



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

ÁREA DE MORFOLOGIA

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

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

Tales Faleiros Nascimento Júnior

**Análise do efeito da Sulfadiazina de Prata e do
Confrei na cicatrização cutânea de ratos Wistar**

Uberlândia

2013

Tales Faleiros Nascimento Júnior

**Análise do efeito da Sulfadiazina de Prata e do
Confrei na cicatrização cutânea de ratos Wistar**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação
em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas –
ICBIM/UFU, como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Tatiana Carla
Tomiosso.

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Daniele Lisboa
Ribeiro

Uberlândia

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- N244a Nascimento Júnior, Tales Faleiros, 1980-
2013 Análise do efeito da sulfadiazina de prata e do confrei na cicatrização cutânea de ratos wistar / Tales Faleiros Nascimento Júnior. -- 2013.
61 f : il.
- Orientadora: Tatiana Carla Tomiosso.
Coorientador: Daniele Lisboa Ribeiro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Citologia - Teses. 2. Plantas medicinais - Teses. 3. Sulfadiazina de prata - Toxicologia - Teses. 4. Cicatrização de feridas – Teses. I. Tomiosso, Tatiana Carla. II. Ribeiro, Daniele Lisboa. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3

Tales Faleiros Nascimento Júnior

Análise do efeito da Sulfadiazina de Prata e do
Confrei na cicatrização cutânea de ratos Wistar

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

Uberlândia, de de 2013.

Banca examinadora

Dedico este trabalho à minha orientadora Tatiana, pelo apoio, força e incentivo, as minhas co-orientadoras: Daniele e Fernanda por terem me ajudado em todos os momentos.

À Marília e ao Tomás que tiveram muito amor e paciência para que eu concretizasse mais este projeto.

Aos Meus Pais e avós que me deram exemplo de dedicação e amor a vida profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar que iluminou o meu caminho durante esta jornada me dando discernimento e sabedoria. Agradeço também minha esposa, Marília, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, nos momentos de dificuldades, quero agradecer também ao meu filho Tomas.

Não deixando de agradecer de forma grata e grandiosa meus pais, Tales e Nilce, a quem eu rogo todas as noites a minha existência. Ao meu irmão Marcos e Paulo que muito me auxiliaram nesta trajetória

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante a pós graduação, sem ressalva, todos conseguiram transmitir o conhecimento de forma clara e didática que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta dissertação.

Ao departamento de pós graduação de Biologia Celular ,a todos do Laboratório que estiveram me apoiando em especial o Fabricio e o Ruy.

Em especial deixo meus agradecimentos a Luana aluna da graduação que me auxiliou na parte laboratorial.

RESUMO

A pele reveste todo o corpo, devido a isso é considerado o maior órgão do corpo e é composta por três camadas distintas, sendo de extrema importância fisiológica. Feridas na pele podem comprometer a integridade tecidual da mesma e trazer problemas maiores ao organismo. Para tanto são utilizados, rotineiramente, fármacos que tentam controlar principalmente, a resposta inflamatória que pode se tornar prejudicial para o reparo eficiente. Embora o uso de algumas plantas pela medicina popular, seja extremamente difundido, existe uma carência de dados científicos relacionados a este uso. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo analisar o reparo em pele após lesão cirúrgica, através da aplicação de pomada de confrei (uma planta que apresenta propriedades anti-inflamatórias) e sulfadiazina de prata. Tendo como foco de análise o comportamento da matriz extracelular no processo de reparação tecidual. Logo este trabalho almeja proporcionar uma análise mais aprofundada e com conteúdo científico do *Symphytum officinale* (confrei), devido a sua utilização como agente cicatrizante. Para tanto, os animais tiveram sua pele dorsal lesionada e os fármacos foram aplicados por 3 e 7 dias após a lesão. O material foi processado para a morfologia ou foi congelado para que fossem feitas as análises bioquímicas. O grupo de animais tratado com o confrei mostrou uma melhor evolução do reparo, se comparado com os demais grupos. Portanto, se conclui que a pomada de confrei auxilia, favorece a cicatrização com suas propriedades anti-inflamatórias ao diminuir a angiogênese, melhorar a deposição do colágeno e controlar a presença de células inflamatórias e tem o potencial de assegurar um melhor desempenho para a cura dos ferimentos. Em resumo a utilização do confrei abre novas possibilidades para sua utilização na prática médica.

PALAVRAS-CHAVE: CONFREI,CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS,PELE

ABSTRACT

The skin covers the entire body, because it is the largest organ of the body is composed of three distinct layers, it is extremely important physiological. The present study was conducted surgical incisions in rats and tested the effectiveness of two drugs, comfrey and silver sulfadiazine in tissue repair analyzing extracellular matrix, level of re-epithelialization of skin collagen quantification, counting of mast cells, Count of blood vessels, Determination of hemoglobin Dosage ,Dosage of NAG activity, and activity myeloperoxidase. Soon this work aims and main scope is to provide a more thorough analysis and scientific content of *Symphytum officinale* (comfrey) widely used in popular culture for its healing properties anti-inflammatory and healing in dermatological treatment comparing well with agent widely used silver sulfadiazine 1%.

Concludes that the comfrey plays a key role in wound healing with its anti-inflammatory and certainly opens up new possibilities for action, based on the mechanism of degranulation of mast cells and neutrophils during the repair phase, decreased angiogenesis best arrangement of collagen and has the potential to provide better performance for the healing of wounds.

KEYWORDS: COMFREY, WOUND HEALING, SKIN

LISTA DE ABREVIATURAS

CO – Controle

CF – Confrei

Hb – Hemoglobina

HE – Hematoxilina-eosina

Kg - Quilograma

MEC – Matriz Extracelular

MMP – Metaloproteinase

MPO – Mieloperoxidase

NAG - N-acetil-D-glicosaminidase

NO - Óxido Nítrico

TGF - Fator de crescimento transformante

TGF - Fator de crescimento transformante beta

TIMP – Inibidor tecidual de metaloprotease

TNF – Fator de necrose tumoral

S – Sulfadiazina de prata

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1 – Microscopia de luz de pele intacta e lesada corada com HE.....	29
Fig. 2 – Quantificação de colágeno.....	31
Fig. 3 – Coloração de picrossírius.....	32
Fig. 4 – Quantificação de mastócitos.....	34
Fig. 5 – Microscopia de luz de pele corada com AT.....	35
Fig. 6 – Quantificação de vasos sanguíneos (HE).....	36
Fig. 7 – Análise de vasos sanguíneos em lâminas coradas com HE.....	37
Fig. 8 - Dosagem de hemoglobina.....	38
Fig. 9 – Quantificação da taxa de proliferação celular no epitélio em região da lesão.....	39
Fig. 10 – Imunocitoquímica da proliferação.....	40
Fig. 11 A – Análise do infiltrado de células inflamatórias na região da ferida. A (acúmulo de neutrófilos).....	41
Fig. 11 B – Análise do infiltrado de células inflamatórias na região da ferida. B (acúmulo de macrófagos).....	42
Fig. 12 – Imunocitoquímica para MMP 2 e 9.....	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Pele.....	11
1.2 Reparo	14
1.3 Curativos	17
2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 MATERIAL E METODOS	22
4.1 Análise Morfológica	23
4.2 Imunocitoquímica	24
4.3 Determinação do conteúdo de hemoglobina	24
4.4 Avaliação da atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	25
4.5 Avaliação da atividade N- acetilglicosaminidase (NAG)	26
4.6 Análise estatística	27
5 RESULTADOS.....	28
5.1 Morfologia.....	28
5.2 Quantificação do colágeno.....	30
5.3 Quantificação de mastócitos.....	33
5.4 Avaliação da angiogênese	36
5.5 Quantificação da proliferação celular	38
5.6 Avaliação da inflamação.....	41
5.7 Análise da presença de MMPs	43
6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pele

A pele é o maior órgão humano e uma das formas de uma interface única e fascinante entre o mundo exterior e o mundo interior. Suas dimensões são variáveis, sendo que no indivíduo adulto, mede em torno de 2,0 m² e apresenta um peso que oscila entre 8,0 e 10,0 Kg (HADGRAFT, 2004). Além da função de revestimento, este órgão exerce outras funções importantes como: proteção contra desidratação, danos e invasões bacterianas, promove excreção através de glândulas sudoríparas e sebáceas, também faz a absorção de radiação ultravioleta do sol necessária para a síntese de vitamina D, além da recepção de sensações vindas do meio ambiente e é fundamental para a regulação da temperatura corporal (GARTNER & HIATT, 1999).

É composta por três camadas distintas: a epiderme (de origem ectodérmica), a derme (origem mesodérmica) e o tecido celular subcutâneo ou hipoderme, que embora possua a mesma origem embriológica da derme, não participa da composição da pele, atuando neste sistema apenas como suporte e união da pele com os órgãos subjacentes (STERNBERG, 1997; BORANIC et al., 1999).

A epiderme (de origem ectodérmica) é um tecido de proteção por possuir grande estabilidade estrutural e resistência química. Pode ser dividida microscopicamente em cinco camadas ou estratos: camada basal ou germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea, onde seus principais tipos celulares são os queratinócitos, os melanócitos (estes responsáveis pela pigmentação da pele), as células de Merkel e as células de Langherans (STRAUSS & MATOLTSY, 1981; SNELL, 1985; GARTNER & HIATT, 1999).

A camada germinativa ou basal contém células basais de morfologia cilíndrica, com núcleos grandes, alongados e ovais e apresentam citoplasma basófilo. As células basais servem de suporte à epiderme através da união célula-célula por junções celulares denominadas desmossomos, principalmente. Os queratinócitos são as células, que garantem a sua renovação, e sofrem constantes modificações em sua morfologia e em seus aspectos biológicos, durante a diferenciação epidérmica. É a partir da camada basal que eles se movem e na camada córnea constituem, por fim, estruturas multilamelares de corneócitos anucleados, circundados por lipídeos e proteínas extracelulares. (WATT, 1988; ECKERT *et al.*, 1997; URMACHER, 1997; BORANIC *et al.*, 1999; TAUBE & TAÏEB, 2000).

Os melanócitos também presentes na camada basal, possuem natureza dendrítica, e tem como função produzir a melanina, outrossim, são responsáveis pela pigmentação da pele, a qual é produzida e posteriormente transferida aos queratinócitos (WATT, 1988).

As Células de Langherans apresentam função, notadamente, imunológica, com atuação no processamento primário de antígenos exógenos que afetam a pele. Já as células de Merkel, que estão associadas a nervos cutâneos, desempenham um papel na sensibilidade. (GAWKRODGER, 2002; KEDE & SABATOVICH, 2004).

Acima da camada basal tem-se a espinhosa, sendo constituída por células poliédricas ou ligeiramente achatadas, de núcleo central com pequenas expansões citoplasmáticas que contêm tonofibrilas partindo de cada uma das células adjacentes. São estas expansões que mantêm as células unidas através dos desmossomos, e conferem aos queratinócitos uma morfologia espinhosa, daí o nome da camada (GUIRRO & GUIRRO, 2002). A camada granulosa é caracterizada pela presença de células poligonais achatadas de núcleo central e citoplasma contendo grânulos basófilos de querato-hialina, os quais não são envolvidos por membrana, e contribuirão para a formação do material citoplasmático inter-filamentoso da camada córnea. A camada lúcida é constituída por células achatadas, eosinófilas, hialinas, cujos núcleos e organelas citoplasmáticas foram digeridos por enzimas dos lisossomos e assim, desapareceram. Superficialmente a camada córnea tem espessura variável de acordo com a área anatômica, sendo formada por células epidérmicas anucleadas que vão se ligando através de filamentos de queratina, uma proteína fibrosa sendo denominada então de células corneificadas (GUIRRO & GUIRRO, 2002).

A região da pele situada mais abaixo da epiderme é chamada de derme, basicamente é formada por três camadas de limites não muito distintos: superficial ou papilar, adventicial, e profunda ou reticular (HUANG *et al.*,1998) sendo constituída geralmente por tecido conjuntivo denso não modelado com muitas fibras de colágeno tipo I e redes de fibras elásticas responsáveis pela sustentação da epiderme e fixação da pele à hipoderme subjacente(HUANG *et al.*,1998; PROST-SQUARCIONI, 2008). É também na derme que se

situam os anexos epidérmicos (PROST-SQUARCIONI, 2008). A derme superficial ou papilar é formada por tecido conjuntivo frouxo com fibras de colágeno tipo III frouxamente entrelaçado, fibras elásticas, fibrilas de ancoragem (colágeno tipo VII) ligando a epiderme à derme e alguns capilares responsáveis pela regulação térmica corporal (GAWKRODGER, 2002).

Ao redor dos folículos pilosos, das glândulas e dos vasos sanguíneos e linfáticos se nota a presença da derme adventicial com estrutura idêntica à derme superficial. E por fim, a derme profunda ou reticular é mais espessa e se estende até a hipoderme. É composta por feixes colagênicos do tipo I espessos e dispostos paralelamente à superfície epidermal, sendo considerada um tecido conjuntivo denso não modelado (GAWKRODGER, 2002).

Nesta camada é onde estão situadas as estruturas anexas da pele como: glândulas sudoríparas e sebáceas, folículos pilosos e algumas células musculares lisas, incluindo o músculo eretor do pelo, e alguns mecanorreceptores como corpúsculo de Pacini, Ruffini, Meissner e de Krause (GARTNER & HIATT, 1999; SAMPAIO & RIVITTI, 2001).

Com relação ao componente celular típico deste tecido conjuntivo tem-se o fibroblasto, célula responsável pela síntese de colágeno, proteoglicanos e, também, das fibras elásticas, exemplos de macromoléculas da matriz extracelular (MEC), sendo que esta célula é também muito ativa nos processos de reparo após uma injúria ao tegumento (KEDE & SABATOVICH, 2004)

Abaixo da derme existe um arcabouço de sustentação que inclui o tecido celular subcutâneo de espessura variável composto de células adiposas, arredondadas e grandes, que contém grande quantidade de lipídeos em seu citoplasma e distribuem-se em lóbulos subdivididos por traves conjuntivo-vasculares. Conecta-se frouxamente à pele e à fáscia dos músculos subjacentes, o que permite aos músculos contraírem-se sem repuxar a pele (HADGRAFT, 2004).

1.2 Reparo

Entre a maioria dos problemas médicos gerais encontram-se o traumatismo dos tecidos com suas sequelas e agravantes, e toda vez que acontece uma lesão tecidual, esta perda é reparada através de uma série de eventos que levará a formação de uma cicatriz (DIEGELMANN & EVANS, 2004).

Se a ferida é uma solução de continuidade em um tecido que anteriormente se achava íntegro, a cicatriz é a tentativa do organismo reparar o defeito criando um tecido que funciona como um elo entre as duas bordas afastadas da ferida, sendo que a principal função da cicatrização é reconstituir os tecidos da forma mais fisiológica (ARAÚJO, 1997).

Quando lesada, a pele se repara através da proliferação e crescimento das células da derme (fibroblastos e outras células estromais) e/ou epiderme (queratinócitos e melanócitos) remanescentes (JANSSON *et. al.*, 2001). Subsequentemente, depois de um período de algumas horas, a camada da epiderme começa a reparar pela migração dos queratinócitos que agem a partir das bordas de corte da ferida ou cotos de amputados ou de quaisquer apêndices danificados, tais como os cabelos ou as glândulas sudoríparas, onde existem novas bordas livres da epiderme (JANSSON *et. al.*, 2001).

