

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO MODULATÓRIO DO GeIMA CONTENDO EXTRATO
ETANÓLICO DE *Himatanthus bracteatus* SOBRE A DENSIDADE
MIOFIBROBLÁSTICA E MICROVASCULAR EM MODELO MURINO
DE CICATRIZAÇÃO**

IZABELLA DAYANE DORTA DOS SANTOS

**Aracaju
Abril –2021**

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO MODULATÓRIO DO GelMA CONTENDO EXTRATO
ETANÓLICO DE *Himatanthus bracteatus* SOBRE A DENSIDADE
MIOFIBROBLÁSTICA E MICROVASCULAR EM MODELO MURINO
DE CICATRIZAÇÃO**

Exame de defesa de dissertação
submetido à banca examinadora para a
obtenção do título de Mestre em Saúde
e Ambiente, na área de concentração
em Saúde e Ambiente.

IZABELLA DAYANE DORTA DOS SANTOS

Orientador
Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, Dr.

**Aracaju
Abril – 2021**

Sistema Integrado de Bibliotecas - SIB

Santos, Izabella Dayane Dorta dos

Efeito modulatório do GelMA contendo extrato etanólico de *Himatanthus bracteatus* sobre a densidade miofibroblástica e microvascular em modelo murino de cicatrização / Izabella Dayane Dorta dos Santos ; orientação [de] Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior. – Aracaju : UNIT, 2021.

91 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente na área de concentração em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes

Inclui bibliografia.

1. Apocynaceae. 2. Hidrogel. 3. Cicatrização. I. Albuquerque Júnior, Ricardo Luiz Cavalcanti de (orient.). II. Universidade Tiradentes. III. Título.

CDU: 615.321

**EFEITO MODULATÓRIO DO GeIMA CONTENDO EXTRATO ETANÓLICO DE
Himatanthus bracteatus SOBRE A DENSIDADE MIOFIBROBLÁSTICA E
MICROVASCULAR EM MODELO MURINO DE CICATRIZAÇÃO**

Izabella Dayane Dorta dos Santos

EXAME DE DEFEA SUBMETIDO À BANCA EXAMINADORA PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE.

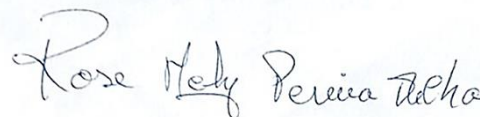
Aprovado por:



Ricardo Luiz C. de Albuquerque Junior, Dr
Universidade Tiradentes (Orientador)



Juliana Cordeiro Cardoso, Dra
Universidade Tiradentes (Examinador)



Rose Nely Pereira Filho, Dra
Universidade Tiradentes (Examinador)

**Aracaju
Abril – 2021**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por depositar Seus sonhos em meu coração e me fazer capaz de viver cada um deles. Agradeço a Ele por colocar pessoas tão especiais na minha vida e ser um Deus que cuida de cada detalhe. Sem Deus nada teria sentido.

Aos meus pais, Marcos e Dalila. Palavras não são suficientes para expressar todo meu amor e orgulho. Aos meus irmãos Cyl, Paulo e Lucas, por fazerem os meus dias mais felizes.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Ricardo Luiz C. de Albuquerque Junior, que foi um presente de Deus. Professor Ricardo tem todo o meu carinho e respeito. Agradeço por toda paciência, todos os ensinamentos, toda dedicação e por me dar a oportunidade de realizar esse sonho. Agradeço também as professoras Rose Nely e Juliana Cordeiro, mulheres que tenho uma grande admiração.

Aos meus amigos Agenor Gomes, Allef Santana, Amanda Santos, Felliipe Matheus e Felipe Fontes. Tudo ficou mais leve ao lado de vocês.

A toda equipe do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes, em especial aos meus professores.

A toda equipe do Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental do Instituto de Tecnologia e Pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento de bolsa.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 Geral	11
2.2 Específicos.....	11
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
3.1 Anatomofisiologia do sistema tegumentar.....	12
3.2 Feridas	22
3.3 Reparação tecidual	22
3.4 Coberturas bioativas	30
3.5 Produtos naturais no tratamento de feridas	33
3.6 Família Apocynaceae e o Gênero <i>Himatanthus</i>	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÃO.....	66
7 REFERÊNCIAS	67

RESUMO

A utilização de produtos naturais como agentes terapêuticos moduladores do reparo cicatricial tem sido tema de estudos por apresentarem combinações complexas de fitoconstituintes. Os mesmos produtos poderiam atuar em diferentes eventos fisiopatológicos que são cruciais para o sucesso do reparo cicatricial, como angiogênese, fibroplasia e contração da ferida. Foi previamente relatado que o extrato etanólico da casca da *Himatanthus bracteatus* apresenta altas concentrações de iridoides (plumerinídeos, plumericina e isoplumericina), e demonstra atividade antioxidante e anti-inflamatória, fazendo deste produto um candidato potencial a fitoterápico podendo agir sobre etapas essenciais da cicatrização, como angiogênese, e diferenciação miofibroblástica. Diante do exposto, o objetivo dessa pesquisa foi analisar o efeito da aplicação tópica de uma formulação a base de GelMA, contendo extrato etanólico de *Himatanthus bracteatus* sobre a diferenciação miofibroblástica e microvascular em modelo murino de cicatrização dérmica. Para o ensaio de cicatrização foram utilizados ratos Wistar tratados com GelMA, GelMA-HB e sem tratamento (CTR). Após 3, 7 e 14 dias, os animais foram eutanasiados para determinação do índice de retração das feridas (IcRF), análise e gradação histológica do reparo cicatricial dérmico e análise imunohistoquímica da diferenciação miofibroblástica (DMf) e da densidade vascular capilar (DVC). No ensaio de cicatrização, os três grupos experimentais apresentaram aumento percentual significativo do IcRF ao longo do período experimental ($p < 0,001$). O GelMA-HB induziu IcRF significativamente maiores que o grupo controle em 3 ($p < 0,01$), 7 ($p < 0,05$) e 14 dias ($p < 0,05$). Em 3 dias, os índices da DMf de GelMA e GelMA-HB, foram significativamente maiores que o CTR ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Em 7 dias, a DMf em GelMA-HB foi significativamente maior que GelMA ($p < 0,01$) e CTR ($p < 0,001$). GelMA apresentou maior DMf que o CTR ($p < 0,001$). Em 14 dias, não houve diferença entre CTR, GelMA e GelMA-HB ($p > 0,05$) em DMf. Em 3 e 7 dias, o grupo GelMA-HB exibiu a DVC significativamente maior que em GelMA ($p < 0,01$) e CTR ($p < 0,001$). A DVC em GelMA foi significativamente maior que em CTR ($p < 0,05$). Em 14 dias, GelMA-HB exibiu a DVC significativamente menor que em GelMA ($p < 0,001$) e CTR ($p < 0,001$). Os escores de gradação histológica do reparo em GelMA-HB foram significativamente maiores que em GelMA ($p < 0,05$), e estes dois, por sua vez, foram significativamente maiores que CTR ($p < 0,001$). Com base na avaliação dos resultados obtidos, pode-se concluir que o hidrogel fotopolimerizável à base de gelatina metacrilada contendo extrato etanólico de *H. bracteatus* a 2% promoveu melhora expressiva no processo de reparo em modelo experimental murino de cicatrização por segunda intenção, na medida em que acelerou a retração da ferida e aumentou a diferenciação miofibroblástica e microvascular em estágios iniciais e intermediários (3 e 7 dias) da cicatrização. Os dados observados ainda fornecem indícios morfológicos de que estes efeitos biomodulatórios promoveram melhora da gradação histológica e que podem ter contribuído para aceleração da regeneração e maturação epidérmica no modelo experimental empregado neste estudo. Desta forma, o GelMA-HB parece constituir um biomaterial de preenchimento promissor para uso futuro em cicatrização de feridas extensas com perda de substância.

PALAVRAS-CHAVE: Apocynaceae; hidrogel; cicatrização.

ABSTRACT

Due to complex combinations of phytochemicals, the use of natural products as therapeutic agents that modulate scar repair has been the subject of several studies. Thus, they can act on different pathophysiological events that are crucial for the success of scar repair including angiogenesis, fibroplasia and wound contraction. The literature has reported that the ethanolic extract from the bark of *Himatanthus bracteatus* has great concentrations of iridoides (plumerinids, plumericin and isoplumericin), which demonstrates antioxidant and anti-inflammatory activity. As a result, this product is considered a potential candidate for herbal medicine. Therefore, the extract of *Himatanthus bracteatus* can act on essential stages of healing, such as angiogenesis, and myofibroblastic differentiation. With this said, this study aimed to evaluate the effect of topical application of a formulation based on GelMA, containing ethanolic extract of *Himatanthus bracteatus* on myofibroblastic and microvascular differentiation in a murine model of dermal healing. For this purpose, wistar rats were treated with GelMA, GelMA-HB and without treatment (CTR). After 3, 7 and 14 days of observation, the animals were euthanized to determine the wound retraction index (IcRF). In addition, histological analysis and gradation of the dermal scar repair and immunohistochemical analysis of myofibroblastic differentiation (DMf) and capillary vascular density (DVC) were evaluated. Concerning healing trial, the three experimental groups revealed a significant percentage increase in IcRF over the experimental period ($p < 0.001$). GelMA-HB induced IcRF significantly higher than the control group at 3 ($p < 0.01$), 7 ($p < 0.05$) and 14 days ($p < 0.05$). In 3 days, the DMf indexes of GelMA and GelMA-HB, were substantially greater than the CTR ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). In 7 days, the DMf in GelMA-HB demonstrated higher values than GelMA ($p < 0.01$) and CTR ($p < 0.001$). GelMA exhibited more expressive DMf values than CTR ($p < 0.001$). In 14 days, there was no difference between CTR, GelMA and GelMA-HB ($p > 0.05$) in DMf. In 3 and 7 days, the GelMA-HB group exhibited significantly higher DVC than in GelMA ($p < 0.01$) and CTR ($p < 0.001$). DVC in GelMA was considerably higher than in CTR ($p < 0.05$). In 14 days, GelMA-HB manifested notably lower DVC than in GelMA ($p < 0.001$) and CTR ($p < 0.001$). The histological gradation scores of the repair in GelMA-HB were markedly higher than in GelMA ($p < 0.05$); in contrast, both indicators were seriously higher than CTR ($p < 0.001$). Considering the results achieved, it can be concluded that the photopolymerizable hydrogel based on methacrylated gelatine containing 2% ethanolic extract of *H. bracteatus* promoted a significant improvement in the repair process in a murine model of healing by second intention, once it accelerated the wound retraction and increased myofibroblastic and microvascular differentiation in early and intermediate stages (3 and 7 days) of healing. The observed data still provide morphological evidence that these biomodulatory effects promoted improvement in histological gradation and that they may have contributed to accelerating regeneration and epidermal maturation in the experimental model applied in this investigation. Finally, GelMA-HB is a promising filler biomaterial for future application in healing extensive wounds with loss of substance.

KEYWORDS: Apocynaceae; hydrogel; healing.

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo fisiológico complexo que ocorre para restaurar a integridade dermo-epidérmica após injúria. Esse fenômeno envolve uma variedade de tipos de células com papéis distintos que atuam de maneira síncrona e assíncrona nas fases de hemostasia, inflamação, neovascularização, fibroplasia, reepitelização e remodelação da cicatrização (WANG *et al.*, 2018).

A neovascularização é uma etapa crítica para a cicatrização eficiente de feridas, já que propicia o fornecimento de nutrientes e oxigênio necessários para permitir a proliferação celular durante o reparo. Este fenômeno se dá por meio da formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), e envolve a ativação de células endoteliais microvasculares (CEs) locais, encontradas na superfície interna dos vasos sanguíneos, em resposta a liberação de fatores de crescimento, como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) no ambiente da ferida, para formar o tecido de granulação (RODRIGUES *et al.* 2017). Posteriormente, os fibroblastos promovem a deposição progressiva de matriz extracelular para formar tecido conjuntivo fibroso, que substitui gradualmente a rede de capilares recém-formados à medida que se torna mais denso e compacto (HERRERA *et al.*, 2018).

A maturação gradual do tecido de granulação e subsequente formação da cicatriz fibrosa primária tem sido considerada uma das características morfológicas mais importantes da progressão da cicatrização de feridas (HÄKKINEN *et al.*, 2011). A regulação da síntese de colágeno é controlada por uma ampla gama de fatores de crescimento, como o TGF- β (fator de crescimento transformador beta) e FGF (fator de crescimento fibroblástico). O TGF- β é a principal citocina associada a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, células com fenótipo contrátil, fundamentais para a redução da área da ferida (NEDELEC *et al.*, 2001), mas também responsáveis pela fibrose do tecido conjuntivo (LI *et al.*, 2015; DOERSCH *et al.*, 2018). Admite-se, portanto, que o adequado curso clínico do processo cicatricial é fortemente dependente do desenvolvimento apropriado desses dois eventos fisiopatológicos, de modo que distúrbios no transcorrer desses fenômenos biológicos determinam a formação de feridas crônicas ou de cicatrizes disformes (DIPIETRO, 2016; DARWIN, TOMIC-CANIC, 2018).

Nos últimos anos, a utilização de produtos naturais como agentes terapêuticos moduladores do reparo cicatricial tem sido tema de estudos. Estes se alicerçam na premissa de que, por apresentarem combinações complexas de fitoconstituintes, os mesmos produtos poderiam atuar em diferentes eventos fisiopatológicos que são

cruciais para o sucesso do reparo cicatricial, como angiogênese, fibroplasia e contração da ferida (IBRAHIM *et al.*, 2018). Adicionalmente, a fim de aprimorar o processo de cicatrização, os compostos ativos derivados de produtos naturais devem ainda agir minimizando o estresse oxidativo e inflamatório para reduzir o edema, hiperemia e riscos de supuração, além de apresentar atividade antinociceptiva, minimizando a dor do paciente (ABDELRAHMAN E NEWTON., 2011; JIN *et al.*, 2016).

Foi previamente relatado que o extrato etanólico da casca da *Himatanthus bracteatus* obtido por meio de extração sequencial sob alta pressão com solventes orgânicos de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol) apresenta altas concentrações de iridoides (plumerinídeos, plumericina e isoplumericina), e demonstra atividade antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória, fazendo deste produto um candidato potencial a fitoterápico para uso em feridas (ALMEIDA, 2016).

A atividade cicatrizante de uma formulação a base de gelatina metacrilada fotopolimerizável (GelMA) contendo etanólico de *H. bracteatus* obtido por extração sequencial pressurizada, expressa por aceleração clínica da retração da ferida e aprimoramento da gradação histológica do reparo em modelo roedor, também foi demonstrada por Almeida (2016). Contudo, o efeito desta formulação sobre etapas essenciais da cicatrização, como angiogênese, indispensável para formação da reação de granulação, e diferenciação miofibroblástica, fundamental para indução da contração da ferida e incremento da fibroplasia, ainda não foi adequadamente investigado.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi analisar o efeito da utilização biomaterial à base de gelatina metacrilada (GelMA) contendo extrato etanólico de *H. bracteatus* obtido por extração sequencial pressurizada sobre a dinâmica de diferenciação miofibroblástica e neoformação microvascular em modelo murinho de cicatrização dérmica.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar o efeito da aplicação tópica de uma formulação a base de GelMA, contendo extrato etanólico de *Himatanthus bracteatus* sobre a diferenciação miofibroblástica e microvascular em modelo murino de cicatrização dérmica.

2.2 Específicos

- ✓ Analisar o índice de retração clínico das feridas tratadas sob as condições experimentais aqui estabelecidas.
- ✓ Analisar a gradação histológica do reparo cicatricial em feridas tratadas sob as condições experimentais aqui estabelecidas.
- ✓ Analisar a intensidade de diferenciação miofibroblástica e da densidade vascular capilar em feridas tratadas sob as condições experimentais aqui estabelecidas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Anatomofisiologia do sistema tegumentar

A pele é o órgão de maior extensão do corpo humano, correspondendo a 15% do peso corporal. Esse órgão funciona como uma barreira ao meio ambiente e atua como primeira linha de defesa contra poluentes, luz solar, microrganismos, infecções e traumatismos (ZHANG *et al.*, 1996; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; FU *et al.*, 2007; PROKSCH *et al.*, 2008). É constituída por uma camada superficial denominada epiderme, que repousa sobre uma camada de tecido conjuntivo denominado derme (TORTORA; DERRICKSON, 2009) (Figura 1).

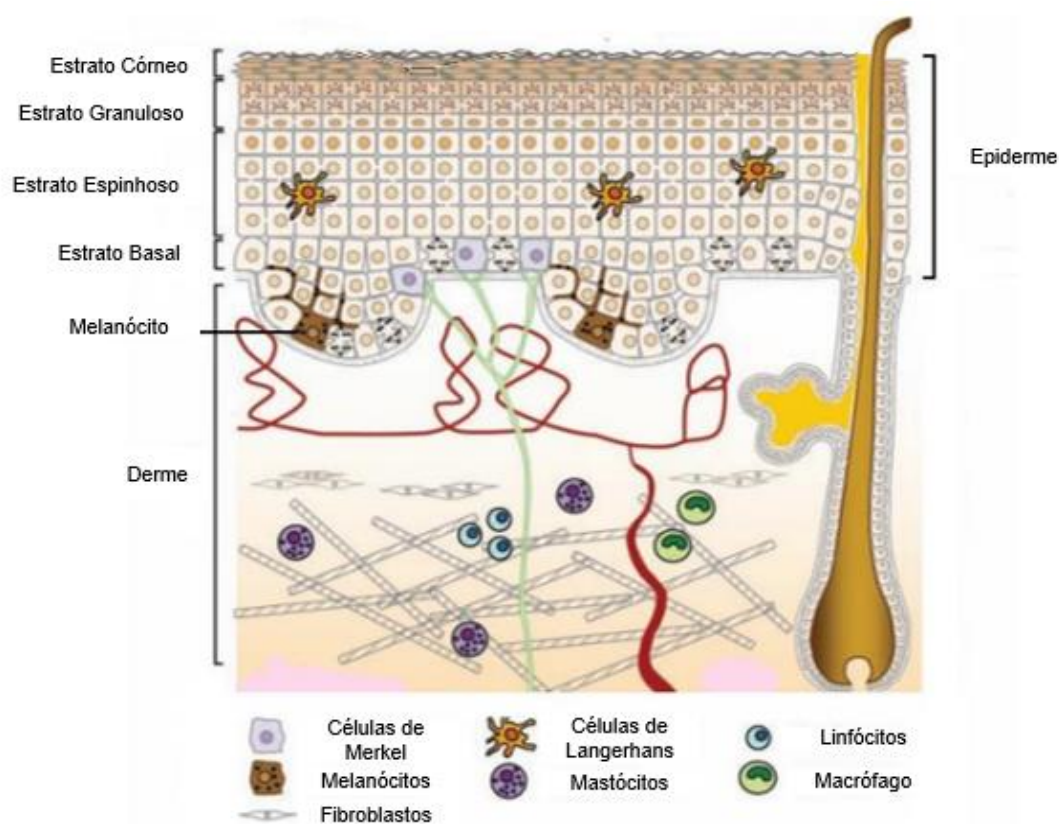


Figura 1: Esquema da pele humana exibindo as camadas: Epiderme diferenciando em seus estratos. Derme constituída de tecido conjuntivo e pelas projeções das cristas epidérmicas. Fonte: Wolk, Witte e Sabat (2010) (adaptado).

3.1.1 Epiderme

A epiderme possui característica avascular, sendo nutrida por difusão a partir de vasos sanguíneos da derme. É formada por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, e possui quatro tipos de células: os queratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel. É subdividida em quatro estratos: Córneo, granuloso, espinhoso e basal (ARNOLD *et al.*, 1994; GUYTON; HALL, 1998; TOBIN, 2006).

O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme. Nela estão presentes células mortas, com grande quantidade de queratina, que se descamam continuamente. Essa barreira funciona como uma proteção contra patógenos e agentes químicos. O estrato granuloso é o revestimento formado por camadas de células poligonais, que são achatadas e apresentam grânulos de querato-hialina em seu interior. O estrato espinhoso é composto por queratinócitos com aspecto poligonal histologicamente diferenciados e unidos por pequenos processos citoplasmáticos, abundantes desmossomos, e células de Langerhans (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; KAMEL *et al.*, 2013; PORTO, 2009). As células de Langerhans reconhecem, processam e apresentam os antígenos aos linfócitos, gerando uma resposta imunológica. A camada basal origina as demais camadas da epiderme por meio de progressiva diferenciação celular, sendo constituída por células basais, melanócitos e células de Merkel (PIEPKORN; PITTELKOW, 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

3.1.2 Derme

A derme separa-se da epiderme pela camada basal, sendo ricamente vascularizada e innervada (LEIGH *et al.*, 2003). Possui duas camadas: a camada papilar e a camada reticular, e é constituída fundamentalmente por tecido conjuntivo (YOUNG *et al.*, 2000; FAWCETT *et al.*, 2002). No tecido conjuntivo predomina a matriz extracelular, formada por fibras e pela substância fundamental. A substância fundamental é composta por água, sais, macromoléculas aniônicas como: glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos e glicoproteínas de adesão (como a laminina e a fibronectina). Estas macromoléculas se ligam a receptores específicos na superfície das células, preenchendo os espaços entre as células e fibras do conjuntivo (GONÇALVES, 2001).

3.1.2.1 Fibras de sustentação dérmica

As fibras de sustentação dérmica são denominadas colágenas, reticulares e elásticas, todas sintetizadas pelos fibroblastos (PARRY; CRAIG, 1988). As fibras colágenas são as mais frequentes no tecido conjuntivo e em muitos casos aparecem agrupadas formando um feixe. Estas fibras são constituídas pela proteína colágeno, que é abundante no corpo humano. São fibras caracteristicamente mais grossas e resistentes, distendendo-se pouco quando tensionadas, conferindo resistência à pele e evitando que ela se rasgue quando esticada.

Os colágenos são compostos de três cadeias polipeptídicas separadas trançadas em hélice tripla. Aproximadamente 30 tipos de colágeno já foram identificados, alguns dos quais únicos para células e tecidos específicos. Certos tipos

de colágeno (p. ex., tipos I, II, III e V) formam fibrilas por causa das ligações cruzadas das triplas hélices. Os colágenos fibrilares constituem a maior parte do tecido conjuntivo da cura de feridas e particularmente das cicatrizes. A resistência dos colágenos fibrilares à tensão se origina das suas ligações cruzadas, resultantes das ligações covalentes catalisadas pela enzima lisil-oxidase (JUNQUEIRA *et al.*, 1983; MONTES *et al.*, 1984; CHAPMAN *et al.*, 1990; MONTES, 1996; GOISSIS, 2007).

As fibras reticulares são formadas por colágeno, são ramificadas e formam um trançado firme que liga o tecido conjuntivo aos tecidos vizinhos. No tecido conjuntivo, as fibras reticulares formam malhas ou redes contínuas. Estas se localizam por baixo da lâmina reticular, de modo que se acham próximas da lâmina basal dos epitélios. Malhas similares de fibras reticulares são encontradas em torno dos adipócitos, vasos sanguíneos de pequeno calibre, células musculares lisas e dos nervos (MONTES *et al.*, 1980).

As fibras elásticas do tecido conjuntivo se dividem e se anastomosam amplamente e compõem redes tridimensionais entrelaçadas com as fibras colágenas. Constan de dois tipos de proteínas fibrilares, a elastina e a microfibrila. Durante o processo de desenvolvimento de uma fibra elástica, o componente microfibrilar é o primeiro a aparecer, vindo depois a ser depositada a elastina, provavelmente devido a uma interação iônica entre a elastina e a superfície microfibrilar como consequência de suas cargas opostas (ROSS, 1973; CLEARY; GIBSON, 1983) (Figura 2).

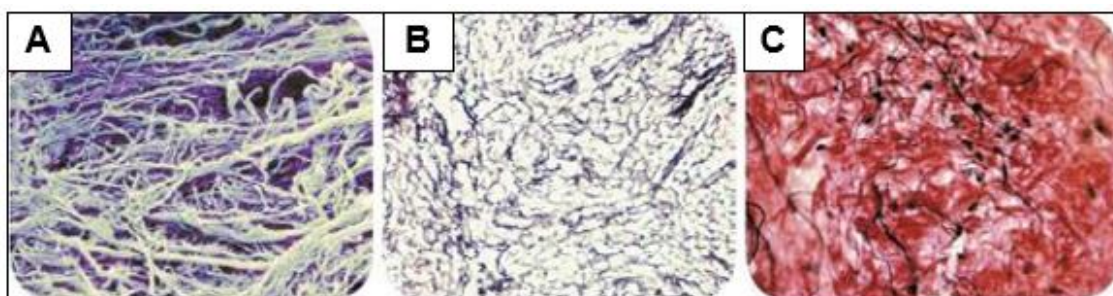


Figura 2: Representação esquemática das fibras do tecido conjuntivo: Fibras colágenas (A), Fibras elásticas (B) e Fibras reticulares (C). Fonte: <https://www.coladaweb.com/biologia/histologia/tecido-conjuntivo> (adaptado)

3.1.2.2 Celularidade dérmica

Além da matriz extracelular, o tecido conjuntivo possui vários tipos de células. Entre elas, os fibroblastos, miofibroblastos, mastócitos e linfócitos (GILLITZER; GOEBELER, 2001; METCALFE; FERGUSON, 2007).

Os fibroblastos originam-se de células mesenquimatosas indiferenciadas, são as principais células envolvidas na cicatrização e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo (AMADEU *et al.*, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Muitos destes fibroblastos adquirem alguns aspectos morfológicos e bioquímicos de células musculares lisas, sendo denominados miofibroblastos (DESMOULIE`RE e GABBIANI, 1996).

Miofibroblastos são considerados como células que exibem um fenótipo híbrido entre fibroblastos e células do músculo liso, capazes de expressar a isoforma α da actina de músculo liso (α -SMA). Analogamente aos fibroblastos, os miofibroblastos possuem retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi bem desenvolvidos, resultado da intensa síntese e secreção de citocinas, hormônios, mediadores inflamatórios, proteínas de adesão, componentes da MEC como o colágeno, fatores de crescimento e proteases. Ultraestruturalmente, os miofibroblastos estão caracterizados pela presença de um aparato contrátil. Está organizado sob a forma de feixes periféricos de miofilamentos de α -SMA conectados aos complexos de adesão especializados que se localizam na superfície celular, denominados fibronexos, caracteristicamente observadas em miofibroblastos (MCANULTY, 2007; EYDEN, 2008; EYDEN *et al.*, 2009).

Os miofibroblastos podem estar presentes em pequenas quantidades em diversos órgãos, em especial naqueles locais cuja força mecânica é necessária: cavidade oral, pele, trato gastrointestinal, útero, testículo, coração (EYDEN, 2008). Nestas estruturas, os miofilamentos ligam-se às integrinas, as quais se conectam à fibronectina existente na MEC, resultando num aparato contrátil que provê um sistema mecanotransdutor capaz de transmitir a força gerada pelas fibras de estresse à MEC (GABBIANI, 2003; TOMASEK *et al.*, 2002).

Inicialmente, acreditava-se que os miofibroblastos eram originados somente a partir de fibroblastos estromais e de populações celulares residentes nos tecidos, como células estreladas hepáticas e pancreáticas (HINZ *et al.*, 2007; XING; SAIDOU; WATABE, 2010). Entretanto, uma variedade de células progenitoras foram identificadas a sofrer transdiferenciação, como as células musculares lisas, os pericitos (HINZ, 2010), as células endoteliais (RONNOV, JESSEN *et al.*, 1995), os adipócitos e as células mioepiteliais (WEVER *et al.*, 2008). Outras fontes potenciais para os miofibroblastos incluem as células-tronco mesenquimais recrutadas nos tecidos, os fibrócitos circulantes, derivados da medula óssea e ainda, células epiteliais submetidas à transição epitéliomesenquimal (TEM) (EYDEN *et al.*, 2009).

