diuréticas, laxativas e cicatrizante (COIMBRA, 1958). Tais atividades medicinais são utilizadas como conhecimento etnofarmacológico para a avaliação dos benefícios de *M. ilicifolia* em diversos modelos científicos, por exemplo, para atividade anti-inflamatória, antidiarréia, antiulcerogênico e cicatrizante. Na medicina popular, a forma mais utilizada, é a extração aquosa, talvez, devido à maior acessibilidade. No entanto, o que podemos observar é que diferentes tipos de extração e partes da planta podem apresentar propriedades biológicas similar. É o que acontece para o tratamento de úlcera gástrica, onde mais de um tipo de extração apresenta resultados positivos para uma determinada enfermidade (MACAUBASET et al., 1988; TABACH; OLIVEIRA, 2003; SILVA et al., 2005).

A infusão (extração aquosa) das folhas de *M. ilicifolia*, apresenta um alto efeito protetor contra úlcera gástrica induzida em ratos por indometacina, reserpina ou por estresse provocado por contenção (MACAUBASET al., 1988). O extrato seco hidroalcoólico também apresenta esta atividade na redução de úlceras estomacais e aumento do volume e pH do suco gástrico (TABACH; OLIVEIRA, 2003) assim como observado para a administração do extrato hidroalcoólico de *M. ilicifolia* experimento de indução de estresse (TABACH; OLIVEIRA, 2003). O efeito medicinal sobre a proteção gástrica também foi descrita para ensaios de administrações a partir das extrações em metanol e acetato de etila (SILVA et al., 2005).

A atividade anti-inflamatória de *M. ilicifolia* foi positiva ao analisar a redução na formação de mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas, leucotrienos, EROs e e óxido

nítrico (ROBAK; GRYLEWSKI, 1996). Em outros ensaios, conduzidos pelo método de indução de carragenina e tratados com extratos hexânicos e de acetato de etila foi possível observar a atividade anti-inflamatória e antinociceptivo através de modelo induzido por injeção de solução de formaldeído. Além disso, estes dois tipos de extração, também neste estudo, demonstraram uma redução na gravidade de lesões gástricas induzidas pelo método de estresse e contenção a frio (JORGE et al., 2004).

O extrato etanólico das folhas de *M. ilicifolia* possui ainda uma ou mais substâncias potentes com capacidade de relaxar o endotélio que parece estar associado à produção de óxido nítrico, ativação da guanilato-ciclase e abertura do canal de potássio (RATTMANN et al., 2006). Pistore e colaboradores (2015), em um estudo recente, demonstraram o efeito do uso tópico com *M. ilicifolia* em feridas em pele. Após quatorze dias de tratamento, foi possível observar um aumento de folículos pilosos em relação ao controle indicando uma reconstituição eficiente na derme cutânea.

#### 4.5.2 Fitoquímica

Diversas metodologias utilizam-se de tipos específicos de cromatografia para a extração, isolamento e purificação de extratos brutos e partições. A partir disso, catequina e epicatequina foram identificadas em extratos aquosos de folhas de *M. ilicifolia* (SANTOS; MELLO, 2004; PESSUTO, 2006). Taninos condensados foram caracterizados (XAVIER; D'ANGELO, 1996) em frações de acetona/álcool, acetato de etila e aquosa (PESSUTO, 2006). Enquanto nas folhas de *M. ilicifolia* foi também identificado uma diversidade de flavonóides (XAVIER; D'ANGELO, 1996; LEITE et al., 2001; TIBERTI et al., 2006) e glicosídeos (ZHU; SHARAPIEN; ZHANG, 1998). Entre os componentes descritos, os flavonóides, catequinas e epicatequinas, são tipos de polifenóis e possuem uma alta capacidade antioxidante.

A ação antioxidante usualmente empregada para a avaliação do reparo tecidual (CHAI-NANI-WU, 2003; JAGETIA; RAJANIKANT, 2004; KAPOOR; HOWARD; HALL, 2004; PANCHATCHARAM et al., 2006). Durante o reparo, a presença de EROs desempenham um papel fundamental na produção de VEGF, um fator pró-angiogênico (ROY et al., 2003) como também na defesa contra a invasão de patógenos (INOUE; ASAMI; INOUE, 2008). Por outro lado, o excesso da produção destes radicais são um dos fatores responsáveis pelo atraso da cicatrização de ferida, assim, deve-se ter um equilíbrio entre a produção e eliminação destes radicais pelos antioxidantes (FITZMAURICE; SIVAMANI; ISSEROFF, 2011). Desta forma são crescentes os estudos pré-clínicos que avaliam o uso de terapias à base de componentes

antioxidantes naturais como  $\beta$ -glucano (FITZMAURICE; SIVAMANI; ISSEROFF, 2011), curcumina (CHAINANI-WU, 2003; JAGETIA; RAJANIKANT, 2004; PANCHATCHARAM et al., 2006;) , galato de epigallocatequina (KAPOOR et al., 2004), proantocianidinas (KHANNA et al., 2002) própolis (GREGORY et al., 2002; MCLENNAN et al., 2008) e mel (JULL; RODGERS; WALKER, 2008; VAL; SUSANNA; STEPHEN, 2009) no reparo de feridas.

Sobre os taninos, compostos também encontrados em *M. ilicifolia*, acredita-se que suas atividades farmacológicas são devido às três características gerais que são comuns a este composto: (1) formação de complexos com íons metálicos, como ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros; 2) atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; 3) capacidade de formar complexos com outras moléculas, incluindo macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996). Na cicatrização de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos ajudam na recuperação por formar uma camada protetora sobre a mucosa ou a pele, protegendo e favorecendo a recuperação natural do tecido (SANTOS; MELLO, 2004). A presença de taninos na espécie vegetal pode explicar seu uso popular como antimicrobiano, anti-inflamatório, cicatrizante, antiulcerogênico (SANTOS; MELLO, 2004).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Animais

O experimento foi aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) com o número de protocolo 062/16 (**Anexo 1**). Após a aprovação, sessenta e quatro camundongos, machos, da linhagem Balb/C, foram obtidos do Cebea e transferidos para o Depósito de Animais da Área de Ciências Fisiológicas- UFU. Os animais passaram por um processo de adaptação até obterem um peso de aproximadamente 27 g e 9 semanas. Antes da cirurgia, os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno 30 x 19 x 12 cm, com quatro animais em cada caixa, e mantidos, em gabinetes com controle de temperatura, ciclo claro/escuro de 12 h e livre acesso a água e ração. Após o procedimento cirúrgico para realizar as feridas, os animais foram mantidos em caixas individuais com a mesma dimensão, a fim de evitar interferências externas que possam comprometer os resultados.

## 5.2 Obtenção da pomada

*M. ilicifolia* utilizada neste trabalho foi coletada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Campinas-SP (UNICAMP) com as seguintes coordenadas 22° 45' 0" S 47° 9' 0" W. Para o preparo do extrato por maceração foi utilizado 600 g de folhas secas e moídas para 4L de uma solução de álcool etílico a 70% v/v. Após seis dias de maceração, a mistura foi filtrada e o álcool evaporado em um rotaevaporador. A água residual foi removida por liofilização. O extrato foi concentrado em rotaevaporador a 40 °C e a água residual congelada e liofilizada por 72h. O produto resultante foi pulverizado em um almofariz com pistilo. A pomada contendo 2%, 4% e 6% do extrato de folhas de *M. ilicifolia* foram a pasta base de vaselina 30% /lanolina 70%.

## 5.3 Indução da ferida

Para a realização das incisões cirúrgicas, os animais foram anestesiados com 10mg/kg – xilazina e 100mg/kg – cetamina via intraperitoneal e tricotomizados na região dorsal. A assepsia do local foi realizada com álcool 70% e em seguida o punch (instrumento cirúrgico) foi utilizado para delimitar a área de 5 mm da retirada da pele até o aprofundamento da fâscia muscular em quatro locais (**figura 9**).



**Figura 9.** Indução de feridas na região dorsal com um punch de 5 mm

Após a cirurgia, os animais foram colocados em caixas individuais e em seus olhos foi administrado uma gota de solução salina 0,9 % a fim de evitar a desidratação. Os animais

foram mantidos sob fonte de luz amarela para aquecê-los até que se recuperassem do efeito anestésico.

#### 5.4 Tratamento

Antes do tratamento, foi padronizado em um ensaio piloto a quantidade de 100 mg de pomada para cobrir toda a área da ferida. Esta quantidade foi pesada e padronizada quanto ao equivalente em mL de uma seringa para facilitar a aplicação sob a ferida. Após cerca de 30 minutos-1 hora da à cirurgia, o tratamento foi iniciado com uma aplicação diária no mesmo horário que o tratamento foi iniciado (**Figura 10**).



**Figura 10.** Tratamento com veículo (lanolina 30%/ vaselina70%)

Nos animais dos grupos controle, foi aplicado o tratamento apenas com o veículo (vaselina 30%/ lanolina 70%). Os demais grupos foram tratados com uma pomada contendo as concentrações de 2%,4% e 6% do extrato de folhas de *M. ilicifolia*. O processo de cicatrização foi avaliado em dois tempos, 3 e 7 dias, após tratamento diário. Cada tratamento apresentou dois grupos, ou seja, 8 animais tratados e eutanasiados com 3 dias e um outro grupo com 8 animais, tratados e sacrificados após 7 dias da indução da ferida. Sendo assim, os grupos foram organizados da seguinte forma:

**Grupo Controle** (animais com lesões cirúrgica e tratados com solução veículo da pomada (vaselina/lanolina).

- Grupo tratado por 3 dias (n:8)
- Grupo tratado por 7 dias (n:8)

**Grupo Extrato 2%** (animais com lesões cirúrgica e tratados com a pomada contendo 2% do extrato de *M. ilicifolia*:

- Grupo tratado por 3 dias (n:8)
- Grupo tratado por 7 dias (n:8)

**Grupo Extrato 4%** (animais com lesões cirúrgica e tratados com a pomada contendo 4% do extrato de *M. ilicifolia*.

- Grupo tratado por 3 dias (n:8)
- Grupo tratado por 7 dias (n:8)

**Grupo Extrato 6%** (animais com lesões cirúrgica e tratados com a pomada contendo 6% do extrato de *M. ilicifolia*.

- Grupo tratado por 3 dias (n:8)
- Grupo tratado por 7 dias (n:8)

Uma das feridas foi direcionada ao processamento histológico e uma para a atividade de NAG (atividade de macrófagos). Outras duas feridas restantes foram divididas ao meio, obtendo-se então 4 metades de uma ferida, as quais foram direcionadas para as demais avaliações, dosagem de hemoglobina, colágeno solúvel, atividade de MPO (atividade de neutrófilos e zimografia).

### 5.5 Fechamento da ferida e coleta das amostras

O acompanhamento do fechamento da ferida foi realizado em 0, 3, 5 e 7 dias com o auxílio de um paquímetro digital (**figura 11**).



**Figura 11.** Medida dos diâmetros com paquímetro digital

A medida da área foi realizada após a mensurar os diâmetros maiores e menores da ferida. A área foi calculada da seguinte fórmula:

$$(\text{diâmetro menor}/2) * (\text{diâmetro maior}/2) * \text{valor de PI: } 3,14$$

Após a obtenção do valor da área nos dias 0,3,5 e 7, a porcentagem de fechamento foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Fechamento da ferida em \%} = ((\text{área da ferida no dia atual} - \text{área da ferida no dia zero}) / \text{área da ferida no dia zero}) * 100$$

Após o tratamento, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com Tiopental (100 mg/ Kg). A pele da região da ferida foi coletada ao final do tratamento com o auxílio de um punch de 5 mm. Uma das feridas de cada animal foi imediatamente fixada em solução Metacarn, seguidos do processamento histológico. Enquanto as outras três feridas destinadas a bioquímica foram identificadas e alocado em Ultrafreezer a -80 até o momento das análises.

## 5.6 Avaliação morfológica

Após a fixação em Metacarn, as amostras foram incluídas em parafina conforme protocolo utilizado no setor de histologia da UFU. Foram obtidos cortes longitudinais com 5µm de espessura, em micrótomo rotativo (MICROM/HM-315). Para visualização geral do tecido os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (H.E.). A quantificação de mastócitos e de colágeno total e I III foi realizado em lâminas coradas com Azul de Toluidina (AT) 0,25 %



em tampão MacIlvaine pH 4,0, Picrossirius Red e Tricômico de Gomori (T.G). Para todas as avaliações, exceto para a quantificação de colágeno em polarização (colágeno dos tipos I e III), foram obtidos imagens de 10 áreas aleatórias no microscópio do tipo Leica Microsystems Inc. (Wetzlar, Alemanha) com a objetiva de 40x em câmera acoplada. A diferenciação e quantificação de colágeno do tipo I e III foram realizadas em 10 áreas aleatórias utilizando-se uma objetiva de 20x, capturadas na câmera Nikon eclipse Ti, câmera opticom com filtro de polarização. Todas as imagens e quantificações foram mensuradas através do programa Image J e as médias dos 10 campos avaliados, foram utilizadas para a estatística.

### **5.7 Conteúdo de hemoglobina**

O método de Drabkin foi utilizado para a dosagem de hemoglobina em amostras de ferida. Para esta avaliação foi utilizado uma amostra correspondente a metade de uma ferida, que foi inicialmente pesada e em seguida, homogeneizada com o auxílio do Ultra-turrax em 2,0mL de um reagente cromogênico específico para hemoglobina (reagente de Drabkin-kit de Dosagem de Hemoglobina Labtest), por 10 segundos em tubos de ensaio. Após a homogeneização, 500µL das amostras foram centrifugadas por 40 minutos, a 10.000g a 4°C e filtrados em filtros de 0,22 µm (Millipore). Uma alíquota de 200µL de cada amostra foi adicionada em placa de 96 poços, em duplicata, para leitura em espectrofotométrica com comprimento de onda de 540nm (E max, Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA). A concentração de hemoglobina de cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão conhecida (Labtest) e os resultados expressos em concentração de hemoglobina (microgramas) por miligrama de peso da ferida.