O tecido conjuntivo lesado é substituído por fibroblastos ativados que migram da ferida partir da sua proliferação, com a finalidade de formar tecido de granulação (assim chamado devido à sua aparência granular, fato que ocorre em decorrência da enorme invasão angiogênica, que se desenvolve por uma rede de vasos sanguíneos capilares, que nutrem metabolicamente a ferida com nutrientes e oxigênio). Alguns desses fibroblastos dentro deste tecido de granulação podem se transformar em miofibroblastos contráteis, o que pode

contribuir para a contração da ferida. Após o término do reparo, os vasos regridem, os miofibroblastos podem morrer, resultando na reparação total dos tecidos (BALBINO & PEREIRA, 2005).

O processo de reparo é complexo e depende de uma série de processos celulares coordenados, sendo que didaticamente, pode ser dividido em três fases, que se sobrepõem: inflamatória, proliferativa e remodelamento (MOYER *et al.*, 2001; GURTNER *et al.*, 2008).

Cada fase é caracterizada por passos celulares específicos e eventos bioquímicos. A duração dessas fases pode variar conforme a localização e a extensão da lesão ou doença que acomete o tecido (WOO *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2004; MIDWOOD *et al.*, 2004; LUO & CHEN, 2005; SHARMA & MAFFULLI, 2005). Todas essas fases compreendem uma série de eventos que incluem coagulação sanguínea, inflamação, formação de um tecido de granulação, apoptose de células inflamatórias, neovascularização e síntese de colágeno (SINGER & CLARK, 1999). Na fase inflamatória do primeiro ao sétimo dia pós-injúria, os macrófagos e outras células fagocitárias, como eosinófilos e neutrófilos, removem os fragmentos de substâncias não-colagênicas intercelulares e as fibras de colágeno degeneradas pela ruptura (MARSOLAIS *et al.*, 2001). Com a ruptura das fibras de colágeno é detectada a deposição de fibrina-fibronectina, moléculas estas que estabilizarão a nova MEC a ser sintetizada e também atuam como uma rede para a migração e adesão celular (MIDWOOD *et al.*, 2004). À medida que ocorre a deposição de fibroblastos na malha de fibrina e neovascularização, alguns destes fibroblastos são estimulados a se diferenciarem em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida, reduzindo o seu tamanho (ARAÚJO, 1997).

Após a fase inflamatória, tem-se o início da fase proliferativa, em cerca de 10-14 dias. Estudos de microscopia eletrônica, nesta fase proliferativa, mostraram aumento do retículo endoplasmático dos fibroblastos, que é um indicativo da atividade de síntese de matriz

extracelular, além disso, o conteúdo de DNA e colágeno tipo III apresentam-se em concentrações elevadas durante esse processo reparativo. Acredita-se que essas mudanças auxiliam na síntese de colágeno e na gradual substituição do colágeno tipo III pelo tipo I (JÓZSA e KANNUS, 1997).

A fase de remodelação é vista após a fase proliferativa. É uma fase de longa duração, que começa por volta do vigésimo primeiro dia e pode se estender a um ano ou mais dependendo do tipo da lesão (HOUGLUM, 1992; WOO *et al.*, 1999). Nesta fase a matriz torna-se mais densa e longitudinalmente orientada (LIN *et al.*, 2004; SHARMA & MAFFULLI, 2005). A reepitelização da superfície é o objetivo final do processo de reparo, iniciando-se já nas primeiras 24 a 36 horas. As células epiteliais migram a partir das bordas da ferida e dos folículos pilosos próximos, contribuindo para a contração e reduzindo sua superfície. Após a cobertura da superfície cutânea, as células amadurecem e diferenciam-se em queratinócitos (ARAÚJO, 1997).

Como já mencionado, a cicatrização é um processo altamente dinâmico que envolve interações complexas de moléculas da MEC, mediadores solúveis e vários tipos de células, as quais interagem e se comunicam por sinais químicos, para aperfeiçoar o processo de reparo (DIEGELMANN & EVANS, 2004).

Dentre essas interações complexas existe a presença de algumas enzimas como as metaloproteinases de matriz (MMPs), que incluem collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, capazes de degradar os componentes estruturais da MEC (PARKS, 1999; RAVANTI & KAHARI, 2000). Entre outras funções, as MMPs promovem a degradação e modificação de proteínas da matriz extracelular no sítio da ferida, facilitando a migração celular (PARKS, 1999). Outras substâncias de extrema importância neste processo são as citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α que são mediadores

fundamentais durante diferentes processos inflamatórios cutâneos (HÜBNER *et al.*, 1996; WERNER & GROSE, 2003).

Ainda o fechamento da ferida pode ser: por primeira, segunda ou terceira intenção. O processo através do qual uma ferida é imediatamente reaproximada ou suturada, demandando um tempo mínimo para seu fechamento, denomina-se de síntese por primeira intenção. A cicatrização por segunda intenção, ou secundária é aquela que demanda uma reposição tecidual maciça, com estímulo máximo das respostas fisiológicas e formação de tecido de granulação e, ainda, reepitelização e contração da ferida. Quando uma ferida é temporariamente mantida aberta, sendo fechada mais tarde, usualmente de quatro a sete dias, com aproximação ou sutura, é denominada de fechamento por terceira intenção, ou terciário (SIMÕES, 1988; LAWRENCE, 1995; ARAÚJO, 1997; GONÇALVES & PARIZOTTO, 1998).

1.3 Curativos

O tratamento de uma ferida e assepsia cuidadosa tem como principais objetivos a prevenção e/ou redução dos riscos de infecções, a eliminação de fatores desfavoráveis que possam retardar o processo de cicatrização, bem como a diminuição da probabilidade da ocorrência de infecções cruzadas pelo uso de técnicas e procedimentos corretos.

Com a finalidade de se diminuir o tempo de cicatrização, existem no mercado inúmeros curativos químicos e biológicos, dentre os quais se destacam os curativos convencionais, hidrogéis, hidrocolóides, polímeros, bioativos, enzimas proteolíticas, curativos antiodor e filmes adesivos, para uma variedade de lesões de pele (CANDIDO, 2001). Entretanto, ainda o uso destes curativos é controverso e o ideal é a utilização de um material

que diminua o período de tempo e evolua para uma boa cicatrização, e concomitantemente seja viável economicamente ao paciente.

Primeiramente, o tratamento de feridas de pele, necessita da aplicação de uma droga antimicrobiana, como por exemplo, a sulfadiazina de prata, um fármaco amplamente utilizado nas mais diferentes lesões cutâneas. Este fármaco é um antibiótico que elimina bactérias, pois inibe a produção de ácido fólico no interior das mesmas, contudo em relação ao seu poder na cicatrização ainda existem controvérsias (MILLER *et al.*, 2010). Outros agentes tópicos têm sido propostos em lesões como uma nova pomada lançado no mercado a base de confrei (*Symphytum officinale*). O extrato de raiz de *Symphytum officinale* possui efeito anti-inflamatório, analgésico e redutor de edema, bem como se mostrou capaz de promover regeneração e granulação tissular (KOLL & KLINGENBURG, 2002).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de infecções da pele é muito comum em muitas áreas rurais e em regiões subdesenvolvidas (NAIDOO & COOPOOSAMY, 2011) e, conforme a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011), cerca de 70% a 95% da população dos países em desenvolvimento baseia-se principalmente em plantas medicinais para os seus cuidados primários de saúde.

Estas plantas são muito procuradas para tratar doenças dermatológicas, isso devido a sua capacidade de parar o sangramento e acelerar a cicatrização de feridas, Além disso, há o aumento da demanda por medicamentos mais baratos e mais acessíveis para o uso em populações de baixo poder aquisitivo. Tais regimes de tratamento são menos dispendiosos e onerosos para os governos, e o uso quase sempre, é baseado no amplo conhecimento e experiência das comunidades locais e tem como vantagem já estarem disseminadas (SHAI *et al.*, 2008; RUA *et al.*, 2008).

Existem muitas espécies de plantas como o *Symphytum officinale* e outras tantas que inclusive já foram direcionadas para comercialização (GEORGE *et al.*, 2001; VAN WYK

2008a; VAN WYK 2008b; VERMAAK *et al.*, 2011), contudo, ainda não foram adequadamente estudadas com a devida profundidade científica. Carecem ainda de comprovações histológicas, imunológicas, fotoquímicas, análises toxicológicas e eficácia farmacológica para que a aplicação dessas plantas medicinais seja liberada para uso em lesões de pele.

As plantas medicinais utilizadas para fins de tratamento dermatológico e em cirurgia plástica, conhecidas da cultura popular e aproveitadas pela indústria de cosméticos, estão angariando valor e adeptos, visto que muitos produtos para a pele estão sendo suplementados com extratos de plantas, portanto, torna-se necessário e essencial a investigação destas plantas para que se possam identificar as lacunas ainda não preenchidas, com a finalidade de se estabelecer novas diretrizes para a sua comercialização.

Após uma análise bibliográfica mais aprofundada da literatura médica, especializada no tema versado por este trabalho, pode-se aferir que mais de 100 (cem) espécies de plantas com aplicação medicinal dermatológica e em cirurgia plástica foram identificadas como sendo relevantes para a medicina atual.

Notadamente, no tratamento de queimaduras e de úlceras se obteve o maior percentual de utilização das plantas medicinais pesquisadas. No entanto, pouca atenção tem sido dispensada à utilização de plantas medicinais para o tratamento tópico de lesões de maneira geral e suas propriedades anti-inflamatórias (10%).

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Tanto o corpo humano, como o de outros animais, é recoberto por pele, que além de desempenhar o papel de barreira aos ataques externos, ainda é responsável pela regulação da temperatura corpórea e pela remoção de impurezas. Desta forma, qualquer lesão cutânea, além de causar danos físicos, mecânicos e térmicos superficiais, pode também afetar as funções fisiológicas de tecidos e órgãos internos. Apesar da diversidade de materiais destinados ao tratamento de feridas cutâneas no mercado, normalmente o custo do tratamento é bastante elevado, principalmente devido ao custo dos curativos e à necessidade de sua frequente reaplicação, além de resultados controversos relatados na literatura a respeito de diferentes fármacos. Sendo assim, um dos grandes desafios da pesquisa na área de reparo e cicatrização de pele consiste na investigação e aplicação de fármacos de baixo custo e de fácil acesso e manipulação por parte dos pacientes.

Desta maneira, este trabalho almeja proporcionar uma análise mais aprofundada e com conteúdo científico do *Symphytum officinale* (confrei) utilizada amplamente pela cultura popular por suas propriedades cicatrizantes, anti-inflamatórias e curativas no tratamento dermatológico (CARRICONDE, 1997), comparando também com agentes amplamente utilizados como a sulfadiazina de prata a 1% (FIGUEIRA & SILVA, 2001) que é um composto apresentado na forma de um creme alcalino hidrossolúvel, de fácil aplicação, de baixo custo, pouco dolorosa, sendo muito utilizada em tratamento de queimaduras e possui baixíssima toxicidade (PAOLIELLO JÚNIOR, 1982).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a MEC e o nível de organização da pele de ratos após 03(três) e 07(sete) da lesão cutânea, e tratamento com dois fármacos presentes no mercado.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar histologicamente a influência dos dois fármacos utilizados tanto na pele saudável como na lesão cutânea provocada.
2. Quantificar o nível de angiogênese, mastócitos, macrófagos e neutrófilos nos animais lesionados tratados e não tratados com os medicamentos de uso tópico.
3. Analisar a organização da MEC em todos os grupos experimentais.
4. Quantificar colágeno nos espécimes tratados e compará-los aos controles.
5. Quantificar através de Imunocitoquímica a presença de MMP-2 e MMP-9, nos diferentes grupos, e a taxa de proliferação celular.

4 MATERIAL E METODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo 083/11. Os animais utilizados foram ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos com idade de 9 semanas. Os animais tiveram livre acesso a água e ração, sendo mantidos num ciclo de 12 horas de claro/escuro somando no total 36 ratos sendo estes divididos em 6 grupos (6 cada):

- Grupo1(CO): grupo de animais com lesão cutânea sem tratamento sacrificados após 3 e 7 dias após a injúria.
- Grupo2(S): animais lesionados e tratados topicamente com a pomada de sulfadiazina de prata, por 3 e 7 dias, com aplicações diárias.
- Grupo 3 (CF): animais lesionados e tratados topicamente com a pomada de Confrei, por 3 e 7 dias, com aplicações diárias.

Para o tratamento das lesões os fármacos utilizados foram as pomadas de sulfadiazina de prata 1% e a de confrei. Estes dois cremes foram topicamente aplicados nos ratos em torno de 1g por curativo, a partir do momento da lesão, até o dia do sacrifício, de acordo com os grupos já estabelecidos acima.

Nos procedimentos cirúrgicos para estabelecimento da lesão cutânea no dorso do rato, assim como para a aplicação diária dos fármacos os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (5mg/kg). O dorso de cada animal foi tricotomizado e foram feitas 4 incisões, divididas em lados direito e esquerdo. Para confecção da ferida utilizamos um molde de cerca de 1,5 cm de diâmetro, composto em cartolina e aplicada sobre a pele do rato. A incisão ocorreu através de tesoura cirúrgica pequena, e

abrangeu a pele e a tela subcutânea, se aprofundando até a fáscia muscular. Para padronização das feridas, as mesmas foram realizadas pelo mesmo investigador. Posteriormente, as lesões foram lavadas com solução salina e secas com gaze, para retirar o sangue e evitar a formação de coágulos. Logo após este cuidado os fármacos, já expostos acima, foram aplicados, e reaplicados nos dias seguintes, até o dia do sacrifício. Depois de aplicarmos os tratamentos, foi passada uma bandagem nas lesões para garantir que os fármacos não fossem retirados pelos animais. Os animais foram sacrificados após 3 e 7 dias pós injúria, e a pele foi retirada para as análises. O sacrifício dos ratos ocorreu por aprofundamento da anestesia em doses letais.

4.1 Análise Morfológica

Após a dissecação, as peles foram fixadas em solução de para formaldeído 4% durante 24 horas em geladeira. Em seguida as peças foram processadas para rotina em parafina (Histosec). Foram realizados cortes longitudinais com 5 μ m de espessura, em micrótomo rotativo (MICROM/HM-315). Para visualização geral do tecido os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) (Kiernam, 1981). Para detecção de mastócitos foi utilizado Azul de Toluidina (AT) 0,25 % em tampão MacIlvaine pH 4,0 (Mello & Vidal, 1980). Alguns cortes foram corados também com picrossirius para análises quantitativas de colágeno.

Para quantificação de vasos sanguíneos foi utilizado lâminas coradas por HE. Foram utilizados 3 animais por grupo (1 lâmina de cada animal), e em cada lâmina foram contados vinte campos visuais, utilizando a objetiva de x 40. As observações e documentações foram feitas em microscópio acoplado com sistema de captura de imagens

A análise estatística foi realizada através dos testes U de Mann Whitney e t de Student para dados não-paramétricos e paramétricos respectivamente, assumindo-se um nível de significância de $p < 0,05$ (*).

4.2 Imunocitoquímica

Os ensaios de Imunocitoquímica avaliaram a distribuição e a presença de MMP-2 e MMP-9, e também o nível de proliferação celular. Para isso, as peles foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS. Posteriormente, foi realizado o bloqueio de interações inespecíficas de proteínas através de soro normal de cabra (10% em PBS) por 1 hora. Os anticorpos primários: rabbit anti-condroitim-sulfato (Santa Cruz), mouse anti-MMP-2 (Santa Cruz) e mouse anti-MMP-9 (Abcam) serão incubados nas lâminas a 4°C overnight, segundo diluição recomendada pelos fabricantes. A reação foi revelada através da incubação com os anticorpos Mouse and Rabbiton Rodent Polymer conjugado com peroxidase (Biocare) por 45 min em temperatura ambiente. Em seguida, a peroxidase foi revelada com diaminobenzidina em tempo e concentração que foram padronizados para cada anticorpo. As células positivas para cada um dos anticorpos utilizados foram quantificadas para determinação de frequência relativa. Um mínimo de 10000 células por grupo foi contado em objetiva de 40 vezes. Os controles negativos das reações foram adquiridos através da omissão da incubação com anticorpo primário.