Uma vez desenvolvidos, os miofibroblastos sustentam uma força contrátil por um longo período de tempo. Isso é gerado pela tensão exercida pelas fibras de estresse na matriz extracelular circundante, que produz uma contração local da matriz. Essa contração é então estabilizada pela deposição de matriz extracelular, e se torna permanente dessa forma. Durante a cicatrização de feridas, a formação do tecido de granulação ocorre com a modulação dos fibroblastos em direção aos miofibroblastos; estes são caracterizados pela capacidade de produzir força e de sintetizar componentes da matriz extracelular que permitem a contração do tecido de granulação. A modulação do fibroblasto em miofibroblasto pode ser resumida na alteração do microambiente do tecido conjuntivo, que pode ser causada por vários agentes ou estímulos. O fibroblasto evolui para o proto-miofibroblasto, fenômeno observado no tecido de granulação inicial (TOMASEK, 2002).

O proto-miofibroblasto é caracterizado pela formação de fibras de estresse expressando β e γ actinas citoplasmáticas. Sob a estimulação de fatores de crescimento e de componentes da matriz extracelular recém-sintetizados, o proto-miofibroblasto evolui em direção ao miofibroblasto diferenciado, que é caracterizado pela expressão de α -SM actina e, em vários casos, por outros marcadores de diferenciação de músculo liso, como desmina e cadeias pesadas de miosina. O miofibroblasto diferenciado é característico do tecido de granulação em contração em uma ferida aberta, bem como de praticamente todas as doenças fibrocontrativas. Essa primeira etapa provavelmente se deve ao estresse mecânico a que o tecido conjuntivo é submetido após uma ferida ou outro fenômeno inflamatório (BORSI, 1990; EYDEN, 2008).

A transição entre proto-miofibroblastos e miofibroblastos diferenciados é essencialmente devida à ação combinada da variante ED-A da fibronectina celular e TGF- β , particularmente TGF- β 1, que é primeiro produzido por células fagocíticas e, em seguida, provavelmente sob a influência de tensão mecânica, também é produzida por proto-miofibroblastos e, assim, inicia um círculo vicioso que leva ao aparecimento de miofibroblastos diferenciados (SERINI, 1998; DESMOULIERE, 1993; ROBERTS 1986).

O TGF- β é um fator de crescimento bem estudado que exerce muitas ações biológicas importantes durante o desenvolvimento de fenômenos fisiológicos e patológicos. Em células fibroblásticas, induz a síntese de α actina de músculo liso e estimula a produção de colágeno tipo I. Portanto, o TGF - β 1 controla as duas atividades mais importantes do tecido de granulação, ou seja, a capacidade de modificar a forma do tecido e a formação de matriz extracelular. A este respeito, o TGF - β é a citocina chave na evolução de lesões caracterizadas pela formação de miofibroblastos. Todas

essas ações, entretanto, requerem a presença de tensão mecânica (TOMASEK., 2002) (Figura 3).

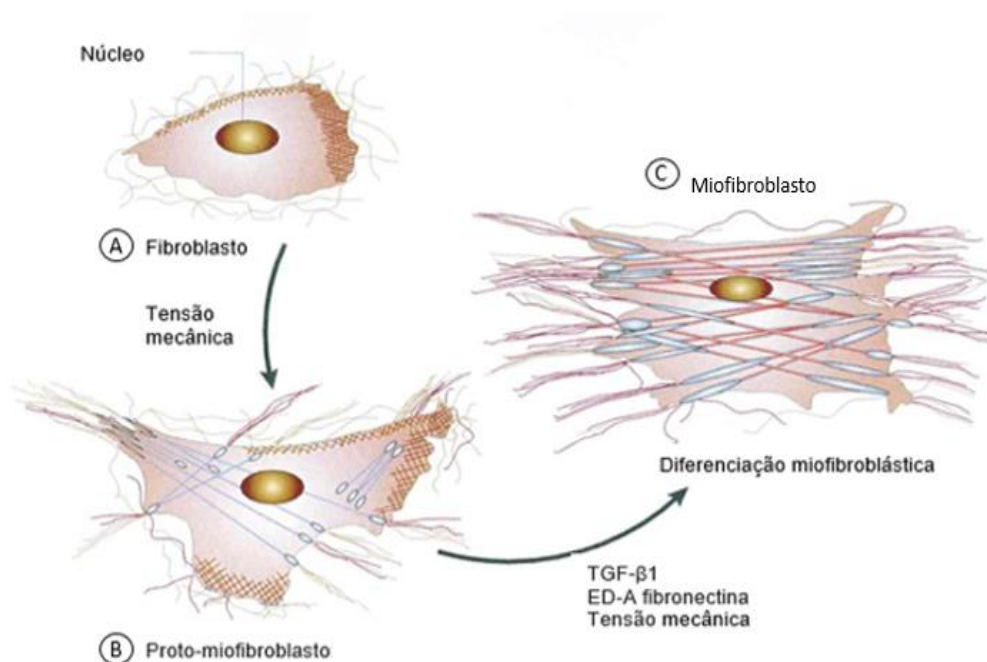


Figura 3: Estágios de diferenciação miofibroblástica: Fibroblasto (A), Pro-miofibroblasto (B), Miofibroblasto (C). Fonte: Gabbiani (2003) (adaptado).

Durante a reparação tecidual, os miofibroblastos são componentes importantes e aparecem após o término dos fenômenos inflamatórios iniciais. O processo de cicatrização envolve uma sequência altamente regulada de eventos coordenados entre si. A fase proliferativa do reparo se inicia por volta do terceiro dia após a injúria tecidual, sendo caracterizada pela formação do tecido de granulação, que é constituído por um leito capilar, fibroblastos, macrófagos, um frouxo arranjo de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico (MAJNO *et al.*, 1971).

No processo normal de cicatrização, os fibroblastos ativados submetem-se à apoptose e são removidos pelo tecido de granulação (DESMOULIÈRE *et al.*, 1995; RÄSÄNEN; VAHERI, 2010). A formação de cicatrizes hipertólicas ou fibroses é caracterizada pela desregulação desse processo e persistência dos fibroblastos ativados no tecido, com o consequente acúmulo da MEC circundante e enrijecimento tecidual, levando à deformação e alteração das suas funções normais (DARBY *et al.*, 2002).

Mastócitos e linfócitos fazem parte do sistema imunitário. Os mastócitos produzem e armazenam mediadores como a histamina, heparina e fator quimiotático dos eosinófilos no processo inflamatório. Esta célula passa para o sangue, onde

permanece apenas por alguns dias, e, atravessa para a parede dos capilares e vênulas através da diapedese, penetram em alguns órgãos, transformando-se em macrófagos (LONGLEY *et al.*, 1995; METZ; MAURE, 2007). Depois dos fibroblastos, os macrófagos são as células mais numerosas do tecido conjuntivo, encontrando-se em movimento ou aderidos às fibras colágenas e capaz de fagocitar partículas estranhas, como bactérias e células mortas (LONGLEY *et al.*, 1995; GORDON, 2003; DALE *et al.*, 2007).

Os linfócitos são as principais células funcionais do sistema imune na defesa do organismo. Estas células são capazes de reconhecer moléculas estranhas em agentes infecciosos e combatê-las por respostas humorais e citotóxicas mediada por células. (PARKIN; COHEN, 2001; VOJDANI; ERDE, 2006; BOWDISH *et al.*, 2007).

3.1.2.3 *Suprimento vascular da pele*

Na derme também estão presentes os nervos e as terminações nervosas sensoriais, anexos cutâneos, vasos linfáticos e sanguíneos (GUYTON; HALL, 1998). 101). O suprimento vascular da pele é limitado à derme e constitui-se de um plexo profundo, em conexão com um plexo superficial. Estes plexos correm paralelos à superfície cutânea e estão ligados por vasos comunicantes dispostos perpendicularmente (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

O plexo superficial situa-se na porção superficial da derme reticular, com arteríolas pequenas das quais partem alças capilares que ascendem até o topo de cada papila dérmica e retornam como capilares venosos. O plexo profundo localiza-se na base da derme reticular e é composto por arteríolas e vênulas de paredes mais espessas. Há uma ligação íntima entre os plexos por meio dos vasos comunicantes, e o controle do fluxo sanguíneo dérmico por esses vasos contribui para a homeostase corpórea (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Os capilares venosos e as vênulas terminais possuem pequenos calibres com células endoteliais sobre uma lâmina basal e células musculares lisas, coberta por uma camada descontínua de pericitos (COLL-BONFILL, 2015; TORTORA, 2007; MOORE, 2007) (Figura 4).

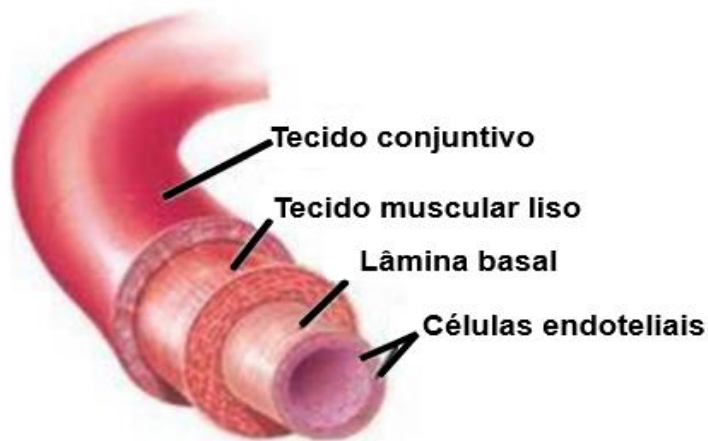


Figura 4: Estrutura de vasos sanguíneos: Tecido conjuntivo; Tecido muscular liso; Lâmina basal; Células endoteliais. Fonte: Torres (2017) (adaptado).

O endotélio vascular é uma camada monocelular que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos, constitui uma interface ativa, estrategicamente situada entre a circulação e o restante da parede vascular. O endotélio intacto controla a permeabilidade vascular, regulando o tráfego de moléculas e células. Provê uma interface não-trombogênica entre o vaso e os componentes sanguíneos, mantém a fluidez do sangue e modula a vasomotricidade, ajustando o calibre dos vasos às constantes alterações hemodinâmicas e humorais locais e a própria estrutura vascular (VANE *et al*, 1990; BLATOUNI, 2001; VIRDIS *et al.*, 2010; MARTINEZ-LEMUS, 2012). Além disso, as células do endotélio sintetizam óxido nítrico (NO), o que aumenta a produção do VEGF, proliferando e formando tubos capilares (WITTE; BARBUL, 2002).

As células musculares lisas da parede vascular são caracterizadas por uma grande abundância de proteínas contráteis, como a actina e miosina e pequeno retículo endoplasmático rugoso. Essas células em condições normais contêm uma função contrátil, apropriada ao seu papel fundamental no controle do tônus vascular, e uma capacidade migratória e proliferativa muito limitada. Quando ativado após uma lesão na parede arterial, as células musculares lisas entram em um estado sintético, no qual adquirem mais retículo endoplasmático bruto para a síntese de proteínas da matriz extracelular. Esta mudança, conhecida como modulação fenotípica, é um pré-requisito para os processos de migração e proliferação celular (OWENS, 1995; OWENS *et al.*, 2004; LIU; JIN., 2016;).

A lesão vascular decorrente da ferida desencadeia o processo de reparação via angiogênese, que é a formação de uma nova vasculatura sanguínea a partir de

vasos em pré-expansão, essencial para a cicatrização de feridas (FOLKMAN; SHING, 1992). Os vasos sanguíneos recém-formados participam da formação de tecido de granulação provisória e fornecem nutrição e oxigênio aos tecidos em crescimento. Além disso, as células inflamatórias requerem a interação e a transmigração através da membrana basal endotelial do vaso sanguíneo para entrar no local da lesão. Em tecidos adultos normais, as vasculaturas sanguíneas permanecem quiescentes, mas têm a capacidade de iniciar a angiogênese durante o reparo de feridas. A neoangiogênese é responsável não apenas pela nutrição do tecido, como também pelo aumento do aporte de células, como macrófagos e fibroblastos, para o local da ferida (RISAU, 1997).

As células endoteliais microvasculares são as células parenquimatosas principais envolvidas na angiogênese da ferida. Essas células são diferentes das células endoteliais que revestem os vasos maiores do sistema circulatório. Em resposta à lesão, as células endoteliais microvasculares iniciam um processo angiogênico que consiste na indução de hiperpermeabilidade microvascular, degradação local de sua membrana basal, migração e brotamento no estroma local, proliferação celular e formação de tecido de granulação, reconstrução da membrana basal, formação de novo vaso sanguíneo, estabilização e, eventualmente, regressão e involução da vasculatura recém-formada como remodelação de tecidos (MARX *et al.*, 1994).

Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (KECK *et al.*, 1989), angiopoietinas (ANG) (SURI *et al.*, 1996), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (FOLKMAN *et al.*, 1987), fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e interleucina-8 (IL-8) (YANG *et al.*, 1990; ARICI *et al.*, 1996) estão entre os fatores de crescimento críticos na angiogênese de feridas. A expressão cooperativa desses fatores de crescimento angiogênicos é essencial na angiogênese de feridas (SUFEN *et al.*, 2011).

Dentre os mediadores químicos da angiogênese destaca-se o VEGF, que é a molécula angiogênica mais potente. A ativação do VEGF ocorre por vários estímulos, como a hipóxia ou isquemia, baixo pH, citocinas, fatores de crescimento, entre outros (GRAÇA *et al.*, 2004). O VEGF estimula a migração e a proliferação das células endoteliais, iniciando assim o processo de brotamento dos capilares durante a angiogênese (FERRARA *et al.*, 2003). Ele promove vasodilatação por estimulação da produção de NO e contribui para a formação do lúmen vascular (HOOD *et al.*, 1998; TAMMELA *et al.*, 2003).

O TGF- β promove a angiogênese através da estimulação da migração de células endoteliais, diferenciação e formação de túbulos (YANG E MOSES, 1990;

Sankar *et al.*, 1996), bem como deposição de MEC e regulação positiva de seus receptores de integrina (MERWIN *et al.*, 1990; ENENSTEIN *et al.*, 1992; COLLO; PEPPER, 1999). Além disso, foi demonstrado que o TGF- β aumenta a secreção de VEGF dos fibroblastos dérmicos (TROMPEZ-INSKI *et al.*, 2000) e, em conjunto com a hipóxia, induz a atividade promotora do VEGF (SANCHEZ-ELSNER *et al.*, 2001). O PDGF funciona como mediador regulando a migração, proliferação e síntese de matriz de células endoteliais (PONTUAL; MAGINI, 2004). Os fatores de crescimento de fibroblastos também são descritos como indutores de angiogênese e estimulam a proliferação e diferenciação de células do endotélio (EICHORN *et al.*, 2007).

A angiostatina e a trombospodina são considerados os inibidores naturais mais potentes da angiogênese. A angiostatina tem efeito inibitório na matriz extracelular, reduzindo a migração e invasão de células endoteliais; a endostatina é um proteoglicano encontrado na parede do vaso, inibe a migração, levando a apoptose (EICHORN *et al.*, 2007). As angiopoetinas 1 e 2 (ANG1 e ANG2) são responsáveis pela estabilização vascular ao se ligarem ao receptor tirosina quinase e promoverem a sobrevivência endotelial, através do recrutamento de pericitos. Já a trombospodina tem ação antiproliferativa nas células endoteliais e modula a adesão destas quando se encontra na forma solúvel. (LINDNER, 2002; ZYGMUNT *et al.*, 2003) (Figura 5).

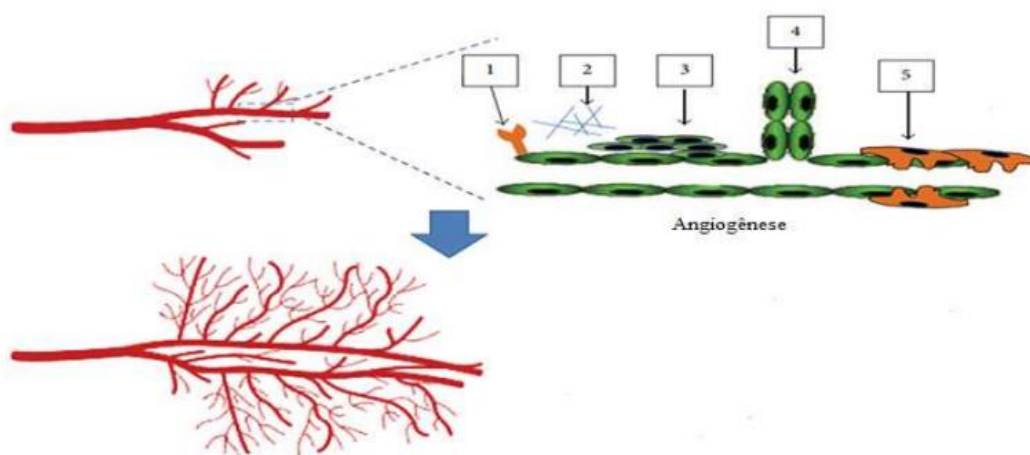


Figura 5: Esquema do processo de angiogênese: Fatores angiogênicos se ligam aos receptores (1), Degradação da membrana basal (2), Proliferação e migração de células endoteliais (3), Formação e remodelação do neovaso (4), Estabilização do novo vaso formado (5).

Fonte: (YOO; KWON, 2013) (adaptado).

3.2 Feridas

O rompimento da integridade da pele resulta na formação de uma ferida. A ferida pode ser classificada quanto a etiologia, o grau de contaminação, a evolução, o tipo de cicatrização e a profundidade. Mediante a intensidade do trauma, é considerada como superficial, afetando apenas as estruturas da superfície, ou grave, envolvendo vasos sanguíneos mais calibrosos, músculos, nervos, fáscias, tendões, ligamentos ou ossos (DEVRIENDT; ROOSTER, 2017; BAUM; ARPEY., 2005; KUMAR; LEAPER, 2008).

Podem ser definidas como agudas ou crônicas, conforme o tempo de existência. As agudas, comumente, são lesões traumáticas, como abrasões ou cortes, possuem tratamento rápido, respondem facilmente às intervenções terapêuticas e geralmente não apresentam complicações. Dessa forma, é possível defini-las como feridas de fácil resolução (KUMAR; LEAPER, 2008). Feridas crônicas, em consequência da sua etiologia subjacente, tornam o processo de cicatrização mais lento e continua a necessitar de tratamento depois de três meses do seu aparecimento. Portanto, são lesões de longa duração, com reparação difícil e estão associadas a complicações. A sua cicatrização envolve uma série complexa de interações entre diferentes tipos celulares, mediadores e matriz extracelular (VOWDEN; VOWDEN, 2017; FERREIRA, 2006; HARDING *et al.*, 2006).

Alguns fatores contribuem para que o processo cicatricial não ocorra naturalmente, como doenças vasculares, diabetes, estado nutricional e infecções (ROCHA *et al.*, 2015). Esses fatores influenciam para a cronicidade da ferida se tornar um grande desafio terapêutico. O crescente número de pessoas com feridas crônicas contribui para o aumento dos gastos públicos em saúde, tornando-se um problema de saúde pública. Além disso, as feridas crônicas apresentam impacto negativo na vida dos acometidos (ALMEIDA *et al.*, 2018).

Estudos comprovam que pacientes com feridas crônicas têm qualidade de vida inferior devido a dor, dificuldade de mobilidade, frustração, ansiedade, depressão, isolamento social, e, frequentemente, alteração da imagem corporal, acarretando mudanças no estilo de vida, piora na autoestima e em sua capacidade funcional, impossibilitando-os, muitas vezes, de exercer suas atividades de vida diária e laborais (WAIDMAN *et al.*, 2011; EVANGELISTA *et al.*, 2012).

3.3 Reparação tecidual

Para que ocorra o restabelecimento da integridade dos tecidos e não haja o retardo no processo de reparo das feridas, é necessário que o organismo proporcione um ambiente favorável com ótimas condições. Os eventos devem se suceder numa

sequência e tempo apropriados, caso contrário, o ferimento não será curado com êxito (KUMAR; LEAPER, 2008). O processo de reparo tecidual da ferida com perda dermo-epidêmica é contextualizado nas fases de hemostasia, inflamação, neovascularização, fibroplasia, reepitelização e remodelação (ANDRADE *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2018) (Figura 6).

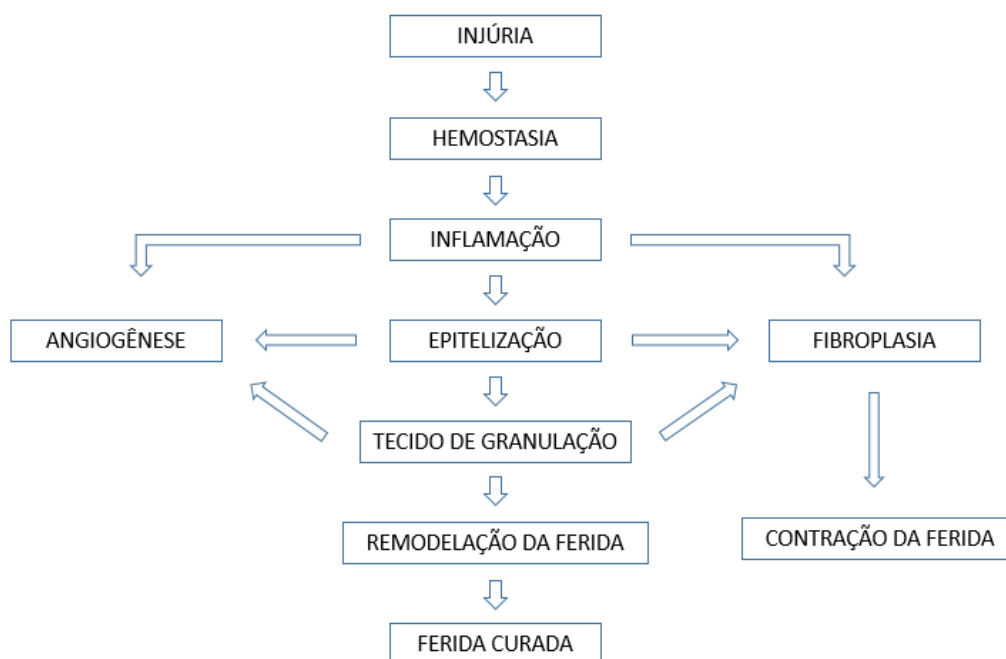


Figura 6: Processo de reparo tecidual da ferida. Fonte: <https://images.app.goo.gl/1xdLF46yYo3K8TQJA> (adaptado).

3.3.1 Hemostasia

A resolução da lesão começa com a hemostasia. Após lesão vascular, fatores neurohumorais locais induzem vasoconstrição transitória, sendo um mecanismo de defesa principalmente contra a perda sanguínea. A contração do músculo liso no endotélio é a primeira resposta à lesão vascular. A lesão endotelial põe as plaquetas em contato com a MEC subendotelial, a qual inclui entre seus constituintes o fator de von Willebrand (fvW), uma grande proteína multimérica que é sintetizada por células endoteliais. O fvW se mantém aderido à MEC por meio de interações com o colágeno e também se liga fortemente à glicoproteína Ib (GpIb) encontrada na superfície das plaquetas. As plaquetas ligam os receptores de GpIb ao fator de von Willebrand (fvW) na matriz extracelular (MEC) exposta e são ativadas, sofrendo alteração de formato e liberação de grânulos. Essas interações permitem a ação do fvW como uma espécie de cola molecular que liga fortemente as plaquetas às paredes desnudas do vaso.

(ANDREWS; BERNDT, 2004; BROUGHTON; JANIS, 2006; REININGER, 2008; WOHNER, 2008).

A adenosina difosfato (ADP) liberada e o tromboxano A₂ (TxA₂) induzem a agregação plaquetária adicional pela ligação de receptores da glicoproteína IIb/IIIa (Gp IIb-IIIa) ao fibrinogênio. Essa agregação plaquetária preenche o defeito vascular, formando o tampão hemostático primário. A Ativação local da cascata de coagulação (envolvendo fator tecidual e fosfolipídeos plaquetários) resulta na polimerização de fibrina, unindo as plaquetas em um tampão hemostático secundário, que é maior e mais estável que o tampão primário e contém hemácias e leucócitos capturados. O coagulo formado protege os vasos remanescentes e fornece a instauração de uma matriz provisória no leito da ferida (BALBINO *et al.*, 2005; GANTWERKER; HOM., 2012) (Figura 7).

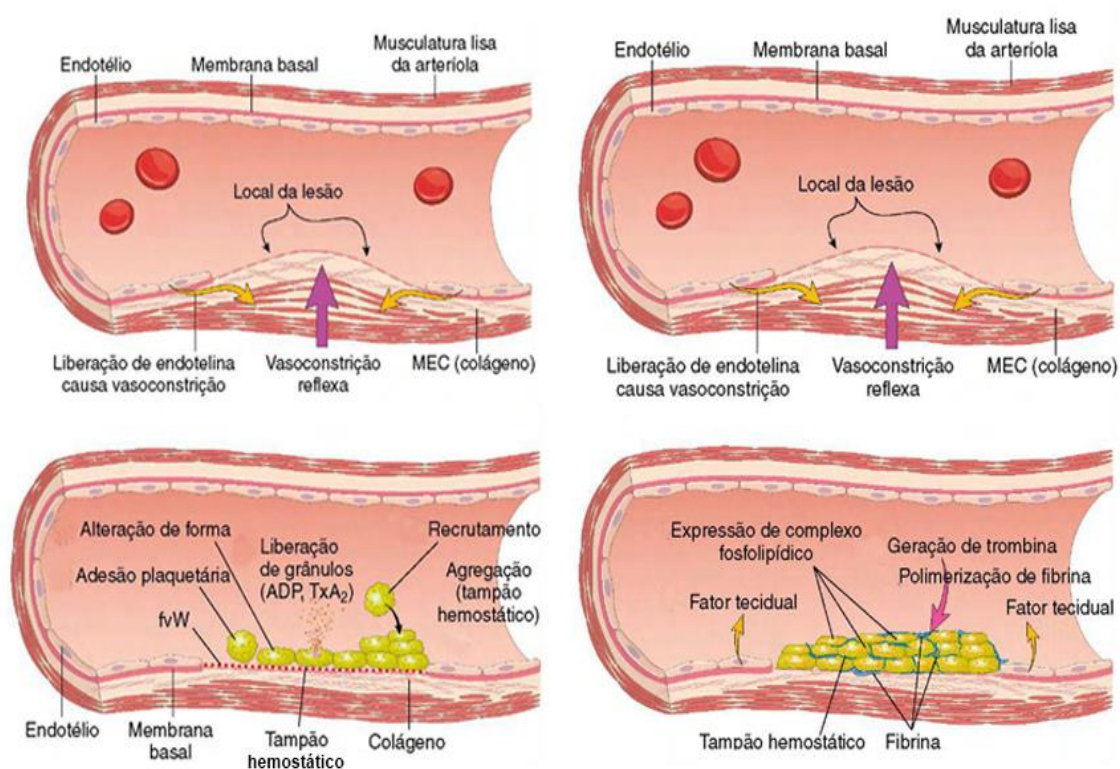


Figura 7: Representação do processo de hemostasia: Vasoconstrição; Hemostasia primária; Hemostasia secundária; Contrarregulação Antitrombótica. Fonte: ROBBINS, (2013) (adaptado).

Além das substâncias vasoativas e proteínas adesivas, existem vários fatores de crescimento que são liberados a partir dos α -grânulos presentes nas plaquetas. Fatores de crescimento são citocinas, proteínas produzidas naturalmente pelas células e responsáveis pela comunicação celular. Essa comunicação química é dinâmica e

dependente do efeito complementar entre os diferentes tipos de fatores de crescimento (WERNER; GROSE, 2003; KIM *et al.*, 2012).

Os dois fatores de crescimento mais importantes são: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformador-beta (TGF- β). O PDGF inicia a quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos, células musculares lisas e fibroblastos. Além disso, também estimula a transformação dos fibroblastos e células musculares lisas. O TGF- β adiciona outro sinal importante para a iniciação da cascata reparativa, atraindo macrófagos e estimulando a secretar citocinas adicionais, incluindo fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), Fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1). Esses mediadores mencionados não só controlam o processo inflamatório, mas também modulam a epitelização, acúmulo de colágeno e angiogênese (ANITUA *et al.*, 2012; BOSWELL *et al.*, 2012; RENZI *et al.*, 2013).