### **5.8 Atividade da mieloperoxidase (MPO)**

Uma das características importantes no processo inflamatório é a presença de células, como neutrófilos e macrófagos. O acúmulo de neutrófilos pode ser detectado utilizando-se a enzima mieloperoxidase (MPO) como um marcador quantitativo da atividade deste tipo celular. A análise da atividade da MPO foi realizada através da técnica de Bradley (BRADLEY; PRIEBAT; CHRISTENSEN, 1982). Uma das feridas, foi pesada e homogeneizada em 2,0mL de tampão fosfato de sódio, 80 mM em pH=6 por 15 segundos. Em seguida, foram transferidos 300µL da amostra para eppendorf e acrescentados 600µL de HTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio – Sigma) 0,75% p/v diluído em tampão fosfato pH 6. As amostras foram



sonicadas por 10 segundos e, logo após, centrifugadas a 5000 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (200µL) foi utilizado no ensaio enzimático. A reação seguiu a seguinte ordem: 100µL de peróxido de hidrogênio 0,003%; 100µL de TMB (3,3'', 5,5''- tetrametilbenzidine - Sigma) a 6,4 mM diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Merck) colocados ao mesmo tempo, por 1 minuto cronometrado. Para interromper a reação, foram adicionados 100µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico – Merck) a 4M. Em seguida, adicionou-se 200µL à placa de 96 poços e a leitura espectrofotométrica foi feita em comprimento de onda de 450nm (E max, Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA). Os resultados foram expressos em índice de MPO (Absorbância em D.O./g de peso úmido da ferida).

### **5.9 Atividade da N- Acetil- β- D- Glicosaminidase (NAG)**

A N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. Esta técnica baseia-se na hidrólise do p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina (substrato) pelo N-acetil-β-D-glicosaminidase, liberando p-nitrofenol. A enzima NAG foi utilizada como um índice da atividade destas células no sítio inflamatório, pela técnica de Bailey, (1988). A amostra correspondente a metade de uma ferida, foi homogeneizada por 40 segundos em 2,0mL de solução salina 0,9% com Triton X-100 (Promega) a 0,1% (gelado). Posteriormente, o homogenato foi centrifugado em 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e adicionado 150 µL deste em 150 µL de tampão citrato/fosfato. Para o ensaio, foi adicionados 100µL/poço, das amostras diluídas (em duplicata) à placa de ELISA de 96 poços. Em seguida, adicionados 100µL do substrato (p-nitrofenil-n-acetil-β-D-glicosaminidase-Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato, pH 4,5, incubadas a 37°C durante 30 minutos. Foram adicionados 100µL de tampão glicina 0,2M, pH 10,6 nas amostras e na curva. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de Elisa, em comprimento de onda de 400nm(E max, Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA). A atividade de NAG na amostra da amostra foi calculada a partir de uma curva padrão de p-nitrofenol avaliada paralelamente. Os resultados das leituras foram expressos em nmol.mL-1/mg de peso úmido do implante.

### **5.10 Dosagem de colágeno solúvel**

A quantidade de colágeno solúvel total nas amostras foi avaliada por um ensaio colorimétrico, pela reação do Picrosirius Red (P.R). Metade de uma ferida foi homogeneizada com

tampão (salina 0.1% Triton X-100) (30 segundos) e posteriormente centrifugadas a 6000g, por 10 minutos, a 4°C. Foram utilizados, 50µL do sobrenadante e 50µL do reagente P.R. As amostras foram incubadas com P.R. por 30 minutos em temperatura ambiente (25°C). O complexo colágeno-picrosirius red foi separado por centrifugação a 10,000g, durante 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, retirando o máximo de líquido possível, vertendo-se o tubo sobre papel absorvente. O sedimento foi lavado com 500 µL de puro (PA) e livre de metanol, delicadamente na parede do tubo para não remover o pellet, e então, todo etanol foi removido, vertendo-se com cuidado em papel absorvente. Foi adicionado ao sedimento, em 1mL de reagente alcalino (NaOH 0,5 M). A absorbância foi quantificada a 540 nm em um leitor de microplacas (E max, Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA) onde foram transferidos 200 µL das amostras, em duplicata. A quantidade de colágeno em cada amostra foi determinada através da comparação de uma curva padrão utilizando-se padrão de colágeno (Merk) e os resultados expressos em µg de colágeno por mg de peso da ferida.

### **5.11 Dosagem de proteínas totais**

As amostras correspondentes a metade de uma ferida foram lavadas 3-4 vezes em salina, homogeneizadas em 500 uL do tampão de zimografia com Ultra-turrax, incubadas por 24 horas a -4° C. Para a extração 1 L de tampão para zimografia foi preparado com os seguintes reagentes: 1,6 g de ácido cacodílico; 8,755 g de NaCl, 100 uL de sestoque de ZnCl<sub>2</sub>; 2,218 g de CaCl<sub>2</sub> e 100 uL de solução estoque de Triton 100X. Para a solução estoque de ZnCl<sub>2</sub> foram diluídos 1,36 g de ZnCl<sub>2</sub> em 1 litro de água e para solução estoque de Triton 100X, 2 mL de Triton 100X foram homogeneizados em 100 mL de água. Após a homogeneização e extração por 24 horas, as amostras foram centrifugadas em 13.000 rpm durante 10 minutos, a -4° C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976). A solução de Bradford foi previamente preparada a partir de 100mg de azul de coomassie G-250 em 50 mL de álcool etílico 100% e 100 mL de ácido fosfórico. Após a diluição o volume foi completado para 1000mL com água destilada. A Albumina de Soro Bovino (BSA) foi utilizada na curva padrão com as seguintes concentrações (0; 0,1; 0,25; 0,35; 0,5; 0,7; 1; 1,4). Cinco microlitros (5 µL) da amostra ou BSA (para a curva) foi aplicada na microplaca de 96 poços e em seguida adicionado 250 uL de reagente de Bradford. A leitura foi realizada com a absorbância de 595 nm (E max, Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA).

## 5.12 Zimografia

Para a avaliação da atividade das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), as amostras foram previamente homogeneizadas 500 µL de tampão de zimografia. O gel de separação contendo 8% de acrilamida e 0,4% de gelatina foi preparado com os seguintes componentes, água destilada, gelatina 0,4%, 1,5 M Tris HCl pH 8,8, acrilamida/bis acrilamida, SDS 10%, APS 10% e TEMED. Após a completar a polimerização, o gel de empilhamento foi preparado com água destilada, 1,5M Tris HCl pH 6,8, acrilamida/bis acrilamida, SDS 10%, APS 10% e TEMED. Após a dosagem de proteínas pelo método de Bradford, 40 µg de proteínas foram aplicadas no gel com o tampão de amostra. Finalizando a eletroforese, o gel foi lavado com tampão triton X100 25% e incubadas overnight a 37 °C com o tampão de incubação com inibidor de protease (2 uL de inibidor/ 50 mL de tampão). O gel foi corado com Comassie Blue por 2 horas e descorado com solução descorante (metanol/água/ácido acético). Para esta avaliação, foi utilizado um total de 3 animais por grupo em duplicata. O gel foi escaneado e a atividade das MMPs 2 e 9 avaliadas por densitometria de bandas.

## 5.13 Análise estatística

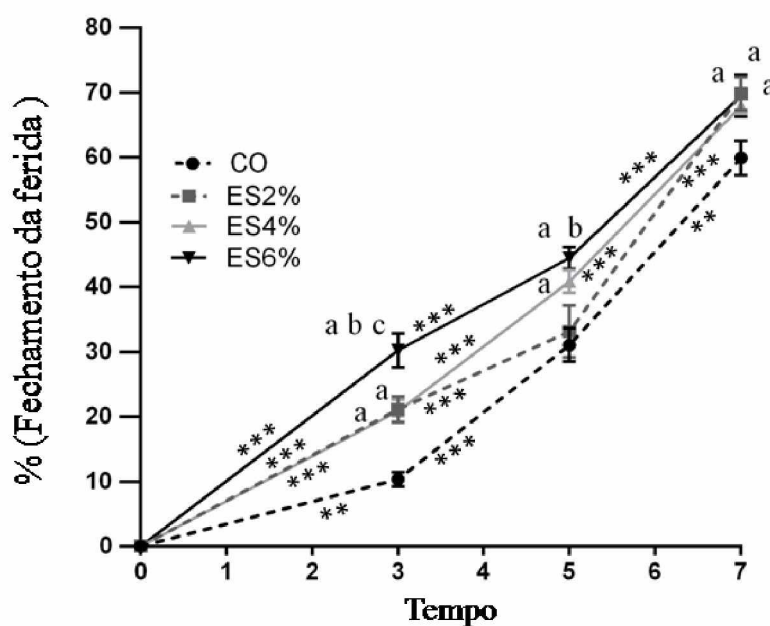
Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão, seguido pelo teste estatístico ANOVA, two-way e pós-teste Bonferroni para múltiplas comparações. A diferença significativa foi considerando com um  $p \leq 0,05$ . A avaliação estatística e os gráficos foram realizados no programa Prism 5.

# 6. RESULTADOS

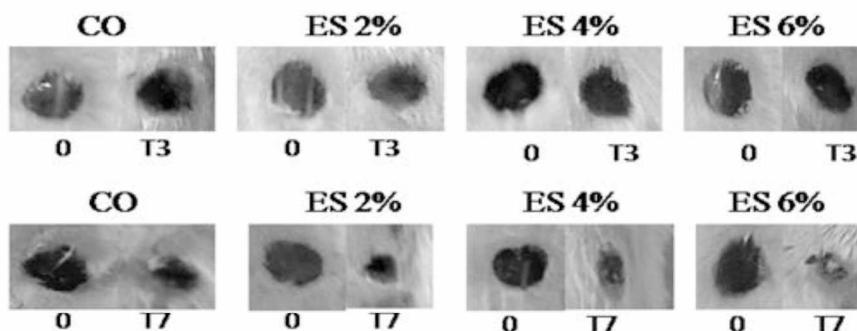
## 6.1 Fechamento da Ferida

As áreas em % sobre o fechamento das feridas, nos dias 3, 5 e 7 foram obtidas com o auxílio de um paquímetro digital e os resultados estão apresentados nas **figuras 12 e 13**. O perfil histológico das feridas em lâminas coradas com H.E é apresentado na **figura 14**. Em todos os tempos, o tratamento com *M. ilicifolia*, em diferentes concentrações, apresentou melhor fechamento das lesões exceto para ES 2% com 5 dias de tratamento, quando comparada ao controle (CO). A pomada foi mais eficaz após 3 dias, justificado por maior diferença estatística neste período entre os tratamentos ES 2% (\*\*), ES 4% (\*\*\*) e ES 6% (\*\*\*) e o controle

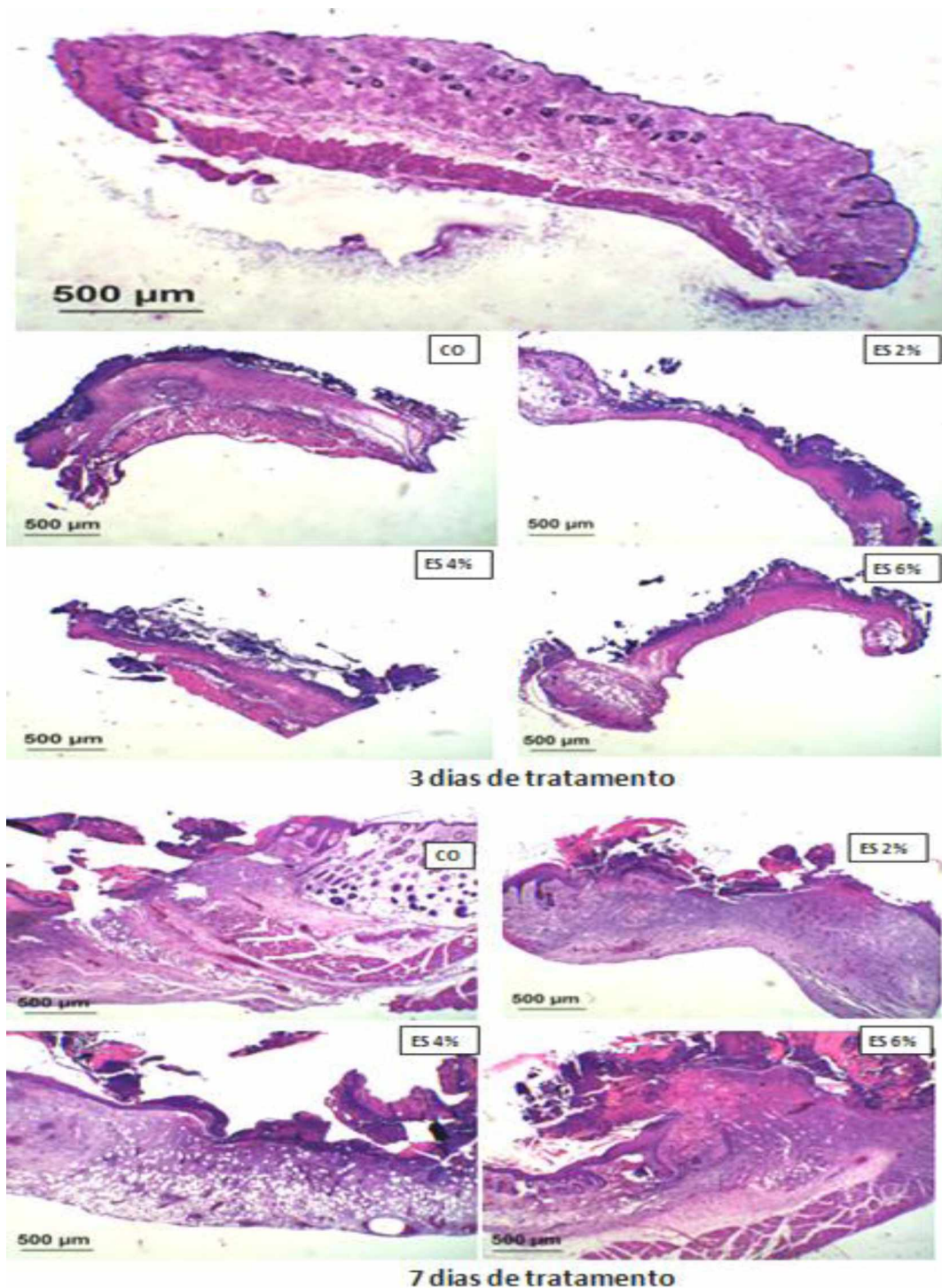
(CO). Os grupos ES 4% (\*) e ES 6% (\*\*) permaneceram com maior porcentagem de fechamento no quinto dia de tratamento (**figura 12**). Assim como no sétimo dia, em que todas as concentrações, ES 2% (\*), ES 4% (\*) e ES 6% (\*) foram melhores em relação ao grupo controle (CO). (**figura 12**). O grupo ES 6% demonstrou maior diferença significativa que os grupos ES 2% e ES 4% no dia 3 e ES 4% (\*) com 7 dias de tratamento. O fechamento das feridas entre o momento da incisão até o terceiro dia e no período final, entre os dias 5 e 7 foi acelerado no grupo tratados (\*\*\*) em relação ao controle (\*\*) (**figura 12**).