4.3 Determinação do conteúdo de hemoglobina

A dosagem de conteúdo de hemoglobina nas feridas foi realizada utilizando-se o método de reagente de Drabkin desenvolvido em 1932 e adaptado como índice de vascularização por Plunkett e Hailey (1990) e Hu *et al.* (1995).

Cada amostra foi homogeneizada (Tekmar TR-10, Ohio, USA) em 2 mL de um reagente cromogênico específico para hemoglobina (reagente de Drabkin-kit de dosagem de hemoglobina Labtest) e adicionados em ependorff de 2 mL. As amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos a 12.000 rpm e os homogenatos filtrados em filtros de 0,22 µm (Millipore). Posteriormente foi realizada a leitura espectrofotométrica em comprimento de

onda de 540 nm (leitor de Elisa), utilizando-se uma placa de 96 poços. A concentração de hemoglobina de cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão conhecida (análise diagnóstica) e os resultados expressos em concentração de hemoglobina (microgramas) por miligramas de peso úmido de pele.

4.4 Avaliação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Uma das características marcantes do processo inflamatório é a presença de células, como neutrófilos e macrófagos, no sítio inflamatório. O acúmulo de neutrófilos pode ser detectado utilizando-se a enzima mieloperoxidase como um marcador quantitativo deste tipo celular. Para avaliar a atividade da mieloperoxidase utilizamos a técnica de Bradley *et al.* (1982).

Após a determinação do conteúdo de hemoglobina, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em 2 mL de tampão fosfato de sódio, pH 5,4. As amostras foram homogeneizadas em Vórtex por 30 segundos, foram transferidos 300 µL desse homogenato para microtubos (eppendorf) de 1,5 mL e acrescentados 600 µL de HTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio – Sigma) 0,5% p/v diluído em tampão fosfato pH 5,4. Após uma nova homogeneização no vórtex as amostras foram congeladas para posterior dosagem. Depois de descongeladas as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram posteriormente utilizados em ensaio enzimático. Este ensaio enzimático foi realizado em microtubos (eppendorf) de 1,5 mL, sendo a reação realizada na seguinte ordem: 100 µL de peróxido de hidrogênio 0,003% adicionando 100 µL de TMB (3,3', 5,5' – tetramethylbenzidine – Sigma) a 6,4 mM diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Merck), adicionando 200 µL do sobrenadante da amostra deixando reagir por 1 minuto cronometrado, parando a reação com a adição de 100 µL de H₂SO₄ 4M (ácido sulfúrico – Merck). Em seguida foram adicionadas 200 µL à placa de 96 poços e a leitura

espectrofotométrica feita em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em índice de MPO (absorbância de D.O./g de peso úmido de pele).

4.5 Avaliação da atividade N- acetilglicosaminidase (NAG)

A n-acetil- β -D-glicosaminidase é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. Essa enzima foi utilizada como um índice da infiltração destas células nos sítios inflamatórios através da técnica de Bailey, 1988.

Após a utilização do material para dosagem de hemoglobina, o precipitado foi ressuspenso em 2,0 mL de solução salina 0,9% com Triton X-100 (Promega) a 0,1% (gelado). As amostras foram homogeneizadas em vórtex até obter uma suspensão homogênea e, posteriormente, centrifugadas em 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a realização do ensaio enzimático.

Para o ensaio, foram adicionados 100 μ L da amostra sem duplicata a uma placa de 96 poços. Às amostras, foram adicionados 100 μ L do substrato (p-nitrofenil-n-acetil- β -D-glicosaminida – Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato pH 4,5, em seguida, incubadas a 37°C durante 30 minutos. Por último, foram adicionados 100 μ L de tampão glicina 0,2M, pH 10,6. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de Elisa, em comprimento de onda de 400nm. A atividade de NAG nas amostras foi calculada a partir de uma curva padrão de p-nitrofenol avaliada paralelamente. O p-nitrofenol é o produto cromógeno da reação entre p-nitrofenol-n-acetil- β -D-glicosaminacoma n-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG). Os resultados das leituras foram expressos em nmol.mL⁻¹ /mg de peso úmido do implante.

4.6 Análise estatística

A análise estatística será realizada através do teste ANOVA e t de Student para dados não-paramétricos e paramétricos respectivamente, assumindo-se $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

5 RESULTADOS

5.1 Morfologia

Observações da pele intacta (Fig. 1 G), corada com HE, mostraram epiderme e derme constituídas normalmente. Nas peles de todos os grupos com três dias pós-injúria (Fig. 1 **A** controle, **C** grupo tratado com sulfa, **E** grupo tratado com confrei), na região da ferida foi visto um intenso processo inflamatório com hiper celularidade. Notou-se nestas amostras um tecido de granulação, contendo células arredondadas, com núcleo proeminente e muito citoplasma, além de inúmeras hemácias e vasos sanguíneos. Nesse tecido de granulação foram observados também muitos tipos de células inflamatórias, principalmente células com morfologia semelhante a macrófagos e células mononucleares. Basicamente não foram observadas diferenças relevantes na fase inicial da inflamação em 3 em todos os grupos analisados. Ainda em 7 (Fig. 1 **B**, **D**) dias pós-injúria o aspecto visto se parece em muito com o notado para os animais com 3 dias após a lesão, contudo no grupo tratado com confrei em 7 dias pós lesão (Fig 1 **F**) a inflamação e a celularidade gradualmente diminuíram e a interface entre a matriz recém-formada e a pele original tornou-se menos distinta, indicando a recuperação do tecido lesionado.

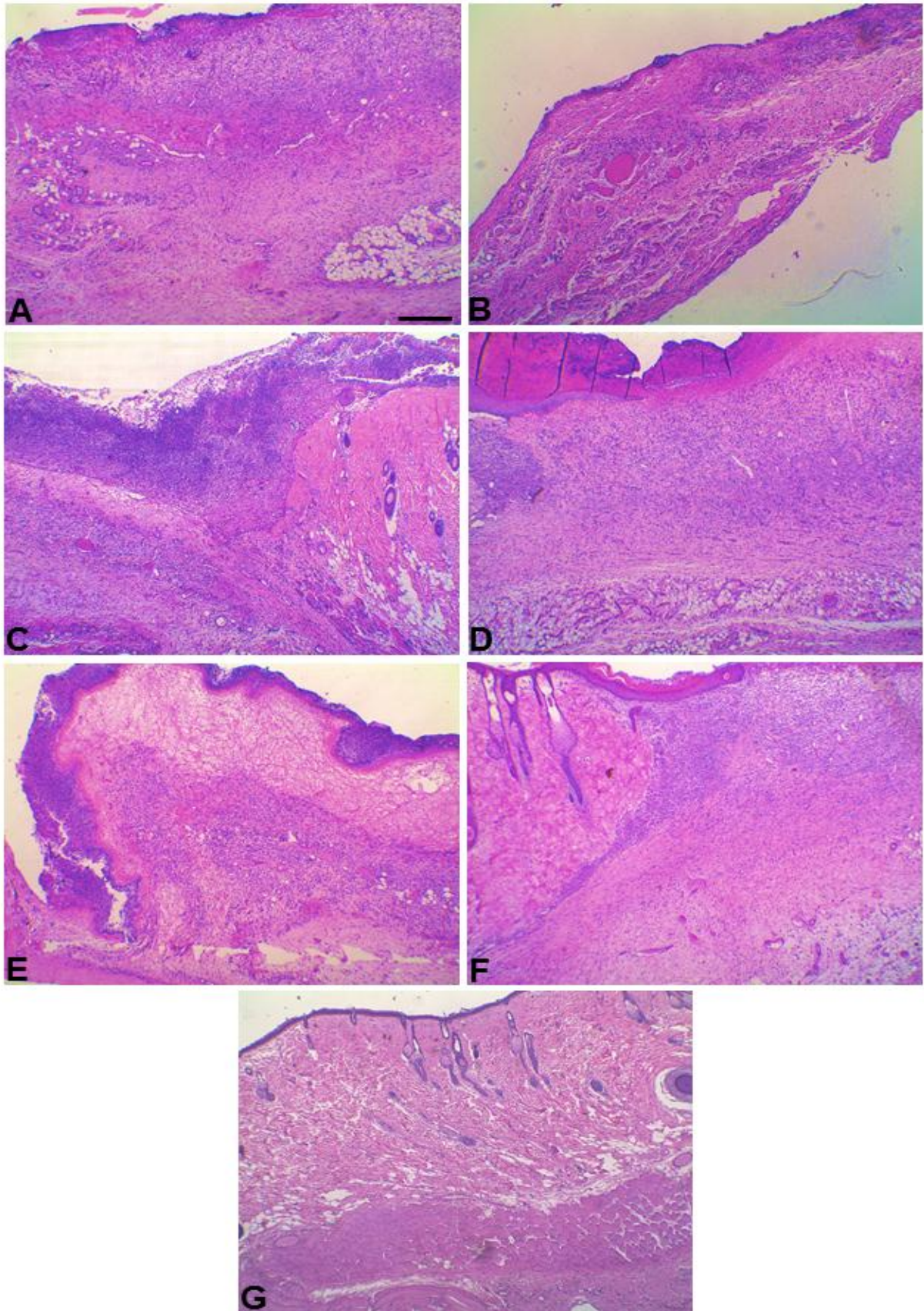


Figura 1 – Microscopia de luz de pele intacta e lesada corada com HE. Comparação da pele normal (**G**) e o processo reparativo em peles de animais não tratados (**A, B**) e tratados com sulfadiazina de prata (**C, D**) e com pomada de confrei (**E, F**), em 3 dias pós lesão (**A, C, E**) e 7 dias (**B, D, F**) dias pós-injúria. Barra: 500 μ m.

Fonte: produção do autor.

5.2 Quantificação do colágeno

O colágeno foi quantificado utilizando-se o programa Image J nas fotos retiradas, e a área da figura foi medida. Os valores para o grupo CO foram 126,07 para 3 dias e 147 para 7 dias. Para o grupo S foram 121 para 3 dias e 161 para 7 dias. Para o grupo tratado com confrei CF os valores foram 157 para 3 dias e 210 para 7 dias.

A estatística mostrou um aumento significativo de colágeno no grupo CF tanto em 3 quanto em 7 dias, comparados aos demais grupos. CO e S não apresentaram diferenças em ambos os tempos, com ou sem tratamento (Figura 2). Comparando-se os grupos corados com picrossírius, uma maior e melhor organização do colágeno foi vista no grupo CF, principalmente em 7 dias pós injúria (Figura 3), corroborando o resultado quantitativo, embora haja uma evolução para uma melhora na matriz colagênica de 3 para 7 dias pós lesão em todos os grupos analisados.

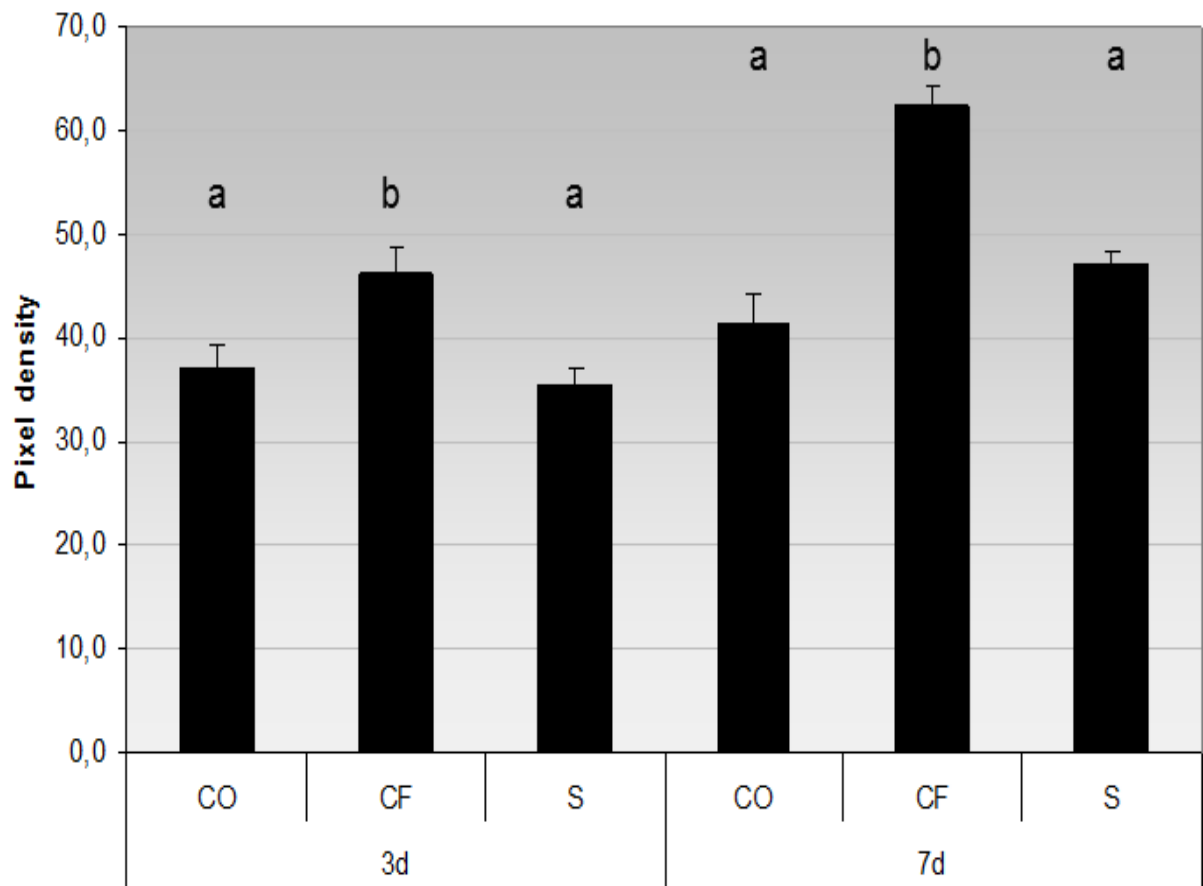


Figura 2 – Quantificação de colágeno. Somente o grupo CF, tanto em 3 quanto em 7 dias, apresentou diferenças significativas em relação ao grupo CO e ao grupo S. $b = p < 0,05$.