3.3.2 Fase inflamatória

A fase inflamatória sucede a hemostasia e tem como principais reações vasculares o aumento da permeabilidade vascular e o aumento do fluxo sanguíneo resultante da vasodilatação que ocorre pouco tempo após a vasoconstrição, ambos destinados a trazer células sanguíneas e proteínas para os sítios de infecção ou lesão (MARTIN, 1997). O aumento da permeabilidade vascular leva à saída de líquido rico em proteínas e células sanguíneas para os tecidos extravasculares. Isso provoca aumento da pressão osmótica do líquido intersticial, levando a maior efluxo de água do sangue para os tecidos. O acúmulo de líquido rico em proteínas resultante é chamado exsudato (MONTES, 1996).

A vasodilatação é induzida por mediadores químicos como a histamina e resulta em aumento do fluxo sanguíneo e abertura dos leitos capilares. Essa expansão vascular é a causa da vermelhidão (eritema) e calor observados, caracteristicamente, na inflamação. A partir dessa reação, os leucócitos começam a se acumular ao longo da superfície endotelial vascular, um processo chamado marginação (DEVEAUD *et al.*, 1998).

Os neutrófilos são o primeiro subconjunto de leucócitos a chegar na ferida. Estão presentes no local da lesão em grandes números no prazo de 24 a 48 horas após a ocorrência do dano. As principais funções de neutrófilos são defender a ferida de bactérias e remover restos de tecidos. Os neutrófilos liberam vários tipos de enzimas proteolíticas, fragmentando as bactérias. Restos de bactérias e de tecidos são

removidos da ferida pela fagocitose dos neutrófilos (YOUNG; MCNAUGHT, 2011; GANTWERKER; HOM, 2012).

É durante a fase inflamatória que ocorre a maior produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), a qual é estimulada pela migração de neutrófilos e macrófagos que combinam com o cloro para tornar as feridas menos susceptíveis às bactérias. Adicionalmente, os fibroblastos também secretam ERO quando são estimulados por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α e fatores de crescimento como fator de crescimento epidermal (EGF) e PDGF. O papel secundário de neutrófilos é manter a fase inicial do processo inflamatório através da excreção de citocinas (SINGER; CLARK, 1999; KIM *et al.*, 2008; GUO; DIPIETRO, 2010; KANTA, 2011; SILVA *et al.*, 2011).

Após 48 a 96 horas do ferimento, os leucócitos predominantes nas feridas são os macrófagos. Os macrófagos são considerados como a célula reguladora mais importante da fase inflamatória. Permitem a lise e a fagocitose, contribuindo para a progressão da cicatrização para a fase proliferativa, através da indução da angiogênese e da formação de tecido de granulação. São também responsáveis pela liberação de vários fatores de crescimento (PDGF, TGF- α , TGF- β , FGF e VEGF). Os macrófagos desempenham funções importantes na migração celular e síntese da MEC. Ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos permanecem dentro de um ferimento até a sua cura completa (MARTIN; SHAW, 2009).

Na fase inflamatória, quando ativados, dão início a um processo de sinalização de vias intracelulares que culmina na síntese de mediadores, tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β), podendo ainda ser indiretamente induzidos pelos prostanoídes como a prostaglandina (CHAPMAN *et al.*, 1990; SINGER; CLARK, 1999; MAHDAVIAN *et al.*, 2011). O TNF- α e IL-1 β são produzidos por macrófagos ativados, mastócitos, células endoteliais e alguns outros tipos celulares. Sua secreção é estimulada por produtos microbianos, como endotoxinas bacterianas, imunocomplexos e produtos dos linfócitos T gerados durante respostas imunes (GOISSIS, 2007).

A IL-1 β também é uma citocina induzida pela ativação do inflamossoma. O principal papel dessas citocinas na inflamação é a ativação endotelial (JUNQUEIRA *et al.*, 1983). O TNF- α e IL-1 β estimulam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, resultando em aumento do recrutamento, aderência dos leucócitos e aumento da produção de citocinas adicionais (principalmente quimiocinas) e eicosanoides. O TNF- α estimula também a trombogenicidade do endotélio. A IL-1 β ativa

os fibroblastos, resultando em aumento da proliferação e da produção de MEC (MONTES *et al.*, 1980).

Os linfócitos são considerados críticos para as fases inflamatória e proliferativa da reparação. Além de fornecer imunidade celular para a produção de anticorpos, os linfócitos atuam como mediadores dentro do ambiente da ferida através da secreção de linfocinas e estimulam o contato célula a célula entre linfócitos e fibroblastos. Os detalhes de como os linfócitos contribuem para a cicatrização não são totalmente conhecidos (MONTES *et al.*, 1984). O linfócito T atua como modulador do fibroblasto intersticial, contribuindo para a fibrose, através de substâncias produzidas por ele. Tais substâncias atuarão no fibroblasto causando efeitos como proliferação e secreção de fibronectina e colágeno. Quando a ferida está completando o seu fechamento e os microorganismos foram eliminados, os linfócitos constituem o subsistema leucocitário mais abundante nas feridas (BAUM; ARPEY, 2005).

3.3.3 Fase proliferativa

Após a fase inflamatória, segue uma intensa proliferação de células epiteliais, de células endoteliais, formação de tecido de granulação, deposição de colágeno e fibroplasia. Essa fase é denominada fase proliferativa, que tem início quatro dias após a lesão e estende-se até o final da segunda semana (CAMPOS *et al.*, 2007). O processo de epitelização garante que o novo epitélio formado se ligue à derme e adira o tecido (ALBUQUERQUE-JÚNIOR *et al.*, 2009).

A reepitelização é iniciada pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) e fatores de crescimento transformador alfa ($TGF\alpha$), que é produzido por plaquetas, macrófagos e queratinócitos (SCHULTZ *et al.*, 1991; LARJAVA *et al.*, 1993; MICHOPPOULOU; ROUSSELLE, 2015; ROUSSELLE *et al.*, 2019).

Com a presença local de macrófagos derivados de monócitos e a produção e liberação dos mediadores químicos produzidos por eles, a migração e ativação de fibroblastos é intensificada. Essas células são os principais componentes do tecido de granulação e após a influência dos fatores de crescimento e demais mediadores, derivados principalmente (mas não exclusivamente) dos macrófagos, são ativadas e migram das margens da ferida para o seu centro. Com o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Este processo é denominado de fibroplasia e para a sua eficiência é necessária a ocorrência em paralelo com a neoangiogênese da região (YATES *et al.*, 1991; JONES *et al.*, 2002; METCALFE; FERGUSON, 2007).

Com a fibroplasia se inicia a formação do tecido de granulação, composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados que estão suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno. Este tecido é edematoso e caracterizado pela presença de muitos espaços vazios, devido à imaturidade dos vasos, os quais, são extremamente exudativos e sangram com facilidade (GUIDUGLI-NETO, 1987; ECKERSLEY; DUDLEY, 1988; GUIDUGLI-NETO, 1992; BERRY; SULLINS, 2003; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Sob estímulo de fatores de crescimento e de outros mediadores, as células endoteliais do interior de capilares intactos nas margens da ferida passam a secretar colagenase e ativador do plasminogênio. Essas substâncias promovem aberturas na membrana basal e permite a migração das células endoteliais que, atravessando a parede do vaso e utilizando como substrato a matriz extracelular provisoriamente produzida, seguem em direção à região da lesão. Uma vez na região externa do vaso, elas passam pelo processo de diferenciação para aquisição da capacidade de formação de novos tubos capilares. As células endoteliais migratórias formam no exterior do vaso um broto capilar que em seguida une-se ao capilar de onde eram originárias para o restabelecimento do fluxo sanguíneo (REGAN *et al.*, 1991; PIERCE *et al.*, 1991; DESMOULIERE *et al.*, 1993 GODMAN; GROWTH, 2004).

A migração e ativação de macrófagos e fibroblastos para a região, somada à presença de vasos neoformados, permitem que os componentes da nova matriz extracelular passem a ser localmente produzidos principalmente por estas células. Os fibroblastos passam a depositar grandes quantidades de fibronectina. Outra substância produzida em grande quantidade neste segundo estágio é o ácido hialurônico, um polissacarídeoglicosaminoglicano não sulfatado com facilidade de se ligar à água, que auxilia na resistência do tecido à compressão. Estas duas substâncias predominam na matriz durante as primeiras fases do reparo, pois esta combinação propicia um microambiente eficiente para a movimentação das células, necessárias nesta etapa (VAN,1967; WERNER; GROSE, 2003; BARRIENTOS *et al.*, 2008).

À medida que o processo de maturação da ferida avança, a concentração de ácido hialurônico diminui e aumenta a síntese de proteoglicanos ou glicosaminoglicanos sulfatados. Essa modificação na composição da matriz extracelular favorece a fixação e mobilidade das células favorecendo a diferenciação delas para fenótipos mais maduros (RAMALHO *et al.*,2000).

As células endoteliais dos vasos neoformados se diferenciam em células de revestimento e os vasos neoformados assumem as características funcionais de

capilares. Os fibroblastos são as células que passam por mudanças fenotípicas mais acentuadas. Do fenótipo de células imaturas migratórias e replicativas no início do processo, passam para fenótipo característico de células ativamente engajadas na síntese protéica, ou seja, o seu citoplasma se torna volumoso e apresenta um retículo endoplasmático rugoso abundante. Com isto, eles passam a secretar grandes quantidades de colágeno. Este aos poucos substitui os proteoglicanos e a fibronectina até se tornar o principal componente da cicatriz em formação (BARRIENTOS *et al.*, 2008; PAGANELA *et al.*, 2009).

A tensão de oxigênio é um importante mecanismo de regulação do processo de reparo. No início do processo, a baixa tensão servia como estímulo ao macrófago para a produção de fatores de crescimento, para a migração e proliferação centrípeta das células das margens da ferida e indutor da angiogênese. Já nesta etapa, é necessária uma alta tensão de oxigênio para a hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina nas cadeias polipeptídicas do colágeno montadas no citoplasma dos fibroblastos. Isto é proporcionado pela rede capilar neoformada (SEMENZA, 2002; BARRIENTOS *et al.*, 2008).

Durante a fixação dos fibroblastos e seu amadurecimento fenotípico para células produtoras de colágeno, o processo de contração da ferida alcança a sua eficiência máxima. Isto ocorre devido à mudança de fenótipo dos fibroblastos das margens da ferida para miofibroblastos. Os fibroblastos destas regiões marginais começam a exibir características funcionais similares às células do músculo liso. À medida que a região da lesão vai sendo coberta pelas células epidermais, as células voltam a apresentar o fenótipo original e a membrana basal é refeita. Ao final desta etapa, o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, a circulação é restabelecida pela neovascularização e a rede linfática está passando por regeneração. Lentamente o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas o que começa a dar à região lesada a aparência de cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa (GABBIANI; RAYAN, 1970; MAJNO *et al.*, 1971; BALBINO *et al.*, 2005).

3.3.4 Fase de remodelamento

O processo de remodelamento é a última fase no processo de cicatrização e envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição de colágeno é feita a princípio de maneira aleatória tendo como orientação a organização da fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subsequentemente digeridas pela collagenase, resintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido

conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes. Essas ligações são formadas entre moléculas de tropocolágeno no âmbito da fibrila e entre as próprias fibrilas (LORENA *et al.*, 2002; MANDELBAUM *et al.*, 2003; BALBINO *et al.*, 2005).

Repetições sucessivas da lise, ressíntese, redirecionamento e religação formam fibras maiores de colágeno e resultam numa configuração mais regular da cicatriz. Isso aumenta a sua resistência devido à organização das fibras acompanhar as forças mecânicas a que o tecido está sujeito durante a atividade normal. Ao final desta etapa, os anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente e as cicatrizes são hipo-vascularizadas devido ao desaparecimento dos neocapilares (GURTNER, 2007; PROFYRIS *et al.*, 2012) (Figura 8).

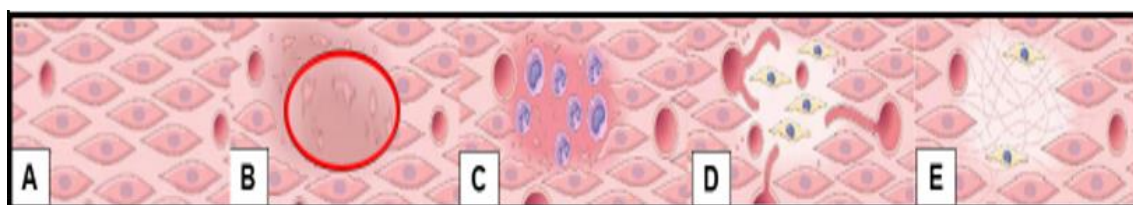


Figura 8: Tecido conjuntivo sem lesão (A); Tecido lesionado (B); Inflamação (C); Formação do tecido de granulação (D); Formação da cicatriz (E).

Fonte: ROBBINS, (2013) (adaptado).

3.4 Coberturas bioativas

Embora a reparação tecidual seja um processo sistêmico, existem terapias tópicas que viabilizam condições apropriadas para a cicatrização. A terapia tópica de feridas é fundamentada em estudos científicos sobre a fisiologia de reparação tecidual, e norteado pelos seguintes princípios: estimular remoção de tecidos necróticos e corpos estranhos do leito da ferida, eliminar processos infecciosos, extinguir espaços mortos, absorver o excesso de exsudato, manter o leito da ferida úmido, promover isolamento térmico e proteger a ferida de traumas e invasão bacteriana (DOUGHTY, 1992; DEALEY, 1996; YAMADA, 1999).

Cobertura é um material, um produto ou uma substância utilizada sobre as lesões. Elas devem proporcionar um ambiente úmido, proteção contra infecções secundárias, remoção de exsudato, promoção de regeneração do tecido e redução das complicações, garantindo princípios ideais de cicatrização, além de formar uma barreira física entre o leito da lesão e o meio externo. Deve ainda, proporcionar impermeabilidade à água e outros fluidos, manter temperatura adequada, proteger a ferida contra traumas mecânicos e limitar os movimentos dos tecidos ao redor da ferida. É importante que a cobertura viabilize as trocas gasosas, absorvam exsudato e

promovam o desbridamento, aliviando a dor e proporcionando condições favoráveis para a realização das atividades da vida diária do paciente (ADEWUMI; OGUNJINMI, 2011; FERREIRA *et al.*, 2005; SANTO *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2016).

O uso de biomateriais e a engenharia tecidual têm crescido expressivamente na tentativa de atender às necessidades da área biomédica. A engenharia tecidual reúne os princípios das ciências da vida e da medicina com as da engenharia, oferecendo nova perspectiva no tratamento de reparação, manutenção ou construção de órgãos danificados ou doentes. São considerados como biomateriais todos os materiais de origem natural ou sintética que interagem em contato com tecidos vivos, a fim de direcionar, complementar ou substituir as funções dos organismos vivos, minimizando os efeitos indesejáveis ou rejeição. Para isso, a natureza do material é crítica para criar as condições desejadas para a formação tecidual. Existe uma diversidade de biomateriais e muitas abordagens, porém é imprescindível que essas tecnologias continuem sendo investigadas quanto a sua capacidade de interagir em sistemas biológicos (PEREIRA *et al.*, 1999; ORÉFICE, 2005).

Para que novos biomateriais possam ser aplicados com sucesso na engenharia de tecidos, existe a necessidade fundamental do estudo das interações entre as células e estes materiais, possuindo segurança e eficiência no uso dos mesmos (DEE *et al.*, 2002; ORÉFICE, 2005). A escolha do biomaterial apropriado para o tratamento de feridas crônicas pode efetivamente promover a cicatrização das mesmas. Ademais, uma cobertura adaptada à lesão do paciente, reduz potencialmente a morbidade e os custos financeiros (BUCHBERGER *et al.*, 2011). Nessa perspectiva, uma série de técnicas e curativos inovadores tem sido aplicados com o objetivo de melhorar a cicatrização de feridas crônicas, incluindo os sistemas de liberação de fármacos (BRANSKI *et al.*, 2009), terapias com células tronco (GREER *et al.*, 2013), estimulação mecânica baseada em compressão (SHAO *et al.*, 2017; VEITH *et al.*, 2019), além de formulações a base de filmes e hidrogéis. Tais estratégias visam contornar as limitações das técnicas convencionais, que são ineficazes para alguns indivíduos (KAMATA *et al.*, 2015).

Polímeros naturais como alginato, quitosana e colágeno ou a gelatina hidrolisada derivada do colágeno têm sido largamente estudados como veículos de fármacos com potencial para cicatrização de feridas (SARANYA *et al.*, 2011; CENSI *et al.*, 2012). Estudos têm se concentrado em promover a incorporação de compostos bioativos (fármacos sintéticos ou produtos naturais) em biomateriais implantáveis, a exemplo do colágeno ou a gelatina hidrolisada derivada do colágeno. O colágeno, é a proteína abundante e principal componentes da matriz extracelular (MEC) no corpo. O colágeno

tem sido amplamente utilizado tanto *in vitro* como *in vivo*, e foi demonstrado que tem propriedades adequadas para uma matriz, especialmente em virtude das vantagens relacionadas a uma aceleração do processo de granulação, epitelização e a liberação controlada do produto incorporado diretamente no tecido danificado (ALBUQUERQUE-JÚNIOR *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2011).

A gelatina consiste de um biomaterial derivado da desnaturação ou hidrólise do colágeno por ácidos ou por substâncias alcalinas, resultando em polieletrólitos carregados. Tem sido conhecida pela excelente capacidade de formação de películas, podendo também ser incorporados fármacos para liberação controlada. As vantagens da gelatina incluem melhor solubilidade e menos antigenicidade. O processo de hidrólise desnatura a estrutura terciária de colágeno, reduzindo suas variações estruturais devido a diferentes fontes, além de exibir a propriedade única de gelificação em baixas temperaturas formando hidrogel (HUANG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012).

Hidrogéis são considerados ferramentas-chave na concepção de biomateriais, como curativos, sistemas para liberação controlada de fármacos, bem como scaffolds para células. Os hidrogéis consistem em redes poliméricas tridimensionais, hidrofílicas, capazes de absorver grandes quantidades de água ou exsudatos. A sua afinidade em absorver a água deve-se a presença de grupos funcionais hidrofílicos, como álcoois, carboxilas e ácidos sulfônicos, na superfície do polímero (DAI *et al.*, 2011). A versatilidade de curativos a base de hidrogéis está associada com a sua capacidade de polimerizar-se covalente ou não covalentemente para sustentar suas estruturas conformacionais. Além disso, estes curativos são eficazes no tratamento de feridas, devido a facilidade de aplicação, flexibilidade e permeabilidade ao transporte de oxigênio e metabólitos para o microambiente da lesão (KAMATA *et al.*, 2015).

O hidrogel fotopolimerizável, apresenta-se como uma alternativa promissora, visto que alguns estudos, principalmente voltados à engenharia de tecidos, tem demonstrado o uso do hidrogel sintetizado com gelatina e adição de anidrido metacrílico contendo um agente fotoiniciador (Irgacure), transformando-se em um hidrogel fotopolimerizável, como um biomaterial que apresenta várias características favoráveis (NICHOL *et al.*, 2010; HUTSON *et al.*, 2011; YUE *et al.*, 2015).

Chen *et al.* (2012) em seu estudo de bioengenharia vascular desenvolveram a gelatina metacrilada (GelMA) para a produção de GelMA fotopolimerizável e demonstrou que este material é compatível com a morfogênese vascular. Além disso, observou que a mesma formulação GelMA pode polimerizar-se muito rapidamente na presença de um fotoiniciador após a exposição à luz UV, evitando com isso, a

disseminação do hidrogel no local da implantação. A fotopolimerização já foi investigada com êxito em pesquisas com objetivo de se obter principalmente matrizes celulares tridimensionais, por exposição de uma solução do polímero precursor (gelatina e anidrido metacrílico) a uma fonte de luz ultravioleta, por determinado tempo na presença de um foto-iniciador (Irgacure), resultando na formação de uma ligação química entre os grupos amino e anidrido. (NICHOL *et al.*, 2010; SHIN *et al.*, 2012; BERTASSONI *et al.*, 2014; FATHI *et al.*, 2014; YUE *et al.*, 2015).

Algumas pesquisas apontam que a reticulação da gelatina com anidrido metacrílico, melhoram características tais como solubilidade, aumentam a resistência proteolítica, base apropriada favorecendo a adesão celular, alta permeabilidade de nutrientes, proteínas e oxigênio, e degradabilidade proteolítica (NICHOL *et al.*, 2010; HUTSON *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2012; YUE *et al.*, 2015). Portanto, minimizariam as desvantagens que ocorrem em algumas dispersões filmogênicas à base de colágeno que podem apresentar baixa resistência mecânica e serem rapidamente reabsorvidas pelo organismo, principalmente quando aplicadas sob feridas, em razão da presença de gelatinases e outras proteases capazes de promover rápida degradação destas membranas (LEE *et al.*, 2001; ALBUQUERQUE JÚNIOR *et al.*, 2009).

3.5 Produtos naturais no tratamento de feridas

Pesquisas de novas substâncias com finalidades terapêuticas têm sido realizadas com objetivo de isolar, extrair ou purificar novos compostos de origem natural. O reino vegetal tem se destacado como um grande fornecedor de substâncias com as mais variadas atividades biológicas, atuando como agentes de cicatrização de feridas devido à sua vasta variedade de diferentes constituintes como, alcalóides, flavonóides, taninos, terpenóides, saponinas, ácidos graxos e compostos fenólicos, que são potencialmente capazes de melhorar o processo de cicatrização de feridas. Esses constituintes possuem atividade positiva em diferentes estágios do processo de cicatrização de feridas por vários mecanismos, incluindo antimicrobiano, antiinflamatório, antioxidante, estimulação da síntese de colágeno, proliferação celular e efeitos angiogênicos (FARZAEI *et al.*, 2013; BAHRAMSOLTANI *et al.*, 2014; BARBOSA; FARIA, 2014).

Entre os diversos alvos dos fitoquímicos, estão modulações da função das células imunológicas, células da pele (queratinócitos e fibroblastos) proliferação, colágeno e outras proteínas da matriz extracelular, angiogênese e citocinas e ou fatores de crescimento. Determinados compostos mostram agir em alvos singulares, enquanto outros, agem em alvos múltiplos por meio de ações não específicas. (TSALA *et al.*,

2013; BAHRAMSOLTANI *et al.*, 2014). Essas substâncias de fontes naturais podem levar a melhores formas de terapia para pacientes com feridas cutâneas agudas, crônicas e cirúrgicas. Além disso, apresentam vantagens como baixo custo, fácil disponibilidade e menos efeitos colaterais. Muitas pesquisas estão em andamento em todo o mundo para identificar e isolar os componentes ativos de produtos naturais medicinais responsáveis por suas propriedades de cicatrização de feridas (THAKUR *et al.*, 2011; FARZAEI *et al.*, 2013).

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), são classificadas como plantas medicinais aquelas que possuem fonte de fármacos usadas para aliviar, prevenir ou curar uma doença ou uma alteração fisiológica ou um processo patológico. No ano de 2009, o Ministério da Saúde lançou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – RENISUS, composta por 71 espécies, algumas delas, entre outras ações biológicas, são cicatrizantes (BRASIL, 2009).

Estudos como os de Nunes *et al.* (2011), Albuquerque-Junior *et al.* (2009), Souza *et al.* (2013) e Nascimento *et al.* (2015), em que foram elaborados biomateriais utilizando produtos naturais que apresentaram resultados promissores na reparação tecidual e contração da ferida, ratificam a interesse da ciência por produtos naturais e suas substâncias químicas (KHAN, 2018).

3.6 Família Apocynaceae e o Gênero *Himatanthus*

A família Apocynaceae compreende aproximadamente 250 gêneros (presentes em duas subfamílias, Apocynoideae e Plumerioideae) e 2000 espécies, distribuídas predominantemente pelas regiões tropicais e subtropicais. São plantas de hábito variado, ervas, subarbustos, árvores e trepadeiras. A maioria contém látex em laticíferos não-articulados, ramificados ou não-ramificados, e vivem tanto nos campos como nas matas. Têm folhas em geral opostas com estípulas rudimentares, inteiras, quase sempre com glândulas ou emergências glandulares na base do limbo ou no pecíolo. As flores podem ser pequenas ou grandes e vistosas, tipicamente pentâmeras e hermafroditas. Os frutos se apresentam como um par de folículos, baga, cápsula ou dois mericarpos indeiscentes (BARROSO *et al.*, 1978; JOLY, 1979; EVANS, 2002; PLUMEL, 1991). Nesta família se destaca o gênero *Himatanthus* com grande importância química e farmacológica (SILVA *et al.*, 1998; MIRANDA *et al.*, 2000; WALTENBERGER *et al.*, 2011; LUZ *et al.*, 2014; VALE *et al.*, 2015).

Este gênero é exclusivo da América do Sul. A maioria das espécies ocorre na região amazônica, com as demais espécies distribuídas fora da região amazônica (extra-amazônica) na costa e no centro-oeste do Brasil (SPINA *et al.*, 2004). O nome do

gênero *Himatanthus* deriva de uma expressão grega que significa “manto-de-flor”, referindo-se às brácteas que envolvem os botões florais das espécies (DEWICK, 2002). Destaca-se por incluir espécies popularmente utilizadas como plantas medicinais e que possuem grande diversidade de compostos ativos, entre eles alcaloides indólicos, iridoides e ésteres triterpênicos (DEWICK, 2002).

PLUMEL (1991) distinguiu treze espécies desse táxon, entre as quais, várias descritas inicialmente por Müller Argoviensis e reclassificadas por sinonímia por Woodson, sendo elas: *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson, *Himatanthus attenuatus* (Benth.) Woodson, *Himatanthus bracteatus* (A. DC.) Woodson, *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, *Himatanthus fallax* (Müll. Arg.) Plumel, *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson, *Himatanthus obovatus* (Müll. Arg.) Woodson, *Himatanthus phagedaenicus* (Mart.) Woodson, *Himatanthus semilunatus* Markgr., *Himatanthus speciosus* (Müll. Arg.) Plumel, *Himatanthus stenophyllus* Plumel, *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson e *Himatanthus tarapotensis* (K. Schum.) Plumel.

A espécie *H. bracteatus*, planta utilizada nesta pesquisa, apresenta poucos relatos sobre a composição química e estudos voltado para as atividades biológicas. AGRA *et al.* (2007), em um levantamento etnofarmacológico de plantas da região norte e nordeste do Brasil, relataram o uso popular desta espécie contra úlceras externas e inflamações. Ferreira *et al.* (2009) identificaram a presença dos iridóides plumierideo no extrato aquoso da folha elátex, além de isoplumerídeo na casca, folha e látex.