**Figura 12.** Gráfico do fechamento de feridas nos dias 0, 3, 5 e 7 dias de tratamento. (a) representa diferença estatística quando comparado ao grupo controle (CO) e (b) e (c) quando comparado respectivamente com os grupos ES 2% e ES 4%. O extrato etanólico das folhas de *M. ilicifolia* mostrou-se eficaz no processo de reparo para todos os tempos e dosagens avaliados, com exceção do tratamento ES 2% após 5 dias de lesão, considerando  $p \leq 0,05$ . Os (\*) representam melhor fechamento das feridas em cada grupo separadamente (CO, ES 2%, ES 4% ou ES 6%) ao longo dos tempos (0, 3, 5 e 7 dias)



**Figura 13. Fechamento de feridas em animais dos grupos CO, ES 2%, ES 4% e ES 6%.** A imagem representa o fechamento das feridas logo após a lesão (0) e após 3 dias (T3) e 7 dias (T7) de tratamento para grupos CO, ES 2%, ES 4% e ES 6%. O fechamento após 5 dias (T5) não foi fotografado devido a dificuldade na imobilização do animal sem a utilização de anestésico



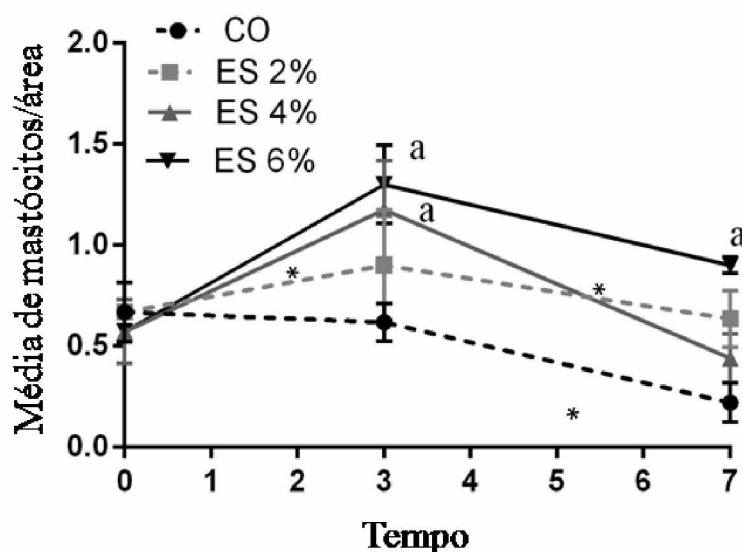
**Figura 14. Fotomicrografias coradas com Hematoxilina e Eosina de feridas.** A primeira imagem (objetiva de 10 x) demonstra a morfologia da pele saudável de camundongos BALB/C. Subjacente a

esta imagem, é demonstrada a histologia da pele ferida (objetiva de 40x) com 3 e 7 dias de tratamento no grupo controle (CO) e tratamentos (ES 2%, ES 4% e ES 6%)

Nas lâminas coradas com H.E foram observadas alterações morfológicas características do reparo em 3 e 7 dias de tratamento da lesão (**figura 14**). Com 3 dias de tratamento, houve deposição inicial de colágeno, cujo tecido de granulação apresentou-se ainda desorganizado. O tecido de granulação é bastante evidente, onde é possível observar no grupo ES 6% com 7 dias de tratamento, uma grande “massa” de células e elementos da matriz. No grupo controle, bem como nos grupos tratados, 7 dias não foram suficientes para recompor totalmente as camadas da derme. Nota-se que ainda é possível observar uma descontinuidade (local lesionado) da camada de células epiteliais.

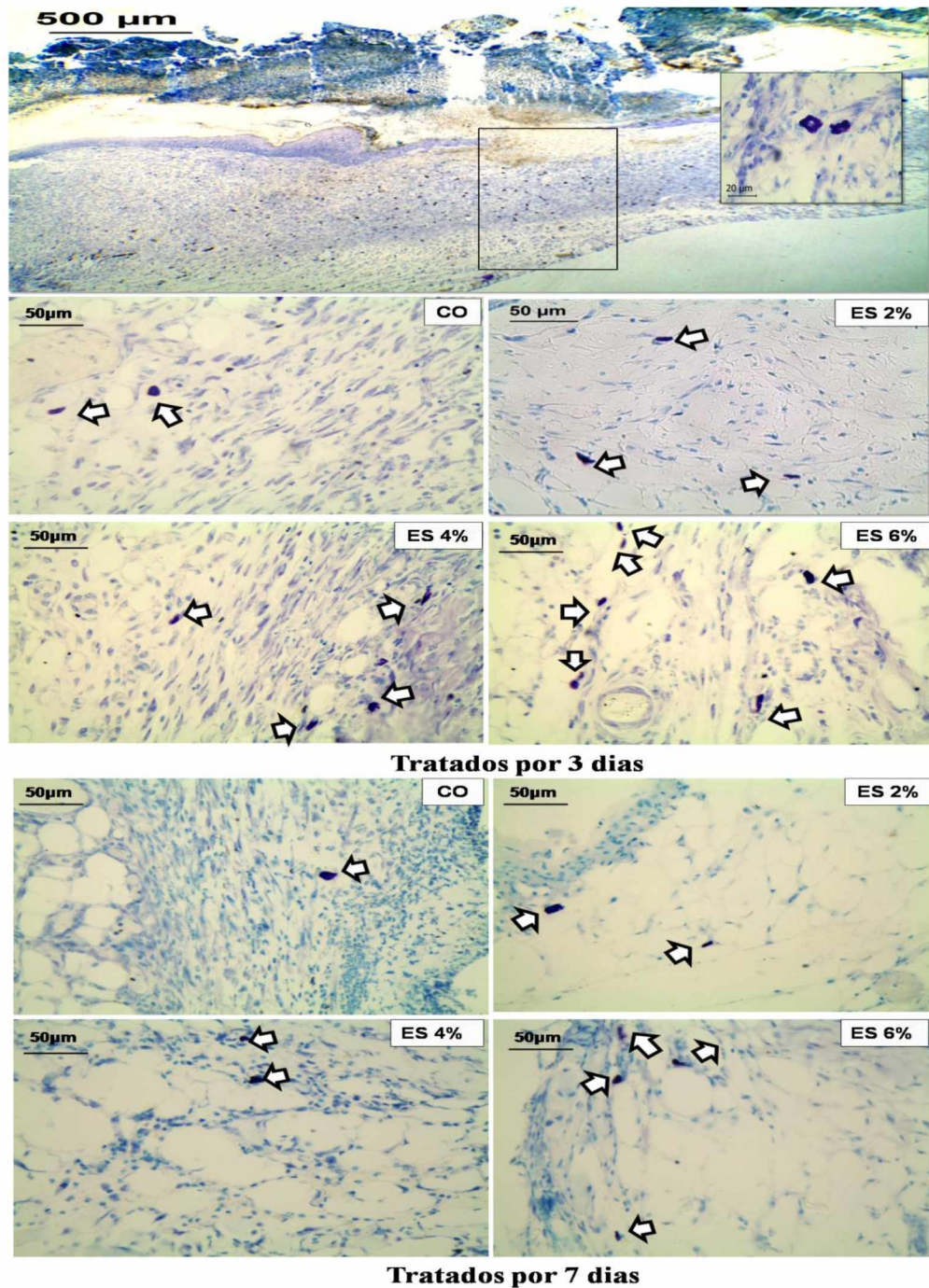
## 6.2 Quantificação de mastócitos

A quantificação de mastócitos foi realizada em lâminas coradas com A.T. A média de mastócitos por campo referente a cada tempo e tratamento é apresentada nas **figuras 15 e 16**. Com 3 dias de tratamento, foi observado um aumento de mastócitos nos grupos de animais tratados com a pomada na concentração de 6% (\*\*) e 4% (\*) de *M. ilicifolia* quando comparado ao grupo controle (CO). Com 7 dias de tratamento, o aumento foi observado apenas no grupo ES 6% (\*\*). O grupo ES 6% apresentou aumento do número de mastócitos (\*) em relação à pele saudável (ponto inicial do gráfico). Por outro lado, a redução no número de mastócitos entre 3 e 7 dias foi observado no grupo ES 2% (\*).





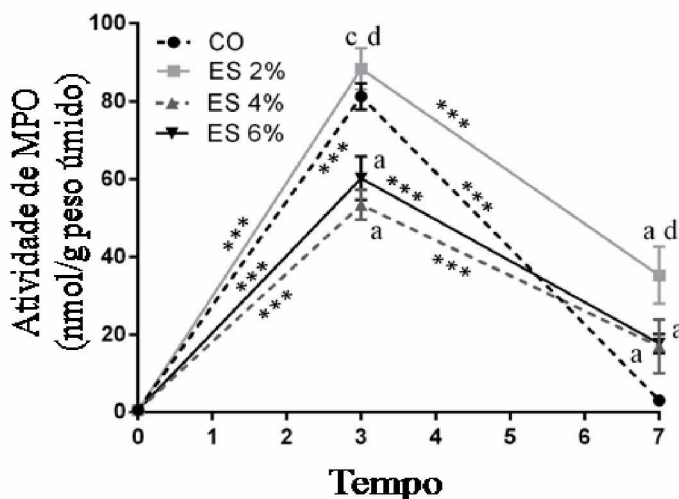
**Figura 15. Quantificação de mastócitos em lâminas coradas com Azul de Toluidina.** O gráfico representa o número de mastócitos nos tempos 0,3 e 7 dias de tratamento da ferida. (a) refere-se ao aumento do número de mastócitos quando comparado ao grupo controle (CO), considerando  $p \leq 0,05$ . Os asteriscos (\*) entre o tempos zero e 3 dias, apresentam diferença estatística entre a pele saudável e tratamento. Enquanto (\*) entre 3 e 7 dias representa uma diferença encontrada no mesmo tratamento (ES 4% ou controle) neste intervalo de tempo



**Figura 16. Fotomicrografias de pele coradas com Azul de Toluidina de feridas.** A primeira imagem (maior) representa a histologia de uma pele saudável. A área delimitada representa o local (tecido conjuntivo) onde os mastócitos foram quantificados em lâminas dos grupos controle (CO) e tratados (ES 2%, ES 4% e ES 6%) após 3 e 7 dias

### 6.3 Atividade de neutrófilos

A atividade de neutrófilos foi avaliada através da ação enzimática de MPO, dos quais o resultado é apresentado na **figura 17**. Com 3 dias de tratamento, os grupos ES 4% (\*\*) e ES 6% (\*) apresentaram uma redução sobre a atividade de MPO em relação ao controle (CO). Enquanto o grupo ES 2% apresentou um aumento na atividade de MPO em relação aos tratamentos ES 4% (\*\*) e ES 6% (\*\*). No sétimo dia de tratamento, a atividade de MPO manteve-se aumentada no grupo ES 2%, com atividade superior ao encontrado para o grupo controle (CO) (\*\*\*) e ES 6% (\*). Os grupos ES 4% (\*) e ES 6% (\*\*\*\*) também apresentaram maior atividade de MPO quando comparado ao grupo controle (CO) com 7 dias de tratamento. Após a incisão cutânea, todos os grupos apresentaram aumento da atividade da MPO quando comparado à pele saudável (ponto inicial). Em seguida, estes valores foram reduzidos entre 3 e 7 dias de tratamento (**figura 17**).