Fonte: produção do autor

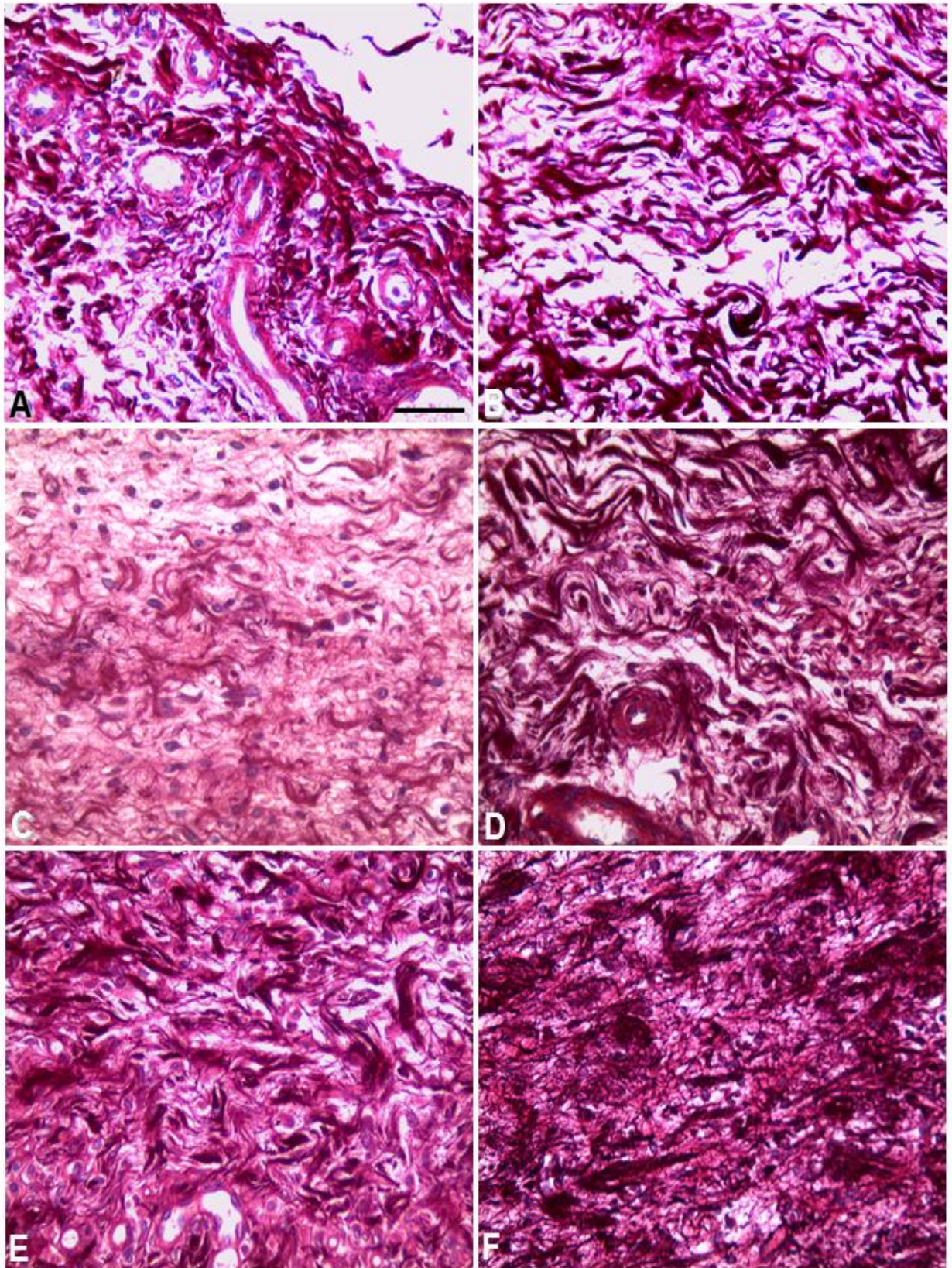


Figura 3 – Coloração com Picrosirius. Animais controle (**A, B**) e tratados com sulfadiazina de prata (**C, D**) e com pomada de confrei (**E, F**), em 3 dias pós lesão (**A, C, E**) e 7 dias (**B, D, F**) dias pós-injúria. Embora seja vista uma melhora em todos os grupos de 3 para 7 dias, a melhor organização do colágeno é vista no grupo CF em ambos os tempos de tratamento. Barra: 50 μ m.

Fonte: produção do autor.

5.3 Quantificação de mastócitos

Para a contagem de mastócitos foram utilizadas lâminas coradas em AT. Os resultados conseguidos representam os valores médios das contagens de 10 campos em cada lâmina. Para o grupo CO foi encontrada uma média de 38 células em 3 dias e 16 células em 7 dias. Para o grupo da S foi vista uma média 53 células em 3 dias de tratamento e 56 células em 7 dias de tratamento. Para o grupo CF encontramos uma média 12 células em 3 dias e 9 células em 7 dias. A região da ferida foi a região quantificada. Os resultados estatísticos mostraram que em 3 dias, o grupo CF teve uma redução significativa no número de mastócitos em relação aos demais grupos. Em 7 dias após os tratamentos, o grupo S apresentou aumento significativo na contagem de mastócitos comparados aos demais grupos, enquanto percebe-se uma diminuição nos demais grupos. Em 7 dias, o grupo CF apresentou a mesma tendência do controle na diminuição no número destas células. (Figuras 4 e 5).

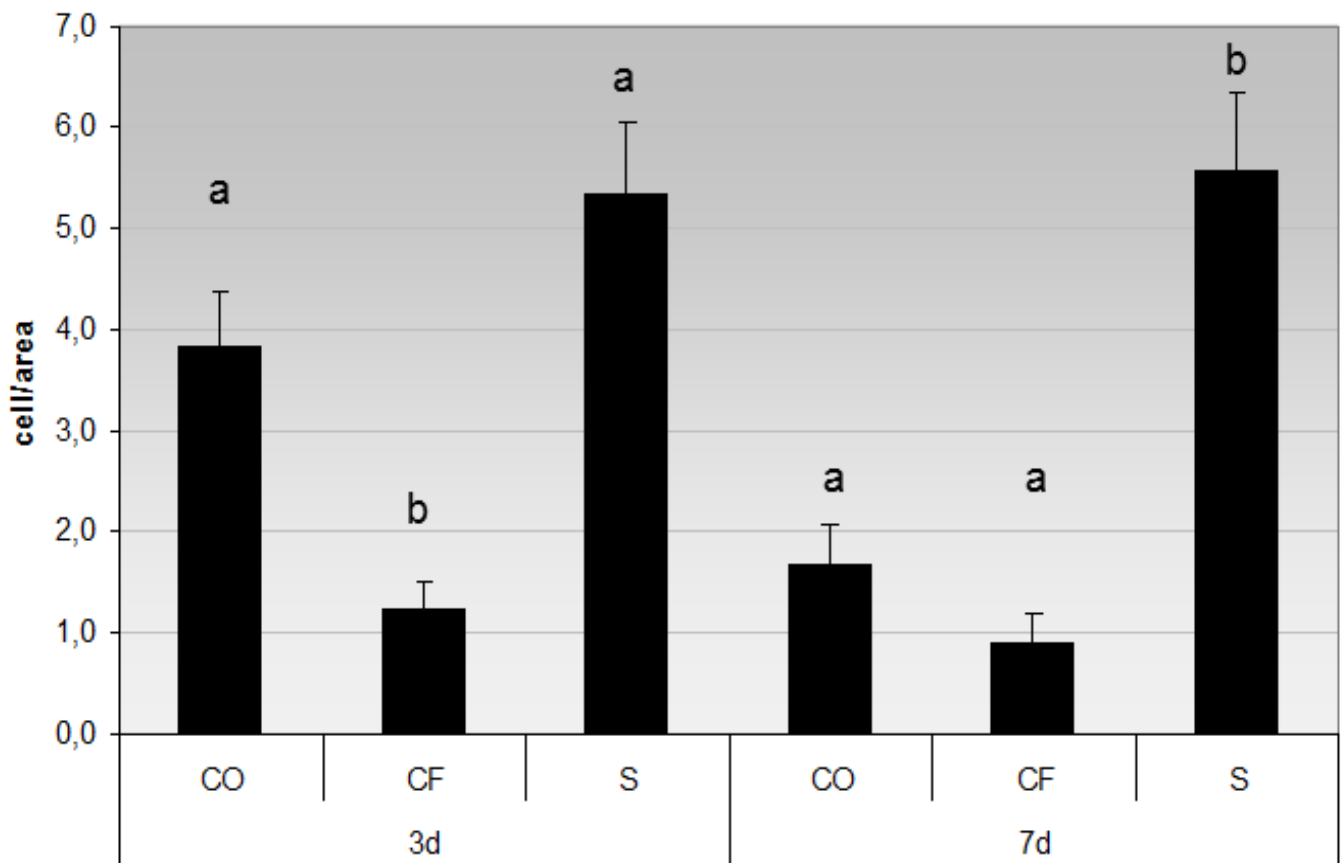


Figura 4 - Quantificação de mastócitos. Em 3 dias somente o grupo CF, apresentou uma redução significativa na quantidade destas células. Em 7 dias o grupo S apresentou um aumento significativo de mastócitos em relação ao grupo CO e ao grupo CF. $b = p < 0,05$.

Fonte: produção do autor

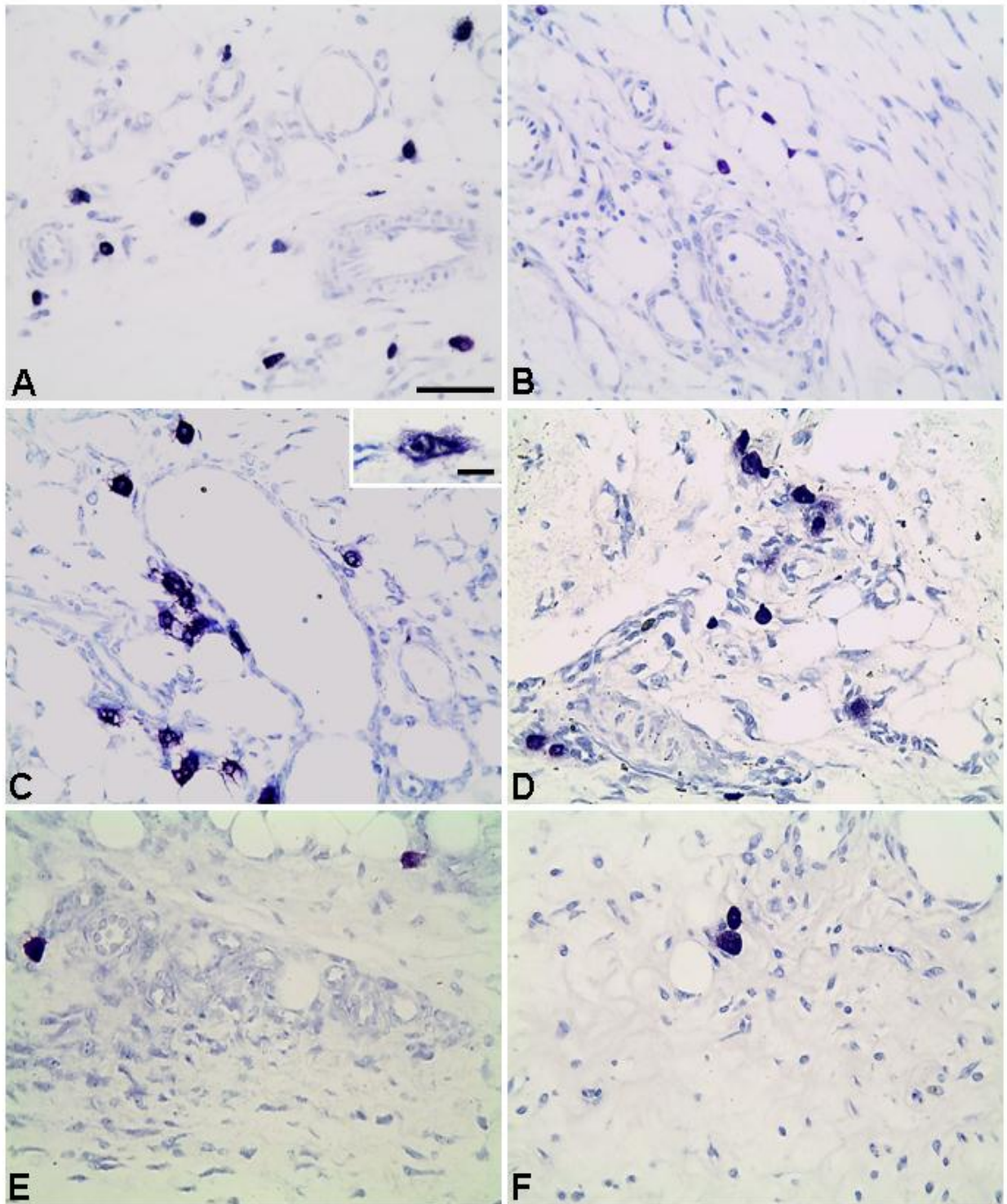


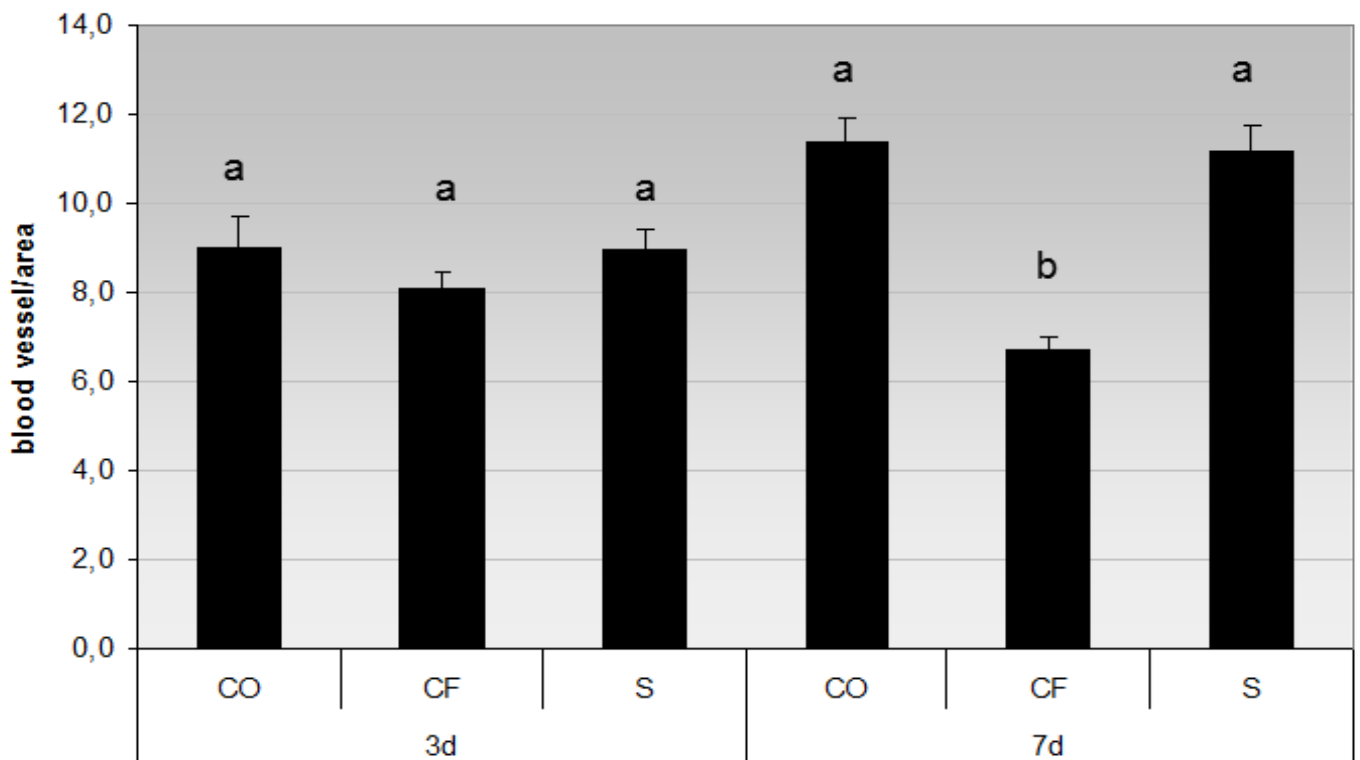
Figura 5 – Microscopia de luz de pele corada com AT. Animais controle (**A, B**) e tratados com sulfadiazina de prata (**C, D**) e com pomada de confrei (**E, F**), em 3 dias pós lesão (**A, C, E**) e 7 dias (**B, D, F**) dias pós-injúria. Barra: 50 μ m. Detalhe em **C**: barra 20 μ m, mostrando um mastócito degranulando.