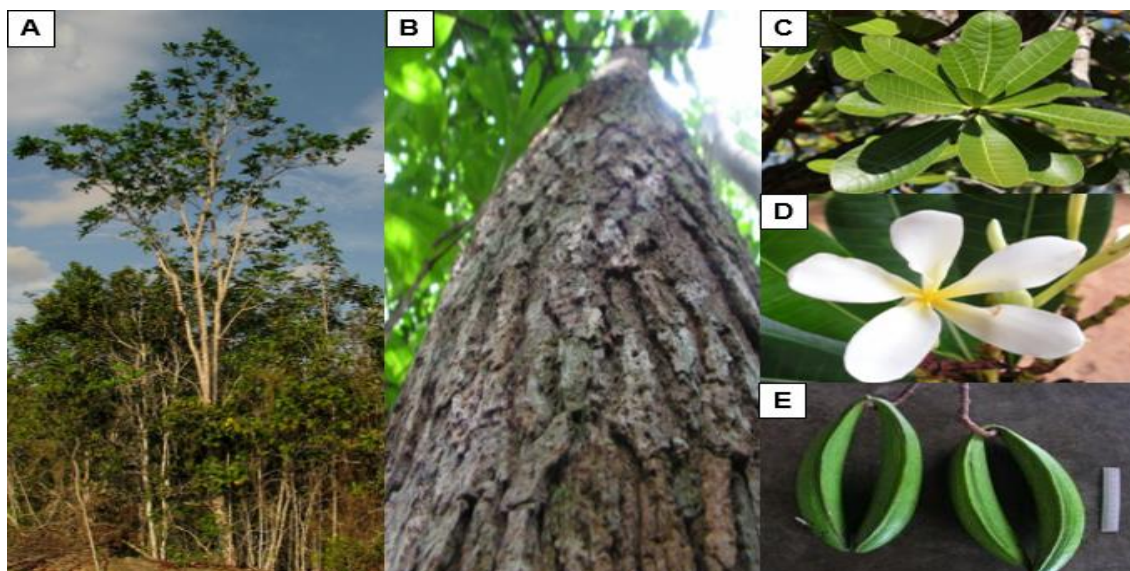


Figura 9: Fotografias da árvore da espécie *Himatanthus bracteatus* (A. DC) Woodson (A), casca do caule da *H. bracteatus* (B), folhas de *H. bracteatus* (C), flores da *H. bracteatus* (D), frutos da *H. bracteatus* (E). Fonte: <http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/04/24/himatanthus-obovatus-muell-arg-woodson/>

Tundis *et al.* (2008), relataram que os iridóides exibem uma ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas tais como: neuroprotetoras, antioxidantes, antiinflamatórias, imunomodulatórias, hepatoprotetoras, cardioprotetoras, anticancerígenas, antimicrobianas, hipoglicemiante, hipolipemiantes, colerético, antiespasmódico e purgativas. Entre os iridóides que se destacam com grande potencial biológico estão a plumericina (CASTILHO *et al.*, 2007; FAKHRUDIN *et al.*, 2014) e isoplumericina (CASTILHO *et al.*, 2007) substâncias estruturalmente relacionadas ao plumerídeo e isoplumerídeo encontradas na *H. bracteatus* (FERREIRA *et al.*, 2009).

Dentro desse contexto, os iridóides, compostos majoritários encontrados no gênero *Himatanthus*, representantes de uma classe de compostos químicos denominados terpenos, pertencentes ao grupo dos monoterpenos, constituintes de óleos essenciais e extratos de diversas plantas com atividade biológica já relatada, tem despertado interesse da comunidade científica, já que existem estudos que confirmam seu efeito farmacológico (RIELLA *et al.*, 2012; GUIMARÃES *et al.*, 2013; SÁ *et al.*, 2013; SANTANA *et al.*, 2014).

De acordo com Almeida (2016), o extrato da casca do caule da *H. bracteatus* obtido por extração por líquidos pressurizados mostrou ser uma técnica eficiente, aumentando o rendimento dos extratos, reduzindo gasto de solventes e tempo. O extrato apresentou atividade antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória. Quando difundido ao hidrogel GelMA fotopolimerizável, acelerou o processo de reparo cicatricial de feridas abertas por segunda intenção em modelo murino.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Neste estudo foram aplicados os princípios éticos do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentos com Animais). Este trabalho é parte integrante de um projeto de pesquisa “guarda-chuva” que foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Tiradentes (CEUA, parecer 011114, **anexo 1**).

4.2 Procedimentos de obtenção do extrato etanólico sequencial pressurizado de *Himatanthus bracteatus* (EEHB) e preparação dos hidrogéis fotoativados

Este trabalho constitui parte de um projeto de pesquisa “guarda-chuva” maior, intitulado “Avaliação das propriedades farmacológicas do extrato etanólico sequencial pressurizado obtido da casca da *Himatanthus bracteatus* (EEHB)”. Dessa forma, os procedimentos de coleta, identificação botânica e processo de extração do material vegetal, assim como caracterização fitoquímica do extrato e análise de suas propriedades antioxidantes, antinociceptivas e anti-inflamatórias, já foram realizados em estudo anterior (ALMEIDA, 2016). Da mesma forma, o desenvolvimento e caracterização de hidrogéis à base de gelatina metacrilada fotoativados contendo o EEHB também já foi efetuado no mesmo estudo. Por esta razão, a metodologia de todas essas etapas é apresentada no **anexo 2**, mas, como não foram realizadas por esta pesquisadora, não constam como parte verdadeiramente integrante da metodologia deste trabalho.

4.3 Ensaio de cicatrização de feridas

Para o ensaio biológico foram utilizados 54 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, todos machos, de aproximadamente 8 semanas de idade e peso médio de 300 ± 20 g, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes (Sergipe, Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno (33 x 17 x 40 cm), mantidas em ambiente controlado, com ciclo claro/escuro de 12 h, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*, mantidos sob temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($50 \pm 5\%$). Os animais foram anestesiados com administração intraperitoneal de xilazina /cetamina (1:1, 5 mg/kg), sendo então o dorso dos animais tricotomizado e a efetuada antisepsia com iodopovidona tópica a 1%. Em seguida, feridas arredondadas de espessura total foram realizadas no dorso de cada animal (1 cm sob área interescapular) usando um *punch* de biópsia de 8 mm de diâmetro (*Punch*

dermatológico nº 8, Rhosse®). Posteriormente, os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (n=18), conforme demonstrado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Distribuição dos animais em três grupos experimentais de acordo com o tratamento.

Grupos (n=18)	Tratamento tópico	volume)
CTR	Solução salina	40 µL
GELMA	Hidrogel fotopolimerizável à base de gelatina	40 µL
GELMA-HB	Hidrogelfotopolimerizável à base de gelatina contendo extrato etanólico de <i>H. bracteatus</i> a 2,0%*	40 µL

(*) A concentração do EEHB foi definida com base no estudo previamente efetuado por Almeida (2016).

Os materiais de preenchimento das feridas dos animais dos grupos **GelMA** e **GelMA-HB** foram submetidos à procedimento de fotopolimerização por meio de exposição à luz UVB (lâmpada Philips TL40W/12 RS, montada a 4 cm acima da área a ser irradiada, com emissão de luz contínua entre 270 e 400 nm, com um pico de emissão em 313 nm). A intensidade de luz de utilizada foi de $8,6 \times 10^4$ cm², durante 60 s à temperatura ambiente (ALMEIDA, 2016). Após o término do ato operatório, os animais receberam diclofenaco de potássio (10 mg/kg), via intramuscular, a fim de minimizar a sintomatologia pós-operatória. Após 3, 7 e 14 dias, seis animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂ (EB 248, 400 x 320 x 350 mm, Insight, São Paulo, Brasil) com fluxo contínuo de 100% de dióxido de carbono por 10 min. Após a certificação do óbito, as áreas feridas foram removidas cirurgicamente (aproximadamente 1,0 cm de margens), fixadas em solução de formalina a 10% (pH 7,4) por um período de 24 h.

4.4 Determinação do índice clínico de retração das feridas (IcRF)

Imediatamente antes da eutanásia dos animais, nos dias 0 (imediatamente após a cirurgia), 3, 7 e 14 dias de pós-operatório (imediatamente após a eutanásia), as feridas foram fotografadas utilizando câmera digital (Cybershot Sony HX-300) fixa em tripé com altura padronizada de 20 cm de distância da superfície das feridas. As imagens foram analisadas através do software Image J® (National Institutes of Health, USA), a fim de se obter valor da área total da ferida. A porcentagem de contração da ferida foi calculada através da seguinte equação 1:

$$\text{IcRF} = (\text{Ai} - \text{Af}) / \text{Ai} \times 100 \quad [\text{EQUAÇÃO 1}]$$

Onde: **IcRF** = índice clínico de retração da ferida

Ai = Área inicial da ferida (dia 0)

Af = Área final da ferida (dias 3, 7 ou 14)

Também foi realizada a avaliação clínica diária e análise descritiva das características macroscópicas das feridas, de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos indicativos de curso atípico da cicatrização, como edema, supuração e hiperemia.

4.5 Análise e gradação histológica do reparo cicatricial dérmico

Inicialmente, os espécimes fixados em formalina foram desidratados, diafanizados, emblocados em parafina e seccionados em 5 µm de espessura, de acordo com técnicas de processamento histológico de rotina. Dezoito secções histológicas seriadas foram obtidas de cada espécime emblocado, sendo três delas (secções 1, 7, e 13) coradas em HE (coloração de rotina) e três em picrossírius (secções 4, 10 e 16). Foi então realizado estudo analítico descritivo e semiquantitativo do infiltrado inflamatório e do tecido de granulação.

Para categorização da intensidade do **infiltrado inflamatório** foram considerados os seguintes critérios: *i)* **intenso** (agregados densos e justapostos de células inflamatórias, sem áreas livres entre os campos ópticos), *ii)* **moderado** (agregados densos de células inflamatórias, mas possibilitando visualizar áreas livres entre os campos ópticos) e *iii)* **discreto** (eventuais grupos células inflamatórias isoladas, dispersas pelos campos ópticos).

O **tecido de granulação** foi semiquantificado em quatro categorias: *i)* **ausente** (não observado nos campos ópticos), *ii)* **escasso** (faixa delgada e delicada limitada a profundidade da ferida), *iii)* **moderado** (faixa espessa ocupando os 2/3 mais profundos da área da ferida e *iv)* **Profuso** (faixa espessa ocupando toda a área da ferida).

A análise das **fibras de colágenas imaturas** foi realizada em cortes histológicos corados em picrossírius e analisados sob luz polarizada. As fibras de colágeno foram classificadas em tipo III (imaturo) ou tipo I (maduro) de acordo com seu padrão de birrefringência (verde ou amarelo/vermelho, respectivamente). A intensidade da deposição de fibras colágenas foi semiquantificada em: *i)* **ausente** (fibras não visualizadas no campo histológico analisado), *ii)* **mínima** (fibras espessas e compactas, e espaços interfibrilares escassos ocupando até 50% da área de neocolagenização), *iii)* **moderada** (fibras de espessura variável e espaços interfibrilares mais visíveis, ocupando 50 a 75% da área de neocolagenização) e *iv)* **profusa** (fibras

predominantemente delgadas e frouxamente dispostas, com espaços interfibrilares amplos e ocupando mais de 75% da área de neocolagenização).

Para realização da graduação histológica do reparo cicatricial foi utilizado o sistema de pontuação semiquantitativo baseado em uma escala ordinal considerando seis parâmetros histológicos relacionados ao processo de cicatrização (Sultana *et al.*, 2009; Gupta, Kumar, 2015), conforme demonstrado na **Tabela 2**. Três campos histológicos obtidos a partir de fotomicrografias em magnificação de 100 × (área óptica analítica de 0,25 mm²), em cada corte histológico, foram selecionados (um de cada borda e um do centro das feridas), e analisados. O procedimento de seleção dos três campos histológicos em cada seção é apresentado na **Figura 10**. A determinação do escore cicatricial total em cada caso foi obtida somando as pontuações dos critérios individuais. Os cortes histológicos foram avaliados por dois examinadores, que desconheciam os grupos durante todas as análises histológicas realizadas neste estudo. Os dados obtidos nesta análise foram expressos em mediana, intervalo interquartil e valores máximos e mínimos.

Tabela 2. Parâmetros histológicos para estabelecimento da gradação histológica do reparação cicatricial em feridas dérmicas

Parâmetro histológico	Sistema de pontuação (escores)	Microscopia (técnica histoquímica)
Infiltrado inflamatório	intenso-1, moderado-2, discreto-3	Microscopia de luz convencional (HE)
Quantidade de tecido de granulação	profuso-1, moderado-2, escasso-3, ausente-4	Microscopia de luz convencional (HE)
Orientação das fibras colágenas	vertical-1, misto-2, horizontal-3	Microscopia de luz polarizada (picrossírius)
Padrão de colagenização	reticular-1, paralelo-2, fascicular-3	Microscopia de luz polarizada (picrossírius)
Quantidade de colágeno maduro (tipo III)	profuso-1, moderado-2, mínimo-3, ausente-4	Microscopia de luz polarizada (picrossírius)
Quantidade de colágeno imaturo (tipo I)	profuso-1, moderado-2, mínimo-3	Microscopia de luz polarizada (picrossírius)

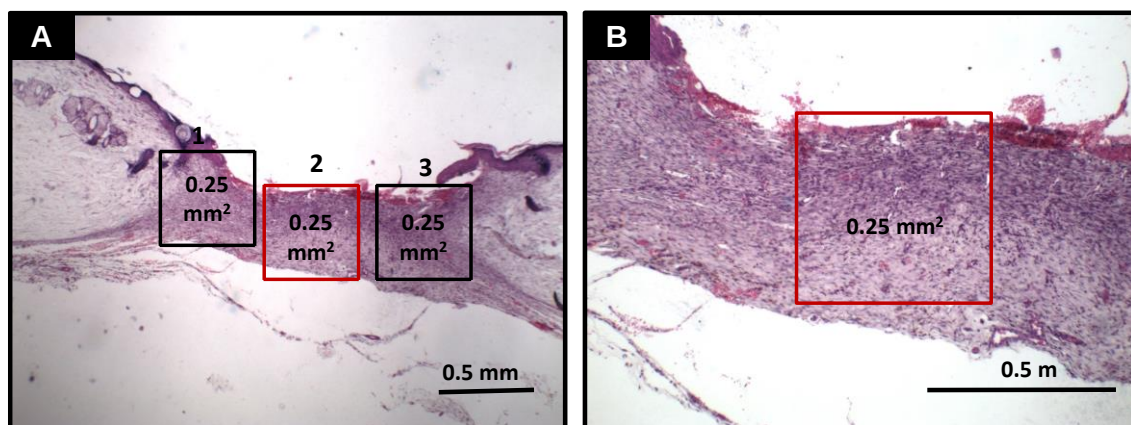


Figura 10. (A) Estratégia de seleção dos campos histológicos em ampliação de baixa potência para posterior avaliação da graduação histológica de cicatrização (HE, 40 ×). (B) Fotomicrografia do campo histológico 2 (em vermelho) em aumento médio, mostrando a delimitação adequada da área (área analítica de 0,25 mm²) para posterior análise histológica (HE, 100 ×). O mesmo procedimento também foi realizado nas áreas 1 e 3, sendo repetido em todos os cortes histológicos, corados em HE ou picrossírius.

4.6 Análise imunohistoquímica da diferenciação miofibroblástica (DMf) e da densidade vascular capilar (DVC)

Secções histológicas (5 µm de espessura) foram montadas em lâminas de vidro previamente silanizadas, desparafinizadas em xilol e lavadas em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 95%, 90%, 80% e 70%). O bloqueio enzimático da atividade da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3% e álcool metílico (10 min em sala escura). Em seguida, foi realizado o procedimento de imunodeteção dos antígenos pesquisados por meio de incubação com os anticorpos primários, conforme descrito na Tabela 3. Previamente a incubação, a recuperação antigênica para ambos os antígenos pesquisados foi efetuada por meio de calor úmido sob pressão em solução de tampão citrato 10 mM/pH 6,0. Para imunodeteção da DMf foram utilizadas as secções histológicas 2, 5, 8, 11, 14 e 17, enquanto para a imunomarcagem da DVC foram utilizadas as secções 3, 6, 9, 12, 15 e 18. As secções foram incubadas com anticorpo secundário (SABC - Complexo de estreptavidina-biotina, nº de catálogo SA1022) a 37 °C por 30 min. A revelação da reação foi efetuada por meio de incubação das secções com cromógeno diaminobenzidina (DAB, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, EUA) em câmara escura por 30 min e a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Meyer. Ambas as etapas foram realizadas com intervalo de quatro minutos cada. A imunocoloração foi considerada positiva quando se observou coloração marrom no citoplasma das células-alvo. Duas secções histológicas de miofibroma¹ oral, previamente diagnosticado, foram utilizadas como controle positivo

¹ **Miofibroma:** Neoplasia benigna caracterizada pela proliferação neoplásica de miofibroblastos.

para o anticorpo 1A4, enquanto duas secções de granuloma piogênico² oral funcionaram como controle positivo para o anticorpo CD 105. O controle negativo foi obtido utilizando duas outras secções dos mesmos casos, substituindo a incubação do anticorpo primário por TRIS-HCl. O número de células positivas para α -SMA e pequenos vasos capilares sanguíneos positivos para CD105 foi contado em dez campos histológicos seriados de cada seção histológica (400 $\times$, área analítica correspondente a 0,025 mm², 6 secções/caso). Os dados finais foram expressos como média $\pm$ erro padrão médio (SEM) células/0,025 mm².

Tabela 3. Antígenos alvo e anticorpos usados na análise imunohistoquímica diferenciação miofibroblástica (DMf) e densidade vascular capilar (DVC).

ANTÍGENO	CÉLULAS-ALVO	CLONE	DILUIÇÃO	INCUBAÇÃO
α -SMA	Miofibroblastos	1A4 (Dako)	1:100	30 min
CD105	Endotélio	SN6H (Dako)	1:500	Overnight (18 h)

4.7 Análise estatística dos dados

Para análise estatística dos dados foi utilizado o *software* PRISM 7.0. Todos os conjuntos de dados obtidos neste estudo foram submetidos a análise de normalidade de distribuição por meio do teste Shapiro-Wilk. Conjuntos de dados com distribuição simétrica (gaussiana) foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP), sendo as diferenças entre médias analisadas por meio do teste de análise de variância (duas vias) seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Conjuntos de dados com distribuição assimétrica (não gaussiana) foram expressos como mediana e amplitude do intervalo interquartil, sendo as diferenças entre médias analisadas por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. As análises de correlação entre o índice de retração clínico das feridas, a gradação histológica do reparo cicatricial, e a análise quantitativa da diferenciação miofibroblástica e da densidade vascular capilar foram realizadas por meio do teste de Pearson. Em todos os testes estatísticos aplicados neste estudo foi adotado o nível de significância de 5%.

² **Granuloma piogênico:** Lesão reacional caracterizada pela formação de tecido de granulação exuberante, rico em vasos capilares neoformados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nenhum dos períodos experimentais foi observada a presença de sinais clínicos de edema pronunciado, hiperemia perilesional ou formação de abscessos, nem no grupo controle (CTR) e nem nos grupos tratados com GelMA e GelMA-HB. Estes dados sugerem que o curso da cicatrização em todos os animais e grupos de estudo transcorreu sem intercorrências que poderiam determinar alguma forma de viés analítico macro ou microscópico (DORSETT-MARTIN, 2004).

A análise dos índices clínicos de retração das feridas (IcRF), determinado a partir do processamento das imagens das feridas no *software* ImageJ®, revelou interação significativa entre os grupos, tanto na variável “tempo”, quanto na variável “tratamento”. Os três grupos experimentais apresentaram aumento percentual significativo do IcRF ao longo do período experimental, seja no período de 3 para 7 dias ($p < 0,001$) quanto de 7 para 14 dias ($p < 0,001$), indicando o caráter contínuo e progressivo da retração da área inicial da ferida (Figura 11).

Considerando a variável tratamento, pode ser observado que, em 3 dias, o IcRF médio do grupo GelMA-HB ($18,5 \pm 5,5\%$) foi significativamente maior que aquele observado no grupo CTR ($9,9 \pm 2,7\%$; $p < 0,01$, respectivamente), mas não houve diferença entre estes e o grupo GelMA ($14,6 \pm 1,7\%$; $p > 0,05$). Em 7 dias, foi observada a maior variação no IcRF do grupo CTR em todo o período experimental ($35,2 \pm 13,7\%$). O grupo GelMA-HB ($53,0 \pm 9,1\%$) apresentou IcRF significativamente maior que CTR ($p < 0,05$), mas também não houve diferença significativa entre estes dois grupos e o grupo GelMA ($42,3 \pm 6,3\%$; $p > 0,05$). Em 14 dias, todos os grupos apresentaram IcRF médio superior a 80%, mas embora o fechamento completo da ferida não tenha observado em nenhum dos animais do grupo CTR, este fenômeno ocorreu em dois animais do grupo GelMA e dois do grupo GelMA-HB. Além disso, foi evidenciado que IcRF do grupo GelMA-HB ($97,6 \pm 2,3\%$) foi significativamente maior que o grupo CTR ($85,9 \pm 8,2\%$; $p < 0,05$), mas uma vez mais não houve diferença significativa entre estes dois grupos e GelMA ($91,6 \pm 6,9\%$; $p > 0,05$). Interessante notar que apenas em 3 dias o grupo GelMA foi estatisticamente melhor que CTR, ao passo que o grupo GelMA-HB foi significativamente superior que CTR durante os três tempos experimentais analisados.

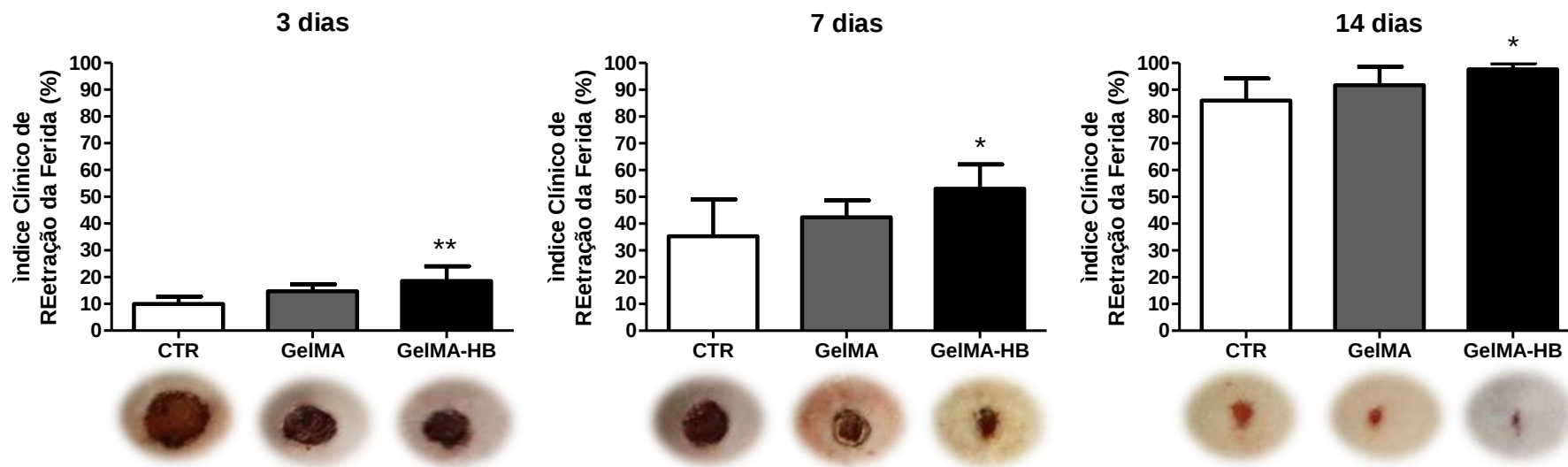


Figura 11. Índice clínico de retração da ferida (IcRF) ao longo do período experimental. CTR (controle sem cobertura); GelMA (tratados com GelMA); GelMA-HB (tratados com GelMA contendo extrato etanólico de *H. bracteatus* a 2%). As imagens na base da figura constituem feridas de cada grupo experimental com valores de IcRF mais próximos da média do grupo. Todos os grupos exibiram aumento significativo do IcRF ao longo do tempo ($p < 0,001$). Quanto a variável tratamento, as diferenças significativas em comparação com o grupo CTR foram expressas como: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey).

Diversos estudos têm demonstrado que um dos principais parâmetros para se analisar a celeridade e a qualidade do processo cicatricial é o índice clínico de retração da ferida (ALBUQUERQUE-JÚNIOR *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2015). A mensuração da área da ferida é essencial na avaliação do processo cicatricial, podendo fornecer parâmetros sugestivos de melhora ou piora da cicatrização (VITORINO-FILHO, 2011). Neste estudo, o grupo tratado com o hidrogel sintetizado com colágeno fotopolimerizável contendo extrato da *H.bracteatus* exibiu índices de retração de ferida significativamente maiores que o grupo controle em todo o período experimental. A interpretação destes dados sugere a participação de constituintes químicos presentes na *H. bracteatus*, como iridioides plumericina e isoplumericina (ALMEIDA, 2016), nas distintas etapas do reparo cicatricial, promovendo aceleração da retração ou fechamento da ferida.

Os fatores determinantes da maior ou menor retração clínica de feridas ao longo do período de cicatrização dérmica variam de acordo com a fase do processo cicatricial. Nas fases iniciais, correspondentes ao período inflamatório, é possível que o maior ou menor diâmetro médio de feridas em cicatrização por segunda intenção esteja relacionado a magnitude do edema intersticial promovido pelos mediadores químicos vasoativos liberados *in situ* durante a inflamação aguda, como prostaglandinas e óxido nítrico (ALBUQUERQUE-JÚNIOR *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2015). O efeito anti-inflamatório em modelo animal do mesmo EEHB utilizado no presente estudo foi previamente demonstrado por Almeida (2016), o que poderia indiretamente justificar a menor área da ferida no grupo GELMA-HB, em razão da menor distensão edematosa dos tecidos perilesionais. Além disso, foi recentemente demonstrado que a plumericina apresenta potente atividade anti-inflamatória, posto que reduz significativamente mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), ciclooxigenase-2 e óxido nítrico sintase induzível (RAPA *et al.*, 2020). Como a plumericina representa um dos principais marcadores químicos do EEHB (ALMEIDA, 2016), estes dados corroboram a teoria de um importante efeito anti-inflamatório desempenhado pelo extrato nas fases iniciais da cicatrização.

Em fases posteriores, a retração clínica da ferida tem sido diretamente relacionada a diferenciação de fibroblasto em miofibroblastos, e consequente contração das margens da lesão em direção centrípeta. Os miofibroblastos começam a se diferenciar na área do ferimento a partir do terceiro dia após a lesão inicial (DESMOULIÉRE *et al.*, 1996; TOMASEK *et al.*, 2002; GABBIANI, 2003), o que justifica a baixa retração da ferida durante os três primeiros dias após a lesão (DIEGELMANN;

EVANS, 2004). O pico de diferenciação miofibroblástica, em modelo murino de cicatrização por segunda intenção, ocorre no sétimo dia após lesão, momento a partir do qual começa a haver redução progressiva dessa população celular (ALMEIDA *et al.*, 2014). Por esta razão, a partir do sétimo dia pode-se notar a diminuição contínua da área da ferida devido ao pico de diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, com redução substancial dessas células após o décimo quarto dia (RIBEIRO *et al.*, 2009), conforme também pode ser observado no presente estudo. Como, no presente estudo, o grupo GelMa-HB continuou apresentando índices significativamente maiores de retração clínica da ferida entre 7 e 14 dias, foi hipotetizado que os componentes fitoquímicos presentes no EEHB poderiam promover maior retração clínica das feridas por acelerarem a diferenciação miofibroblástica *in vivo*.

Para analisar a veracidade desta teoria, foi realizado o estudo morfométrico da diferenciação miofibroblástica (DMf), no qual os miofibroblastos foram identificados pela imunomarcagem citoplasmática do antígeno α -actina de músculo liso (α -SMA). Para a determinação da DMf média, apenas células imunomarcadas dispersas no tecido conjuntivo, seguindo ou não a orientação das fibras e fibrilas de colágeno, foram consideradas nas contagens. Células imunomarcadas envolvendo a parede de vasos sanguíneos foram interpretadas como pericitos e excluídas das contagens (NUNES *et al.*, 2011).

Conforme pode ser observado na Figura 12, os mais baixos índices de DMf em todos os grupos foram vistos em 3 dias. Tanto no grupo GelMA ($6,3 \pm 2,1$ células/0,025 mm²) quanto no GelMA-HB ($6,9 \pm 1,8$ células/0,025 mm²) a DMf foi significativamente maior que em CTR ($4,8 \pm 1,9$ células/0,025 mm²; $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). Em 7 dias foi observado o pico de DMf, tendo os valores médios de miofibroblastos por campo histológico aumentado significativamente em todos os grupos ($p < 0,001$). A DMf em GelMA-HB ($36,1 \pm 6,6$ células/0,025 mm²) foi significativamente maior que em GelMA ($31,9 \pm 5,3$ células/0,025 mm²; $p < 0,01$) e CTR ($25,8 \pm 4,6$ células/0,025 mm²; $p < 0,001$). Além disso, GelMA apresentou maior diferenciação miofibroblástica que CTR ($p < 0,001$). Em 14 dias, houve redução significativa da DMf nos três grupos em comparação com 7 dias ($p < 0,001$). Contudo, não houve diferença entre CTR ($16,8 \pm 3,7$ células/0,025 mm²), GelMA ($17,5 \pm 4,3$ células/0,025 mm²) e GelMA-HB ($18,2 \pm 3,8$ células/0,025 mm²) ($p > 0,05$).