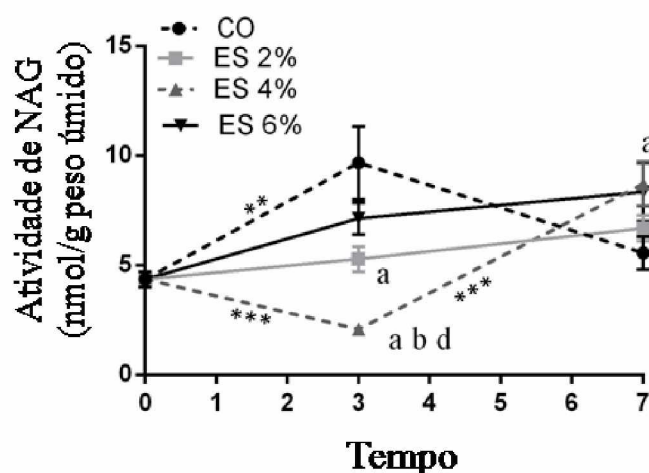


**Figura 17. Atividade de MPO.** (a) representa diferença estatística quando comparado ao grupo controle (CO) e (c) e (d) quando comparado respectivamente com os grupos ES 4% e ES 6%, considerando o valor de  $p \leq 0,05$ . Os (\*) indicam que houve um aumento (pico), sobre a atividade de neutrófilos em todos os grupos após 3 dias quando comparado a pele saudável (ponto inicial). O aumento da atividade de neutrófilos foi reduzidos posteriormente, entre o dias 3 e 7 (\*)



## 6.4 Atividade de macrófagos

A atividade de macrófagos no local lesionado foi inferida através do ensaio bioquímico sobre a atividade da enzima NAG. Com 3 dias de tratamento, a atividade de NAG nos grupos ES 2% (\*) e ES 4% (\*\*\*) foram inferiores a atividade no grupo controle (CO). O Grupo ES 4% apresentou também redução da atividade de NAG em relação aos tratamentos ES 2% (\*\*\*) e ES 6% (\*\*\*) (**figura 18**). Em amostras de ferida com 7 dias de tratamento, a atividade de NAG esteve aumentada no grupo ES 2% (\*) em relação ao grupo controle (CO). Após 3 dias de tratamento, a atividade de NAG foi menor no grupo ES 4% (\*\*\*) em relação a pele saudável com aumento entre os dias 3 e 7 dias (\*\*\*)).

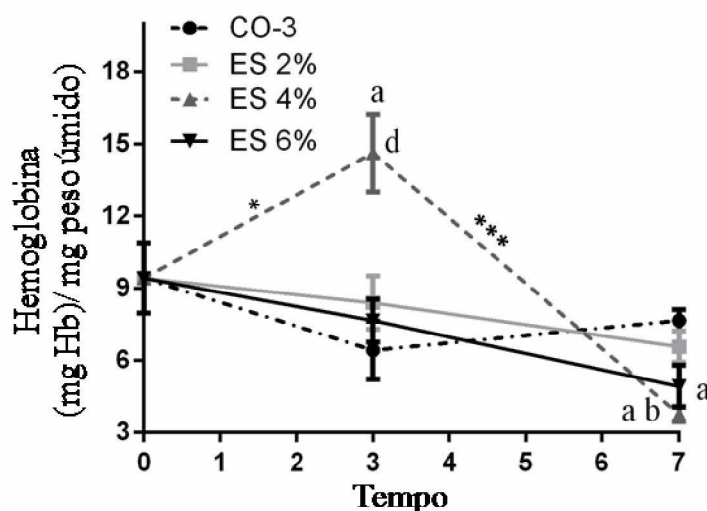


**Figura 18. Atividade de NAG.** (a) indica diferença significativa

quando comparado ao grupo controle (CO) e (b) e (d) quando comparado respectivamente com ES 2% e ES 6%, considerando  $p \leq 0,05$ . Os (\*) entre o ponto inicial e 3 dias indicam diferença significativa entre o grupo e a pele saudável, enquanto o (\*) após o terceiro dia, representa uma diferença sobre a atividade de macrófagos entre os períodos de tratamento, 3 e 7 dias.

## 6.5 Dosagem de hemoglobina

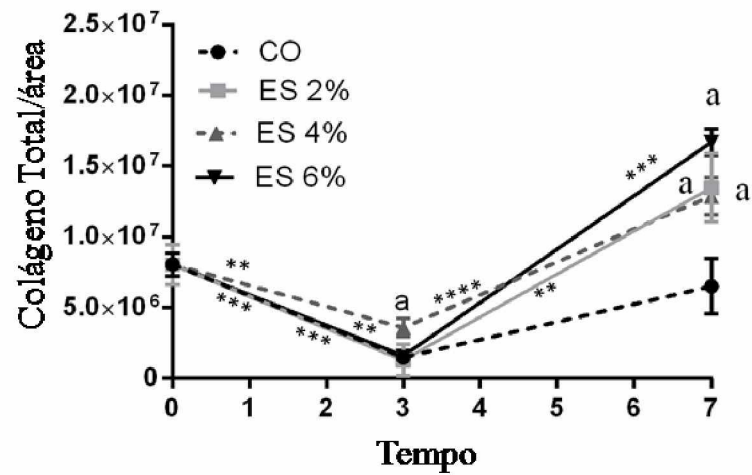
O processo de angiogênese foi avaliado a partir da dosagem de hemoglobina e está apresentado na **figura 19**. Houve um aumento na dosagem de hemoglobina no grupo ES 4%, em relação aos grupos controle (\*\*\*\*) e ES 6% (\*) no terceiro dia de tratamento, em seguida, o conteúdo de hemoglobina foi reduzido (**figura 19**).



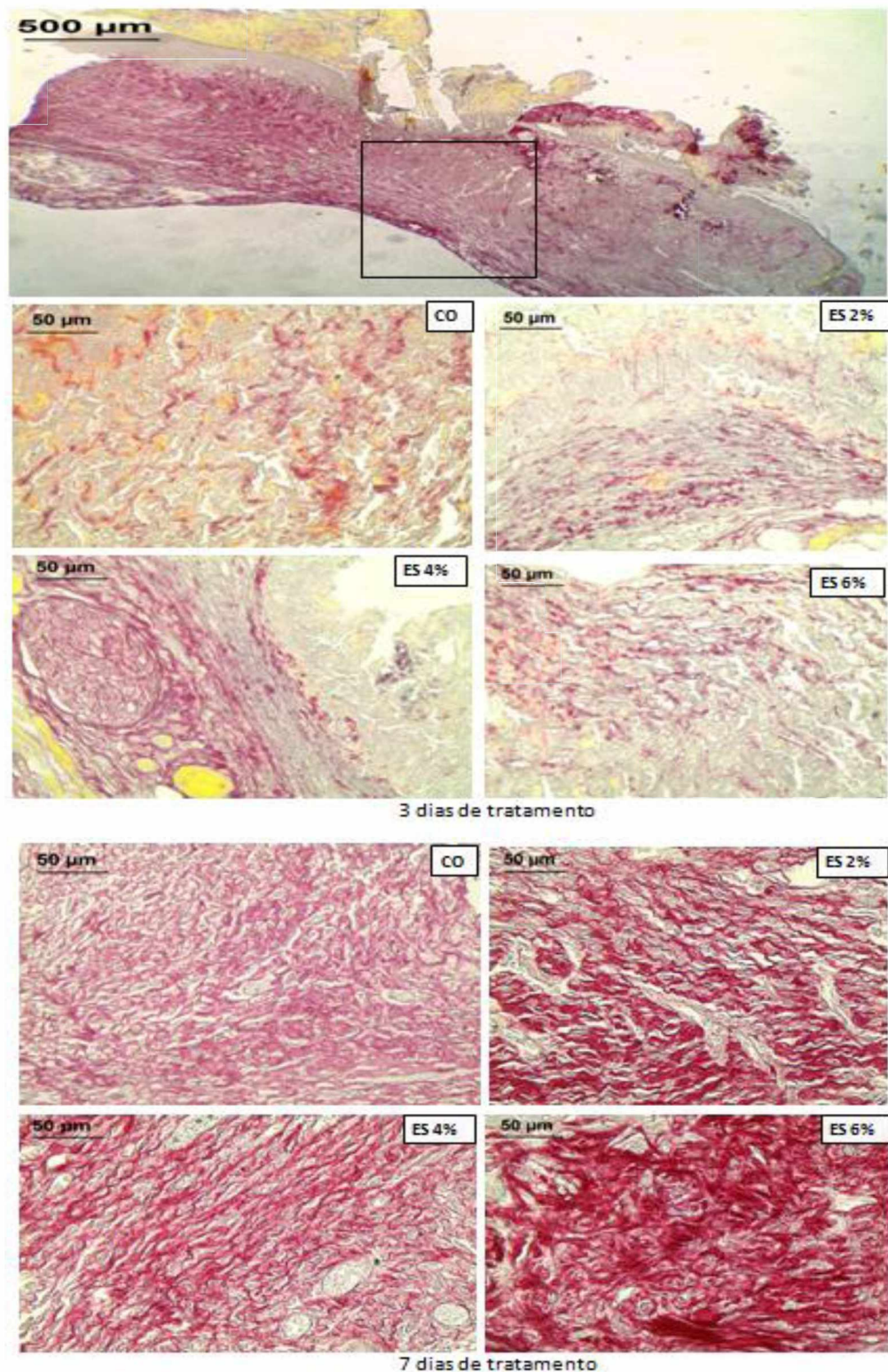
**Figura 19. (A) Dosagem de hemoglobina .** (a) referente à diferença significativa quando comparado ao grupo controle (CO), (b) diferença quando comparado ao grupo ES2% e (d) quando comparado a ES 6%, considerando  $p \leq 0,05$ . O (\*) entre o ponto inicial e 3 dias representa diferença estatística entre a pele saudável e o grupo ES 2% no terceiro dia de tratamento, enquanto o (\*) entre 3 e 7 dias, indica uma diferença na dosagem de hemoglobina entre este período

## 6.6 Deposição de colágeno total

A avaliação sobre a densidade de colágeno depositado sobre a matriz extracelular foi avaliada a partir de lâminas coradas com Picrosirius Red (**figura 20 e 21**). As fibras de colágeno foram quantificadas com o Software Image J e os resultados obtidos estão apresentados nas **figuras 20 e 21**. No terceiro dia, o grupo ES 4% apresentou uma deposição inicial de colágeno aumentada (\*) quando comparado a densidade de colágeno/área ocupado no grupo controle. A pele saudável (ponto inicial) apresentou uma maior proporção de colágeno quando comparado ao terceiro dia após a indução da ferida. Isso porque, após o dano tecidual, uma grande quantidade de colágeno é clivado e removido. Forma-se então um leito de sustentação na ferida para a migração de fibroblastos e retomada na deposição de colágeno que ocorre de forma gradativa. Após 7 dias de tratamento, todos os grupos, exceto o grupo controle intensificou a produção de colágeno (**figura 20 e 21**).



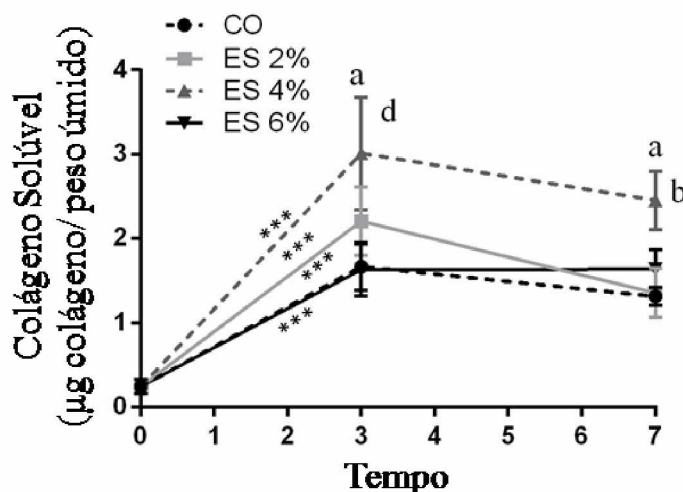
**Figura 20.** Quantificação de colágeno total por densidade de área ( $\mu\text{m}$ ) em lâminas coradas com Picosirius Red. (a) indica diferença estatística quando comparado ao grupo controle (CO), considerando  $p \leq 0,05$ . (\*) antes do dia 3 representa diferença estatística entre a pele saudável (ponto inicial) e terceiro dia após a ferida. (\*) após o terceiro dia indica diferença estatística sobre a síntese de colágeno entre 3 e 7 dias de tratamento.



**Figura 21. Fotomicrografias em coloração de Picrosirius Red demonstrando a deposição de Colágeno total em ferida** A primeira imagem (maior) representa um corte histológico de uma amostra de pele saudável. O local delimitado representa a localização onde foi adquirida a captura das imagens e quantificação de colágeno.

## 6.7 Colágeno Solúvel

A dosagem de colágeno solúvel foi realizada com o método de Picrosirius Red e o resultado é representado na **figura 22**. A partir dos dados apresentados para colágeno solúvel, é possível observar que todos os grupos com 3 dias de tratamento de feridas, apresentaram uma maior proporção de colágeno solúvel em relação a pele saudável (ponto inicial). No terceiro dia de tratamento, o grupo ES 4% apresentou maiores valores para colágeno solúvel em relação ao grupo controle (\*) e ES 6% (\*). Após 7 dias de tratamento, o grupo ES 4% manteve o nível de colágeno solúvel aumentado, maiores que os valores encontrados neste período para o grupo controle (\*) e ES 2% (\*). Entre os dias 3 e 7 de tratamento, não houve um aumento considerável de colágeno solúvel em nenhum dos grupos avaliados.



**Figura 22. Dosagem de colágeno solúvel** (a) representa aumento na dosagem de colágeno solúvel quando comparado ao grupo controle, e (b) e (c) quando comparado respectivamente com os grupos ES 2% e ES 6%, considerando  $p \leq 0,05$ . (\*) representam diferença estatística na dosagem de colágeno solúvel entre os tratamentos e a pele saudável (ponto inicial)

## 6.8 Colágeno I e III

As lâminas coradas com Picrosirius Red e utilizadas para a quantificação de colágeno total, foram também avaliadas quanto à proporção de colágeno do tipo I e III em microscópio com filtro de polarização. Os resultados para a diferenciação destes tipos de colágeno estão demonstrados nas **figuras 23A, 23 B e 24**.