Fonte: produção do autor

5.4 Avaliação da angiogênese

A avaliação da angiogênese foi realizada através da contagem de vasos utilizando-se as lâminas coradas em HE, e também através da dosagem do conteúdo de hemoglobina. A contagem de vasos representa os valores médios por campo encontrados na região da ferida das lâminas analisadas. Em 3 dias não houve diferenças significativas entre os grupos, contudo em 7 dias após a lesão o grupo CF mostrou uma redução significativa no número de vasos sanguíneos se comparado aos demais grupos neste mesmo tempo (Figura 6 e 7). Os níveis de hemoglobina em 3 dias apresenta-se igual em todos os grupos, contudo em 7 dias o grupo CF apresentou uma quantidade de hemoglobina significativamente menor se comparada aos demais grupos (Figura 8).

Figura 6 – Quantificação de vasos sanguíneos (HE). Em 3 dias não houve diferenças significativas entre os grupos. Em 7 dias somente o grupo CF, apresentou uma redução significativa na quantidade dos vasos. $b = p < 0,05$.



Fonte: produção do autor.

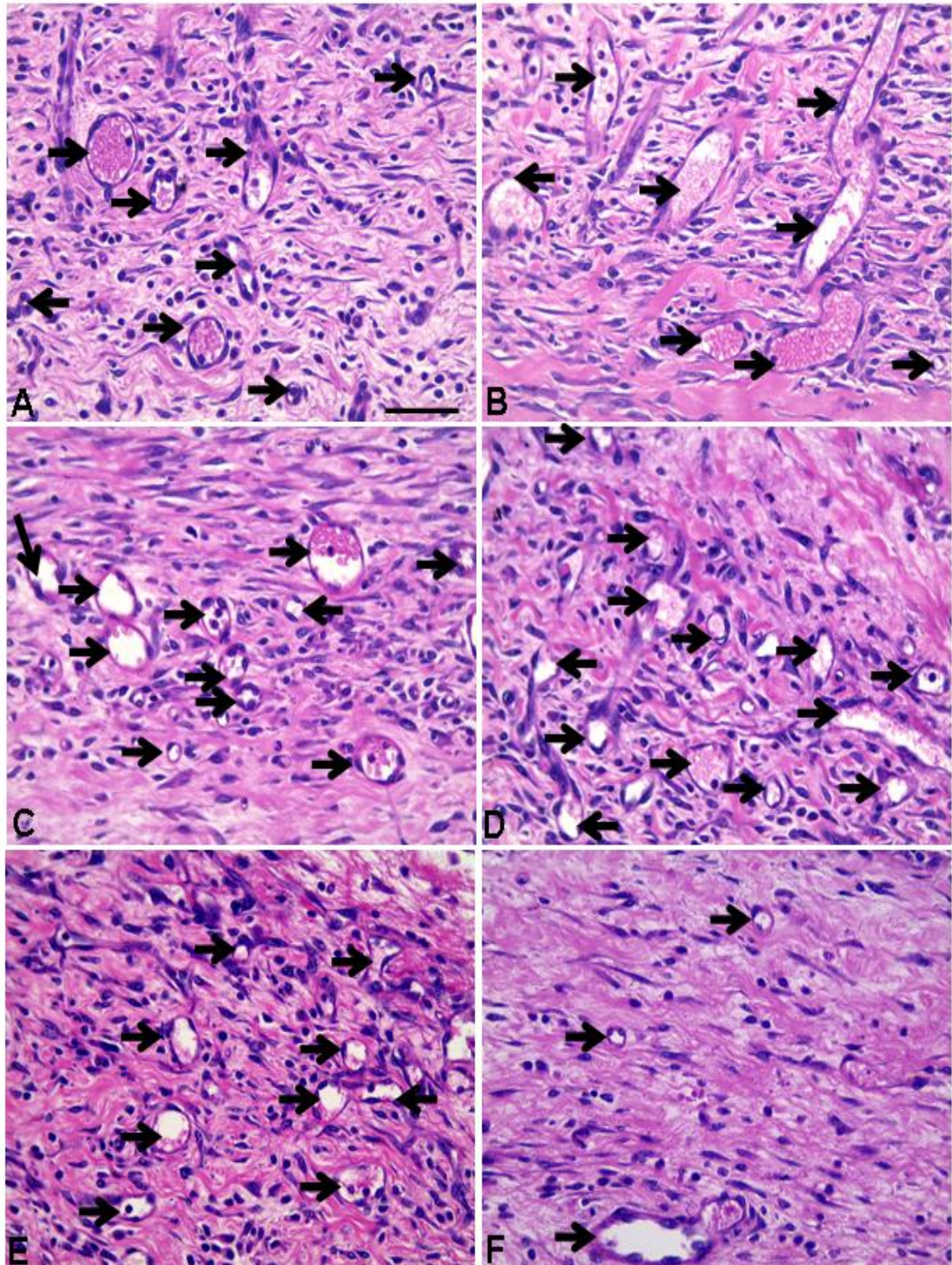


Figura 7 – Análise de vasos sanguíneos em lâminas coradas com HE. Animais controle (A, B) e tratados com sulfadiazina de prata (C, D) e com pomada de confrei (E, F), em 3 dias pós lesão (A, C, E) e 7 dias (B, D, F) dias pós-injúria. As setas indicam vasos. No grupo CF 7 dias após a injúria (F), a presença de vasos sanguíneos é bem menor se comparada aos demais grupos. Barra: 50 μ m.

Fonte: produção do autor.

0

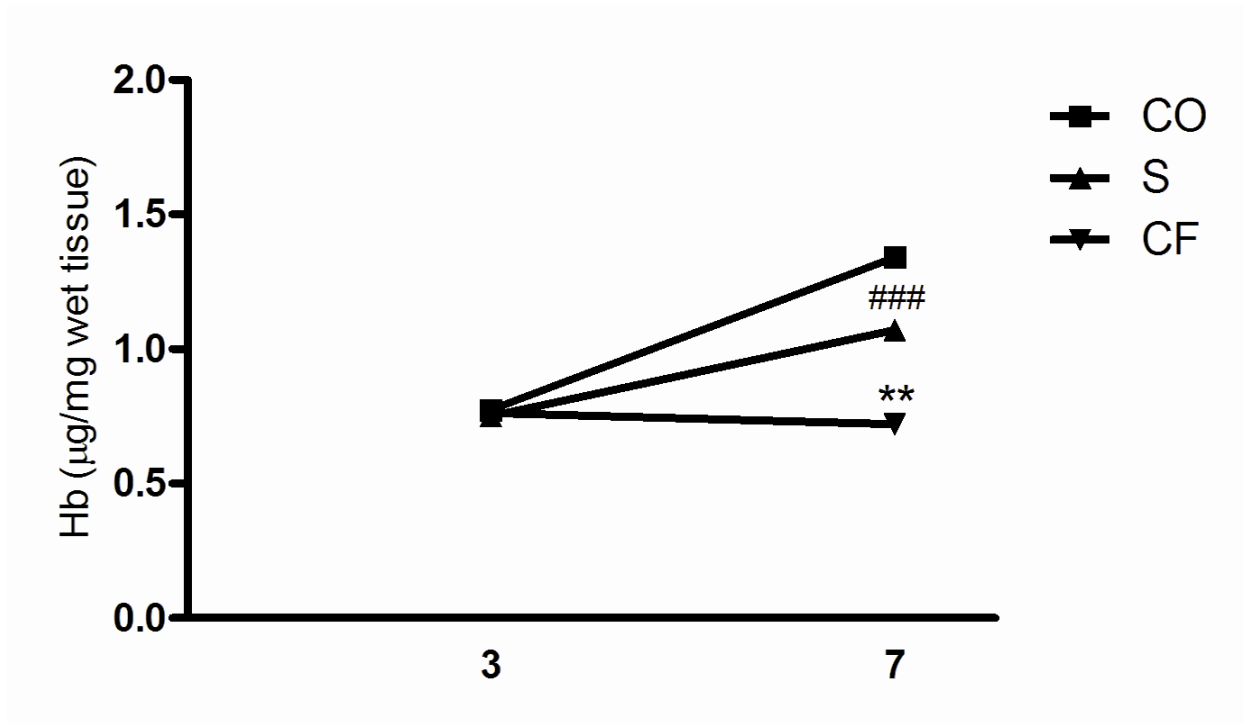


Figura 8 – Dosagem de hemoglobina. O conteúdo de hemoglobina em 3 dias é igual para todos os grupos analisados. Em 7 dias pós injúria, o grupo CF mostrou uma quantidade menor de hemoglobina se comparado ao grupo CO (*) e ao grupo S (#). ** $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$.

Fonte: produção do autor.

5.5 Quantificação da proliferação celular

Para a quantificação da proliferação celular utilizamos as lâminas da Imunocitoquímica. Foram observadas as marcações celulares tanto na epiderme quanto na derme em ambos os tempos de tratamento. Analisando-se primeiramente o epitélio ao lado da lesão, visto que as células sofrem mitose nesta região e posteriormente migram para recompor o epitélio injuriado, em 3 dias todos os grupos apresentaram a mesma taxa de proliferação celular e em 7 dias a proliferação continuou aumentada somente no grupo controle, visto que houve uma diminuição significativa desta taxa nos grupos CF e S. Quando se analisou a proliferação na região da lesão propriamente dita, tanto em 3 quanto 7 dias, a taxa

proliferativa foi maior no grupo S quando comparada aos demais grupos, e o grupo CF apresentou a mesma tendência do controle. Embora as comparações entre os diferentes grupos tenham sido realizadas dentro do mesmo tempo, é importante ressaltar que existe uma diminuição da proliferação celular, tanto em células epiteliais, quanto em células dermais, quando se observa a passagem de tempo de 3 para 7 dias (Figuras 9 e 10).

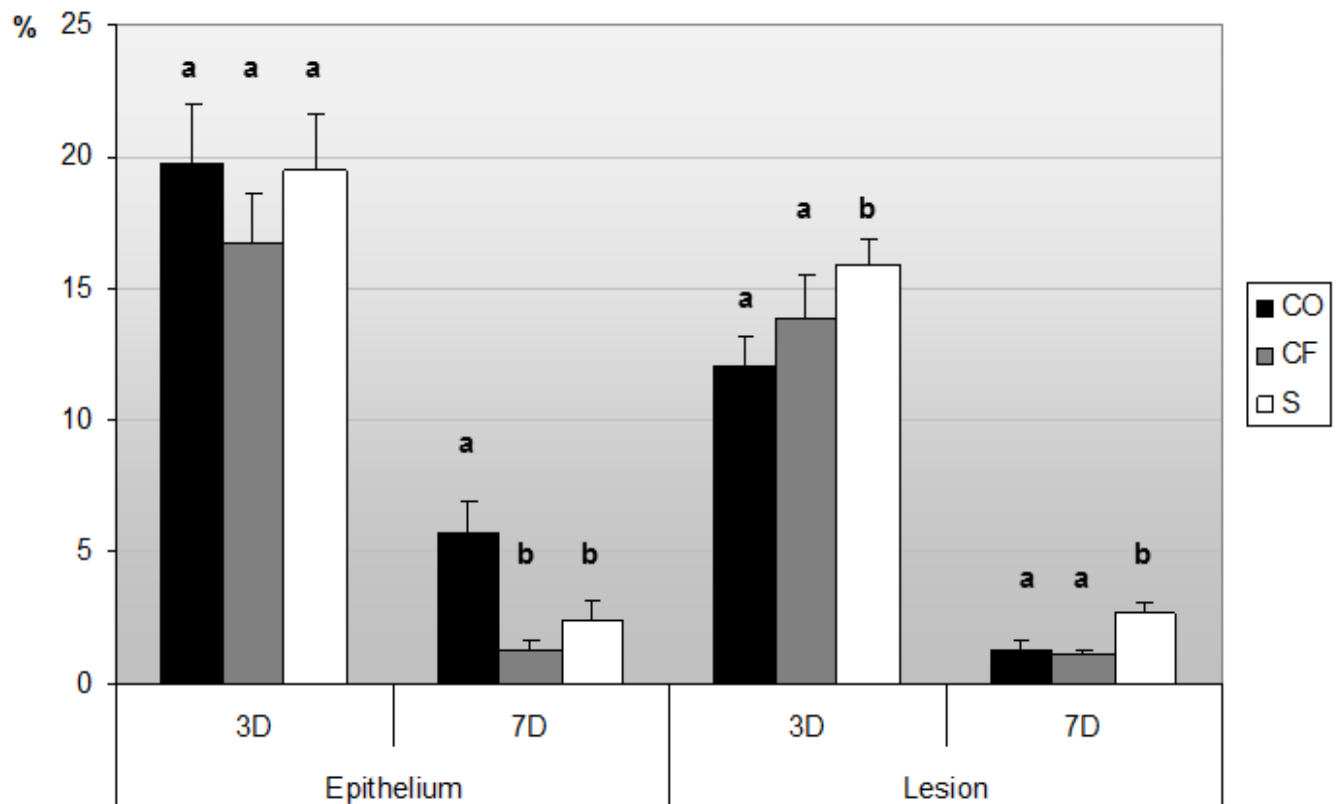


Figura 9 – Quantificação da taxa de proliferação celular no epitélio e na região da lesão. Para o epitélio, somente em 7 dias os grupos CF e S apresentaram uma redução significativa de proliferação. Na região da lesão, tanto em 3 quanto em 7 dias, o grupo S apresentou um aumento significativo na taxa proliferativa. $b = p < 0,05$.

Fonte: produção do autor.