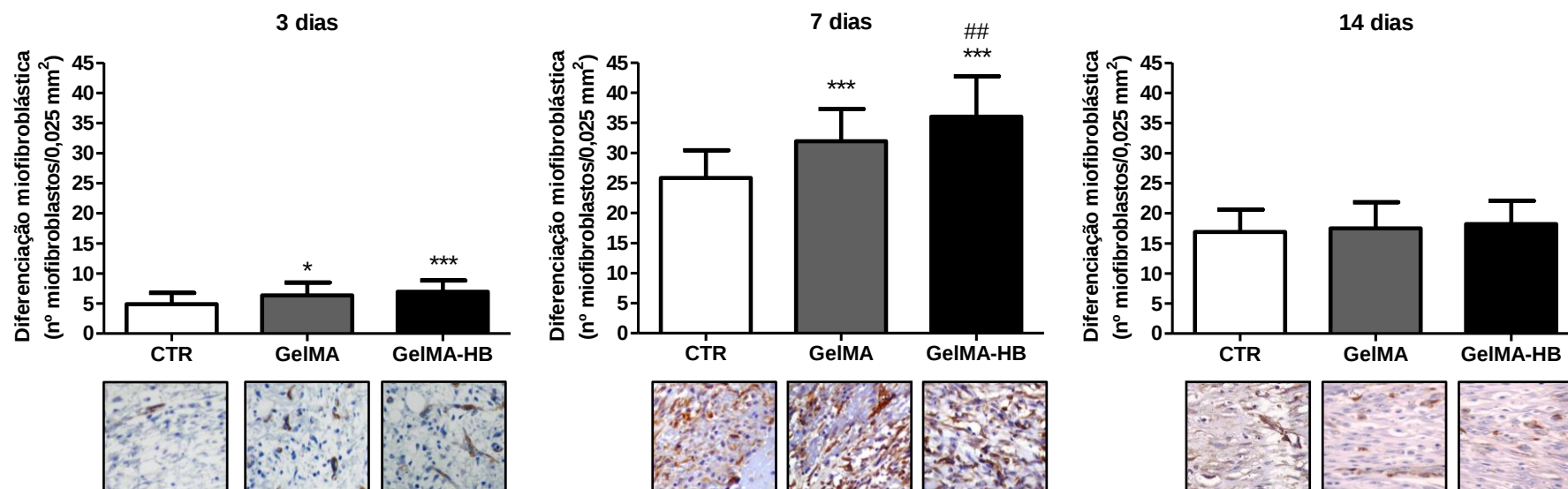


Figura 12. Determinação da diferenciação miofibroblástica (FMf) ao longo do período experimental (dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão). Diferenças significativas em comparação com CTR estão expressas como * $p < 0,05$ e *** $P < 0,001$; diferenças significativas em relação a GelMA estão expressas como ## $p < 0,01$ (ANOVA, seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey). As fotomicrografias na base da figura constituem secções histológicas representando o padrão de imunomarcação positiva para α -SMA em células fusiformes no tecido conjuntivo da área cicatricial nos diferentes grupos ao longo do período experimental (SABC, 800)

Os miofibroblastos são conhecidos principalmente por seu papel na cicatrização de feridas. Uma característica central da diferenciação dessas células envolve a neoformação de fibras de estresse e expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA), caracterizando o aparato contrátil dos miofibroblastos (SERINI; GABBIANI, 1999; EYDEN *et al.*, 2009). Miofibroblastos podem derivar de uma grande variedade de fontes histogenéticas, como: i) fibroblastos da derme ou mucosa; ii) células musculares lisas; iii) células perisinusoidais; iv) células epiteliais, como ceratinócitos (transição epitelial-mesenquimal) e endotélio (transição endotelial-mesenquimal) e v) células mesenquimais totipotentes circulantes (células tronco) (BOCHATON-PIALLAT *et al.*, 2016). Essas células são frequentemente caracterizadas pela expressão de α -SMA, marcador mais importante para identificar miofibroblastos bem diferenciados (KOGA *et al.*, 2019). Além disso, o anticorpo 1A4, comumente empregado para imunomarcação do antígeno α -SMA, já havia demonstrado reatividade para tecido dérmico parafinado de roedores (NUNES *et al.*, 2011, ALMEIDA *et al.*, 2014), justificando sua utilização no presente trabalho.

Os baixos índices de diferenciação miofibroblástica nos três primeiros dias observados no presente estudo eram esperados, já que, durante o reparo tecidual, essas células só aparecem após o término dos fenômenos inflamatórios iniciais (RAMASASTRY, 2005). Estudos tem demonstrado que o tratamento com PGE2 promove perda de expressão de filamentos de actina e colapso drástico do citoplasma dos fibroblastos, gerando um fenótipo completamente oposto aos fibroblastos de citoplasma amplo e volumoso, rico em filamentos contrateis, tratados com TGF- β (GERARDUZZI; BATISTA, 2017). Assim, uma das principais razões para reduzida diferenciação miofibroblástica em 3 dias poderia ser a alta concentração de prostaglandinas, incluindo prostaglandina E2 (PGE2) durante a fase inflamatória, particularmente secretada por polimorfonucleares neutrófilos e macrófagos M1 (SHEPPE *et al.*, 2018).

Corroborando esta teoria, os grupos GelMA e GelMA-HB exibiram DMf significativamente maiores que o grupo CTR. Sabe-se que a aplicação de material de preenchimento moldável à base de colágeno no sítio de injúria, mesmo sem ativos, pode promover rápida e dinâmica interação entre as células e a MEC, o que promove a resolução rápida da inflamação e crescimento interno de fibroblastos e queratinócitos (GOULD *et al.*, 2016). A presença do biomaterial também minimiza o influxo natural de macrófagos, já que reduz sensivelmente a necessidade de remoção de desbris e do material hemostático (CHATTOPADHYAY; RAINES, 2014). Adicionalmente, tanto o EEHB (ALMEIDA, 2016) quanto a plumericina (um dos compostos majoritários do extrato)

(FAKHRUDIN *et al.*, 2017) exibiram potente atividade anti-inflamatória, o que atuaria reduzindo a migração de leucócitos para o sítio de injúria tissular. Este fenômeno reduziria, pelo menos parcialmente, a concentração de citocinas pró-inflamatórias liberadas por leucócitos, incluindo PGE2.

A diminuição dos neutrófilos polimorfonucleares é comumente acompanhada por uma redução simultânea de macrófagos M1 (capazes de secretar citocinas pró-inflamatórias), enquanto os macrófagos M2 permanecem na área ferida logo no início da fase proliferativa. Essa transição fenotípica do infiltrado inflamatório desempenha um papel importante na cicatrização de feridas, pois estas células secretam uma ampla gama de fatores de crescimento que têm o potencial de modular o processo de cicatrização, incluindo a proliferação de fibroblastos, diferenciação miofibroblástica e a formação de tecido de granulação. Assim, os elevados teores de TGF- β liberados por macrófagos M2 na fase pós-inflamatória determinam o início da diferenciação miofibroblástica ativa na área cicatricial (FONSATTI *et al.*, 2001; BORUT *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2011). Este fenômeno biológico envolve ativação de fibroblastos quiescentes em miofibroblastos. Essas células ganham fibras contráteis através da expressão de α -SMA e formam contatos célula-célula através de junções tipo *gap*, o que conduz à contração da ferida e remodelação da MEC.

Os dados obtidos no presente estudo sugerem que o preenchimento das feridas com as matrizes de gelatina fotopolimerizável contendo EEHB (GeLMA-HB) aumentou significativamente a diferenciação miofibroblástica em 7 dias. Até onde foi pesquisado, estes dados parecem representar as primeiras evidências de que os principais constituintes fitoquímicos do EEHB, como plumericina ou isoplumericina, poderiam atuar na diferenciação miofibroblástica *in vivo*. Por outro lado, também é possível que este fenômeno biológico seja resultado não de uma ação direta dos componentes do extrato mas sim um efeito secundário do efeito anti-inflamatório e antioxidante dos constituintes fitoquímicos nas fases iniciais do reparo. Isto levaria a antecipação da infiltração de macrófagos M2, com liberação de TGF- β e consequente diferenciação miofibroblástica precoces. No entanto, estudos posteriores são necessários para analisar com mais precisão a veracidade destas teorias.

No presente estudo, foi observado um pico de diferenciação miofibroblástica em sete dias, e redução expressiva em quatorze dias. É fato que o período de diferenciação miofibroblástica ativa e contração centrípeta das margens da ferida perdura por 2 a 3 semanas e é o marco inicial da formação da cicatriz (LIU *et al.*, 2010), justificando os resultados aqui obtidos. Além disso, corroborando os resultados observados no

presente trabalho, o perfil imunohistoquímico de diferenciação miofibroblástica ao longo do tempo se mostrou bastante similar àquele descrito por Almeida *et al* (2014) em modelo murino de cicatrização por segunda intenção. Além do aumento dos níveis locais de TGF- β , dois outros fenômenos biológicos parecem estar intimamente associados ao aumento da diferenciação miofibroblástica: i) acúmulo de proteínas de matriz extracelular especializadas (ECM), como a proteína ED-A resultante de *splicing* variante da fibronectina; e ii) alto estresse mecânico extracelular da MEC e atividade de remodelação celular (HINZ, 2009). Por outro lado, a redução progressiva do número de miofibroblastos a partir do sétimo dia de reparo parece ocorrer em resposta à apoptose mediada pela diminuição progressiva dos níveis locais de TGF- β (LI *et al.*, 2010).

De especial interesse é o fato de que GelMA apresentou maiores índices de DMf que CTR em 3 e 7 dias. Estes dados sugerem que a mera presença de um biomaterial moldável a base de gelatina preenchendo a ferida pode funcionar como potencial agente modulador da diferenciação miofibroblástica. Como o GelMA não possui constituintes fitoquímicos bioativos, estes achados sugerem que essa matriz de colágeno hidrolisado fotopolimerizável pode ter atuado como uma barreira física que minimizaria a contaminação da ferida e, por consequência, reduziria a infiltração inflamatória. Como a diminuição da inflamação é um evento-chave para fornecer as condições adequadas para o desenvolvimento da fase proliferativa, uma vez que permite que uma ampla gama de fatores de crescimento seja secretada na área ferida, incluindo TGF- β (PAKSHIR *et al.*, 2020), isto justificaria a maior DMf em GelMA quando comparado a CTR.

Em 14 dias, os três grupos apresentaram redução significativa na DMf. Esse fato é consistente com uma evolução fisiológica adequada do reparo, uma vez que, com o fechamento da ferida, os miofibroblastos sofrem apoptose, desaparecendo do leito da ferida e deixando apenas a cicatriz fibrosa na área afetada (VAN DER WATER *et al.*, 2013). Entre os principais sinais fisiopatológicos que vêm sendo considerados como indutores de apoptose de miofibroblastos nesta fase do reparo estão a restauração da tensão isotônica normal da MEC que ocorre após a contração da ferida e a redução dos níveis tissulares de TGF- β (GERARDUZZI; BATISTA, 2016).

Por outro lado, a persistência de miofibroblastos em uma ferida fechada é fortemente sugestiva de desenvolvimento de uma cicatriz hipertrófica, uma forma de evolução patológica da cicatrização de feridas (BOCHATON-PIALLAT *et al.*, 2016). Este fenômeno está embasado no fato de que, além do colágeno tipo I e tipo III, proteínas primárias da MEC expressas por miofibroblastos, estas células também produzem uma miríade de outros constituintes durante o reparo de feridas e fibrose, como colágeno tipo

IV, V e VI, glicoproteínas e proteoglicanos, como fibronectina, laminina e tenascina (KLINGBERG; HINZ; WHITE, 2013).

A ausência de diferença na DMf entre os grupos sugere, portanto, que não houve indícios histomorfológicos de formação fibrótica excessiva em nenhuma das condições experimentais avaliadas. Interessante notar que apesar da DMf significativamente maior apresentada por GelMA-HB em 3 e 7 dias, não houve diferenciação miofibroblástica excessiva em 14 dias, sugerindo a existência de mecanismos regulatórios desse processo. Contudo os mecanismos exatos por trás dessa atividade modulatória ainda não estão elucidados.

Além da diferenciação miofibroblástica, outro fenômeno biológico fundamental para o desenvolvimento da fase proliferativa do reparo é a formação do tecido de granulação. Este se caracteriza pela formação de uma rica rede vascular que preenche a área da ferida, aumentando substancialmente a oferta de oxigênio e nutrientes na área lesada, que permite a proliferação celular e ampla deposição e remodelação do colágeno cicatricial (ALHAJJ *et al.*, 2020). Desta forma o perfil de desenvolvimento da microvasculatura ao longo do período cicatricial é fator crítico para o sucesso do processo de reparo.

No presente estudo, os vasos sanguíneos neoformados foram identificados pela positividade citoplasmática das células endoteliais para o antígeno endoglina (CD105), uma proteína transmembrana componente do receptor do fator transformador de crescimento- β (TGF β R), que é expressa em células endoteliais vasculares em todos os estágios de maturação (NASSIRI *et al.*, 2011). Aliado ao TGF- β , o PDGF também participa do processo de estabilização dos vasos recém-formados, tornando tubos endoteliais simples em estruturas vasculares elaboradas, ajudando, com isso, a manter a quiescência endotelial (FOX *et al.*, 2001). Durante a angiogenese, o TGF- β atua regulando a proliferação e migração de células endoteliais, inibindo a formação de novos vasos sanguíneos, enquanto o PDGF e VEGF atuam de forma contrária (DUFF *et al.*, 2003; NAGATSUKA *et al.*, 2005). Assim, a imunoexpressão de CD105 tem sido utilizada para analisar a angiogênese em modelos experimentais de cicatrização (BLATT *et al.*, 2020; AN *et al.*, 2020), justificando sua utilização neste estudo.

Em 3 dias, a neoformação vascular se limitou a discreta proliferação capilar na base hipodérmica das feridas. Os capilares preexistentes se apresentaram bastante dilatados e congestos. Como demonstrado na **Figura 13**, a maior DVc foi observada em GelMA-HB ($4,6 \pm 1,3$ vasos/ $0,025 \text{ mm}^2$), significativamente mais intensa que em CTR ($3,8 \pm 1,2$ vasos/ $0,025 \text{ mm}^2$; $p < 0,05$). O grupo GelMA exibiu DVc intermediário entre

CTR e GelMA-HB ($4,1 \pm 1$, vasos/ $0,025 \text{ mm}^2$), e não mostrou diferença significativa em comparação com estes dois últimos grupos ($p > 0,05$).

A DVc aumentou significativamente nos três grupos de 3 para 7 dias ($p < 0,001$). O grupo GelMA-HB mais uma vez exibiu a neoformação vascular mais intensa ($23,1 \pm 3,9$ vasos/ $0,025 \text{ mm}^2$), desta vez significativamente maior que em GelMA ($20,2 \pm 3,5$ vasos/ $0,025 \text{ mm}^2$; $p < 0,01$) e CTR ($17,5 \pm 3,3$ vasos/ $0,025 \text{ mm}^2$; $p < 0,001$). Além disso, a DVc em GelMA também foi significativamente maior que em CTR ($p < 0,05$).

Em 14 dias todos os grupos exibiram redução expressiva na quantidade de vasos sanguíneos para cada $0,025 \text{ mm}^2$ de área analisada ($p < 0,001$). Neste tempo experimental, GelMA-HB exibiu a DVc mais baixa ($9,9 \pm 2,4$ vasos/ $0,025 \text{ mm}^2$), significativamente menor que em GelMA ($13,2 \pm 2,8$ vasos/ $0,025 \text{ mm}^2$; $p < 0,001$) e CTR ($14,8 \pm 2,7$ vasos/ $0,025 \text{ mm}^2$; $p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre estes dois últimos grupos ($p > 0,05$).

A angiogênese (proliferação e migração de células endoteliais a partir de vasos sanguíneos preexistentes) é uma etapa fundamental no processo de cicatrização (BECK; D'AMORE, 1997; CORAZZA, 2005). Durante a cicatrização da ferida, os brotamentos capilares angiogênicos invadem o coágulo da ferida rica em fibrina/fibronectina e, em poucos dias, se organizam em uma rede microvascular em todo o tecido de granulação. Uma interação dinâmica ocorre entre células endoteliais, citocinas angiogênicas (e.g. FGF, VEGF, TGF- β , angiopoietina e triptase de mastócitos) e o ambiente da matriz extracelular (MEC). Receptores específicos para componentes da MEC expressos em células endoteliais, particularmente, o receptor de integrina para fibrina e fibronectina $\alpha(v)\beta_3$, são críticos para essas mudanças morfogênicas nos vasos sanguíneos ocorram durante o reparo de feridas (TONNESEN; FENG; CLARK, 2000).

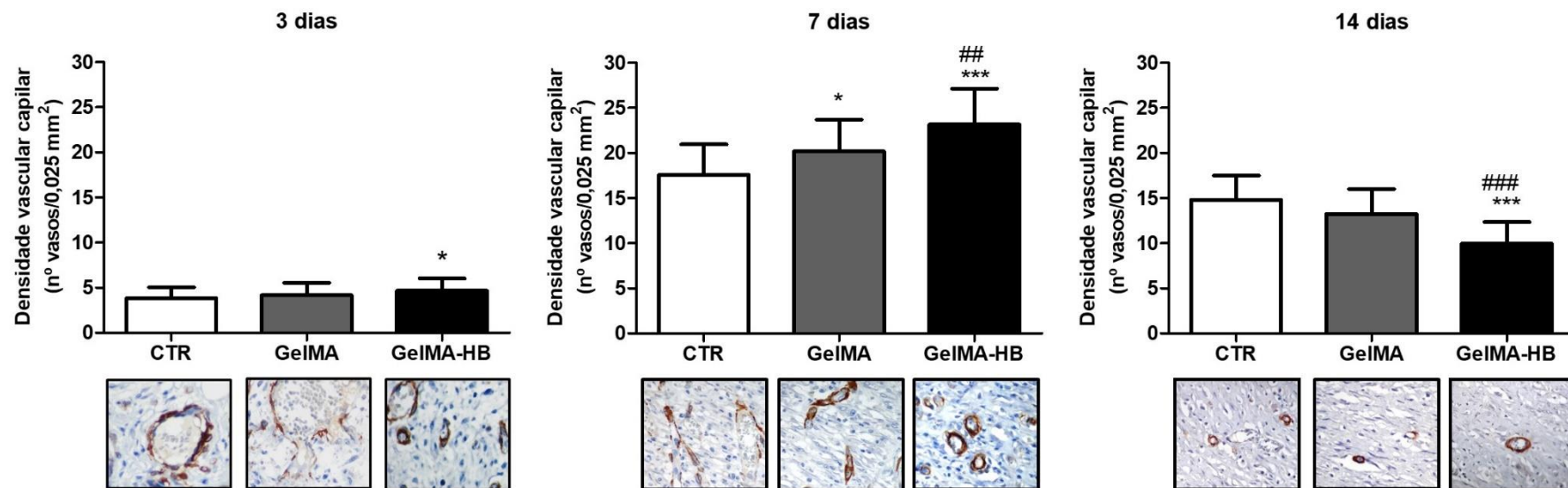


Figura 13. Determinação da densidade vascular capilar (DVC) ao longo do período experimental (dados apresentados como média $\pm$ desvio padrão). Diferenças significativas em comparação com CTR estão expressas como * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$; diferenças em comparação com GelMA estão expressas como ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ (ANOVA, seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey). As fotomicrografias na base da figura constituem secções histológicas representando o padrão de imunomarcacção para CD105 em células endoteliais capilares nos diferentes grupos ao longo do período experimental (SABC, 800 $\times$).

A formação de uma nova rede capilar proporciona o suprimento local de oxigênio, nutrientes e recrutamento de células que atuam diretamente na formação do tecido cicatricial ou cicatriz fibrosa (LAUREANO; RODRIGUES, 2011). À medida que o colágeno se acumula no tecido de granulação para produzir a cicatriz fibrosa, a densidade dos vasos sanguíneos diminui até que o padrão de vascularização compatível com a normalidade do tecido seja restabelecido (DiPIETRO, 2013). Portanto, a análise da dinâmica de desenvolvimento e redução da microvasculatura poderia fornecer informações importantes sobre a evolução do processo cicatricial.

A escassez e imaturidade de vasos neoformados eram esperadas durante os 3 primeiros dias após a lesão, fato explicado pela presença do processo inflamatório agudo (RAMASASTRY, 2005). Nesta fase do reparo, não há liberação expressiva de fatores de crescimento, de modo que os poucos brotos vasculares e células endoteliais em proliferação observados se limitam as margens e base das feridas. Ratificando estes resultados, perfil bastante semelhante de comportamento microvascular foi também evidenciado em outros estudos em modelo murino, seja por imunohistoquímica (DANTAS *et al*, 2011, NUNES *et al*, 2011, ALMEIDA *et al.*, 2014, BUSCUIO *et al.*, 2015) seja por métodos imaginológicos, como angiografia (YOUSEFI *et al.*, 2014).

O aumento da DVc nos 3 grupos de 3 para 7 dias, corroboram estudos que demonstraram existir maior desenvolvimento vascular, induzido principalmente pelo VEGF, na fase proliferativa do reparo cicatricial, sendo, por essa razão, esperado encontrar aumento da expressão *in situ* imunomarcadores endoteliais (DEMIDOVA-RICE *et al.*, 2012), o que inclui a endogлина. Em todos os grupos a maior DVc foi em dias, o que está em acordo com relatos prévios de Almeida *et al* (2014). A justificativa para este achado para residir no fato de que aproximadamente quatro dias após a injúria tecidual, ocorre aumento da população de macrófagos no sítio de lesão, os quais são fonte das principais citocinas (especificamente os fatores de crescimento) responsáveis pelos fenômenos biológicos que caracterizam a fase proliferativa da cicatrização, como VEGF e TGF- β (HESKETH *et al.*, 2017, KOTWAL; CHIEN, 2018, KIM; NAIR, 2019). A proliferação vascular-endotelial persiste até por volta do sétimo dia pós-injúria, quando ocorre preenchimento total da área da ferida por tecido de granulação exuberante ricamente vascularizado, que constitui a estrutura morfofuncional que serve de base para a formação do tecido cicatricial (DiPIETRO, 2016).

Em 7 dias GelMA-HB apresentou índices de DVc significativamente maiores que os demais grupos. Os mecanismos determinantes destes achados ainda não estão claros. Embora não tenham sido encontradas evidências na literatura de um possível

efeito estimulatório dos iridoides que majoritariamente compõem o EEHB, seria possível hipotetizar que o efeito pró-angiogênico observado no presente estudo tenha sido uma ação indireta, secundária ao efeito antioxidante do extrato. Khanna (2002), comprovou que a ação antioxidante aumenta a liberação de VEGF, proporcionando maior permeabilidade vascular e maior proliferação de células endoteliais. Além disso, a ação antioxidante, tende a eliminar radicais livres que, em excesso, podem promover inibição do desenvolvimento microvascular (MOURA *et al.*, 2018). Adicionalmente, foi previamente demonstrado que compostos químicos antioxidantes, como N-acetil-cisteína, e inibidores da via do NF- κ B, como PHA-408 e plumericina, são capazes de prevenir a senescência de células endoteliais, aumentando, assim, a sua viabilidade. O bloqueio da senescência endotelial pela plumericina ocorre em resposta ao bloqueio da ativação da enzima IKK2, uma proteína quinase responsável pela supressão dos inibidores da via do NF- κ B. Este processo resulta em redução da produção de ROS induzida por TNF- α à níveis basais, de modo que tal atividade biológica estaria intimamente associada ao potencial antioxidante desse iridoide (KHAN *et al.*, 2017). O fato de que o EEHB exibe potente atividade antioxidante (ALMEIDA, 2016) parece dar suporte a essa teoria.

Paradoxalmente, a plumericina, um dos marcadores químicos majoritários observados no EEHB, promove S-glutathionilação da proteína STAT3, o que na verdade promove efeito inibitório sobre a proliferação de células musculares lisas vasculares (HEISS *et al.*, 2016). Apesar desse efeito inibitório, por si só, não ser capaz impedir a angiogênese (proliferação endotelial), certamente poderia dificultar a formação de estruturas vasculares mais maduras, como vasos arteriolares. Contudo, como os fenômenos de maturação vascular só ocorrem em fases tardias do reparo, quando já teria ocorrido completa reabsorção das matrizes de gelatina metacrilada e não mais haveria atividade bioativa induzida pela plumericina liberada pelo GelMA-HB, seria bastante improvável que a utilização deste curativo pudesse interferir negativamente no curso de cicatrização em longo prazo.

De especial interesse foi o fato de que o GelMA, mesmo sem ativos, apresentou DVc médio significativamente maior que CTR. Foi previamente demonstrado que sistemas de entrega de fármacos e células a base de biomateriais que mimetizam a matriz extracelular (MEC), como biomateriais colagenosos, incluindo a gelatina, aumentam a sobrevivência e a retenção celular, levando a uma revascularização melhorada e a necessidade de menor contingente celular para reparo. Além disso, estes sistemas podem fornecer um microambiente morfoestrutural orientada a formação de vasos e atua como um “molde” ou arcabouço para a regeneração de tecidos (CRITSER

et al., 2010). Adicionalmente, a reticulação intermolecular incomum de matrizes colagenosas parece funcionar como um processo de ajuste da microestrutura fibrilar, formando um arcabouço 3D semirrígido que propicia melhor proliferação e orientação da migração de colônias endoteliais (ECFC) para formar redes vasculares lumenizadas tridimensionais *in vitro* (WHITTINGTON *et al.*, 2013). Sabe-se que o GelMA utilizado no presente estudo constitui um biomaterial matricial colagenoso que sofre reticulação via metacrilção após submetido a reação de polimerização induzida por radiação UV. Assim, seria possível hipotetizar que os fenômenos físicoquímicos e biológicos anteriormente citados poderiam justificar os resultados obtidos pelo GelMA.

Após 14 dias de injúria, a redução expressiva do contingente vascular observada em todos os grupos era esperada. O grande incremento no aporte de oxigênio nos tecidos induzido pela neformação vascular no início da fase proliferativa do reparo atua como *feedback* negativo sobre a produção *in situ* de VEGF, inibindo a proliferação endotelial (SEMENZA, 2002). Com o tempo, a maioria dos vasos recém-formados regride até que finalmente a densidade dos vasos sanguíneos volte à normalidade da pele não lesada. O processo de regressão é cuidadosamente regulado e inclui a apoptose seletiva de muitos dos capilares recentemente formados, seguida pela maturação dos vasos restantes (DiPIETRO *et al.*, 2016). Além da perda do estímulo pró-angiogênico, vários reguladores negativos da angiogênese são produzidos na ferida em resolução, incluindo Sprouty2, fator derivado do epitélio pigmentar e ligantes CXCR3, como IFN- proteína γ - induzível - 10 (CXCL10) (WIETECHTA *et al.*, 2011, BODNAR *et al.*, 2009). Esses fatores vêm, portanto, justificar a redução da DVc em 14 dias.

Contudo, nem todos os vasos capilares neoformados são eliminados, alguns deles permanecendo no tecido e sofrendo maturação. A cobertura seletiva dos capilares por pericitos desempenha um papel importante na maturação capilar, pois parecem proteger parte dos vasos capilares neoformados de sinais negativos antiangiogênicos, incluindo estímulos apoptóticos (DULMOVITS; HERMAN, 2012, KELLY-GOSS *et al.*, 2014). Esses dados justificam a presença de vasos sanguíneos remanescentes em 14 dias nos três grupos estudados.