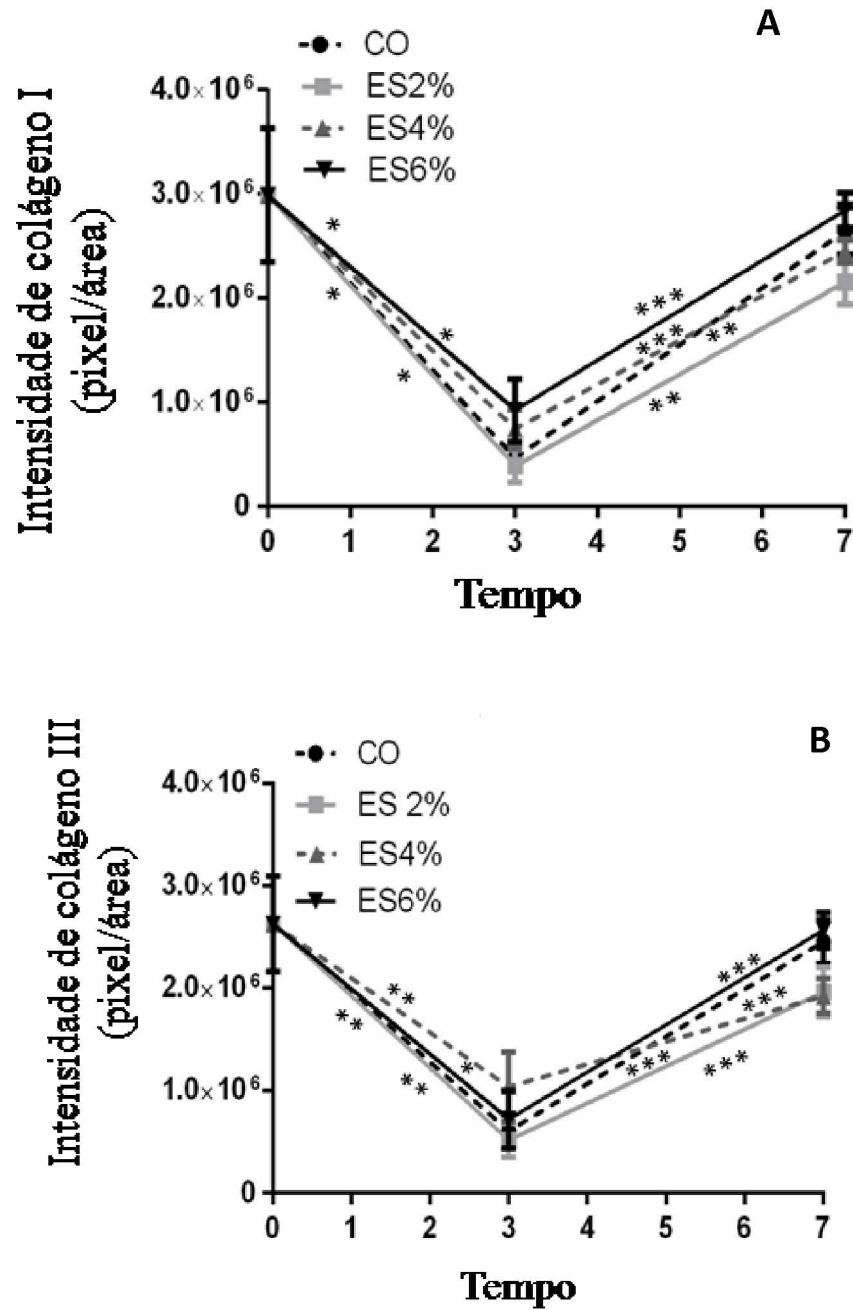


Figura 23 . (A) quantificação de colágeno do tipo I em feridas. (B), quantificação do colágeno do tipo III e feridas. Não houve diferença significativa entre o controle e os grupos tratados em nenhum dos tempos avaliados, 3 e 7 dias

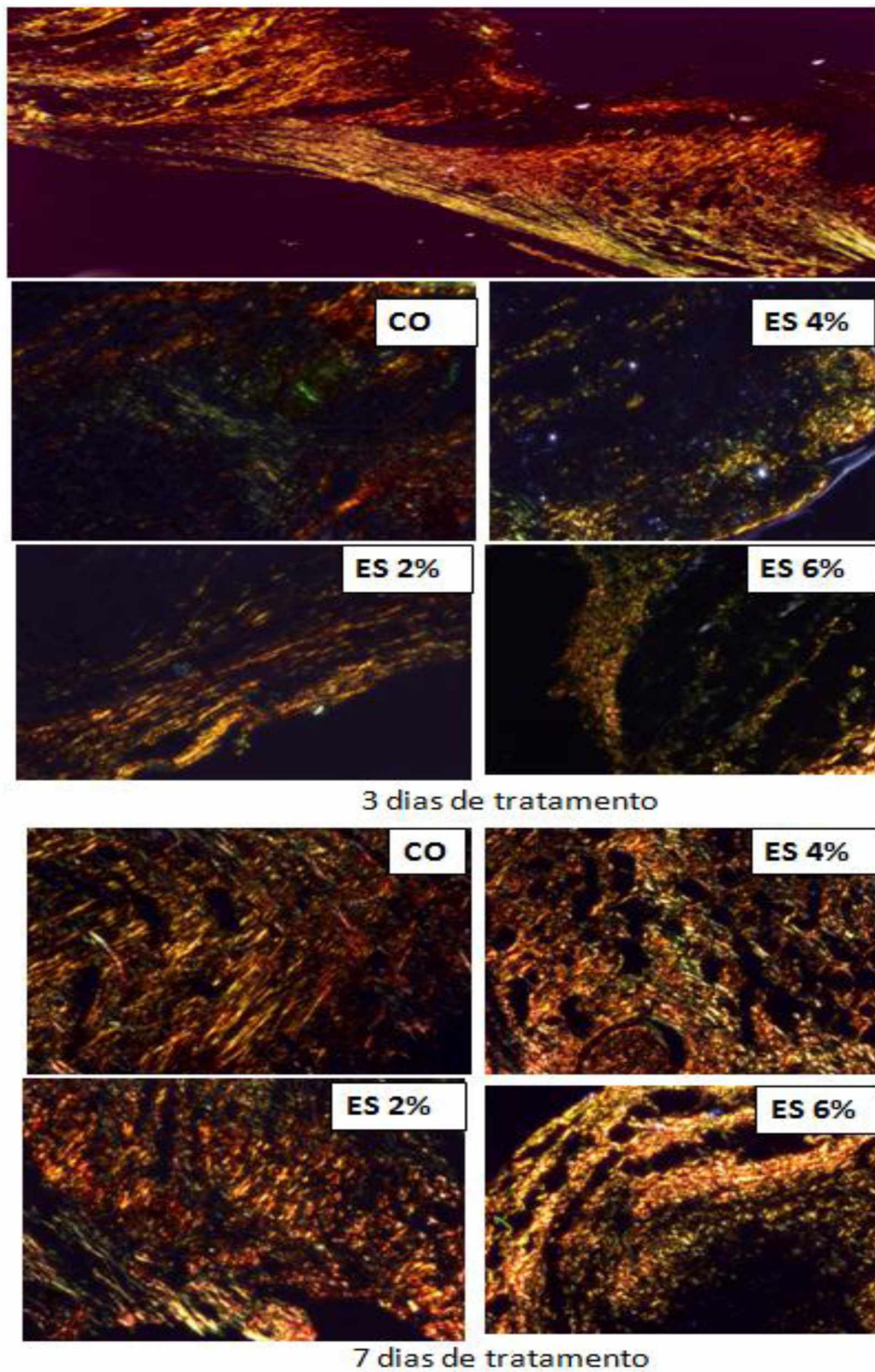
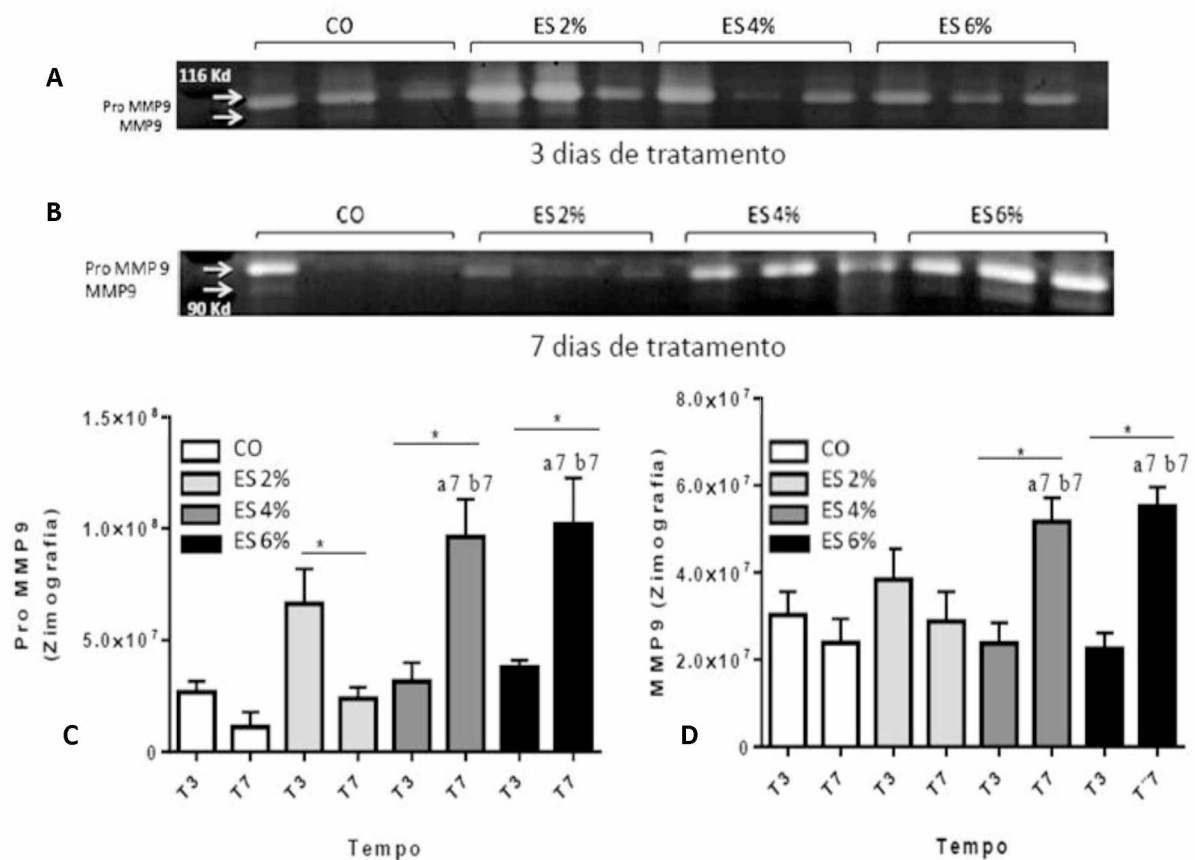


Figura 24. Fotomicrografias de pele obtidas com a objetiva de 20 x em filtro de polarização em coloração de Picrosirius Red. A primeira imagem demonstra uma fotomicrografia de ferida com 7 dias de tratamento sobre a objetiva de 10x. É demonstrado o colágeno dos tipos I (vermelho) e III (verde) e sua sobreposição (amarelo)

## 6.9 Pro MMP9 e MMP9

Com 7 dias de tratamento, foi observado um aumento na marcação para pro-MMP9 nos grupos ES 4% (\*\*) e ES 6% (\*\*) quando comparado ao grupo controle (CO) (**figura 25**). Houve também aumento na pro MMP9 nos grupos ES 4% (\*), ES 6% (\*) em relação ao grupo ES 2%, com 7 dias de tratamento. Os grupos ES 4% (\*) e ES 6% (\*) apresentaram aumento na marcação da pro MMP9 entre os dias 3 e 7 de tratamento enquanto ES 2% apresentou uma redução neste período (**figura 25**). Assim com para pro MMP9, a MMP9 foi aumentada nos grupos ES 4% (\*) e ES 6% (\*) entre 3 e 7 dias de tratamento. No sétimo dia estes mesmos grupos, ES 4% (\*) e ES 6% (\*\*) apresentaram maior valor para MMP9 quando comparado ao grupo controle T7. Os valores de MMP9 encontrados nos grupos ES 4% (\*) e ES 6% (\*) também foram maior que no grupo tratado com 2 % de *M. ilicifolia* no sétimo dia de tratamento (**figura 25**).



**Figura 25.** (A) Gel de zimografia para atividade da pro MMP9 e MMP9 com 3 de tratamento; (B) Gel de zimografia para atividade da pro MMP9 e MMP9 com 3 de tratamento; (C) . Densitometria da atividade da Pro MMP9 com 3 e 7 dias de tratamento e (D) Densitometria da ati-



dade da MMP9 com 3 e 7 dias de tratamento. (a7) representa diferença estatística quando comparado ao grupo controle de 3 dias e (b7) indica uma diferença em relação a ES 2% tratados por 7 dias (T7). As barras e (\*) representam diferença estatística em um mesmo tratamento entre os dias 3 e 7 dias.

### 6.10 pro MMP2 e MMP2

A pro-MMP 2 e MMP2 foi observada somente em amostras obtidas com 3 dias de tratamento. A pro-MMP2 foi reduzida nos grupos ES 4% (\*) e ES 6% (\*) quando comparado ao grupo ES 2%. A redução na MMP-2 foi observada apenas no grupo ES 6% (\*) em relação à densidade encontrada em ES 2% (figura 26).