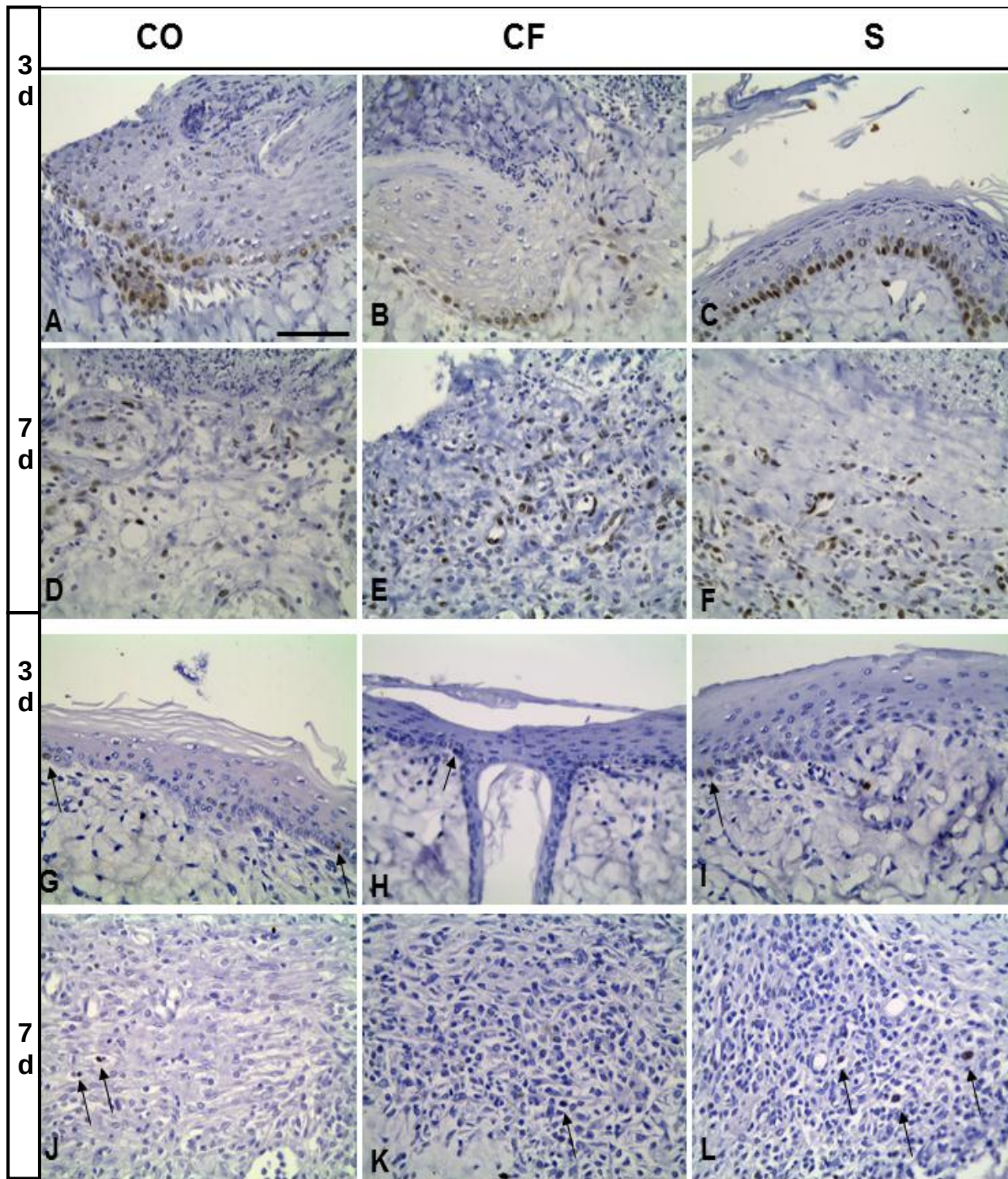
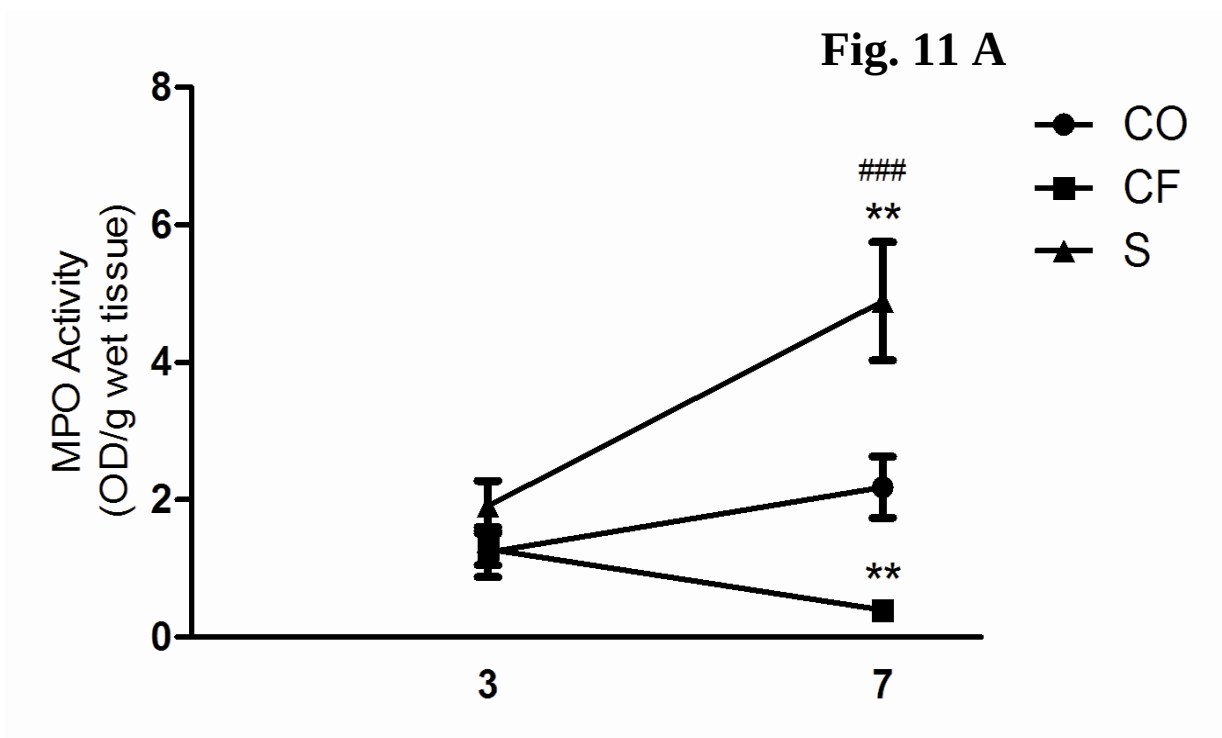


Figura 10 – Imunocitoquímica da proliferação. Representação da proliferação do epitélio em 3 dias para o grupo CO (A), CF (B) e S (C) e 7 dias para o grupo CO (G), CF (H) e S (I). Proliferação na região da ferida: 3 dias para o grupo CO (D), CF (E) e S (F), e 7 dias para o grupo CO (J), CF (K) e S (L). A marcação em marrom e as setas indicam células em proliferação. Barra: 50 μ m.

Fonte: produção do autor.

5.6 Avaliação da inflamação

Os componentes inflamatórios do tecido fibrovascular induzidos pela lesão foram determinados pela estimativa do número de leucócitos presentes na região da ferida através da avaliação das atividades das enzimas MPO e NAG. O número de neutrófilos (como atividade da MPO), em três dias pós-injúria foi semelhante em todos os grupos, em 7 dias o grupo CF apresentou redução significativa na quantidade de neutrófilos, e o grupo S apresentou considerável aumento comparado ao grupo CO e CF. Com relação ao número de macrófagos (atividade da NAG), somente em 7 dias pós lesão foram observadas diferenças entre os grupos, sendo que o grupo CF apresentou uma redução na quantidade destas células, comparado ao grupo CO e S, e o grupo S apresentou um aumento comparado ao grupo CF (figura 11 A e B).



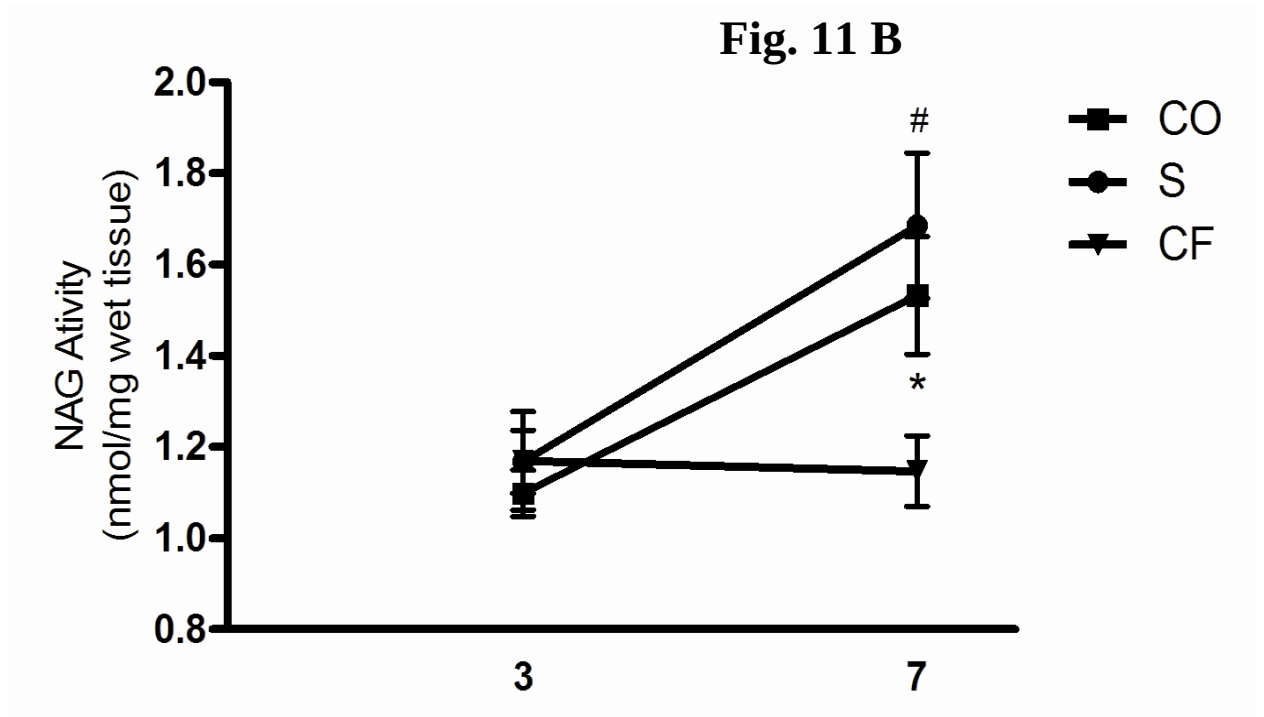


Figura 11 – Análise do infiltrado de células inflamatórias na região da ferida. A (acúmulo de neutrófilos) e B (acúmulo de macrófagos). Em A o grupo CF mostrou uma diminuição significativa da quantidade de neutrófilos e o grupo S um aumento considerável. Em B também o grupo CF mostrou uma quantidade significativamente menor de macrófagos se comparado aos demais grupos. * e # $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ### $p < 0,001$.

Fonte: produção do autor.

5.7 Análise da presença de MMPs

Para confirmar a presença de MMP 2 e 9 foi realizada a citoquímica para as mesmas. As imagens mostraram a presença de ambas as MMPs em todos os grupos analisados, embora não se tenha conseguido realizar a quantificação de tais metaloproteinases (Figura 12).

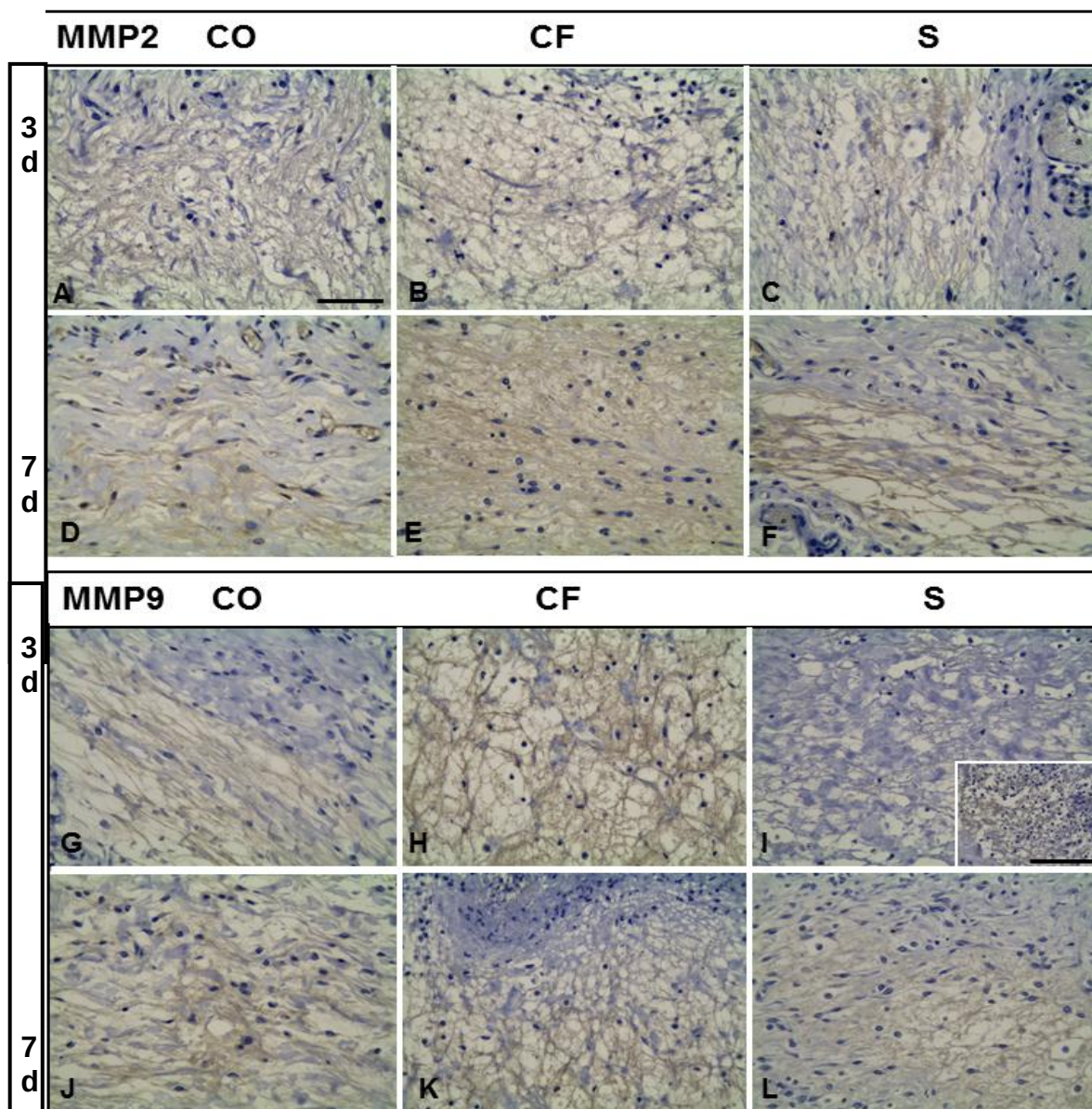


Figura 12. Imunocitoquímica para MMP 2 e 9. MMP 2 em 3 e 7 dias pós lesão respectivamente: grupo CO (A, D), CF (B, E) e S (C, F). MMP 9 em 3 e 7 dias após a injúria: CO (G, J), CF (H, K) e S (I, L). Barra: 50 µm.

Fonte: produção do autor.

6 DISCUSSÃO

A cicatrização de feridas é resultante do equilíbrio entre as influências do meio interno(intrínseco) e os fatores externos conhecidos como extrínsecos (ROBSON, 1990). A atuação destes fatores fazem com que as feridas se curem passando por fases que podem se sobrepor, resultando num processo complexo que pode ser dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e remodelação. Alguns autores têm dividido a cicatrização de feridas em quatro etapas, com a primeira etapa sendo a hemostasia, destacando a importância de respostas vasculares, portanto: Hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (CHIN, 2005; BUCHANAN, 2009).A cascata de cicatrização começa imediatamente após a lesão, eficiente e organizada objetivando o reparo que se refere a um processo dinâmico que resulta na restauração da arquitetura tecidual e da função após a lesão; bem como eliminar estes agentes lesivos, tóxicos ou inflamatórios que são críticos para a sobrevivência de um organismo (LAZARUS *et al*,1994).

A progressão ordenada de uma série de eventos cicatriciais, que estabelecem a integridade do tecido danificado, pode ser afetada por muitos fatores, logo se a cura não conseguir progredir, no habitual passo, pode levar ao desenvolvimento de feridas crônicas. Contudo a resposta inflamatória serve para estimular os processos de reparo (KUMAR *et al.*, 2008) e se exacerbada pode também cursar com a cronicidade da lesão. As feridas crônicas são o resultado de um processo de reparação imperfeita, que é incapaz de restaurar a integridade anatômica e funcional num período de tempo apropriado. As feridas crônicas são frequentemente um desafio de condutas médicas, mesmo com uma abordagem interdisciplinar. A qualidade de vida dos indivíduos afetados é comprometida, além de criarem um ônus econômico significativo nos orçamentos de saúde dedicados ao cuidado de feridas (NAGORI, 2011).