Dos três grupos analisados, o GelMA-HB exibiu maior redução da DVc em 14 dias. Esse achado parece sugerir um melhor desempenho na evolução do processo de reparo, já que a redução do componente vascular também parece desempenhar papel importante na formação da cicatriz fibrosa. Estudos indicam que o crescimento descontrolado dos vasos ou a regressão prejudicada dos vasos como consequência de uma resposta inflamatória excessiva podem prejudicar a cicatrização de feridas,

resultando em cicatrizes e disfunção (KORNTNER *et al.*, 2019). Além disso, feridas que cicatrizam excepcionalmente bem – como feridas da pele fetal e da mucosa oral - têm muito menos angiogênese do que feridas de pele de adultos que normalmente formam cicatrizes mais aparentes e disfuncionais (DiPIETRO *et al.*, 2016). Tomados em conjunto, estes dados sugerem que feridas que exibiram inflamação menos intensa, como o GelMA-HB, apresentaram crescimento capilar reduzido no início da etapa de remodelação, e consequente tendência a apresentar uma rede capilar de maturação mais rápida e menos formação de cicatriz fibrosa, o que poderia ser interpretado como sinal morfológico de melhor processo de reparo.

Embora os principais alvos de análise para determinar o sucesso do reparo de feridas tenham sido o processo de fechamento/retração da ferida, intensidade e duração da fase inflamatória, natureza e adequação do suprimento sanguíneo às demandas funcionais do tecido em reparo e intensidade e caracterização morfoarquitetural do colágeno cicatricial, a dinâmica do processo de cicatrização é um processo muito mais complexo (DIEGELMAN; EVANS, 2004). Por esta razão, mesmo estes parâmetros sendo frequentemente analisados em estudos do potencial cicatrizante de diferentes produtos em modelos experimentais, se tomados isoladamente seu impacto sobre a determinação precisa de melhora do reparo é ainda bastante limitada (THEUNISSEN *et al.*, 2016). Partindo dessa premissa, a avaliação do estado histológico da ferida em cicatrização deve incluir, simultaneamente, os componentes básicos do processo de cicatrização, incluindo angiogênese, inflamação, fibroplasia e restauração da matriz do tecido conjuntivo, contração e remodelação da ferida e epitelização (PILLEN *et al.*, 2009).

A comparação dos padrões histológicos observado sobre condições ou tratamentos distintos com a variação fisiológica morfológica conhecida do tecido constitui o fundamento das ferramentas de gradação histológica do reparo (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). O grau de alteração observado, em relação ao controle, pode ser pontuado em uma escala ordinal, ou seja, baixo, médio ou alto grau, fornecendo uma pontuação semiquantitativa (escore). Por outro lado, as medidas histométricas exatas, como análise do número absoluto de populações celulares distintas, estruturas morfológicas tissulares ou áreas de tecidos específicos neoformados ou reestruturados fornece uma pontuação quantitativa. Embora sejam mais precisos e até mais padronizados, sistemas pontuação quantitativa são mais difíceis de analisar, especialmente em razão das intensas variações nestas estruturas que ocorre dentro de cada caso, o que leva a sérios vieses analíticos, particularmente os estatísticos. Consequentemente, os sistemas semiquantitativos de pontuação

permanecem em amplo uso no universo da pesquisa biomédica (GUPTA; KUMAR, 2015), tendo sido também aplicado no presente trabalho.

A Figura 14 apresenta o sumário de dados obtidos na análise morfológica e gradação histológica do *status* do reparo cicatricial na área das feridas nos diferentes grupos ao longo do período experimental.

Em 3 dias, todos os grupos exibiam intensa alteração exsudativa do tecido conjuntivo dermo/hipodérmico remanescente na base das feridas, especialmente no grupo CTR. O edema intersticial se mostrou profuso, e o infiltrado inflamatório intenso e constituído de polimorfonucleares neutrófilos e macrófagos. Os vasos sanguíneos hipodérmicos se apresentavam intensamente dilatados e congestionados, mas especialmente limitados a base e margens do tecido lesado. O edema intersticial se apresentou menos evidente e a resposta inflamatória menos intensa em GelMA-HB que nos demais grupos. Além disso, a proliferação fusocelular, especialmente na base da ferida, também foi mais evidente em GelMA-HB. Os escores de gradação histológica do reparo em GelMA-HB (9; 6 – 12) foram significativamente maiores que em GelMA (8; 6 – 11; $p < 0,05$), e estes dois, por sua vez, foram significativamente maiores que CTR (6; 6 – 9; $p < 0,001$).

Os achados morfológicos observados neste período experimental foram totalmente compatíveis com a fase inflamatória aguda do reparo. Nesta fase, em decorrência de alterações vasculares e bioquímicas do tecido lesado, ocorre influxo maciço de polimorfonucleares neutrófilos para a área de injúria, que são gradativamente substituídos por macrófagos, além de edema intersticial (CAÑEDO-DORANTES; CAÑEDO-AYALA, 2019). As evidências morfológicas de menor edema e inflamação aguda, acompanhada de maior infiltração de macrófagos e proliferação fusocelular em GelMA e, especialmente, em GelMA-HB são sugestivos de melhora no processo de reparo e podem ter relação direta com a redução e modulação do processo inflamatório local, como já explicado em etapas anteriores deste trabalho. Esses dados suportam os achados obtidos na análise semiquantitativa da gradação histológica, que sugerem que o melhor *status* de reparo foi observado em GelMA-HB.

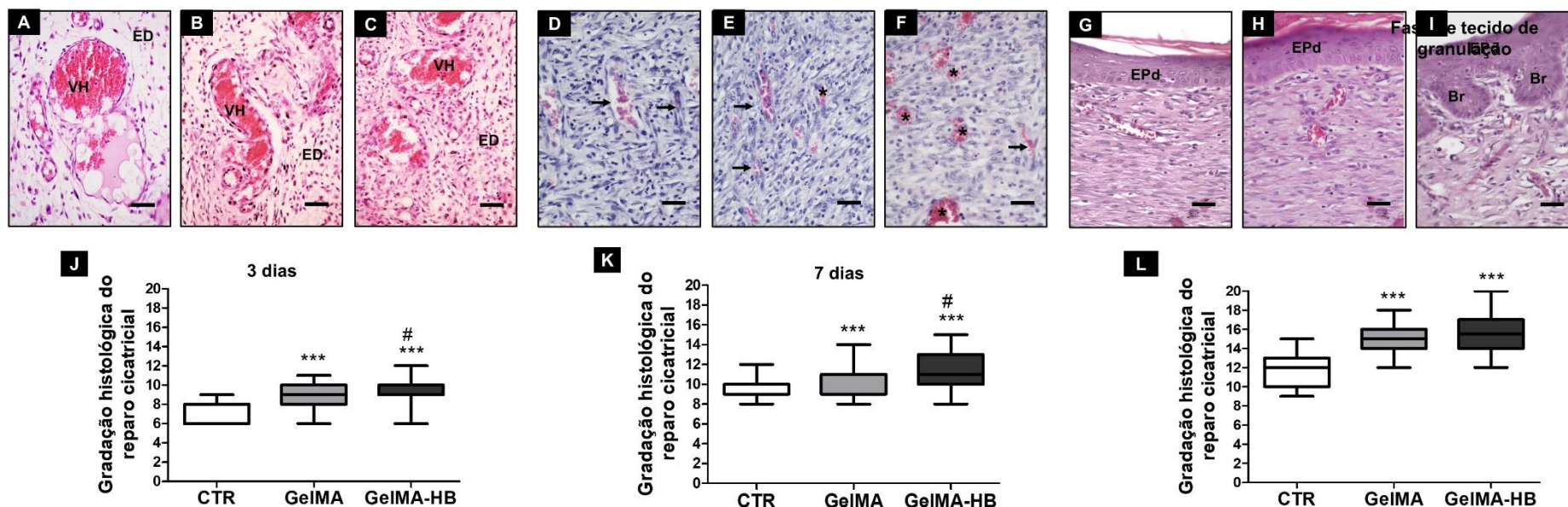


Figura 14. Fotomicrografias de secções histológicas representativas dos grupos experimentais. **(A, B, C)** Em 3 dias, observou-se fase exsudativa-inflamatória nos três grupos, com vasos hipodérmicos bastante dilatados e congestionados. Note exsudação e edema do tecido conjuntivo mais expressivos em CTR enquanto a inflamação crônica foi mais intensa em GelMA-HB. **(D, E, F)** Tecido de granulação exuberante em 7 dias, mostrando vasos irregulares (em fenda) em CTR e GelMA, mas volumosos, arredondados e hiperemiados em GelMA-HB. **(G, H, I)** Em 14 dias, nota-se formação de cicatriz fibrosa primária e reepitelização da superfície das feridas. Note interface dermo-epidérmica plana em CTR e GelMA, mas exibindo bortamentos epiteliais (anexos cutâneos rudimentares) em GelMA-HB (HE, 400 x; barra = 20 µm). **(J, K, L)** Determinação dos escores médios de gradação histológica do reparo cicatricial ao longo do período experimental (dados apresentados como mediana e amplitude do intervalo interquartil). Diferenças em comparação com CTR estão expressas como *** $P < 0,001$ e diferenças em comparação com GelMA estão expressas como # $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, seguido de teste de comparações múltiplas de Dunn) **Legenda:** VH – vasos hipodérmicos hiperemiados; ED – Edema intersticial; setas – vasos capilares em forma de “fenda”; asteriscos – vasos arredondados mais regulares dilatados e congestionados; EPd – tecido epidérmico (epitélio escamoso estratificado); Br – brotamentos epiteliais compatíveis com anexos cutâneos rudimentares.

Além disso, o quadro inflamatório ainda bem instalado também sustenta a baixa densidade miofibroblástica (DMf) e vascular capilar (DVC) previamente identificada nesta etapa experimental. Por outra ótica, a menor intensidade do edema e da infiltração inflamatória aguda, aliadas a maior proliferação fusocelular, vistas em GelMA-HB também vêm corroborar os melhores achados morfológicos obtidos na análise da diferenciação miofibroblástica e endotelial-capilar deste mesmo grupo.

Em 7 dias foi observada a formação do tecido de granulação exuberante na área das feridas. No Grupo CTR, o tecido de granulação era composto por tecido conjuntivo fibroso delicado, exibindo sinais morfológicos de edema intersticial, além de moderada proliferação tanto de células fusiformes (interpretadas como fibroblastos, Miofibroblastos e células endoteliais, assim como eventuais macrófagos) quanto de uma rede de vasos capilares delicados em forma de fenda, muitos deles hiperemiados. Esta arquitetura morfológica foi interpretada como consistente com tecido de granulação imaturo. Fibrilas de colágeno curtas e delgadas pareciam se dispor em disposição paralela ao longo eixo da ferida, enquanto os vasos se dispunham perpendicularmente a estas fibrilas. Observou-se, ainda, persistência de infiltração polimorfonuclear na porção centro-superficial das feridas. O grupo GelMA exibiu tecido conjuntivo fibroso com menor intensidade de alterações edematosas, bem celularizado e moderadamente vascularizado. Os vasos, como no grupo anterior, eram, em sua maioria, estreitos (“em fenda”) e dispostos perpendicularmente à superfície da ferida. As fibrilas de colágeno também exibiam aparência delgada e delicada. O grupo GelMA-HB apresentou tecido de granulação notoriamente mais denso e altamente celular, sustentado por rede vascular exuberante constituída de numerosos capilares arredondados e hiperemiados. O infiltrado inflamatório ainda se mostrou intenso na porção centro-superficial das feridas. Em todos os grupos, a reepitelização não ultrapassou 50% da superfície total das feridas. Assim como na etapa anterior, os escores de gradação histológica do reparo em GelMA-HB (11; 8 – 15) foram significativamente maiores que em GelMA (10; 8 – 14; $p < 0,05$), e estes dois, por sua vez, foram significativamente maiores que CTR (9; 8 – 12; $p < 0,001$).

Os achados morfológicos e morfométricos (gradação histológica) identificados nesta etapa do período experimental são, de fato, condizentes com a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa do reparo (LANDÉN; LI; STÅHLE, 2016, ALHAJJ; BANSAL; GOYAL, 2020) e sugerem a progressão do curso da cicatrização em todos os grupos estudados. Contudo, foi observado um perfil morfoarquitetural do tecido de granulação mais maduro em GelMA-HB em comparação com CTR. Estes dados são claramente sugestivos de que o grupo tratado com biomaterial à base de gelatina

contendo EEHB exibiu uma transição mais rápida da fase inflamatória para a fase proliferativa, com consequente amadurecimento precoce do tecido de granulação. Estes fenômenos impactaram diretamente na gradação histológica do reparo, justificando os escores mais altos obtidos no grupo GelMA-HB.

A maior diferenciação miofibroblástica, provendo uma maior quantidade de células com elevada capacidade de síntese de fibras colágenas, e a maior neoformação vascular, promovendo maior aporte de oxigênio e nutrientes ao tecido lesado, observado em GelMA-HB no presente estudo parecem ser os elementos-chave por trás desse fenômeno biológico. De fato, a participação dos miofibroblastos como agentes produtores e remodeladores de matriz extracelular (DARBY *et al.*, 2014) e da angiogênese (DEMIDOVA-RICE; DURHAM; HERMAN, 2012) são bastante estudados e têm sido alvo de pesquisas que os usam como avos terapêuticos para melhoramento do reparo (LEBONVALLET *et al.*, 2018, VEITH *et al.*, 2018.). Contudo, os mecanismos bioquímicos e/ou moleculares envolvidos no amadurecimento precoce do tecido de granulação no grupo GelMA-HB ainda não estão claros e estudos posteriores são necessários a fim de esclarecer este tema.

O grupo GelMA, mesmo sem ativos, apresentou um quadro histomorfológico intermediário entre CTR e GelMA-HB, e uma gradação histológica de reparo significativamente maior que o controle, mas menor que o grupo tratado com biomaterial contendo EEHB. Esses dados são concordantes com aqueles anteriormente observados na análise da retração da ferida, diferenciação miofibroblástica e densidade microvascular e ratifica inferências anteriores de que a matriz de colágeno hidrolisado, por si só, pode acelerar a formação e maturação da reação de granulação, ainda que de maneira menos expressiva do que quando funciona também como sistema de liberação de compostos bioativos. De fato, tem sido demonstrado que devido à sua resistência mecânica e biocompatibilidade, biomateriais de preenchimento à base de colágeno tipo I reconstituído podem substituir a pele danificada diretamente. Esses materiais funcionam como substrato para ancoragem, proliferação e migração celular, facilitando a formação do tecido de granulação, re-epitelização e contração da ferida (CHATTOPADHYAY, RAINES, 2014), corroborando os achados do presente estudo.

Em 14 dias, todos os grupos exibiram formação de cicatriz fibrosa primária. No grupo CTR o tecido conjuntivo tinha aparência mais delicada, com componente vascular ainda considerável. A análise das 18 seções histológicas seriadas mostrou que apenas dois animais apresentavam re-epitelização completa, mas formada por epiderme de espessura variável, sem camada granulosa proeminente e com interface epitélio-

conjuntivo eminentemente plana. Os grupos GelMA e GelMA-HB exibiram formação de cicatriz fibrosa pouco vascularizada mais homogênea preenchendo a área cicatricial. A reepitelização da superfície da ferida se mostrou completa em todos os animais. A epiderme se mostrou espessa em ambos os grupos, mas apenas em GelMA-HB o estrato granuloso se apresentou bem desenvolvido e foi notada a presença de brotamentos epiteliais (*buddings*), eventualmente exibindo corneificação vorticilar central, consistente com anexos cutâneos em desenvolvimento (folículos pilosos rudimentares). A gradação histológica do reparo cicatricial nos grupos GelMA (15; 12 – 18) e GelMA-HB (15; 12 – 20) foi significativamente maior que CTR (12; 10 – 15; $p < 0,001$), mas não houve diferença significativa entre os dois primeiros ($p > 0,05$).

Os achados morfológicos nesta etapa experimental são compatíveis com o início da transição entre o final da fase proliferativa e início da fase de remodelação, na qual se forma a cicatriz fibrosa primária. Nesta fase, ocorrem as etapas finais de fibroplasia (produção de colágeno cicatricial), seguida de remodelação fibrosa, e da re-epitelização, esta seguida da restauração da continuidade e integridade da membrana basal e neoformação dos anexos cutâneos (GONZALES *et al.*, 2016).

Como já discutido anteriormente, o principal componente de uma cicatriz de tecido conjuntivo maduro é o colágeno, e o aumento desse constituinte fibroso ocorre em função da atividade regulada de fibroblastos e miofibroblastos. Estas células secretam novas fibras de colágeno, ao mesmo tempo em que degradam fibras antigas, produzindo uma cicatriz fibrosa arquiteturalmente adequada para dispersão de forças mecânicas (DARBY *et al.*, 2014). Contudo, não pareceu haver diferença expressiva na quantidade e disposição das fibras colágenas entre os grupos com base na análise morfológica, embora CTR apresentasse componente vascular remanescente nas áreas centrais, compatível com tecido de granulação residual. Outro dado relevante foi a melhor relação entre colágeno III/I observada em GelMA e GelMA-HB, em detrimento do elevado teor de colágeno III visto em CTR nos cortes corados em picrossírius e analisados sob luz polarizada. Estes últimos achados também foram descritos por Almeida (2016), que também relataram que não haver diferença significativa na densidade de fibras colágenas no 14º dia de análise, determinada por técnicas de histomorfometria, entre feridas sem tratamento e tratadas com os mesmos biomateriais utilizados no presente estudo. Tomados em conjunto, estes achados sugerem que não há indícios de formação de cicatriz fibrosa excessiva nos grupos estudados, mas justificam a gradação histológica mais alta em GelMA e GelMA-HB em relação ao CTR.

Além da formação do colágeno cicatricial, outros achados morfológicos, vem sendo considerados relevantes para análise do processo de reparo por segunda intenção, destacando-se, dentre eles, o fenômeno de re-epitelização da ferida. As células do revestimento epitelial, por ação de citocinas específicas, proliferam e migram das bordas da ferida na tentativa de fechá-la, o que se denomina reepitelização. Para tanto, células germinativas epidérmicas do folículo piloso, que criam o bulbo capilar, servem como reservatório de queratinócitos no processo de cicatrização. Aproximadamente 10 h após o início da lesão, ocorre o desenvolvimento e alongamento de pseudópodes dos queratinócitos, perda dos contatos célula-MEC e célula-célula, retração dos tonofilamentos e formação de filamentos de actina nas extremidades de seus citoplasmas, permitindo a movimentação e migração celular. Quando a migração cessa, possivelmente devido à inibição por contato, os queratinócitos são reconectados e reconstroem a membrana basal (AMAR; WU, 2014).

A proliferação de queratinócitos é mediada pela liberação local de fatores de crescimento por macrófagos M2, com uma regulação positiva paralela de receptores de fator de crescimento, incluindo TNF- α , fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina (EGF) e fator de crescimento de queratinócitos (KGF ou FGF-7) (RAKITA *et al.*, 2020). Além disso, foi recentemente demonstrado que citocinas inflamatórias, como IL(interleucina)-1, IL-6 e IL-17 também podem contribuir, ainda que indiretamente com a re-epitelização na medida em que atuam mobilizando células tronco (progenitoras) capazes de se diferenciar em ceratinócitos (XIAO *et al.*, 2020).

Como a re-epitelização estava completa em GelMA e GelMA-HB, mas não em CTR, é possível sugerir que o aspecto histológico do tecido epitelial (epidérmico) nestes grupos era compatível com um estágio mais avançado que em CTR. Já foi bem estabelecido que o TGF- β é uma citocina capaz de mudar a expressão de integrinas de queratinócitos para um fenótipo mais migratório (BARRIENTOS *et al.*, 2008). Portanto, como GelMA e GelMA-HB apresentaram maior grau de diferenciação miofibroblástica que CTR, um fenômeno biológico intimamente relacionado com aumento dos níveis locais de TGF- β , isso poderia justificar a melhor re-epitelização observada nestes dois grupos.

Por sua vez, o desenvolvimento da camada granulosa é um evento crítico para impermeabilizar a epiderme, formando uma barreira capaz de manter o equilíbrio de fluidos epidérmicos. A eficiência desta barreira requer a entrega de lipídios e proteínas contidas nos grânulos citoplasmáticos lamelares, presentes nos ceratinócitos da camada granulosa, para os interstícios do estrato córneo (PASTAR *et al.*, 2014). Isso

resulta na reticulação de proteínas da camada cornificada (e.g. loricrina, involucrina e filagrina), com consequente formação de polímeros de alto peso molecular. Durante a diferenciação terminal e formação desse polímero, os queratinócitos também se tornam desidratados e achatados em um poliedro, referido como o corneócito terminal. A camada lipídica é muitas vezes referida como a “argamassa” que fica presa à estrutura proteica em torno dos corneócitos (“tijolos”), em uma analogia de “tijolo e argamassa” do estrato córneo, de natureza impermeável à água (GUZMAN *et al.*, 2006). Desta forma, a identificação de uma camada granulosa mais aparente e espessa em GelMA-HB é fortemente sugestiva de um estágio mais avançado de maturação do tecido epidérmico.

A formação de anexos cutâneos, com especial ênfase em folículos pilosos, é um achado morfológico relevante para o reparo cicatricial de feridas extensas. Sabe-se que pequenos ferimentos experimentalmente induzidos em modelo roedor (~6 mm) cicatrizam em grande parte por contração (observe que a contração é responsável por ~90% do reparo dérmico), não havendo, por isso, necessidade de neoformação de folículos pilosos no local da ferida. Contudo, em ferida aberta de grandes dimensões (cerca de 1 cm²), a contração para antes do fechamento da ferida, deixando uma área de cicatriz. Nestes casos a re-epitelização completa ocorre aproximadamente duas semanas após o ferimento e a neogênese dos folículos pilosos ocorre dois a três dias após a conclusão desse processo (TAKEO; LEE, ITO, 2015). GelMA-HB foi o único grupo a exibir neoformação de brotamentos epiteliais compatíveis com folículos pilosos rudimentares. Este achado é, portanto, sugestivo de um estágio mais avançado e exitoso do processo de cicatrização dermo-epidérmica. Todavia, estudos posteriores ainda são demandados a fim de esclarecer se a aceleração da re-epitelização é efeito direto dos constituintes do EEHB ou uma ação indireta destes fitocompostos sobre outras etapas da cicatrização, que vieram a favorecer a proliferação e maturação epidérmica.

A despeito dos achados epidérmicos claramente apontarem para um estágio mais avançado do reparo em GelMA-HB, não houve diferença significativa nos escores de gradação histológica de reparo entre este grupo e o GelMA. Contudo, a justificativa para este aparente paradoxo reside no fato de que o sistema analítico adotado no presente trabalho não considera os achados epidérmicos, se limitando a análise dos eventos morfológicos que tomam sede no tecido conjuntivo dérmico ao longo do período experimental. Este fato ratifica a premissa que mesmo utilizando sistemas complexos de gradação histológica, a avaliação do reparo cicatricial deve ser efetuada de maneira mais ampla, considerando um cabedal extenso de aspectos histológicos, atestando a complexidade desse processo.

Tomados em conjunto, os dados obtidos no presente trabalho sugerem que a utilização de biomaterial de preenchimento moldável à base de gelatina metacrilada fotopolimerizável contendo extrato etanólico de *H. bracteatus* obtido por extração sequencial sob alta pressão promoveu aceleração do reparo cicatricial em modelo roedor. Também foram observados indícios morfológicos de que esta melhora estaria associada a modulação positiva da diferenciação miofibroblástica, da formação do tecido de granulação e da re-epitelização e maturação epidérmica. Contudo, outros estudos ainda são necessários a fim de determinar os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos nesta atividade modulatória.

6 CONCLUSÃO

Com base na avaliação dos resultados obtidos, e dentro das condições experimentais realizadas no presente trabalho, pode-se concluir que o hidrogel fotopolimerizável à base de gelatina metacrialada contendo extrato etanólico de *H. bracteatus* a 2% promoveu melhora expressiva no processo de reparo em modelo experimental murino de cicatrização por segunda intenção, na medida em que acelerou a retração da ferida e aumentou a diferenciação miofibroblástica e microvascular em estágios iniciais e intermediários (3 e 7 dias) da cicatrização.

Os dados observados ainda fornecem indícios morfológicos de que estes efeitos biomodulatórios promoveram melhora da gradação histológica e que podem ter contribuído para aceleração da regeneração e maturação epidérmica no modelo experimental empregado neste estudo.

Desta forma, o GelMA-HB parece constituir um biomaterial de preenchimento promissor para uso futuro em cicatrização de feridas extensas com perda de substância.

7 REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMAN, T.; NEWTON, H. Wound dressings: principles and practice. *Surgery Journal* 2011; 29: 491 – 495.
- ADEWUMI, A. A.; OGUNJINMI, A. A. The healing potential of honey and propolis lotion on septic wounds. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2011; 1(1): S55-S57.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2007; 17(1): 114-140.
- ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; BARRETO, A. L. S.; PIRES, J. A.; REIS, F. P.; RIBEIRO, M. A. G.; CARDOSO, J. C. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *International Journal of Morphology* 2009; 27: 1105-1110.
- ALHAJJ, M.; BANSAL, P.; GOYAL, A. Physiology, Granulation Tissue [online]. 2020 [acessado em 18 jan 2020]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554402/>
- ALMEIDA, A.M. *Desenvolvimento de hidrogel fotopolimerizável contendo extrato etanólico da casca de Himatanthus bracteatus (A. DC.) Woodson obtido por líquido pressurizado para uso como cobertura de feridas* [Tese Doutorado]. Aracaju: Universidade Federal de Sergipe; 2016.
- ALMEIDA, W.A.; FERREIRA, A. M.; IVO, M. L.; RIGOTTI, M. A.; BARCELOS, L. DA S.; SILVA, A. L. N. V. Fatores associados à qualidade de vida de pessoas com feridas complexas crônicas. *Rev Fund Care Online* 2018; 10(1): 9-16.
- AMADEU, T. P.; COULOMB, B., DESMOULIERE, A.; COSTA, A. M. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. *Int J Low Extrem Wounds* 2003; 2(2): 60-8.
- AN R.; ZHANG, Y.; QIAO, Y.; SONG, L.; WANG, H.; DONG, X. Adipose stem cells isolated from diabetic mice improve cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 11(1):120.
- ANDRADE, A. G.; LIMA, C. F.; ALBUQUERQUE, A. K. B. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. *Rev Bras Queimaduras* 2010; 9(1): 21-30.
- ANDRADE, M. N. B.; ROBERTA S., MELO, J. R. C. Curativos. *Rev. Med. Minas Gerais* 1992; 228-36.
- ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Platelet physiology and thrombosis. *Thrombosis Research* 2004; 447-453.
- ANITUA, E.; ALKHRAISAT, M.H.; ORIVE, G. Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. *J. Control. Release* 2012; 157: 29-38.

- ARICI, A.; ORAL, E.; BUKULMEZ, O.; BURADAGUNTA, S.; ENGIN, O.; OLIVE D.L. Interleukin-8 expression and modulation in human preovulatory follicles and ovarian cells. *Endocrinology* 1996; 137(9): 3762-9.
- ARNOLD, J. R. H. L.; ODOM, R. B.; JAMES, W. D. *A pele: estrutura básica e função. Doenças básicas da pele de Andrews*. Dermatologia clínica; 1994. p.1-14.
- BABU, M. Collagen based dressings - a review. *Burns* 2000; 26(1): 54-62.
- BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, H. F.; RAHIMI, R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. *Archives of dermatological research* 2014; 306(7): 601-617.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA L. M.; CURI R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazil J. of Pharmaceutic Science* 2005; 41(1):27-51.
- BARBOSA, M. B.; FARIA, M. G. I. F. Produtos naturais como nova alternativa terapêutica para o tratamento de candidíase bucal. *Revista UNINGÁ Review* 2014; 20-1.
- BARRIENTOS, S. STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M. S.; BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Perspective article: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 2008; 16(5): 585–601.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO *et al.* *Sistemática de angiospermas no Brasil*. Viçosa: Imprensa Universitária UFV; 1991. p. 326.
- BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 2005; 31: 674-86.
- BECK, L.; A D'AMORE, P. Vascular development: cellular and molecular regulation. *The Faseb Journal* 1997; 11(5): 365-373.
- BEN AMAR M.; WU, M. Re-epithelialization: advancing epithelium frontier during wound healing. *J R Soc Interface*. 2014; 11(93): 20131038.
- BERRY D. B.; SULLINS, K. E. Effects of topical application of antimicrobials and bandaging on healing and granulation tissue formation in wounds of the distal aspect of the limbs in horses. *Am J Vet Res* 2003; 64: 88–92.
- BERTASSONI, L. E.; MARTINA CECCONI, M.; MANOHARANB, V.; NIKKHAH, M.; HJORTNAES, J.; CRISTINO, A. L. *et al.* Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs. *Lab on a Chip Journal* 2014; 14(13): 2202-2211.
- BLATOUNI, M. Endotélio e Hipertensão Arterial. *Rev Bras Hipertens*. 2001; 8: 328-338.
- BLATT S.; BURKHARDT, V.; KÄMMERER, P.W.; PABST, A. M.; SAGHEB, K.; HELLER, M. *et al.* Biofunctionalization of porcine-derived collagen matrices with platelet rich fibrin: influence on angiogenesis in vitro and in vivo. *Clin Oral Investig*. 2020; 24(10): 3425-3436.