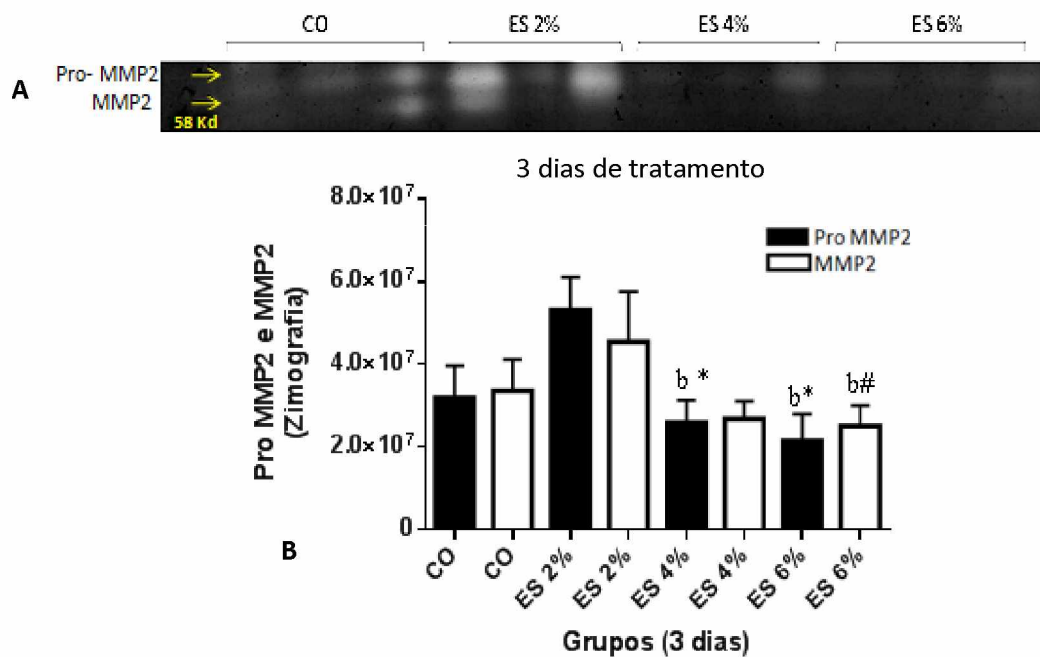


Figura 26. (A) Gel de zimografia para atividade da pro MMP2 e MMP2 com 3 de tratamento e (B) Densitometria sobre a atividade da Pro MMP9 e MMP9 com 3 dias de tratamento. (b\*) significa redução na pro-MMP2 quando comparado ao grupo ES 2% e (b#) redução na MMP9 quando comparado ao grupo ES 2%

## 7. DISCUSSÃO

A cicatrização de feridas envolve um processo complexo que tem como finalidade restaurar a integridade estrutural e/ou funcional do tecido danificado (SEIFERT; MADEN, 2014). Durante o reparo, ocorrem quatro etapas que são contínuas e complementares: hemostasia, inflamação, proliferação e maturação (GONÇALVES et al., 2010; SEIFERT; MADEN, 2014). Neste estudo, foram utilizados modelos de cicatrização de feridas por segunda intenção para avaliar o efeito da pomada formulada a partir do extrato etanólico de folhas de *M. ilicifolia* nos componentes envolvidos no reparo.

Antes que as células inflamatórias se estabeleçam no local da ferida, os mastócitos exercem a sua participação. Mastócitos são células importantes no processo de cicatrização, pois liberam grânulos contendo enzimas, histamina, quimases e outras aminas ativas responsáveis pelos sinais característicos da inflamação no local danificado (ARNOLD; WEST, 1991). Dentre os fatores derivados de mastócitos, as quimases e as aminas ativas contribuem para o aumento de neutrófilos no sítio da lesão (DIEGELMANN; EVANS, 2004; OSKERITZIAN, 2012). Aminas ativas tornam os vasos próximos ao local danificado mais permeável a passagem de células mononucleares, como os neutrófilos (DIEGELMANN; EVANS, 2004; NATHAN, 2006). Em relação às quimases, foi observado que a injeção de indutores de quimase humana conduz a acumulação de neutrófilos em tecido cutâneo e, portanto atuam no recrutamento destas células (OSKERITZIAN, 2012).

A atividade de neutrófilos esteve aumentada no terceiro dia de tratamento em feridas em comparação a pele saudável. No entanto, uma menor atividade de MPO foi observada nos grupos ES 4% e ES 6% em relação ao grupo controle (CO) após 3 dias. Os grupos ES 4% e ES 6% que apresentaram aumento na atividade de MPO foram os mesmos que apresentaram também aumento de mastócitos no mesmo período (3 dias). Neste período, a redução de mastócitos pode estar associada à liberação antecipada de quimases e aminas (DIEGELMANN; EVANS, 2004; OSKERITZIAN, 2012) o que poderia promover uma maior atividade de neutrófilos na ferida com 7 dias. Em todos os grupos, houve uma redução de neutrófilos entre os dias 3 e 7, o que era esperado, já que o processo inflamatório está presente, até aproximadamente o sexto dia após a lesão (BROUGHTON et al 2006). Entre o terceiro e sétimo dia, o número de mastócitos nos grupos ES 2% e ES 6% não foram significativamente reduzidos. Esta evidência pode ser devido ao fato de que, estas células desempenham seu papel não apenas na etapa inflamatória, mas também na etapa proliferativa.

Quimases exercem atividade mitogênica para fibroblastos e com efeito mínimo sobre os queratinócitos, contribuindo assim, principalmente no reparo dérmico (OSKERITZIAN, 2012). Por outro lado, mediante sua atividade prófibrogênica (mitogênese de fibroblastos e síntese de colágeno), quando presentes de forma descontrolada, podem também conduzir a um estado de fibrose e a formação de cicatriz hipertrófica (DIPIETRO, 2010). Os nossos resultados demonstram que apesar do aumento de mastócitos no grupo ES 4% após 3 dias de tratamento, houve redução destas células até o sétimo dia. Isso permite com que estas células exerçam a sua atividade de forma moderada e adequada na resolução do processo de cicatrização. Além disso, quimases, derivada de mastócitos também convertem precursores de TGF- $\beta$  e MMP-9 para a sua forma ativa fazendo com que a presença destas células seja fundamental na degradação da MEC e no remodelamento de tecidos (OSKERITZIAN, 2012). A MMP9 é uma protease com atividade fundamental na liberação de queratinócitos para a migração e re-epitelização. Nos grupos ES 4% e ES 6%, o maior conteúdo de mastócitos no terceiro dia, pode estar contribuído na conversão da pro-MMP9 em MMP9, onde ambas encontraram-se aumentadas no sétimo dia de tratamento.

A melhora no fechamento nos grupos ES 4% e ES 6% podem ser justificadas pela atividade dos compostos presente em *M. ilicifolia*. Esta planta apresenta em sua composição, taninos, utilizado na cicatrização de feridas, queimaduras e inflamações na recuperação por formar uma camada protetora sobre a mucosa ou a pele, protegendo e favorecendo a recuperação natural do tecido (SANTOS; MELLO, 2004). A presença de taninos justifica o seu uso popular como antimicrobiano, anti-inflamatório, cicatrizante, antiulcerogênico (SANTOS; MELLO, 2003). Pistore e colaboradores (2015) foi o único trabalho encontrado até o momento, que avaliou o efeito do tratamento com *M. ilicifolia* após 14 dia de tratamento. No entanto, este estudo, apresentou resultados apenas morfológicos. Neste período, foi observado aumento de folículos pilosos e redução na espessura da epiderme o que foi associado com uma melhor reorganização das camadas da epiderme retomando os níveis essenciais semelhante ao encontrado na pele saudável (PISTORE et al., 2015). Não há, até o momento, descrições na literatura sobre o efeito de *M. ilicifolia* nas etapas iniciais do processo de reparo como descrito em nosso trabalho.

Embora a literatura descreva a atividade anti-inflamatória para *M. ilicifolia*, não há estudos científicos sobre a atividade de neutrófilos (MPO) e macrófagos (NAG). A atividade anti-inflamatória para *M. ilicifolia* é descrita por outros modelos e análises experimentais, tais como pela redução na formação de mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas, leucotrienos, EROs e óxido nítrico (ROBAK; GRYGLEWSKI, 1996) e pelo método de indução

de carragenina para efeito anti-inflamatório e anti-nociceptivo em modelo induzido por injeção de solução de formaldeído (JORGE et al., 2004).

A pomada formulada a partir de 4% do extrato de *M. ilicifolia* pode ser considerada anti-inflamatória, pois reduziu em primeiro instante, após 3 dias os níveis de neutrófilos e macrófagos em comparação ao grupo controle e ES 2%. O grupo ES 6% foi capaz de reduzir a atividade de neutrófilos em relação ao controle, embora não tenha apresentado uma redução sobre a atividade de macrófagos quando comparado ao controle (CO) no terceiro dia. Este resultado é interessante, uma vez que temos no grupo ES 6% uma menor atividade de neutrófilos em 3 dias acompanhado de níveis adequados de macrófagos. Por outro lado, a redução observada no terceiro dia para o grupo ES 4% pode ser justificado pela migração tardia ou acelerado destas células, uma vez que a migração macrófagos para a ferida se faz entre 48-72, quando tem início a fagocitose de neutrófilos (HESS, 2000; MESZAROS; REICHNER; ALBINA, 2000; HART, 2002). Além da fagocitose de neutrófilos, os macrófagos também liberam fatores fundamentais para as próximas etapas do reparo, principalmente a etapa proliferativa, por liberarem fatores de crescimento como EGF, FGF, PDGF, TGF- $\alpha$  e VEGF (KIERZENBAUM, 2004).

A redução de neutrófilos e macrófagos no local da ferida indica o fim da etapa inflamatória e o início da fase proliferativa (DIEGELMANN; EVANS, 2004). A etapa de proliferação é caracterizada por diversas atividades, incluindo a migração de fibroblastos, síntese de colágeno, angiogênese e formação do tecido de granulação (DIEGELMANN; EVANS, 2004; VELNAR et al., 2009). As MMPs 2 e 9 desempenham um papel fundamental nesta etapa. O aumento da pro MMP-9 e MMP9 no sétimo dia de tratamento, nos grupos ES 4% e ES 6% podem contribuir para o melhor processo de re-epitelização. Uma vez que o processo de migração de queratinócito (etapa de proliferação) necessita da liberação dos hemidesmossomos de queratinócitos epidérmicos basais que é promovido pelas MMPs. Este rompimento ocasiona a separação destas células com a membrana basal e permite a migração através da matriz da ferida (LARJAVA et al., 1996; HAKKINEN; UITTO; LARJAVA, 2000). Sobre suas localizações, MMP-2 é característica da etapa inflamatória e o aumento da sua expressão é localizado no preenchimento da ferida neste período (CALEY et al., 2015). Por este motivo, foi observada apenas em amostras obtidas após 3 dias de tratamento. Enquanto, a MMP-9 por ser umas das MMPs mais importantes no processo de re-epitelização, é expressa nas bordas de contato dos queratinócitos migradores durante o fechamento da ferida. A importância da MMP-9 na cicatrização de feridas é ainda reforçada pela observação de que animais knockout para MMP9 exibem um fechamento de ferida retardado (HATTORI et al., 2009).

A angiogênese, assim como a re-epitelização é um processo característico da etapa proliferativa e garante um passo crítico na regeneração de tecidos. Tanto a MMP-2 como a MMP-9 desempenham um papel na regulação da angiogênese através da ativação de citocinas proangiogénicas, incluindo TNF- $\alpha$  e VEGF e geração de péptidos antiangiogénicos (por exemplo, endostatina do colagénio do tipo XVII, expressa na membrana basal) (KATO et al., 2001; HELJASVAARA et al., 2005). Apesar de ser essencial para o reparo, como re-epitelização, angiogênese e remodelamento, o aumento de MMPs ou inflamação podem conduzir a cronificação da feridas e resultar na incapacidade de remodelamento final (CALEY et al., 2015).

A angiogênese ocorre na etapa proliferativa que tem início aproximadamente no quarto dia após a ferida (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). O grupo ES 4% apresentou aumento no conteúdo de hemoglobina no terceiro dia, que foi reduzida entre o dias 3 e 7 de tratamento. No sétimo dia, todos os tratamentos ES 2%, ES 4% e ES 6% apresentaram uma redução no conteúdo de hemoglobina. Este resultado sugere que, o processo proliferativo possa ter iniciado recentemente no grupo ES 4% e que nos demais grupos, o aumento do conteúdo possa ter estado presente entre os dias avaliados 3 e 7 dias (período não avaliado), pois no sétimo já estariam reduzidos, o que é característico da fase tardia da etapa proliferativa (NAUTA; GURTNER; LONGAKER 2011).

No evento de fibroplasia, os fibroblastos, células fundamentais para o processo, são formadas principalmente de células mesenquimais não diferenciadas, residentes na derme, que, sob a influência de citocinas e fatores de crescimento, liberadas de plaquetas, neutrófilos e macrófagos, sofre uma transformação em fibroblastos (SORRELL; CAPLAN, 2004; GUO; DIPIETRO, 2010; LI; WANG, 2011). Os fibroblastos são as células com maior contribuição na síntese dos elementos da MEC (colágeno, fibronectina, GAGs, proteoglicanos e ácido hialurónico). A formação da MEC é um passo importante, pois fornece um andaime para a adesão celular e regula e organiza criticamente o crescimento, movimento e diferenciação das células (ECKES; NISCHT; KRIEG, 2010; BARKER, 2011). O movimento e diferenciação celular estão relacionados com a estimulação da adesão e migração das células durante o processo de cicatrização, assim como com a mediação das interações entre as células, entre as células e a matriz, ou entre as proteínas da MEC (RAMAN; SASISEKHARAM, 2005; AGREN; WERTH'EN, 2007; SHULTZ; WYSOCKI, 2009; SHULTZ et al., 2011). O conteúdo de colágeno no tecido de granulação aumenta até a terceira semana, a partir do momento em que a ferida apareceu, o que é acompanhado por uma redução gradual da quantidade de fibroblastos até o momento em que desaparecem no processo de apoptose (HINZ, 2007). Os componentes da MEC servem também como um reservatório e um modulador de citocinas e ação dos fatores

de crescimento, regulando assim a atividade do reparo de ferida (RAGHOW, 1994; TAKEHARA, 2000; DIEGELMANN; EVANS, 2004; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; BARRIENTOS et al., 2008). O aumento do colágeno depositado na MEC foi observado nos grupos ES 2%, 4% e 6% em relação ao controle após 7 dias de tratamento, o que proporciona integridade e resistência a este tecido. Além de contribuir para uma melhor migração celular que desempenha papel essencial especialmente nas fases proliferativa e de remodelação a fim de restabelecer o tecido danificado (GREENHALGH, 1998; BAUM; ARPEY, 2005).