Após o trauma local o organismo normalmente leva à reparação tecidual e restauração da função através da inflamação que pode ser subdividida em resposta vascular e celular. As respostas vasculares caracterizadas pela coagulação do sangue e pela hemostasia ocorrem após o ferimento. A ruptura dos vasos na área traumatizada leva ao sangramento que ocorre imediatamente após a lesão de tecidos, como resultado desta ruptura de vasos sanguíneos ocorre a hemostasia que consiste de dois processos principais: o desenvolvimento de um coágulo de fibrina e a própria coagulação. O primeiro passo para a cicatrização de feridas é a hemostasia onde há o extravasamento de líquidos para o espaço extra vascular, conseqüentemente ocorre o bloqueio da drenagem linfática, que pode produzir os sinais cardinais da inflamação: que são a dor, vermelhidão, o inchaço e o calor e posteriormente a perda da função. Esta resposta inflamatória aguda geralmente dura entre 24 e 48 horas e pode persistir por até duas semanas (COUSSERS & WERB, 2002).

No presente trabalho os tempos analisados foram de três e sete dias após a lesão, tempo este que engloba a fase inflamatória e início da fase proliferativa. Nos primeiros dias tem-se uma taxa muito alta de angiogênese, fato caracterizado pelo surgimento de novos vasos a partir de vasos pré-existentes. Este é um dos processos para cicatrização de feridas, visto que a vascularização fornece nutrientes e oxigênio para o local da ferida durante a subsequente fase proliferativa que consumirá muita energia.

Vale salientar que o desenvolvimento de novos vasos capilares é dependente não somente de células como queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais que são capazes de produzir o fator de crescimento endotelial vascular, fator esse que é expresso em baixos níveis em pele humana normal, ao passo que a sua expressão é altamente regulada durante a cicatrização de feridas e tem sido demonstrado desempenhar um papel crítico na angiogênese, mas também depende da quantidade e organização dos componentes da matriz extracelular. A matriz extracelular é crítica para o crescimento dos vasos sanguíneos e sua manutenção,

atuando como suporte, através do qual as células endoteliais podem migrar e ainda como um reservatório modulador para fatores de crescimento (FENG, 1999; LI 2003).

No que tange a neovascularização, através da quantificação do total de vasos sanguíneos e a dosagem de hemoglobina, nosso estudo não mostrou diferenças entre os grupos analisados no tempo de 3 dias após a injúria, contudo em sete dias pós lesão, o grupo de animais tratados com confrei (grupo CF), apresentou uma menor quantidade de vasos sanguíneos e a mesma tendência para a dosagem de hemoglobina, demonstrando então que o confrei apresenta efeito anti-angiogênico no reparo tecidual. Ao diminuir a angiogênese exacerbada, visto que esse aumento na angiogênese gera um ambiente desequilibrado que pode propiciar um aumento do infiltrado inflamatório, o qual libera substâncias pró-angiogênicas, sendo que estas atrairão mais células imunes através da migração pelos novos vasos e assim, cria-se um círculo vicioso (JACKSON *et al.*, 1997; MROWIETZ & BOEHNCKE, 2006), o confrei apresentou então um potente efeito no auxílio do reparo.

Vários mediadores químicos (citocinas, histaminas, proteases, dentre outros) são liberados pelas células após uma injúria (COUSSERS & WERB, 2002). Estes componentes ou ficam armazenados em mastócitos ou são produzidos por células vistas na região da lesão, como por exemplo, macrófagos, neutrófilos e células estromais. Esses mediadores provocam vasodilatação, promovem adesão endotelial e maior recrutamento de células inflamatórias (NATHAN, 2002; FILHO, 2006).

Os mastócitos, macrófagos e neutrófilos advindos deste recrutamento infiltram a área da ferida e auxiliam na limpeza e remoção de restos do tecido lesionado. Os neutrófilos predominam nas primeiras 24 horas e após aproximadamente 48 horas do início da lesão ocorre a predominância de macrófagos no sítio da injúria (FILHO, 2006; KUMAR, *et al.*, 2008).

A resposta celular da fase inflamatória então é caracterizada pelo influxo destas células já citadas para a área de lesão. No estado inflamatório inicial os neutrófilos e os monócitos são as células predominantes no local da lesão. Um dos componentes inflamatórios avaliados neste trabalho foi a avaliação da atividade de MPO, um dado que representa neutrófilos ativados. Corroborando o resultado de uma menor taxa de angiogênese no grupo CF, este mesmo grupo apresentou uma redução significativa de MPO, ao passo que o grupo S apresentou uma quantidade maior destas células, sendo que mais uma vez ficou evidenciada a ação anti-inflamatória do confrei através da redução do número de neutrófilos demonstrada pela medida da atividade de MPO.

Seguindo a mesma linha de raciocínio também se analisou a atividade de NAG (representando monócitos/macrófagos ativados), visto que estas células também são encontradas na região da lesão. Novamente o grupo CF apresentou uma redução nos níveis de NAG, ao passo que os animais tratados com sulfadiazina de prata apresentaram uma maior concentração destas células. Os macrófagos são considerados células reguladoras das mais importantes na reação inflamatória (FILHO, 2006; KUMAR *et al.*, 2008). Os macrófagos fagocitam, digerem e matam organismos patogênicos; limpam os restos de tecido, e destroem quaisquer neutrófilos restantes, visto que estes granulócitos são os mais abundantes na corrente sanguínea e representam a primeira linha de defesa contra infecções. Uma vez no local da ferida, os macrófagos ativados liberam importantes fatores de crescimento e citocinas, iniciando a formação de tecido de granulação. Os macrófagos produzem a NAG (n-acetil-D-glicosaminidase) que é uma enzima lisossômica produzida demonstrando a ativação destas células (VISSER *et al.*, 2006).

Ainda com relação aos componentes celulares os mastócitos são células importantes envolvidas em numerosas atividades que vão desde o controle do tônus vascular até a participação no reparo tecidual, onde são capazes de sintetizar uma série de mediadores

quimioatraentes FORSYTHE *et al.*, 2001). Durante o reparo tecidual, essas células apresentam habilidade para regular a ativação, migração e proliferação de outras células inflamatórias, a formação de tecido de granulação, angiogênese e proliferação de fibroblastos (MAURER *et al.*, 2003). Uma vez ativados por lesão tecidual direta, os mastócitos localizados nas bordas da ferida lançam, por meio da degranulação, os mediadores essenciais para desencadear a reação inflamatória do tecido lesado (SAYED, 1993). Os mastócitos exercem papel fundamental na inflamação com o recrutamento de leucócitos (KANWAR 1994) e o aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial (selectinas, integrinas) (WALSH 1991; CHRISTOFIDOU 1996), para que novas células sejam atraídas e consigam migrar. O grupo CF neste trabalho, já em 3 dias após a lesão mostrou uma quantidade menor no número desta células, ao passo que no grupo S a quantidade continuou aumentada mesmo em 7 dias após a injúria. Alguns estudos mostraram que a presença elevada de mastócitos, assim como sua degranulação e liberação de histamina, leva a um aumento da permeabilidade microvascular e a infiltração leucocitária, indicando que a atividade dos mastócitos está potencializada e leva a uma cronificação da inflamação (MASINI *et al.*, 1991; GABOURY *et al.*, 1996; GOTTWALD, 1998; AMADEU & COSTA, 2006). Esses achados podem explicar o aumento no número de mastócitos bem como sua maior degranulação observada no grupo tratado com S, principalmente em 7 dias após a lesão onde se notou a permanência do processo inflamatório com maior angiogênese, se comparado aos demais grupos, como foi visto na análise geral dos cortes. A contribuição significativa dos mastócitos para o dano tecidual e propagação da resposta inflamatória, torna vital o controle da função dos mastócitos em muitas condições patológicas (Forsythe *et al.*, 2001).

Além de atuar na fase inicial inflamatória, o mastócito também atua nas fases subsequentes sendo capaz de liberar substâncias com atividade específica fibroproliferativas tais como a histamina (KUPIETZKY, 1996) fibrogênicas como as citocinas (IL-1, IL-4 e

TNF), e os fatores de crescimento (TGF e FGFb) (QUI, 1998), possuem ainda as armas biológicas necessárias para estimular a quimiotaxia, a migração, a diferenciação fenotípica e atividade biossíntese de fibroblastos, além de auxiliar na proliferação de células endoteliais e queratinócitos (MOULIN, 1998) que são essenciais para a reparação. Extratos de mastócitos podem ativar fibroblastos, desempenhando um papel essencial na deposição de matriz de tecido conjuntivo através da síntese de colágeno e a ativação da gelatinase A, uma enzima envolvida na remodelação da matriz (BERTON, 2000). Existe uma verdadeira sinergia entre função de mastócitos e fibroblastos, impulsionado pela recente descoberta de que existe um aparelho de membrana (gap junctions) entre estes dois tipos de células, permitindo a interligação física direta (METCALFE 1997; VLIAGOFTIS 1999). A maior taxa de proliferação encontrada no grupo tratado pela Sulfadiazina de prata provavelmente se relaciona com a atividade de mastócitos atraindo para a região células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos.

Durante a fase proliferativa, existe a formação de epitélio para cobrir a superfície da ferida e juntamente há um crescimento do tecido de granulação para preencher o espaço da ferida. A formação do tecido de granulação envolve a proliferação de fibroblastos, a deposição de colágeno e outros componentes da matriz extracelular. Algumas citocinas produzidas pelas células inflamatórias aumentam a transcrição de genes para colágeno, proteoglicanos e fibronectina e assim, aumentam a produção de proteínas de matriz (HALL *et al.*, 2003).

Na análise das lâminas dos grupos corados com picrossírius, foi observada uma maior quantidade de colágeno tipo I no grupo CF, em ambos os tempos de tratamento, embora haja uma tendência para o aumento da deposição de colágeno durante a evolução temporal do processo de reparo, visto que já foi relatado que há um aumento na síntese de colágeno e outras proteínas não colagênicas (WOO *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2004).

Outro fator que também pode explicar uma menor quantidade de colágeno nos grupos CO e S, nestes dias pós-injúria observados, refere-se à maior presença de macrófagos e outras células fagocitárias, como eosinófilos e neutrófilos, que removem os fragmentos de substâncias não-colagênicas intercelulares e as fibras de colágeno degeneradas pela ruptura e algumas recém-formadas (MARSOLAIS *et al.*, 2001). Com a ruptura das fibras de colágeno é detectada a deposição de fibrina-fibronectina, moléculas estas que estabilizarão a nova matriz extracelular a ser sintetizada e também atuam como uma rede para a migração e adesão celular (MIDWOOD *et al.*, 2004). É fundamental a deposição de colágeno, pois ele preenche o leito da ferida e permite que o processo de reepitelização possa começar (LEE, 2004), portanto, além de estabilizar a região da ferida e recompô-la, a síntese dessa proteína na pele contribui em muito para restaurar a funcionalidade da pele. Como no grupo CF a deposição de colágeno foi maior, é de se esperar que o processo inflamatório, combinado com os demais resultados, seja menor neste grupo.

O colágeno depositado inicialmente é mais fino que o colágeno de um tecido sem lesão e está orientado paralelamente à pele. Com o passar do tempo, o colágeno inicial é reabsorvido e um colágeno mais espesso é depositado e organizado paralelamente às linhas de tensão. Estas alterações são acompanhadas também com um aumento da força tensora da ferida indicando uma correlação positiva com a espessura do colágeno/orientação e força tensora e determinam a fase de remodelamento (WITTE & BARBUL, 1997; DIEGELMANN, 2003).

Além disso, vale ressaltar que durante o reparo existe uma grande atividade de collagenases, que digerem moléculas de colágeno de fibras e fibrilas fragmentadas durante a secção. Nos nossos resultados notamos a presença de metaloproteinases (MMPs) 2 e 9 em todos os grupos, embora não tenhamos conseguido quantificá-las.

As três fases de cicatrização de feridas são eventos não lineares e sim sobrepostos no tempo que ocorre o processo de reparação da ferida, através da formação de um coágulo de fibrina na fase inflamatória precoce sendo substituído por tecido de granulação, rico em colágeno do tipo III e em vasos sanguíneos neoformados durante a fase proliferativa, com subsequente substituição por uma cicatriz predominantemente de colágeno do tipo I e vasos sanguíneos maduros (WELCH ,1990). Com o fechamento da ferida, gradualmente ocorre degradação do colágeno tipo III e substituição pelo colágeno tipo I. O processo desta conversão da derme é realizado através principalmente da ação de MMPs (VISSE, 2003). As metaloproteinases de matriz (MMPs) constituem uma família de enzimas que partilham várias propriedades comuns (WOESSNERN, 1998; ALPAGOT *et al.*, 2001). Atualmente, mais de 20 MMPs diferentes foram caracterizadas e essas proteases devem ser capazes de clivar ou degradar, pelo menos, uma proteína de matriz extracelular, sendo que na verdade, a maioria das MMPs pode degradar várias proteínas da matriz.

Tanto queratinócitos, como miofibroblastos, fibroblastos, células endoteliais, e células perivasculares em todo o leito da ferida, macrófagos e neutrófilos podem expressar MMPs (STRICKLIN 1994; MADLENER 1998), ou seja, a maioria das células encontradas no momento do reparo da ferida. O equilíbrio entre as atividades de MMPs e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPS) também é fundamental para a cicatrização e remodelação (USUI, 2008), pois uma proporção anormal de enzimas de degradação favorece a não deposição de tecido para o fechamento da ferida, logo a presença de TIMPs é crucial, pois caso contrário, não permitiria a formação do tecido cicatricial (SCHAUBER, 2008).

7 CONCLUSÃO

Analisando os resultados encontrados neste trabalho, através de dados morfológicos e bioquímicos, podemos concluir que o confrei apresentou um efeito anti-inflamatório melhor, em ambos os tempos de lesão estudados. O confrei se mostrou melhor ao controlar a presença de células inflamatórias, controlar a angiogênese exacerbada e aumentar a deposição de colágeno funcional. Já a Sulfadiazina de prata, um fármaco muito utilizado na prática médica, potencializou o efeito pró-inflamatório, o que leva o tecido a passar por um processo de cronificação da ferida. Portanto, o confrei apresentou um efeito benéfico para a recuperação deste modelo de ferida de pele.

REFERÊNCIAS

- ALBERCROMBIE, M.; FLINT, M.H.; JAMES, D.W. **Wound contraction in relation to collagen formation in scorbutic guinea pigs.** J Embryol Exp Morph, v. 4, p. 167–175, 1956.
- BELL, E; EHRLICH, H.P; BUTTLE, D.J; NAKATSUJI, T. **Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness.** Science, v. 211, p. 1052–1054, 1981.
- BERTON, A; LEVISCHAFER, F; EMONARD, H. *et al.* **Activation of fibroblasts in collagen lattices by mast cell extract: a model of fibrosis.** Clinical and Experimental Allergy, v. 30, p. 485–92, 2000.
- BOCK, O. & MROWIETZ, U. Keloids. **A fibroproliferative disorder of unknown etiology.** Hautarzt, v. 53, n.8, p. 515-523, 2002.
- BUCHANANA, EP; LORENZ, HP. **Wound healing, including fetal skin healing.** In: Bahman G, Eriksson E, Persing JA, editors. Plastic Surgery: Indications and Practice. Elsevier, p. 9-26, 2009.
- BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. **Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker.** J. Invest. Dermatol, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.
- CHARO, I.F. & RANSOHOFF, R.M. **The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation.** N. Engl. J. Med., v. 354, n. 6, p. 610-621, 2006.
- CHEDID, M.; RUBIN, J.S.; CSAKY, K.G. et al. **Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin-1.** Journal of Biological Chemistry, v. 269, p. 10753–7, 1994.
- CHIN, GC; DIEGELMANN, RF; SCHULTZ, GS. **Cellular and molecular regulation of wound healing.** In: Falabella AF, Kirsner RS, editors. Wound Healing. Boca Raton: Taylor & Francis Group, p. 17-37, 2005.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Reparo dos tecidos: Crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas.** In: ROBBINS - Patologia estrutural e funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 79-100, p. 2000.
- CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M; MURPHY, G.F; ALBELDA, S.M. **Induction of E-selectin-dependent leukocyte recruitment by mast cell degranulation in human skin grafts transplanted on SCID mice.** American Journal of Pathology, v. 148, p. 177–88, 1996.
- CLARK, R.A. **Basics of cutaneous wound repair.** J Dermatol Surg Oncol, v. 19, p. 693–706, 1993.