- BLOCKMANS, D.; DECKMYN, H.; VERMYLEN, J. Platelet Activation. *Blood Reviews* 1995; 9: 143-156.
- BOCHATON-PIALLAT, M.L.; GABBIANI, G.; HINZ, B. The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions. *F1000Res*. 2016; 5:752.
- BODNAR, R.J.; YATES, C.C.; RODGERS, M.E.; DU, X.; WELLS, A. IP-10 induces dissociation of newly formed blood vessels. *J Cell Sci*. 2009; 122(12): 2064-77.
- BORSI, L.; CASTELLANI, P.; RISSO, A.M.; LEPRINI, A.; ZARDI L. Transforming growth factor-beta regulates the splicing pattern of fibronectin messenger RNA precursor. *FEBS Lett* 1990; 261: 175-178.
- BORUT, K.; MAASS, T.; MEYER, E.; LEHR, H. A.; METZGER, D.; CHAMBON, P.; MANN A. *et al.* TGF- β superfamily signaling is essential for tooth and hair morphogenesis and differentiation. *European Journal of Cell Biology* 2007; 86 (11-12): 781–799
- BOSWELL, S. G.; COLE, B. J.; SUNDMAN, E. A.; KARAS, V.; FORTIER, L. A. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy* 2012; 28: 429-439.
- BOWDISH, D.M.E.; LOFFREDO, M. S.; MUKHOPADHYAY, S.; MANTOVANI, A.; GORDON, S. Macrophage receptors implicated in the “adaptive” form of innate immunity. *Microbes and Infection* 2007; 9 (14-15): 1680-1687.
- BRANSKI, L. K.; GAUGLITZ, G. G.; HERNDON, D. N.; JESCHKE, M. G. A review of gene and stem cell therapy in cutaneous wound healing. *Journal of the International Society for Burn Injuries* 2009; 35(2): 171-80.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. *Plast. Reconstr. Surg*. 2006; 117(7): 12-34.
- BUCHBERGER, B.; FOLLMANN, M.; FREYER, D.; HUPPERTZ, H.; EHM, A.; WASEM J. The evidence for the use of growth factors and active skin substitutes for the treatment of non-infected diabetic foot ulcers (DFU): a health technology assessment (HTA). *Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology and German Diabetes Association* 2011; 119(8): 472-9.
- BUSUIOC, C.J.; MOGOȘANU, G.D.; POPESCU, F.C.; LASCĂR, I.; PÂRVĂNESCU, H.; MOGOANTĂ, L. Phases of the cutaneous angiogenesis process in experimental third-degree skin burns: histological and immunohistochemical study. *Rom J Morphol Embryol*. 2013; 54(1):163-71.
- CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. *Arq. Bras. Cir. Dig*. 2007; 20(1): 51-8.
- CAÑEDO-DORANTES, L.; CAÑEDO-AYALA, M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *Int J Inflamm*. 2019; 2019: 3706315.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438(7070): 932-936.

CASTILHO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R.; RENGIFO, E. *et al.* Identification of plumericin as a potent new inhibitor of the NF- κ B pathway with anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. *British Journal of Pharmacology* 2014; 171(7): 1676-86.

CASTILLO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R.; RENGIFO, E.; VAISBERG, A. *et al.* Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). *J Ethnopharmacol* 2007; 112: 410-414.

CENSI, R.; DI MARTINO, P.; VERMONDEN, T.; HENNINK, W. E. Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 2012; 161(2): 680-92.

CHAPMAN, J. A. *et al.* The collagen fibril—a model system for studying the staining and fixation of a protein. *Electron microscopy reviews* 1990; 3(1): 143-182.

CHATTOPADHYAY, S.; RAINES, R.T. Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*. 2014; 101(8): 821-33.

CHEN, Y.; LIN, R.; QI, H.; YANG, Y.; BAE, H.; MELERO-MARTIN, J. M. *et al.* Functional human vascular network generated in photocrosslinkable gelatin methacrylate hydrogels. *Advanced Functional Materials* 2012; 22: 2027 - 2039.

CLEARY, E. G.; GIBSON, M. A. Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins. In: International review of connective tissue research. *Elsevier* 1983; 97-209.

COLL-BONFILL, N. *et al.* Transdifferentiation of endothelial cells to smooth muscle cells play an important role in vascular remodelling. *American journal of stem cells* 2015; 4(1): 13.

COLLO, G.; PEPPER, M.S. Endothelial cell integrin $\alpha 5 \beta 1$ expression is modulated by cytokines and during migration in vitro. *Journal of Cell Science* 1999; 112(4): 569-578.

CORAZZA, A. V. Fotobiomodulação comparativa entre o laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas de ratos. 2005. [Dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2005.

COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, G.; BITTENCOURT-SAMPAIO, S. Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. *Journal of Investigative Dermatology* 1976; 66(3): 143-148.

CRITSER, P.J.; KREGER, S.T.; VOYTIK-HARBIN, S.L.; YODER, M.C. Collagen matrix physical properties modulate endothelial colony forming cell-derived vessels in vivo. *Microvasc Res*. 2010; 80(1): 23-30

CUMBERBATCH, M.; DEARMAN, R.J.; GRIFFITHS, C.E.M.; KIMBER, I. Epidermal Langerhans cell migration and sensitisation to chemical allergens. *APMIS* 2003; 111: 797-804.

DAI, T.; TANAKA, M.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert review of anti-infective therapy* 2011; 9(7): 857-79.

DALE, C. D.; BOXER, L.; LILES, W. C.; The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 2008; 112: 935-945.

DANTAS, M.D.; CAVALCANTE, D.R.; ARAÚJO, F.E.; BARRETTO, S.R.; ACIOLE, G.T.; PINHEIRO, A.L. et al. Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2011; 105(1):51-9.

DARBY, I.A.; BISUCCI, T.; PITTET, B.; GARBIN, S.; GABBIANI, G.; DESMOULIÈRE, A. Skin flap-induced regression of granulation tissue correlates with reduced growth factor and increased metalloproteinase expression. *The Journal of pathology* 2002; 197(1): 117-127.

DARBY, I.A.; LAVERDET, B.; BONTÉ, F.; DESMOULIÈRE, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014; 7: 301-11.

DARWIN E.; TOMIC-CANIC, M. Healing Chronic Wounds: Current Challenges and Potential Solutions. *Curr Dermatol Rep*. 2018 7(4): 296-302.

DE MARCO, L.; MAZZUCATO, M.; MASOTTI, A.; RUGGERI, Z. M. Localization and characterization of an alpha-thrombinbinding site on platelet glycoprotein Ib alpha. *J Biol Chem* 1994; 269(9): 6478-84.

DEALEY C. *Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras*. São Paulo: Atheneu; 1996. p.1-21.

DEE, K. C.; PULEO, D. A.; BIZIOS, R. An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions. John Wiley & Sons; 2003.

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO C.; MUÑOZ, V.; RUIZ G.; SAUVAIN, M. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part. I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *J Ethnopharmacol* 2001; 77: 91-98.

DESMOULIÈRE, A.; GABBIANI, G. The role of myofibroblasts in wound healing and fibrocontractive diseases. In: Clark RAF, editor. *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum Press, 1996. p. 391-423.

DESMOULIERE, A.; GEINOZ, A.; GABBIANI, F. et al. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol*. 1993; 122: 103.

DESMOULIERE, A.; GEINOZ, A.; GABBIANI, F.; GABBIANI, G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122(1): 103-111.

DEVEAUD, C. M.; MACARAK, E. J.; KUCICH, U.; EWALT, D. H.; ABRAMS, W. R. Molecular analysis of collagens in bladder fibrosis. *The Journal of urology* 1998; 160(4): 1518-1527.

DEVRIENDT, N.; ROOSTER, H. Initial Management of Traumatic Wounds Veterinary Clinics: Small Animal Practice 2017; 47(6): 1123–1134.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience* 2004; 9(1): 283-289.

DIPIETRO, L.A. Angiogenesis and scar formation in healing wounds. *Curr Opin Rheumatol.* 2013; 25(1): 87-91.

DOERSCH, K. M.; NEWELL-ROGERS, M. K. The impact of quercetin on wound healing relates to changes in αV and $\beta 1$ integrin expression. *Exp Biol Med (Maywood)* 2017; (14):1424-1431.

DOERSCH, K.M. *Molecular Mechanisms Regulating Wound Healing and Fibrosis* [Tese de Doutorado]. 2018.

DORSETT-MARTIN, W.A. Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Repair Regen.* 2004; 12(6):591-9.

DOUGHTY, D.B. Principles of wound healing and wound management. Cap 2. In: Bryant RA. *Acute and chronic wounds: nursing management*. St Louis: Mosby; 1992. p. 31-68.

DUFF, S.E.; LI, C.; GARLAND, J. M.; KUMAR, S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 2003; 17(9): 984-92.

DULMOVITS, B.M.; HERMAN, I.M. Microvascular remodeling and wound healing: a role for pericytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012; 44(11): 1800-12.

DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 2002; (20): 4368-80.

DZAU, V. J. Significance of endothelial derived vasoactive substances. *J Vasc Med Biol* 1989; 1: 43-55.

ECKERSLEY, J. R. T.; DUDLEY, H. A. F. Wound and wound healing. *British Medical Bulletin* 1988; 44 (2): 423-36.

EICHHORN, M.E.; KLEESPIES, A.; ANGELE, M.K.; JAUCH, K.W.; BRUNS, C.J. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langenbeck's Arch Surg* 2007; 392(3): 371-379.

ENENSTEIN, J.; WALEH, N.S.; KRAMER, R.H. Basic FGF and TGF-beta differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 1992; 203(2): 499-503.

EVANGELISTA, D. G.; MAGALHÃES, E. R. M. M.; MORETÃ, D. I. C.; SILVA, M. M.; LIMA, R. L. et al. Impacto das feridas crônicas na qualidade de vida de usuários da estratégia de saúde da família. *Revista de Enfermagem do Centro-Oeste Mineiro* 2012.

EVANS, W. C. *Trease and Evans pharmacognosy*. 15. ed. Londres: Saunders, 2002. 585 p.

EYDEN, B. The myofibroblast: Phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine: Translational Medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2008; 12(1): 22–37.

EYDEN, B.; BANERJEE S.S.; SHENJERE, P.; FISHER, C. The myofibroblast and its tumours. *Journal of clinical pathology* 2009; 62(3): 236-249.

FAKHRUDIN, N.; WALTENBERGER, B.; CABARAVDIC, M.; ATANASOV, A. G.; MALAINER, C.; SCHACHNER, D. *et al.* Identification of plumericin as a potent new inhibitor of the NF- κ B pathway with anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. *British Journal of Pharmacology* 2014; 171: 1676-86.

FARZAEI, M.H.; RAHIMI, R.; ABBASABADI, Z.; ABDOLLAHI, Z. An evidence-based review on medicinal plants used for the treatment of peptic ulcer in traditional Iranian medicine. *Int J Pharmacol* 2013; 9(2): 108-124.

FATHI, A.; LEE, S.; BREEN, A.; SHIRAZI, A. N.; VALTCHEV, P.; DEGHANI, F. Enhancing the mechanical properties and physical stability of biomimetic polymer hydrogels for micropatterning and tissue engineering applications. *European Polymer Journal* 2014; 59: 161-170.

FAWCETT, D.W.; JENSH, R.P.J.; BLOOM, W. *Bloom & Fawcett's concise histology*. London: Arnold; 2002.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LE COUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669–676.

FERREIRA, A. M.; GENTILE, P.; CHIONO, V.; CIARDELLI, G. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta biomaterialia* 2012; 8(9): 3191-3200.

FERREIRA, A. M.; OLIVEIRA, K. A.; VIEIRA, L. C.; ROL, J. L. Revisão de Estudos Clínicos de Enfermagem: Utilização de Papaína para o tratamento de feridas. *Rev. enferm. UERJ* 2005; 13(3): 382-389.

FERREIRA, E. C.; SILVA, J. L. L.; SOUZA, R. F. As Propriedades Medicinais e Bioquímicas da Planta *Stryphnodendron adstringens* “Barbatimão”. *Biológicas & Saúde* 2013; 3(11).

FERREIRA, J. L. P.; AMARAL, A. C. F.; ARAÚJO, R. B.; CARVALHO, J. R.; PROENÇA, C. E. B.; FRAGA, S. A. P. M. *et al.* Pharmacognostical comparasion of three species of Himatanthus. *International Journal of Botany* 2009; 5(2): 171-175.

FERREIRA, M. C.; JR TUMA, P.; CARVALHO, V. F.; KAMAMOTO, F. Complex wounds. *Clinics* 2006; 61(6): 571-578.

FINE, J. D. Basement membrane proteins. In: Leigh IM, Birgitte Lane E, Watt FM, eds. *The keratinocyte handbook*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2000 p. 181-199.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442- 448.

FONSATTI, E.; DEL VECCHIO, L.; ALTOMONTE, M.; SIGALOTTI, L.; NICOTRA, M. R.; CORAL, S.; NATALI, P. G.; MAIO, M. Endoglin: A accessory component of the TGF- β -

binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol* 2001; 188(1): 1-7.

FOX, S. B.; GASPARINI, G.; HARRIS, A. L. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol.* 2001; 2(5): 278-89.

FU, X.; FANG, L.; LI, H.; LI, X.; CHENG, B.; SHENG, Z. Adipose tissue extract enhances skin wound healing. *Wound Repair Regeneration* 2007; 15: 540–548.

FURCHGOTT, R. F.; CHERRY, P. D.; ZAWADZKI, J. V. Endothelial cells as mediators of vasodilations of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6(2): S336-S344.

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 2003, 200(4): 500-503.

GABBIANI, G.; RAYAN, G. B.; MAJNO, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and possible role in wound contraction. *Experientia* 1970; 27(5): 549-550.

GAILIT, J. X.; BUELLER, J.; CLARK, H. R. 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* 1996; 169: 281.

GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. *Clin Plastic Surg.* 2012; 39(1): 85-97.

GERARDUZZI, C.; DI BATTISTA, J.A. Myofibroblast repair mechanisms post-inflammatory response: a fibrotic perspective. *Inflamm Res.* 2017; 66(6): 451-465.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* 2001; 69: 513–521.

GLINARDELLO, M. M. C.; SANTOS, A. R.; SANT'ANNA, C. M.; CRUZ, C. R.; CARVALHO, D. P.; SILVA, V. P. Lesão epitelial e cicatrização de natureza hipertrófica e quelóide. *Corpus et Scientia* 2009; 5(2): 37- 44.

GOISSIS, A. P. A. Análise estrutural do colágeno do tipo I-correlação estrutura: atividade biológica [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.

GOLDMAN, R. Growth factors and chronic wound healing: Past, present, and future. *Adv. Skin Wound Care* 2004; 17: 24.

GONÇALVES, C.B.V. *Histologia Texto e Imagens Histologia Histogênese Organogênese*. 3ª ed. 2010. p. 185-201.

GONZALEZ, A. C. O.; COSTA, T. F.; ANDRADE, Z. A.; MEDRADO, A.R.A.P. Wound healing - A literature review. *An. Bras. Dermatol.* [online]. 2016 [acessado em 18 jan 2020]. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962016000500614

GOPINATH, D.; AHMED, M. R.; GOMATHI, K.; CHITRA, K.; SEHGAL, P. K.; JAYAKUMAR R. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials* 2004, 25(10): 1911-1917.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*; 2003; 3: 23-25.

GOULD, L.; ABADIR, P.; BREM, H.; CARTER, M.; CONNER-KERR, T.; DAVIDSON, J. et al. CHRONIC WOUND REPAIR and healing in older adults: current status and future research. *Wound Repair and Regeneration* 2015; 23(1): 1-13.

GOULD, L.J. Topical Collagen-Based Biomaterials for Chronic Wounds: Rationale and Clinical Application. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2016; 5(1):19-31.

GRAÇA, B.; LUNET, C.; COELHO, A. S.; MONTEIRO, G.; FREIRE, P.; SPEIDEL, A.; et al. Angiogênese e cancro, da fisiopatologia à terapêutica. *Acta Med Port* 2004; 17: 76-93.

GREER, N.; FOMAN, N. A.; MACDONALD, R.; DORRIAN, J.; FITZGERALD, P.; RUTKS I. et al. Advanced wound care therapies for nonhealing diabetic, venous, and arterial ulcers: a systematic review. *Annals of internal medicine* 2013; 159(8): 532-42.

GRYGLEWSKI, R.; BOTTING, R.; VANE, J. R. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension* 1988; 12: 530-48.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue II: ultrastructural aspects. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo* 1992; 6: 66-71.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue I: quantitative study of the vascular volume. *Rev. Odontol* 1987; 1: 6-8.

GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Monoterpenes with analgesic activity-a systematic review. *Phytotherapy Research* 2013; 27(1): 1-15.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010; 89(3): 219-229.

GUPTA, A.; KUMAR, P. Assessment of the histological state of the healing wound. *Plast Aesthet Res* 2015; 2(5): 239-242.

GURTNER, G.C. Wound healing: normal and abnormal. In: Thorne CH, editor. *Grabb and Smith's plastic surgery*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2007. p. 15- 22.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E.T. Fisiologia da pele. In: Guyton AC. *Tratado de fisiologia médica*. 8ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p. 864.

GUZMAN STRONG, C.; WERTZ, P.W.; WANG, C.; YANG, F.; MELTZER, P.S.; ANDL T.; MILLAR, S.E.; HO, I.C.; PAI, S.Y.; SEGRE, J.Á. Lipid defect underlies selective skin barrier impairment of an epidermal-specific deletion of Gata-3. *J Cell Biol*. 2006 20; 175(4): 661-70.

HAKKINEN, K. M.; HARUNAGA, J. S.; DOYLE, A. D.; YAMADA, K. M. Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices. *Tissue Engineering Part A* 2011; 17: 713-724.

HARDING, K. G. H. L.; MORRIS, G. K. PATEL. Healing chronic wounds." *Bmj* 324.7330 (2002): 160-163.

HARRI, A. L. Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(1): 38-47.

HEISS, E., LIU, R., WALTENBERGER, B. et al. Plumericin inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells by blocking STAT3 signaling via S-glutathionylation. *Sci Rep* 2016; 6: 20771.

HELARY, C.; OVTRACHT, L.; COULOMB, B.; GODEAU, G.; GIRAUDGUILLE, M. Dense fibrillar collagen matrices: A model to study myofibroblast behaviour during wound healin. *Biomaterials* 2006; 27(25): 4443–4452.

HENRIKSON, R.C.; KAYE, G.I.; MAZURKIEWICZ, J.E. *NMS Histology*. National Medical Series for Independent Study. 1997.

HERRERA, J.; HENKE, C. A.; BITTERMAN, P. B. Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 2018; 128: 45-53.

HESKETH, M.; SAHIN, K.B.; WEST, Z.E.; MURRAY, R.Z. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(7):1545.

HINZ, B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech*. 2010; 43(1): 146-55.

HINZ, B. The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. *Journal of Biomechanics* 2010; 43(1): 146–155.

HINZ, B.; PHAN, S.H.; THANNICKAL, V.J.; GALLI, A.; BOCHATON-PIALLAT, M.L.; GABBIANI, G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American journal of pathology* 2007; 170(6): 1807-1816.

HOOD, J. D.; MEININGER, C. J.; ZICHE, M.; GRANGER, H. J. VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol*. 1998; 274: 1054-1058.

HUANG, C.; CHI, C.; CHEN, Y.; CHEN, K.; CHEN, P.; YAO, C. Evaluation of proanthocyanidin-crosslinked electrospun gelatin nanofibers for drug delivering system. *Materials Science and Engineering* 2012 32(8): 2476-2483.

HUTSON, C. B.; NICHOL, J. W.; AUBIN, H.; BAE, H.; YAMANLAR, S.; AL-HAQUE, S. et al. Synthesis and characterization of tunable poly (ethylene glycol): gelatin methacrylate composite hydrogels. *Journal of Tissue Engineering* 2011; 17: 1713 - 1723.

IBRAHIM, N.; WONG, S.K.; MOHAMED, I.N.; MOHAMED, N.; CHIN, K.Y.; IMA-NIRWANA, S. et al. Wound Healing Properties of Selected Natural Products. *Int J Environ Res Public Health*. 2018; 15(11): 2360.

ICHHORN, M.E.; KLEESPIES, A.; ANGELE, M.K.; JAUCH, K.W.; BRUNS, C.J. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langenbeck's archives of surgery* 2007; 392(3): 371-379.

ITO, H.; ANDO, T.; OGISO, H.; ARIOKA, Y.; SAITO, K.; SEISHIMA M. I. Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase activity accelerates skin wound healing. *Biomaterials* 2015; 53: 221-228.

JIN, S. G.; YOUSAF, A. M.; KIM, K. S.; KIM, D. W.; KIM, D. S.; KIM, J. K. *et al.* Influence of hydrophilic polymers on functional properties and wound healing efficacy of hydrocolloid based wound dressings. *International Journal of Pharmaceutics* 2016; 501: 160 - 166.

JOLY, A.B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 12. ed. São Paulo: Imprensa Nacional, 1998. 777 p.

JONES, I.; CURRIE, L.; MARTIN, R. A guide to biological skin substitutes. *Br. J. Plast. Surg.* 2002; 55(3): 185–193.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica – texto/atlas*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 488.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; MONTES, G. S.; MARTINS, J. E; JOAZEIRO, P. P. Dermal collagen distribution. *Histochemistry* 1983; 79(3): 397-403.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 303.

KAMATA, H.; LI, X.; CHUNG, U. I.; SAKAI, T. Design of Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced healthcare materials* 2015; 4(16): 2360-74.

KAMEL, R. A.; ONG, J. F.; ERIKSSON, E.; JUNKER, J. P. E.; CATERSON, E. J. Tissue Engineering of Skin. *Journal of the American College of Surgeons* 2013; 217: 533-555.

KANTA, J. The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *ActaMedica (Hradec Kralove)* 2011; 54(3): 97-101.

KECK, P.J.; HAUSER, S.D.; KRIVI, G.; SANZO, K.; WARREN, T. FEDER, J. *et al.* Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 246: 1309-1313.

KELLY-GOSS, M.R.; SWEAT, R.S.; STAPOR, P.C.; PEIRCE, S.M.; MURFEE, W.L. Targeting pericytes for angiogenic therapies. *Microcirculation*. 2014; 21(4): 345-57.

KHAN, S.Y.; AWAD, E.M.; OSZWALD, A.; MAYR, M.; YIN, X.; WALTENBERGER, B. *et al.* Premature senescence of endothelial cells upon chronic exposure to TNF α can be prevented by N-acetyl cysteine and plumericin. *Sci Rep*. 2017; 7:39501.

KHANNA S.; VENOJARVI, M.; ROY, S.; SHARMA, N.; TRIKHA, P.; BAGCHI, D. Dermal Wound Healing Properties of Redox-Active Grape Seed Proanthocyanidins. *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 33(8): 1089-96.

KIM, H. N.; HONG, Y.; KIM, M. S.; KIM, S. M.; SUH, K-Y. Effect of orientation and density of nanotopography in dermal wound healing. *Biomaterials*. v. 33, n. 34, p. 8782-8792, 2012.

KIM, M. H.; LIU, W.; BORJESSON, D. L.; CURRY, F. R.; MILLER, L. S.; CHEUNG, A. L. *et al.* Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging. *J. Invest. Dermatol* 2008; 128: 1812-1820.

KIM, S.Y.; NAIR, M.G. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunol Cell Biol.* 2019; 97(3): 258-267.

KOGA, M.; KURAMOCHI, M.; KARIM, M.R.; IZAWA, T.; KUWAMURA, M.; YAMATE, J. Immunohistochemical characterization of myofibroblasts appearing in isoproterenol-induced rat myocardial fibrosis. *J Vet Med Sci.* 2019; 81(1): 127-133.

KORNTNER, S.; LEHNER, C.; GEHWOLF, R.; WAGNER, A.; GRÜTZ, M.; KUNKEL, N.; TEMPFER, H. *et al.* Limiting angiogenesis to modulate scar formation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019; 146: 170-189.

KOTWAL, G.J.; CHIEN, S. Macrophage Differentiation in Normal and Accelerated Wound Healing. *Results Probl Cell Differ.* 2017; 62: 353-364. KLINGBERG, F.; HINZ, B.; WHITE, E.S. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol.* 2013; 229(2): 298-309.

KUMAR, S.; LEAPER D. J. Classification and management of acute wounds. *Surgery (Oxford)* 2008; 26(2): 43-47.

KUMAR, V. *Robbins patologia básica*. 2013.

LANDÉN, N.X.; LI, D.; STÅHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 2016; 73(20): 3861-85.

LARJAVA, H.; SALO, K.; HAAPASALMI, R.H. KRAMER, J. H. Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *J. Clin. Invest* 1993; 92: 1425-1435.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Wound Healing. *Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology* 2011; 69(3): 355.

LEBONVALLET, N.; LAVERDET, B.; MISERY, L.; DESMOULIÈRE, A.; GIRARD, D. New insights into the roles of myofibroblasts and innervation during skin healing and innovative therapies to improve scar innervation. *Exp Dermatol.* 2018; 27(9): 950-958.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 222: 1-22.

LI, B.; WANG, J.H. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. *J Tissue Viability.* 2011; 20(4): 108-20.

LI, H.; LIU, B. L.; GAO, L. Z.; CHEN, H. L. Studies on bullfrog skin collagen. *Food Chemistry* 2004; 84(1): 65-69.

LI, Z.; WANG, H.; YANG, B.; SUN, Y.; HUO, R. Three-dimensional graphene foams loaded with bone marrow derived mesenchymal stem cells promote skin wound healing with reduced scarring. *Materials Science and Engineering* 2015; 57: 181-188.

LINDNER, D.J. Interferons as antiangiogenic agents. *Curr Oncol Rep* 2002; 4(6): 510-514.

LIU, L.K.; JIANG, X.Y.; ZHOU, X.X.; WANG, D.M.; SONG, X.L.; JIANG, H.B. Upregulation of vimentin and aberrant expression of Ecadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Modern Pathology* 2010; 23(2): 213-24.

LIU, R.; JIN, J-P. Calponin isoforms CNN1, CNN2 and CNN3: Regulators for actin cytoskeleton functions in smooth muscle and non-muscle cells. *Gene* 2016; 585(1): 143–153.

LONGLEY, J.; DUFFY, T. P.; KOHN, S. The mast cell and mast cell disease. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1995; 32(4): 545-561.

LORENA, D.; UCHIO, K.; COSTA, A. M.; DESMOLIERE, A. Normal scarring: importance of myofibroblasts. *Wound Repair Regen* 2002; 10 (2): 86-92.

LUZ, H. S., SANTOS, A. C. G.; LIMA, F. C.; MACHADO, K. R. G. Prospecção fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), da mesorregião leste maranhense. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 2014; 16(3): 657-662.

M IRANDA, A. L. P.; SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; NEVES, J. S.; PARRINI, S. C.; PINHEIRO, M. L. B. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic activities of the látex containing triterpenes from *Himatanthus sucuba*. *Planta Médica* 2000; 66: 284 - 286.

MAHDAVIAN DELAVARY B.; VAN, D. E. R.; VEER, W. M.; VAN EGMOND, M.; NIESSEN, F. B.; BEELEN, R. H. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology* 2011; 216 (7): 753–762.