Após a proliferação, ocorre a etapa de remodelamento que tem início após 7 dias da ferida. Nesta etapa, ocorre a mudança do colágeno constituinte e a sua disposição que passa a ser mais orientada. O colágeno tipo III, inicialmente mais abundante que o tipo I, vai sendo degradado mais ativamente com o decorrer do tempo, enquanto que o colágeno I vai tendo sua produção aumentada pelos fibroblastos (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; ISAAC et al., 2010). O colágeno tipo I também é vital durante o período de maturação (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). No entanto, como o processo de remodelação ocorre após o sétimo dia, até o sétimo dia, não foi possível observar uma diferença na deposição do colágeno I e III na avaliação por polarização.

## 8. CONCLUSÃO

A pomada formulada a partir das concentrações de 4% e 6% do extrato etanólico de folhas de *M. ilicifolia* foram mais eficientes na otimização do reparo em feridas cutâneas. Estas concentrações apresentaram um efeito anti-inflamatório, reduzindo a atividade principalmente de neutrófilos, sendo ES 4% capaz de reduzir também a atividade de macrófagos, ambos após 3 dias. Diante de todos os resultados, podemos destacar que, embora todas as concentrações tenham sido eficientes em promover um maior fechamento sobre as feridas, ES 4% pode ser considerado a dose mais promissora. O processo de angiogênese pode ter sido acelerado no grupo ES 4%, já que este apresentou, após 3 dias um aumento na dosagem de hemoglobina, sendo posteriormente reduzido. Todos os tratamentos aumentaram também a deposição de colágeno, importante para a reconstrução da estrutura da derme e migração de células essenciais para o restabelecimento do tecido danificado. O aumento de MMP9 nos grupos ES 4% e ES 6% podem estar associados a um avanço no sentido da etapa proliferativa, uma vez que são fundamentais para o processo de queratinização importantes para o fechamento da camada epidérmica.

## 9. Anexo 1: Certificado- Comissão de Ética na Utilização de Animais



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Análise morfológica e bioquímica do efeito do extrato de *Maytenus ilicifolia* na cicatrização cutânea", protocolo nº 062/16, sob a responsabilidade de **Tatiana Carla Tomiosso** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **03 de junho de 2016**.

(We certify that the project entitled "Análise morfológica e bioquímica do efeito do extrato de *Maytenus ilicifolia* na cicatrização cutânea", protocol 062/16, under the responsibility of Tatiana Carla Tomiosso - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of June 03rd, 2016).

Vigência do Projeto	Início: 01/07/2016 Término: 31/12/2016
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongos Balb/c
Número de animais	80
Peso / Idade	27 g / 9 semanas
Sexo	Machos
Origem / Local	Biotério da ARFIS/CBIM/UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 17 de junho de 2016.

**Prof. Dr. César Augusto Garcia**  
Coordenador da CEUA/UFU

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGREN, M. S.; WERTHEN, M. The extracellular matrix in wound healing: a closer look at therapeutics for chronic wounds. **The international journal of lower extremity wounds**, v. 6, n. 2, p. 82-97, 2007.
- ARNHOLD, J. Free radicals: friends or foe. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69(1), p. 4-9, 2004..
- ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacology & therapeutics**, v. 52, n. 3, p. 407-422, 1991.
- BADKE, M. R. et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, v. 15, n. 1, p. 132-9, 2011.
- BAILEY, P. J. Sponge implants as models. **Methods in enzymology**, v. 162, p. 327-334, 1988.
- BARKER, Thomas H. The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine. **Biomaterials**, v. 32, n. 18, p. 4211-4214, 2011.
- BARRIENTOS, S. al. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 5, p. 585-601, 2008.
- BAUER, S. M.; BAUER, R. J.; VELAZQUEZ, O. C. Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. **Vascular and endovascular surgery**, v. 39, n. 4, p. 293-306, 2005.
- BAUM, Christian L.; ARPEY, Christopher J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic surgery**, v. 31, n. 6, p. 674-686, 2005.
- BEANES, S.R et al. Skin repair and scar formation: the central role of TGF-[beta]. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 5, n. 08, p. 1-22, 2003.
- BELO, A.V.; BARCELOS, L.S.; FERREIRA, M.A.N.D.; et al. Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. **Life Sciences**, v.74, n.23, p. 2827-2837, 2004.
- 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. 7, p 248-54, 1976.



- BRADLEY, P. P., PRIEBAT, D.A, CHRISTENSEN, R.D. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v.78. p. 206-209, 1982.
- BRANDÃO, M.G. L et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 408-420, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária **RDC 48, de 16 março, 2004**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em <<http://anvisa.gov.br>>.
- BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução- RDC Nº 10 de 09 de março de 2010**. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. 60 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC-SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 92 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS – Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- BRASS, L. F. Thrombin and platelet activation. **CHEST Journal**, v. 124, n. 3\_suppl, p. 18S-25S, 2003.
- BRINK, H. E.; STALLING, S. S.; NICOLL, S. B. Influence of serum on adult and fetal dermal fibroblast migration adhesion, and collagen expression. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 41, n. 8-9, p. 252-257, 2005.
- BROUGHTON, G., G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 117, n. 7 Suppl, p. 12S-34S, 2006.
- BUSTI, A. J et al. Effects of perioperative antiinflammatory and immunomodulating therapy on surgical wound healing. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 25, n. 11, p. 1566-1591, 2005.
- CALEY, Matthew P.; MARTINS, Vera LC; O'TOOLE, Edel A. Metalloproteinases and wound healing. **Advances in wound care**, v. 4, n. 4, p. 225-234, 2015.
- CARLINI, E. A.; GARTEN, F. Toxicologia clínica (Fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: (Ed.). **Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (Maytenus ilicifolia)**: Central de Medicamentos (Brasil), 1988. p.67-73.

- CARNEIRO, J.; JUNQUEIRA, L. C. U. **Histologia básica: texto, atlas**. Guanabara-Koogan, 2008.
- CARVALHO, A. C. B et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.
- CHAINANI-WU N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of turmeric (*Curcuma longa*). **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, 9, p.161–168, 2003.
- COIMBRA, R.; DA SILVA, E. D. **Notas de fitoterapia**. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, p. 32-33, 1958.
- CORRÊA JUNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP. 1994. 162p.
- COSTA, V.B. et al. Antiinflammatory and analgesic activity of *Bouchea fluminensis*. **Fitoterapia**, v.74, p.364–371, 2003.
- COULAUD-CUNHA, S.; OLIVEIRA, R.; WAISSMANN, W. Venda livre de *Sorocea bomplandii* Bailon como Espinheira Santa no município de Rio de Janeiro-RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 51-53, 2004.
- CUNHA, S. C. Ação farmacológica da espinheira-santa: usos e precauções. **Ação farmacológica da espinheira-santa: usos e precauções**, 2003. *Monografia de especialização* Universidade Federal de Lavras, P.100, Lavras, 2003.
- CUTTLE, L, NATAATMADJA, M, FRASER, J. F., et al. Collagen in the scarless fetal skin wound: detection with picrosirius-polarization. **Wound repair regen**, v. 12, p. 374-83. 2004.
- DE SOUZA ARAÚJO, R. V. et al. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 1, p. 82-88, 2011.
- DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, n. 1, p. 283-289, 2004.
- DULMOVITS, B.M.; HERMAN, I. M. Microvascular remodeling and wound healing: a role for pericytes. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 44, n. 11, p. 1800-1812, 2012.
- ECKES, B.; NISCHT, R.; KRIEG, T. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. **Fibrogenesis & tissue repair**, v. 3, n. 1, p. 4, 2010.
- EMING, S. A. et al. Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, p. 517-527, 2009.

- EMING, S.A et al. Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. **Progress in histochemistry and cytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 115-170, 2007.
- EMING, S.A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 3, p. 514-525, 2007.
- exposed to various doses of  $\gamma$ -radiation. **Journal of Surgical Research**, v. 120, n. 1, p. 127-138, 2004.
- FERREIRA A.S et al. Measurement of healing area using planimetry after applying low-intensity ultrasound to the skin of rats. **Revista Brasileira Fisioterapia**, v. 12, n. 5, p. 351-8, 2008.
- FITZMAURICE, S. D.; SIVAMANI, R. K.; ISSEROFF, R. R. Antioxidant therapies for wound healing: a clinical guide to currently commercially available products. **Skin pharmacology and physiology**, v. 24, n. 3, p. 113-126, 2011.
- FITZPATRICK, T. B., EISEN, A. Z., WOLF, K. **Tratado de Dermatologia**. 5 ed. Rio de Janeiro : Ed, Revinter, p.88-259, 2005.
- FOSSUM, T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2002. 1335p.
- FREIRE, S.M. et al. Analgesic activity of a triterpene isolated from *Scoparia dulcis* L. (Vasourinha). **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p.149–151, 1991.
- FU, X. B. et al. Epidermal stem cells are the source of sweat glands in human fetal skin: Evidence of synergetic development of stem cells, sweat glands, growth factors, and matrix metalloproteinases. **Wound Repair Regeneration**. St. Louis, v. 13, p. 102- 108, 2005.
- GALATI, E.M. et al. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid (Note I): anti-inflammatory and analgesic activity. **Farmaco**, v. 40, p.709–712, 1994.
- GARTNER, L. P et al. **Tratado de Histologia**. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 243-66.
- GONÇALVES, Reggiani Vilela et al. Influência do laser de arseneto de gálio-alumínio em feridas cutâneas de ratos. **Fisioterapia em Movimento**, v. 23, p. 381-8, 2010.
- GONZALES, J. G et al. Chuchuhuasha—a drug used in folk medicine in the Amazonian and Andean areas. A chemical study of *Maytenus laevis*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 5, p.73-77, 1982.
- GRAY, H.; BANNISTER, L. H., BERRY, M. M. et al. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Medicine and Surgery. **Churchill-Livingstone**. New York, p.76, 1995.
- 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, n. 3, p. 206-217, 2013.

- GREENHALGH, David G. The role of apoptosis in wound healing. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 30, n. 9, p. 1019-1030, 1998.
- GREGORY SR et al. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, 8,p. 77–83, 2002.
- GUIRRO, E. C.O. **Fisioterapia Dermato-Funcional**. 3. ed. São Paulo: Editora Manole, 2002.
- GUO, S. A.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of dental research**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.
- GURTNER, G. C et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-321, 2008.
- HAEKKINEN, L. A. R. I.; UITTO, VELI-JUKKA; LARJAVA, H. Cell biology of gingival wound healing. **Periodontology** 2000, v. 24, n. 1, p. 127-152, 2000.
- HANNAS, A.R. Determinação da expressão de MMP-2 e MMP-9 na saliva de pacientes portadores de lesões cervicais não cariosas e da influência das MMPs sobre lesões radiculares artificiais através de EDX [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru; 2007.
- HANSSON, M.; OLSSON, I. ; NAUSEEF, W. M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 445, n. 2, p. 214-224, 2006.
- HARRIS, M. I. N .C. **Pele: Estrutura e Propriedades e Envelhecimento** 2.ed.São Paulo: SENAC, 2005, 238p.
- HARRIS, M. I. N. C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. 3.ed. São Paulo: Senac, 2009.
- HART, J. Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. **Journal of wound care**, v. 11, n. 6, p. 205-209, 2002.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of natural products**, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.
- HATTORI, Noriko et al. MMP-13 plays a role in keratinocyte migration, angiogenesis, and contraction in mouse skin wound healing. **The American journal of pathology**, v. 175, n. 2, p. 533-546, 2009.
- HELJASVAARA, Ritva et al. Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases. **Experimental cell research**, v. 307, n. 2, p. 292-304, 2005.

- HESS, Cathy Thomas. Skin care basics. **Advances in skin & wound care**, v. 13, n. 3, p. 127, 2000.
- HINZ, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 3, p. 526-537, 2007.
- HOFFMAN, M et al. Cutaneous wound healing is impaired in hemophilia B. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 3053-3060, 2006.
- INOUE, Y.U.; ASAMI, J.; INOUE, T.. Cadherin-6 gene regulatory patterns in the postnatal mouse brain. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 95-104, 2008.
- ISAAC, C. et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3-4, p. 125-131, 2010.
- ITOKAWA, H. et al. 1991. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v.30, p. 3713–3716, 1991.
- JAGETIA, G.C., RAJANIKANT, G.K. Role of curcumin, a naturally occurring phenolic compound of turmeric in accelerating the repair of excision wound, in mice whole-body 21
- JORGE, R. M et al. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 93-100, 2004.
- JULL, A. B.; RODGERS, A. ; WALKER, N. Honey as a topical treatment for wounds. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 4, 2008.
- KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European journal of dermatology**, v. 12, n. 4, p. 390-9; 2001.
- KAPOOR, M. et al. Effects of epicatechin gallate on wound healing and scar formation in a full thickness incisional wound healing model in rats. **The American journal of pathology**, v. 165, n. 1, p. 299-307, 2004.
- KATO, T. et al. Diminished corneal angiogenesis in gelatinase A-deficient mice. **FEBS letters**, v. 508, n. 2, p. 187-190, 2001.
- KHAN, B.A et al. Human skin, aging and antioxidants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, p. 1-6, 2012.
- KHANNA, S. et al. Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 8, p. 1089-1096, 2002.
- KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier; p.168-70, 2004.
- KO'ZMA, E.M. et al. "Wound repair," **Advances in Hygiene and Experimental Medicine**, vol. 52, pp. 173–185, 1998.

- KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 13, p. e23, 2011.
- KOIVUKANGAS, V. et al. UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin *in vivo*. **Acta Dermato-Venereologica**, Stockholm, v. 74, p. 279-282, 1994.
- KUMAR, B et al. Ethnopharmacological approaches to wound healing—exploring medicinal plants of India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, p. 103-113, 2007.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins basic pathology**. Elsevier Health Sciences, 2013.
- LARJAVA, H. et al. Keratinocyte integrins in wound healing and chronic inflammation of the human periodontium. **Oral diseases**, v. 2, n. 1, p. 77-86, 1996.
- LAU, D., BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharm Therap**, v. 111, p. 16-26, 2006.
- LAU, K et al. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. **Experimental dermatology**, v. 18, n. 11, p. 921-933, 2009.
- LAURENS, N.; KOOLWIJK, P.; DE MAAT, M. P. M. Fibrin structure and wound healing. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 5, p. 932-939, 2006.
- LEACH, M. J. A critical review of natural therapies in wound management. **Ostomy/wound management**, v. 50, n. 2, p. 36-40, 2004.
- LEITE, J.P.V et al. Isolation and Quantitative Analysis of Flavonoid Glycosides from Brazilian Beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*), **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.8, p. 3796- 3801, 2001.
- LI, B.; WANG, J. H. C. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. **Journal of tissue viability**, v. 20, n. 4, p. 108-120, 2011.
- 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, n. 1, p. 107-114, 2003.
- LIN, T.W.; CARDENAS, L.; SOSLOWSKY, L.J. Biomechanics of tendon injury and repair. **Journal of biomechanics** v.37, n.6, p. 865-877. 2004.
- LORENZI H, MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no brasil - nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, p. 120-122, 2002.
- LUCAS, R. **Semiologia da pele**. Semiologia Veterinária-a arte do diagnóstico, v.1, p.641-676, 2004.
- LUO, J.; CHEN, A.F. Nitric oxide, a newly discovered function on wound healing. **Acta Pharmacol Sin.**, v.26, p. 256-264. 2005.

- MACAUBAS, C.I.P et al. **Estudo da eventual ação antiúlcera gástrica do bálsamo (Sedumsp), folha-da-fortuna (*Bryofillum calycinum*), couve (*Brassica oleraceae*) e da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) em ratos.** Estudo da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: Maytenus ilicifolia (espinheira santa) e outras. Brasília: Central de Medicamentos. 1988; 5-20.
- MACLEOD, A. S.; HAVRAN, W. L. Functions of skin-resident  $\gamma\delta$  T cells. **Cellular and molecular life sciences**, v. 68, p. 2399–408, 2011.
- MADDEN, J.; AREM, A.; SABISTON, D. A cicatrização das feridas. Aspectos biológicos e clínicos. **DABISTON, D. Tratado de cirurgia**, v. 14, p. 156-158, 1991.
- MARIA DE FÁTIMA, G. S. et al. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 41, n. 3, p. 259-264, 2008.
- MCLENNAN, S.V. et al. The anti-inflammatory agent propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. **Wound Repair Regeneration**, p 706–713, 2008.
- MESZAROS, A. J.; REICHNER, J. S.; ALBINA, J. E. Macrophage-induced neutrophil apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 1, p. 435-441, 2000.
- 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, n. 6, p. 1031-1037, 2004.
- MOSSI, A. J et al. Extraction and characterization of volatile compounds in Maytenus ilicifolia, using high-pressure CO<sub>2</sub>. **Fitoterapia**, v. 75, n. 2, p. 168-178, 2004.
- MURTHY, S. et al. Evaluation of in vivo wound healing activity of Bacopa monniera on different wound model in rats. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- NAGASE, H., VISSE, R., MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPS. **Cardiovascular Research**, v.69, n.3, p. 562-73, 2006.
- NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. **Journal of Biological chemistry**, v. 274, n. 31, p. 21491-21494, 1999.
- NATHAN, Carl. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173-182, 2006.
- NAUTA, A.; GURTNER, G. C.; LONGAKER, M. T. Wound healing and regenerative strategies. **Oral diseases**, v. 17, n. 6, p. 541-549, 2011.
- NAYAK, B. S. et al. Wound-healing activity of the skin of the common grape (*Vitis Vinifera*) variant, cabernet sauvignon. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 8, p. 1151-1157, 2010.

- NAYAK, B. S.; SANDIFORD, S.; MAXWELL, A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 6, n. 3, p. 351-356, 2009.
- NAYAK, S. B. et al. Wound healing activity of the fruit skin of *Punica granatum*. **Journal of medicinal food**, v. 16, n. 9, p. 857-861, 2013.
- NIKIEMA, J.B et al. Effects of antiinflammatory triterpenes isolated from *Leptadenia hastata* latex on keratinocyte proliferation. **Phytoteraphy Research**, v. 15, p. 131–134, 2001.
- NOLDIN, V. F.; ISAIAS, D. B.; FILHO, V. C. Genêro *Calophyllum*: importância química e farmacológica. **Química Nova**, v. 29, n. 3, 2006.
- NOWAK, G.; OLEJEK, A, “Biological and molecular aspects of wound healing,” **Practical Gynecology**, vol. 12, pp. 2–30, 2004.
- OLCZYK, P.; MENCNER, Ł. ; KOMOSINSKA-VASSEV, K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- OSKERITZIAN, C. A. Mast cells and wound healing. **Advances in wound care**, v. 1, n. 1, p. 23-28, 2012.
- PANCHATCHARAM et al. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 290, p.87–96, 2006.
- PANG, Y. et al. *Blumea balsamifera*—A phytochemical and pharmacological review. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9453-9477, 2014.
- PELZER, L.E. et al. 1998. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **Farmaco**, v. 53, p. 421–424, 1998.
- PESSUTO, M. B. **Análise fitoquímica de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e avaliação do potencial antioxidante**. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.
- PEYREFITTE, G.; MARTINI, M. C.; CHIVOT, M. **Cosmetologia, biologia geral e biologia da pele**. 3.ed. São Paulo: Andrei, 1998.
- PISTORE, M et al. **Elicácia da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mabb.) na cicatrização de ferida cutânea em ratos**. Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI ISSN 1809-1636. Vivências. Vol. 11, N.20: p.21-29, Maio/2015
- RADOMSKI, M.I. Caracterização ecológica e fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em populações nativas no município da Lapa – Paraná. Curitiba, 1998. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.



- RAGHOW, R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. **The FASEB journal**, v. 8, n. 11, p. 823-831, 1994.
- RAINA, R. et al. Medicinal plants and their role in wound healing. **Online Veterinary J**, v. 3, p. 21, 2008.
- RAMAN, R.; SASISEKHARAN, V.; SASISEKHARAN, R. Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions. **Chemistry & biology**, v. 12, n. 3, p. 267-277, 2005.
- RATTMANN, Y. D. et al. Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Celastraceae) leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 104, n. 3, p. 328-335, 2006.
- REHDER, J. et al. Model of human epidermis reconstructed in vitro with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 122, n. 1, p. 22-25, 2004.
- REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.
- RITTIÉ, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. **Journal of cell communication and signaling**, v. 10, n. 2, p. 103-120, 2016.
- ROBAK, J., GRYGLEWSKI, R.J. Bioactivity of flavonoids. **Polish Journal of Pharmacology** 48, 555-564, 1996.
- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. 5 ta ed. **Madrid: Editorial médica panamericana**, p. 268-302, 2008.
- ROY, S.; KHANNA, S., NALLU, K. et al. Dermal wound healing is subject to redox control.. **Molecular therapy** 13, p. 211-220, 2006.
- SAFAVHI, H., SAILER, E.R. Antiinflammatory actions of pentacyclic triterpenes. **Planta Medica**, v. 63, p. 487-493, 1997.
- SALO, T. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and-9 during early human wound healing. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 70, n. 2, p. 176-182, 1994.
- SAMUELSON, P. **Tratado de histologia veterinária**. Elsevier Health Sciences, 2011.
- SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. cap. 2. p. 29-43.
- SCHULTZ, G. S.; WYSOCKI, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. **Wound repair and regeneration**, v. 17, n. 2, p. 153-162, 2009.

- SCHULTZ, G.S. et al. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 2, p. 134-148, 2011.
- SEIFERT, A. W.; MADEN, M. New insights into vertebrate skin regeneration. **International Review of Cell and Molecular Biology** v. 310, p. 129-169, 2014.
- SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**., v.6, p. 181-190. 2006.
- SHIROTA, O et al. 1994. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 1675–1681, 1994.
- SILVA, M. A. D. et al. Evaluation of *Strychnos pseudoquina* St. Hil. leaves extract on gastrointestinal activity in mice. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 53, n. 8, p. 881-885, 2005.
- SINGER, A. J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **New England journal of medicine**, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.
- SINNO, H.; PRAKASH, S. Complements and the wound healing cascade: an updated review. **Plastic surgery international**, v. 2013, 2013.
- SORG, H.; KRUEGER, C.; VOLLMAR, B. Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. **Journal of anatomy**, v. 211, n. 6, p. 810-818, 2007.
- SORRELL, J. M. ; CAPLAN, A. I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **Journal of cell science**, v. 117, n. 5, p. 667-675, 2004.
- SOUSA, M. A. J.; VARGAS, T. J. S. **Anatomia, fisiologia e histologia da pele**. In: kede, m. P. V.; sabatovich, O. *Dermatologia estética*. São Paulo: Atheneu, cap. 1, 2004.
- SOUTO, L.R.M et al. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. **Sao Paulo Med J**, v. 124, p. 71-6, 2006.
- SOUZA, A. P. ; LINE, S. R. P. The biology of matrix metalloproteinases. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2002.
- STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 17, p. 463, 2001.
- TABACH, R.; OLIVEIRA, W. P. Evaluation of the anti-ulcerogenic activity of a dry extract of *Maytenus ilicifolia* Martius ex. Reiss produced by a jet spouted bed dryer. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, n. 8, p. 573-576, 2003.
- TAKEHARA, Kazuhiko. Growth regulation of skin fibroblasts. **Journal of dermatological science**, v. 24, p. S70-S77, 2000.
- TAYLOR, K. R et al. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 17, p. 17079-17084, 2004.

- TIBERTI, Luciana A. et al. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 846, n. 1, p. 378-384, 2007.
- TOMASEK, J. J et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 3, n. 5, p. 349-363, 2002.
- TONNESEN, M. G.; FENG, X.; CLARK, R.A.F. Angiogenesis in wound healing. In: **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. Nature Publishing Group, p. 40-46, 2000.
- TOWNSEND, J.R, C. et al. **Sabiston textbook of surgery**. Elsevier Health Sciences, 2012.
- UPADHYAY, A. et al. Topical application of *Cleome viscosa* increases the expression of basic fibroblast growth factor and type III collagen in rat cutaneous wound. **BioMed Research International**, p. 1-7, 2014.
- VAL R, SUSANNA, D., STEPHEN, T. Standardized antibacterial honey (Medihoney) with standard therapy in wound care: randomized clinical trial, **Journal of Advanced Nursing**, p. 565-575, 2009.
- VELNAR, Tomaž; BAILEY, Tracey; SMRKOLJ, Vladimir. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **Journal of International Medical Research**, v. 37, n. 5, p. 1528-1542, 2009.
- VÉROLLET, C. et al. Extracellular proteolysis in macrophage migration: losing grip for a breakthrough. **European journal of immunology**, v. 41, n. 10, p. 2805-2813, 2011.
- VESTWEBER, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. **Nature Reviews Immunology** v.15, n. 11, p. 692-70, 2015.
- VISSCHER, M.; NARENDHAN, V. Neonatal infant skin: development, structure and function. **Newborn and Infant Nursing Reviews**, v. 14, n. 4, p. 135-141, 2014.
- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827-839, 2003.
- YANG, H. S. et al. Enhanced skin wound healing by a sustained release of growth factors contained in platelet-rich plasma. **Experimental & molecular medicine**, v. 43, n. 11, p. 622-629, 2011.
- YONEDA, A. ; COUCHMAN, J. R. Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans. **Matrix biology**, v. 22, n. 1, p. 25-33, 2003.
- YUSSOF, S. J. M et al. Cellular events and biomarkers of wound healing. **Indian Journal of Plastic Surgery**, v. 45, n. 2, p. 220, 2012.

- WANG, W. et al. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. **Circulation**, v. 106, n. 12, p. 1543-1549, 2002.
- WILGUS, T. A.; ROY, S. ; MCDANIEL, J. C. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. **Advances in wound care**, v. 2, n. 7, p. 379-388, 2013.
- WIPFF, P.J. et al. Myofibroblast contraction activates latent TGF- $\beta$ 1 from the extracellular matrix. **The Journal of cell biology**, v. 179, n. 6, p. 1311-1323, 2007.
- WITTE, M.B.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. **The American Journal of Surgery**, v. 183, n. 4, p. 406-412, 2002.
- WOO, S. L-Y et al. Tissue engineering of ligament and tendon healing. **Orthop Tissue Engineer.**, v.367S, p. S312-S323. 1999.
- WU, Y. S; CHEN, S. N. Apoptotic cell: linkage of inflammation and wound healing. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, p. 1, 2014.
- XAVIER, H.S.; D'ANGELO, L.C.A. Perfil cromatográfico dos componentes polifenólicos de *Maytemus ilicifolia* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, 1996.
- ZHANG, Z. R. et al. In vivo angiogenesis screening and mechanism of action of novel tanshinone derivatives produced by one-pot combinatorial modification of natural tanshinone mixture from *Salvia miltiorrhiza*. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e100416, 2014.
- ZHU, N.; SHARAPIN, N.; ZHANG, J. Three glucosides from *Maytemus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v.47, n.2, p.265-268, 1998.