DARBY, I; SKALLI, O; GABBIANI, G. **Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing.** Lab Invest, 63 (1990), p. 21–29.

DAVIDSON, J.M. & BENN, S.I. **Regulation of angiogenesis and wound repair:** Interactive role of the matrix and growth factors. In: SIRICA, A.E. Cellular and molecular pathogenesis. USA: Lippincott-Raven publishers, p. 79-107, 1996.

DETMAR, M; BROWN, L.F; BERSE, B. et al. **Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin** J Invest Dermatol, v. 108, p. 263–268, 1997.

DIEGELMANN, R.F. **Analysis of collagen synthesis.** Meth. Mol. Med., v. 78, p. 349-358, 2003.

DIEGELMANN, R.F. & EVANS, M.C. **Wound healing:** an overview of acute, fibrotic and delayed healing. Front Biosci, vol. 9, p. 283-289, 2004.

DIEGELMANN, R.F. **Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers.** Wound Repair Regen, v. 11, p. 490–495, 2003.

EL SAYED, S.O; DYSON, M. **Responses of dermal mast cells to injury.** Journal of Anatomy, v. 182, p. 369–76, 1993.

EHRlich, H.P. & KRUMMEL, T.M. **Regulation of wound healing from a connective tissue perspective.** Wound Repair Regen., v. 4, n. 2, p. 203-210, 1996.

FALANGA, V. **Growth factors and wound healing.** J Dermatol Surg Oncol, v. 19, p. 711–714, 1993.

FENG, X.; CLARK, R.A.; GALANAKIS, D.; TONNESEN, M.G. **Fibrin and collagen differentially regulate human dermal microvascular endothelial cell integrins: stabilization of $\alpha v \beta 3$ mRNA by fibrin1.** J Invest Dermatol, v. 113, p. 913–919, 1999.

GAILIT, J; XU, J; BUELLER, H; CLARK, R.A. **Platelet-derived growth factor and inflammatory cytokines have differential effects on the expression of integrins $\alpha 1 \beta 1$ and $\alpha 5 \beta 1$ by human dermal fibroblasts in vitro.** J Cell Physiol, v. 169, p. 281–289, 1996.

GAILIT, J; WELCH, M.P; CLARK, R.A.F. **TGF- $\beta 1$ stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds.** Journal of Investigative Dermatology, v. 103, p. 221–7, 1994.

GARTNER, L. P. & HIATT, J. L. **Tratado de Histologia.** 1ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

GOTTWALD, T.; COERPER, S.; SCHAFFER, M. et al. **The mast cell–nerve axis in wound healing:** a hypothesis. Wound Repair and Regeneration, v. 6, p. 8–20, 1998.

GREENHALGH, D.V. **The role of growth factors in wound healing.** J. Traum. v. 41, n. 1, p. 159-167, 1996.

GRINNELL; F.; BILLINGHAM, R.E; BURGESS, L. **Distribution of fibronectin during wound healing in vivo.** J Invest Dermatol, v. 76, p. 181–189, 1981.

GROVE, G.L. **Age-related differences in healing of superficial skin wounds in humans.** Arch Dermatol Res, v. 272, p. 381–385, 1982.

GRUBER, B.L; MARCHESE, M.J; KEW, R.R. **Transforming growth factor β 1 mediates mast cell chemotaxis.** Journal of Immunology, v. 152, p. 5860–7, 1994

GRUBER, B.L; KEW, R.R; JELASKA, A. *et al.* **Human mast cells activate fibroblasts. Tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis.** Journal of Immunology, v. 158 p. 2310–17, 1997.

GUIRRO E, GUIRRO R. **Fisioterapia dermatofuncional: fundamentos, recursos, patologias.** 3a ed. São Paulo: Manole; 2002

HALPERT, I; ROBY, JD; SIRE, UI; POTTER-PERIGO, S; WIGHT, TN; WELGUS, HG, SHAPIRO, SD; WICKLINE, SA, PARKS, WC. **Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme.** Proc Natl Acad Sci USA, v. 93, p. 9748 -53, 1996.

HELL, E.; LAWRENCE, J.C. **The initiation of epidermal wound healing in cuts and burns.** Br J Exp Pathol, v. 60, p. 171–179, 1979.

HUANG, C., SALI, A., STEVENS, R.L. **Regulation and function of mast cell proteases in inflammation.** Journal of Clinical Immunology, v. 18, p. 169–83, 1998.

JANSEN, P; ROSCH, R; JANSEN, M; BINEEBOSEL, K; JUNGE, K; ALFONSO-JAUME, A. *et al.* **Regulation of MMP-2 gene transcription in dermal wounds.** J Invest Dermatol, v. 127, p. 1762–1767, 2007.

KANWAR, S; KUBES, P. **Ischemia/reperfusion-induced granulocyte influx is a multistep process mediated by mast cells.** Microcirculation, 1994; v. 1, 175–82, 1994.

KEDE, M. P. V. & SABATOVICH, O. Dermatologia Estética. São Paulo, Atheneu, 2004.

KOZMA, E.M; OLCZYK, K; BOBINSKI, R; KASPERCZYK, M. SZPYRA, K.. **Pathogenesis of Dupuytren's contracture--a review .** Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol, v. 67, p. 73–79, 2002.

KUNKEL, S.L; STANDIFORD, T.; KASAHARA, K. STRIETER, R.M. **Stimulus specific induction of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) gene expression.** Adv Exp Med Biol, v. 305, p. 65–71, 1991.

KUPIETZKY, A; LEVI-SCHAFFER, F. **The role of mast cell-derived histamine in the closure of an *in vitro* wound.** Inflammation Research, v. 45, p. 176–80, 1996.

KURKINEN, M; VAHERI, A; ROBERTS, P.J; STENMAN, S. **Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue.** Lab Invest, v. 43, p. 47–51, 1980.

LEE, P.Y; CHESNOY, S; HUANG, L. **Electroporatic delivery of TGF-beta1 gene works synergistically with electric therapy to enhance diabetic wound healing in db/db mice.** J Invest Dermatol, v. 123, p. 791–798. 2004.

LI, J.; ZHANG, Y.P.; KIRSNER, R.S. **Angiogenesis in wound repair:** angiogenic growth factors and the extracellular matrix. Microsc Res Tech, v. 60, p. 107–114, 2003.

LI, Jie; CHE, Juan, KIRSNER, Robert. **Pathophysiology of acute wound healing**, v. 25, Issue 1, January–February, p. 9–18, 2007.

MACKAY, AR; HARTZLER, JL; PELINA, MD; THORGEIRSSON, UP. **Studies on the ability of 65-kDa and 92-kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen.** J Biol Chem, v. 265, p. 219–234, 1990.

MADLENER, M; PARKS, WC; WERNER S. **Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially regulated during excisional skin wound repair in mice.** Exp Cell Res, v. 242: p. 201-11, 1998.

MAJNO, G. **The story of the myofibroblasts.** Am J Surg Pathol, v. 3, p. 535–542, 1979.

MENKE, N.; WARD, K.; WINTTEN, T.; BONCHEV, D.; DIEGELMANN, R. **Impaired wound healing Clin Dermatol**, v. 25, p. 19–25, 2007.

ETCALFE, D.D; BARAM, D; MEKORI, Y.A. Mast cells. **Physiological Reviews**, v. 77: p. 1033–79, 1977.

MOULIN, V. Growth. **Factors in skin wound healing.** European Journal of Cell Biology, 1995.

MOULIN, V.; CASTILLOUX, G.; AUGER, F.A. *et al.* **Modulated response to cytokines of human wound healing myofibroblasts compared to dermal fibroblasts.** Experimental Cell Research, v. 238, p 283–93, 1998.

MOSSER, D.M; EDWARDS, J.P. **Exploring the full spectrum of macrophage activation.** Nat Rev Immunol, v. 8, p. 958–969, 2008.

MUDERA, V; EASTWOOD, M.; MECFARLAND, C; BROWN, R.A. **Evidence for sequential utilization of fibronectin, vitronectin, and collagen during fibroblast-mediated collagen contraction.** Wound Repair Regen, v. 10, p. 397–408, 2002.

MULLER, M.; TROCME, C.; LARDY, B.; MOREL, F.; HALIMI, S.; BENHAMOU, P. **Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers:** the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. Diabet Med, v. 25, p. 419–426, 2008.

NAGORI, B.P., SOLANKI, R. Role of medicinal plants in wound healing. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 5 (4), p. 392-405, 2011.

- NOLI, C; MIOLO, A. **The mast cell in wound healing.** Vet Dermatol, v. 12, p. 303–313., 2001.
- NEDELEC, B; OLIVEIRA, A. De; SAINT-CYR, M; GARREL, D. **Differential effect of burn injury on fibroblasts from wounds and normal skin.** Plast Reconstr Surg, v. 119, p. 2101–2109, 2007.
- PARKS, W.C. **Matrix metalloproteinases in repair.** Wound Repair Regen, v. 7, p. 423–432, 1999.
- PIAGGESI, A; VIACAVA, P; RIZZO, L. et al. **Semiquantitative analysis of the histopathological features of the neuropathic foot ulcer: effects of pressure relief.** Diabetes Care, v. 26, p. 3123–3128, 2003
- POWELL, D.W; MIFFLIN, R.C; VALENTICH, J.D; CROWE, S.E. Crowe; SAADA, J.I. Saada; WEST, A.B. **Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease.** Am J Physiol, v. 277., p. C1–C9, 1999.
- QU, Z., KAYTON, R.J., AHMADI, P. *et al.* **Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor in mast cell secretory granules: morphological evidence for bFGF release through degranulation.** Journal of Histochemistry and Cytochemistry, v. 46 p. 1119–28, 1998.
- RAYMENTE, E.A; UPTON, Z.; SHOOTER, G.K. **Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer.** Br J Dermatol, v. 158, p. 951–961, 2008.
- RIBEIRO, R.A; SOUZA-FILHO, M; SOUZA, M. et al. **Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a.** International Archives on Allergy and Applied Immunology, v. 112, p. 27–35, 1997.
- ROBERTS, A.B; SPORN, M.B. **Transforming growth factor-beta: potential common mechanisms mediating its effects on embryogenesis, inflammation-repair, and carcinogenesis.** Int J Rad Appl Instrum B, v. 14, p. 435–439, 1987.
- ROBSON, M.C; STENBERG, B.D, HEGGERS, J.P. **Wound healing alterations caused by infection.** Clin. Plast. Surg., v. 17, p. 485–492, 1990.
- ROSS, R; BOWEN-POPE, D.F; RAINES, E.W. **Platelet-derived growth factor: its potential roles in wound healing, atherosclerosis, neoplasia, and growth and development.** Ciba Found Symp, v. 116, p. 98–112, 1985.
- SALONURMI, T; PARIKKA, M; KONTUSAARI, S; PIRILAE, E; MUNAUT, C; SALO, T. et al. **Overexpression of TIMP-1 under the MMP-9 promoter interferes with wound healing in transgenic mice.** Cell Tissue Res, v. 315, p. 27–37, 2004.
- SCHAUBER, J; GALLO, Schauber. **Antimicrobial peptides and the skin immune defense system.** J Allergy Clin Immunol, v. 122, p. 261–266, 2008.

SINGER, I.I; KAWKA, D.W.; KAZAZIS, D.M; CLARK, R.A. **In vivo co-distribution of fibronectin and actin fibers in granulation tissue:** immunofluorescence and electron microscope studies of the fibronexus at the myofibroblast surface. *J Cell Biol*, v. 98, p. 2091–2106, 1984

SHAPIRO, SD. **Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes.** Potential roles in destructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 150, p. S160-4, 1994.

SHERRY, B.; TEKAMP-OLSON, P.; GALLEGOS, C. **Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta.** *J Exp Med*, v. 168,, p. 2251–2259, 1988.

SUN, T.T; COTSARELIS, G.; LAVKER, R.M. **Hair follicular stem cells: the bulge-activation hypothesis.** *J Invest Dermatol*, v. 96, p. 77S–78S, 1991.

STRICKLIN GP; NANNEY LB. **Immunolocalization of collagenase and TIMP in healing human burn wounds.** *J Invest Dermatol*, v.103, p. 488- 92, 1994.

TOKUMARU, S.; SAYAMA, K.; SHIRAKATA,Y; KOMATSUZAWA, H. **Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37.** *J Immunol*, v. 175, p. 4662–4668, 2005.

TOMASEK, J.J; GABBIANI, G; HINZ, B; CHAPONNIER, C; BROWN, R.A. Brown. **Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 3, p. 349–363, 2002.

TRABUCCHI, E.; RADAELLI, E.; MARAZZI, M. et al. **The role of mast cells in wound healing.** *International Journal of Tissue Reactions*, vol. X, 367–72, 1988.

USU, I.L., MANSBRIGGE, J.N; CARTER; W.G.; FUJITA; M.; ORELUD, J.E. **Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds.** *J Histochem Cytochem*, v. 56, p. 687–696., 2008.

VALENT, P., SILLABER, C., BAGHESTANIAN, M. et al. **What have mast cells to do with edema formation, the consecutive repair and fibrinolysis?** *International Archives on Allergy and Applied Immunology*, v. 115, p. 2–8, 1998.

VISSE, R.; NAGASE, H. **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases:** structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, v. 92, p. 827–839, 2003.

VLIAGOFTIS, H; HUTSON, A.M; MAHMUDI-AZER, S. *et al.* **Mast cells express connexins on their cytoplasmic membrane.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 103, p. 656–62, 1999.

WALSH, L.J; TRINCHIERI, G; WALDORF, H.A. *et al.* **Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor α , which induces endothelial leucocyte adhesion**

molecule-1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v. 88, p. 4220–4, 1991.

WELCH, M.P; ODLAND, G.F. CLARK, R.A. **Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction.** J Cell Biol, v. 110, p. 133–145, 1990.

WOCHENSCHRIFT, Wiener Medizinische. **Der wundheilende Effekt einer Symphytum-Herba-Extrakt-Creme (Symphytum × uplandicum Nyman):** Ergebnisse einer randomisierten, kontrollierten Doppelblindstudie, v. 157, p. 569-574, Issue 21-22, 2007.

WOESSNER JR, Jf. **The matrix metalloproteinase family.** In: Parks WC, Mecham RP, editors. Matrix metalloproteinases. San Diego: Academic Press, p. 1-14, 1998.

WOODLEY, D.T; O'KEEFE, E.J. PRUNIERAS, M. **Cutaneous wound healing: a model** for cell-matrix interactions. J Am Acad Dermatol, v. 12, p. 420–433, 1985.