MAJNO, G.; GABBIANI, G.; HIRSCHL, B.J.; RYAN, G.B.; STATKOV, P.R. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science (New York, N.Y.)* 1971; 173(996): 548–550.

MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P. D.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *AnbrasDermato* 2003; 78(4): 393-410.

MARTIN, P. Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* 1997; 276 (5309): 75-81.

MARTINEZ-LEMUS, L. A. The Dynamic Structure of Arterioles. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012; 110: 5-11.

MCANULTY, R. J. Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39(4): 666-671.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol* 2009; 84(3): 257-262.

- MERWIN, J.R.; ANDERSON, J.M.; KOCHER, O.; VAN ITALLIE, C.M.; MADRI, J.A. Transforming growth factor beta1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis. *Journal of cellular physiology* 1990, 142(1): 117-128.
- MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J. E.; GRELLIER, P. *et al.* Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem I Oswaldo Cruz* 2005; 100: 783-787.
- METCALFE, A. D.; FERGUSON, M. W. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials* 2007; 28(34): 5100-5113.
- METZ, M.; MAURER, M. Mast cells—key effector cells in immune responses. *Trends in immunology* 2007; 28(5): 234-241.
- MICHOPOULOU, P.; ROUSSELLE, A. How do epidermal matrix metalloproteinases support re-epithelialization during skin healing?. *Eur. J. Dermatol* 2015; 25: 33–42.
- MING, L. C.; SILVA, S. M. P.; SILVA, M. A. S.; HIDALGO, A. F.; MARCHESE, J. A.; CHAVES, F. C. M. Manejo e cultivo de plantas medicinais: algumas reflexões sobre as perspectivas e necessidades no Brasil. Diversos olhares em Etnobiologia, Etnoecologia e Plantas Medicinais.(MFB Coelho, P. Costa Júnior & JLD Dpmbroski, org.). *Unicen Publicações* 2003; 1: 149–156.
- MIRANDA, A. L. P.; SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; NEVES, J. S.; PARRINI, S. C.; PINHEIRO, M. L. B. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic activities of the látex containing triterpenes from Himatanthus sucuba. *Planta Médica* 2000; 66(3): 284-286.
- MOLHO-SABATIER, P. Endothelium et thrombose. *Rev Méd Interne* 1987; 8: 389-94.
- MONTES, G. S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell biology international* 1996; 20 (1): 15-27.
- MONTES, G. S.; KRISZTN, R. M.; SHIGIHARA, K. M.; TOKORO, R.; MOURO, P. A. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. *Histochemistry* 1980; 65(2): 131-141.
- MONTES, G.S.; BEZERRA, M.S.F.; JUNQUEIRA, L.C. Collagen distribution in tissues. In: *Ultrastructure of the connective tissue matrix*. Springer: Boston, MA, 1984. p. 65-88.
- MOORE, K.L.; DALLEY, A.F. *Anatomia Orientada para a Clínica*. , 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.
- MOREL, A. F.; GRAEBNER, I. B.; PORTO, C.; DALCOL, I. I. Study on the antimicrobial activity of Himatanthus sucuba. *Fitoterapia* 2006; 77: 50-53.
- MOURA, F.; JUSTINO, A.; FERREIRA, B.; ESPINDOLA, F.; ARAËJO, F.; TOMIOSSO, T. Pro-Fibrogenic and Anti-Inflammatory Potential of a Polyphenol-Enriched Fraction from Annona crassiflora in Skin Repair. *Planta Medica* 2018; 85(7): 570-577.
- NAGATSUKA, H.; HIBI, K.; GUNDUZ, M.; TSUJIGIWA, H.; TAMAMURA, R.; SUGAHARA, T. *et al.* Various immunostaining patterns of CD31, CD34 and endoglin

and their relationship with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34(2): 70-6.

NASCIMENTO, M.F.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C.; CARDOSO, J. C.; ALMEIDA, B. M.; SOUZA, I. C. L.; PADILHA, F. F.; ALSINA, O. L. S.; ARAUJO, A. A. S.; CARAMAO, E. B.; CARDOSO, C. A. L.; COSTA, L. P. Composição para obtenção de biomembrana que permite aceleração da cicatrização de feridas de pele, processo e utilização da mesma. Nº de depósito: INPI 1020150240520. 2015.

NASSIRI, F.; CUSIMANO, M.D.; SCHEITHAUER, B.W.; ROTONDO, F.; FAZIO, A.; YOUSEF, G.M. *et al.* "Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer research* 2011; 31(6): 2283-2290.

NEDELEC, B.; SHANKOWSKY, H.; SCOTT, P. G.; GHAHARY, A.; TREDGET, E. E. Myofibroblasts and apoptosis in human hypertrophic scars: The effect of interferon- α 2b. *Surgery* 2001; 130: 798-808.

NICHOL, J. W.; SANDEEP, T. ; KOSHY, S. T.; BAE, H.; HWANG, C. M.; YAMANLAR, S.; KHADEMHOSEINI, A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* 2010; 31: 5536-5544.

NUNES, P. S.; BEZERRA, M. S.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; CAVALCANTE, D. R. R.; DANTAS, M. D. M., CARDOSO, J. C. *et al.* Collagen-Based Films Containing Liposome-Loaded Usnic Acid as Dressing for Dermal Burn Healing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011; 12: 1 - 9.

OLIVEIRA, Z. N. P. *Dermatologia pediátrica*. 2 ed. Manole, 2012.

ORÉFICE, R. L. *Biomateriais e Biocompatibilidade – texto/atlas*. 2 ed. Rio de Janeiro: Uveíte: Clínica e Cirúrgica; 2005. p. 1317-1351.

OWENS, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological Reviews* 1995; 75(3): 487–517.

OWENS, G. K.; KUMAR, M. S.; WAMHOFF, B. R. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiological Reviews* 2004; 84(3): 767– 801.

PACHENCE, J. M. Collagen-based devices for soft tissue repair. *Journal of biomedical materials research* 1996; 33(1): 35-40.

PAGANELA J. C.; RIBAS L. M.; SANTOS C. A.; FEIJÓ L. S.; NOGUEIRA C. E. W.; FERNANDES C. G. Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. *RPCV* 2009; 104(569-572): 13-18.

PAKSHIR, P.; NOSKOVICOVA, N.; LODYGA, M.; SON, D.O.; SCHUSTER, R.; GOODWIN, A.; KARVONEN, H.; HINZ, B. The myofibroblast at a glance. *J Cell Sci.* 2020; 133(13): jcs227900.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg.* 2004; 187: 11-6.

PARKIN, J.; COHEN, B.; Overview of the immune system. *The Lancet* 2001; 357(9270): 1777-1789.

PARRY, D.A.D.; CRAIG, A.S. Collagen Vol. 2, *Biochemistry and Biomechanics*. 1988.

PASTAR, I.; STOJADINOVIC, O.; YIN, N.C.; RAMIREZ, H.; NUSBAUM, A.G.; SAWAYA, A. et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014; 3(7):445-464.

PEREIRA FILHO, R.N. Efeito citotóxico e antitumoral do extrato etanólico da casca de *Himatanthus bracteatus* (A. CD.) Woodson obtido por meio de líquidos pressurizados [Tese Doutorado]. Aracaju: Universidade Tiradentes; 2017.

PEREIRA, A. P. V.; VASCONCELOS, W. L.; ORÉFICE, R. L. Novos Biomateriais: Híbridos Orgânico-Inorgânicos Bioativos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 1999; 9(4): 104-109.

PIEPKORN, M.; PITTELKOW, M. R.; COOK, P. W. Autocrine regulation of keratinocytes: the emerging role of heparin-binding, epidermal growth factor-related growth factors. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 715-721.

PIERCE, G.; MUSTOE, T.; ALTROCK, B. et al. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J. Cell Biochem* 1991; 45: 319.

PILLEN, H.; MILLER, M.; THOMAS, J.; PUCKRIDGE, P.; SANDISON, S.; SPARK, J.I. Assessment of wound healing: validity, reliability and sensitivity of available instruments. *Wound Pract Res*. 2009; 17(4): 208-17.

PLUMEL, M. M. *Le genre Himatanthus (Apocynaceae) révision taxonomique*. Bradea: Rio de Janeiro; v. 5, 1991. p. 1-118.

PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de crescimento: das pesquisas científicas à clínica odontológica. São Paulo, 2004.

PORTO, C. C. *Semiologia médica*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.

PORTOU, M. J.; BAKER, D.; ABRAHAM, D.; TSUI, J. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: a review. *Vascular pharmacology* 2015; 71: 31-36.

PRIYA, K. S.; GNANAMANI, A.; RADHAKRISHNAN, N.; BABU, M. Healing potential of *Datura alba* on burn wounds in albino rats. *Journal of ethnopharmacology* 2002; 83 (3): 193-199.

PROFYRIS, C.; TZIOTZIOS C. ; DO VALE, I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. *J Am AcadDermatol*. 2012; 66 (1):1-10.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. M. The skin: An indispensable barrier. *Exp. Dermatol* 2008; 17: 1063-1072.

RAJA, S.K.; GARCIA, M.S.; ISSEROFF, R.R. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci* 2007; 12: 2849-68.

- RAKITA, A.; NIKOLIĆ, N.; MILDNER, M.; ELBE-BÜRGER, A. Re-epithelialization and immune cell behaviour in an ex vivo human skin model. *Sci Rep* 2020; 10:1
- RAMALHO, L. N. Z.; SÉRGIO, Z.; RAMALHO, F. S.; CASTRO-E-SILVA, J. R. O.; CORRÊA, F. M. A. Efeito de agentes anti-hipertensivos sobre as células estreladas durante a regeneração hepática em ratos. *Arq. Gastroenterol.* 2003; 40(1).
- RAMASASTRY, S. S. Acute wounds. *Clinics in plastic surgery* 2005; 32(2): 195-208.
- RAPA, S.F.; WALTENBERGER, B.; DI PAOLA, R.; ADESSO, S.; SIRACUSA, R.; PERITORE, A.F. et al. Plumericin prevents intestinal inflammation and oxidative stress in vitro and in vivo. *Faseb J.* 2020; 34(1): 1576-1590.
- RDNNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O.W.; KOTELIANSKY, V.; BISSELL, M.J. The Origin of the Myofibroblasts in Breast Cancer. *J Clin Invest* 1995; 95(2): 859–873.
- REGAN, M.; KIRK, S.; WASSERKRUG, H. et al. The wound environment as a regulator of fibroblast phenotype. *J. Surg. Res* 1991; 50: 442.
- REININGER, A. J. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia* 2008; 14 (5):11- 26.
- RENZI, S.; RICCÒ, S.; DOTTI, S.; SESSO, L.; GROLLI, S.; CORNALI, M.; CARLIN, S.; PATRUNO, M.; CINOTTI, S.; FERRARI, M. Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: a clinical report. *Res. Vet. Sci* 2013; 95: 272-277.
- RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E.; ROCCARO, A. M.; RIA, R.; VACCA, A. Mast cell contribution to angiogenesis related to tumour progression. *Clinical & Experimental Allergy* 2004; 34(11): 1660-1664.
- RIBEIRO, M. A. G.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; RAMALHO, L. M. P.; PINHEIRO, A. L. B.; BONJARDIM, L. R.; CUNHA, S. S. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660 nm. *Photomedicine and Laser Surgery* 2009; 27(1): 49-55.
- RIBEIRO, M. A.; ALBUQUERQUE, J. R.; R. L.; RAMALHO, L. M.; PINHEIRO, A. L.; BONJARDIM, L. R.; CUNHA, S. S. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660 nm. *Photomedicine and Laser Surgery* 2009; 49–55.
- RIELLA, K. R.; MARINHO, R. R.; SANTOS, J. S.; PEREIRA-FILHO, R. N.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C. et al. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal Ethnopharmacology* 2012; 143: 656 - 663.
- ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B.; ASSOIAN, R.K.; SMITH, J.M.; ROCHE, N.S.; WAKEFIELD, L.M.; KEHRL, J.H. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1986, 83(12): 4167-4171.

ROCHA, A. C. A. A.; CARNEIRO, F. A. S.; SOUZA, M. S. Tratamento domiciliar de feridas crônicas: relato de experiência da extensão na prática do cuidar. *Revista Ciência e Estudos Acadêmicos de Medicina* 2015; 1(2): 20-30.

RODRIGUES, M.; KOSARIC, N.; BONHAM, C.A.; GURTNER, G. C. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev.* 2019; 99: 665–706.

RØNNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O.W. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1993; 68(6): 696-707.

ROSS, R. The elastic fiber a review. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1973; 21(3): 199-208.

ROUSSELLE, P.; MONTMASSON, M.; GARNIER, C. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. *Matrix Biology* 2019; 75: 12-26.

RZUCIDLO, E. M.; MARTIN, K. A.; POWELL, R. J. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Journal of Vascular Surgery* 2007, 45(6): A25–A32.

SÁ R, C. S.; ANDRADE, L.N.; SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules* 2013; 18(1): 1227-1254.

SÁNCHEZ-ELSNER, T.; BOTELLA, L.M.; VELASCO, B.; CORBÍ, A.; ATTISANO, L.; BERNABÉU, C. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- β pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(42): 38527-38535.

SANKAR, S.; MAHOOTI-BROOKS, N.; BENSON, L.; MCCARTHY, T.L.; CENTRELLA, M.; MADRI, J.A. Modulation of transforming growth factor beta receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *The Journal of clinical investigation* 1996, 97(6): 1436-1446.

SANTANA, M. T.; SILVA, V. B.; BRITO, R. G.; SANTOS, P. L.; CAVALCANTI, S. C. H.; BARRETO, E. O. *et al.* Synthesis and Pharmacological Evaluation of Carvacrol Propionate. *Inflammation* 2014; 4: 1-14.

SANTOS E.; QUEIRÓS, P.; CARDOSO, D.; CUNHA, M.; APÓSTOLO J. The effectiveness of cleansing solutions for wound treatment: a systematic review. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. *Revista de Enfermagem Referência* 2016; 8: 133-144.

SARANYA, N.; MOORTHY, A.; SARAVANAN, S.; DEVI, M. P.; SELVAMURUGAN, N. Chitosan and its derivatives for gene delivery. *International journal of biological macromolecule* 2011; 48(2): 234-8.

SCHUGART, R.C.; FRIEDMAN, A.; ZHAO, R.; SEN, C.K. Wound angiogenesis as a function of tissue oxygen tension: a mathematical model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; 105(7): 2628-2633.

SCHULTZ, G.S.; ROTATORI, W. CLARK. EGF and TGF- α in wound healing and repair, *J. Cell. Biochem* 1991; 45: 346-352.

SEMENZA, G. L. Vasculogenesis, Angiogenesis and Arteriogenesis: Mechanisms of Blood Vessel Formation and Remodeling. *J Cell Biochem* 2007; 102: 840-47.

SEMENZA, G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical pharmacology. Oxford*. 2002; 64(5-6): 993-998.

SERINI, G.; BOCHATON-PIALLAT, M.L.; ROPRAZ, P.; GEINOZ, A.; BORSI, L.; ZARDI, L. et al. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor- β 1. *J Cell Biol* 1998; 142(3): 873-881.

SERINI, G.; GABBIANI, G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Experimental cell research* 1999; 250: 273-283.

SHAO, M.; HUSSAIN, Z.; THU, H. E.; KHAN, S.; DE MATAS, M.; SILKSTONE, V et al. Emerging Trends in Therapeutic Algorithm of Chronic Wound Healers: Recent Advances in Drug Delivery Systems, Concepts-to-Clinical Application and Future Prospects. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* 2017; 34(5): 387-452.

SHAW, T. J.; MARTIN, P. Wound repair at a glance, *J. Cell Sci* 2009; 122: 3209- 3213.

SHEPPE, A.E.F.; KUMMARI, E.; WALKER, A.; RICHARDS, A.; HUI, W.W.; LEE, J.H. et al. PGE2 Augments Inflammasome Activation and M1 Polarization in Macrophages Infected With Salmonella Typhimurium and Yersinia enterocolitica. *Front Microbiol*. 2018; 9:2447.

SHIN, H.; OLSEN, B. D.; KHADEMHOSEINI, A. The mechanical properties and cytotoxicity of cell-laden double-network hydrogels based on photocrosslinkable gelatin and gellan gum biomacromolecules. *Biomaterials* 2012; 33: 3143-3152.

SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; PINHEIRO, M. L. B.; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E.; YOUNG, C. M.; BOLZANI, V. S. Ésteres Triterpênicos de Himatanthus sucuba (Spruce) Woodson. *Química Nova* 1998; 21(6): 702-704.

SILVA, L. H.; SILVA, M. T.; GUTIERREZ, R. M.; CONTE, T. C.; TOLEDO C. A.; AOKI, M. S. et al. GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin. *Lasers Med Sci*. 2011; in press.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing New England Journal of Medicine. 1999; 341:738 - 46.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999; 341(10): 738-746.

SONG, R.; BIAN, H.; LAI, W.; CHEN, H.; ZHAO, K. Normal skin and hypertrophic scar fibroblasts differentially regulate collagen and fibronectin expression as well as mitochondrial membrane potential in response to basic fibroblast growth factor. *Braz J Med Biol Res* 2011; 43(5): 381-496.

SOUZA, I. C. L., DO NASCIMENTO, M. F., DE SOUZA NETA, R. G., DOS SANTOS, J. E. C., COSTA, L. P., CARDOSO, J. C. et al. Effect of the maltodextrin-induced chemical reticulation on the physical properties and healing potential of collagen-based

membranes containing Brazilian red propolis extract. *International. Journal of Medicine and Medical Sciences* 2013; 5(12): 514-524.

SPINA, A.P. Estudos taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult.(Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae [Tese de doutorado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2004.

SUFEN, G.; XIANGHONG Y.; YONGXIA C.; QIAN, P. bFGF and PDGF-BB have a synergistic effect on the proliferation, migration and VEGF release of endothelial progenitor cells. *Cell Biol Int* 2011; 35(5): 545-51.

SULTANA, J.; MOLLA, M. R.; KAMAL, M.; SHAHIDULLAH, M.; BEGUM, F.; BASHAR, M. A. Histological differences in wound healing in maxillofacial region in patients with or without risk factors. *Bangladesh Journal of Pathology* 2009; 24: 3-8.

SURI, C.; JONES, P.F.; PATAN, S.; BARTUNKOVA, S.; MAISONPIERRE, P. C.; DAVIS, S.; YANCOPOULOS, G.D. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87(7): 1171-1180.

TAKEO, M.; LEE, W.; ITO, M. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015; 5(1): a023267.

TAMMELA, T.; ENHOLM, B.; ALITALO, K. PAAVONEN, K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65(3): 550-563.

THAKUR, R.; JAIN, N.; PATHAK, R.; SANDHU, S. S. Practices in Wound Healing Studies of Plants *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011; 2011: 1-17

THEUNISSEN, D.; SEYMOUR, B.; FORDER, M.; COX, S.G.; RODE, H. Measurements in wound healing with observations on the effects of topical agents on full thickness dermal incised wounds. *Burns*. 2016; 42(3): 556-63.

TOBIN, D. J. Biochemistry of human skin--our brain on the outside. *Chem Soc Rev* 2006; 35(1): 52-67.

TOMASEK, J.J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R.A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* 2002; 3(5): 349-363.

TONNESEN, M.G.; FENG, X.; CLARK, R.A. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2000; 5(1): 40-6.

TORRES, B. M. Efeitos da Elevada Concentração de Sódio no Fenótipo Migratório de Células Endoteliais [Dissertação]. Vitoria: Universidade Federal do Espírito Santo; 2017

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. *Principles of Anatomy and Physiology*. 12th ed. Wiley and Sons Inc. 2009.

TORTORA, G. *Princípios de Anatomia Humana*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.

TROMPEZINSKI, S.; PERNET, I.; MAYOUX, C.; SCHMITT, D.; VIAC, J. Transforming growth factor- β 1 and ultraviolet A1 radiation increase production of vascular endothelial

growth factor but not endothelin-1 in human dermal fibroblasts. *British Journal of Dermatology* 2000; 143(3): 539-545.

TSALA, D. E.; DAWE, A.; SOLOMON, H. Natural wound healing and bioactive natural products. *Phytopharmacology* 2013; 4(3): 532-60.

TSUKADA, T.; TIPPENS, D.; GORDON, D.; ROSS, R.; GOWN, I. HHF35, a muscle-actin-specific monoclonal antibody. I. Immunocytochemical and biochemical characterization. *The American journal of pathology* 1987; 126(1): 51.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F.; STATI, G. A.; MENICHINI, F. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2008; 8(4): 399-420.

ULUBAYRAM, K.; CAKAR, A. N.; KORKUSUZ, P.; ERTAN, C.; HASIRCI, N. EGF containing gelatin-based wound dressings. *Biomaterials* 2001; 22: 1345-1356.

VALE, V.; VILHENA, T. C.; TRINDADE, R. C. S.; FERREIRA, M. R. C.; PERCÁRIO, S.; SOARES, L. F. *et al.* Anti-malarial activity and toxicity assessment of *Himatanthus articulatus*, a plant used to treat malaria in the Brazilian Amazon. *Malaria Journal* 2015; 132(3): 1-10.

VAN DE WATER L.; VARNEY, S.; TOMASEK, J.J. Mechanoregulation of the Myofibroblast in Wound Contraction, Scarring, and Fibrosis: Opportunities for New Therapeutic Intervention. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013; 2(4): 122-141.

VAN, W. W. The fibroblast in wound healing. *Surg Gynecol Obstet* 1967; 124: 369.

VANE, J. R.; ANGARD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. *New England Journal of Medicine* 1990; 323: 27-36.

VEITH, A. P.; HENDERSON, K.; SPENCER, A.; SLIGAR, A. D.; BAKER, A. B. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2019; 146: 97-125.

VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; TADDEI, S. Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Eur J Physiol*. 2010; 459: 1015-1023.

VITORINO-FILHO, R. N. L. Uso de polissacarídeo extraído do exsudato de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) na terapêutica tópica de feridas. [Dissertação]. Teresina: Universidade Federal do Piauí; 2011.

VOJDANI, A.; ERDE, J. Regulatory T cells, a potent immunoregulatory target for CAM researchers: Modulating tumor immunity, autoimmunity and alloreactive immunity (III). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2006; 3: 309-316.

VOWDEN, K.; VOWDEN, P. Wound dressings: principles and practice. *Surgery (Oxford)* 2017; 35(9): 489-494.

WAIMAN, M. A. P. *et al.* O cotidiano do indivíduo com ferida crônica e sua saúde mental. *Texto & Contexto-Enfermagem* 2011; 20(4): 691-699.

WALTENBERGER, B.; ROLLINGER, J. M.; GRIESSER, U. J.; STUPPNER, H.; GELBRICH, T. Plumeridoid C from the Amazonian traditional medicinal plant *Himatanthus sukuuba*. *Acta Crystallographica Section B* 2011; 67(10): 409-412.

WANG, P.H.; HUANG, B.S.; HORNG, H. C.; YEH, C.C.; CHEN, Y.J. Wound healing, *Journal of the Chinese Medical Association* 2017; 20: 1-8.

WANG, P.-H.; HUANG, B.-S.; HORNG, H.-C.; YEH, C.-C.; CHEN, Y.-J. Cicatrização de feridas. *Journal of the Chinese Medical Association* 2018; 81 (2): 94-101.

WERNER S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews* 2003; 83.

WEVER, O.; DEMETTER, P.; MAREEL, M.; BRACKE, M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *International Journal of Cancer* 2008; 123(10): 2229–2238.

WHITTINGTON, C.F.; YODER, M.C.; VOYTIK-HARBIN, S.L. Collagen-polymer guidance of vessel network formation and stabilization by endothelial colony forming cells in vitro. *Macromol Biosci.* 2013; 13(9): 1135-49.

WIETECH, M.S.; CHEN, L.; RANZER, M.J.; ANDERSON, K.; YING, C.; PATEL, T.B. et al. Sprouty2 downregulates angiogenesis during mouse skin wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; (2): 459-67.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. Princípios Gerais De Cura De Feridas. *Surgical Clinics of North America* 1997; 77(3): 509-528.

WOHNER, N. Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008; 63:224-8.

WOLK, K.; WITTE, K.; SABAT, R. Interleukin-28 and Interleukin-29: Novel Regulators of Skin Biology. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2010; 8(30): 617 – 628.

WOOD, C. A.; LEE, K.; VAISBERG, A. J.; KINGSTON, D. G.; NETO, C. C.; HAMMOND, G. B. A bioactive spiro lactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sukuuba*. *Chem Pharm Bull* 2001; 49: 1477-1478.

XIAO, T.; YAN, Z.; XIAO, S.; XIA, Y. Proinflammatory cytokines regulate epidermal stem cells in wound epithelialization. *Stem Cell Res Ther.* 2020 ;11(1): 232.

XING, F.; SAIDOU, J.; WATABE, K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 2010;15(2): 166–179.

YAGUISHITA, N. Avaliação da cicatrização induzida pela membrana de celulose porosa depois da retirada total da pele em dorso de ratos. *Jornal Vascular Brasileiro* 2007; 6(2): 193-194.

YAMADA, B. F. A. Terapia tópica de feridas: limpeza e desbridamento. *Rev Esc Enf USP* 1999; 33: 133-40.

YANG, E.Y.; MOSES, H.L. Transforming growth factor-1-induced migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J Cell Biol* 1990; 111: 731–741.

YATES, R. A.; NANNEY, L. B.; GATES, L. E. K. Epidermal growth factor and related growth factors. *Int. J. Dermatol* 1991; 30: 687–694.

YOO, S.Y.; KWON, S.M. Angiogenesis and Its Therapeutic Opportunities. *Mediators Inflamm* 2013; 1(11).

YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. *Surgery* 2011; 29(10): 475-479.

YOUNG, B.; HEATH, J.W.; STEVENS, A.; LOWE, J. S.; WHEATER, P. R.; BURKITT, H.G. Wheater's functional histology: a text and colour atlas. *Churchill Livingstone: Edinburgh* 1979; 278.

YOUSEFI, S.; QIN, J.; DZIENNIS, S.; WANG, R.K. Assessment of microcirculation dynamics during cutaneous wound healing phases in vivo using optical microangiography. *J Biomed Opt.* 2014;19(7):76015.

YUE, K.; SANTIAGO, G. T.; ALVAREZ, M. M.; TAMAYOL, A.; ANNABI, N.; KHADEMHOSEINI, A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* 2015; 73: 254 - 271.

YUE, T.L.; WANG, X.; LOUDEN, C.S.; GUPTA, S.; PILLARISETTI, K.; GU, J.L. et al. 2-Methoxyestradiol, an Endogenous Estrogen Metabolite, Induces Apoptosis in Endothelial Cells and Inhibits Angiogenesis: Possible Role for Stress-Activated Protein Kinase Signaling Pathway and Fas Expression. *Mol Pharmacol* 1996; 51(6): 951-962.

ZHANG, X. J.; SAKURAI, Y.; WOLFE, R. R. An animal model for measurement of protein metabolism in the skin. *Surgery* 1996; 119: 326-32.

ZHANG, Y.; OUYANG, H.; LIM, C. T.; RAMAKRISHNA, S.; HUANG, Z.. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *Journal Of Biomedical Materials Research* 2004; 72 (1): 156-165.

ZYGMUNT, M.; HERR, F.; MÜNSTEDT, K.; LANG, U.; LIANG, O.D. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2003; 110: S10-S18.

ANEXO 2

PROCEDIMENTOS DE OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO SEQUENCIAL PRESSURIZADO DE *Himatanthus bracteatus* (EEHB) E PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS FOTOATIVADOS

A) Coleta e Preparo do Material Vegetal

As amostras das cascas do caule de *H. bracteatus* foram coletadas nas coordenadas S 01° 44' 32" W 55° 28' 13" (Fazenda Piquiá, comunidade Cipoal, Óbidos/PA, Brasil) em fevereiro de 2013, ao amanhecer, com o auxílio de um facão devidamente higienizado. A identificação do espécime vegetal foi realizada no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (voucher nº ASE-26.808) e depósito da exsicata efetuado em 14 de fevereiro de 2014. Após a coleta, as cascas do caule de *H. bracteatus* foram secas em estufa (40 °C, 24 h) e posteriormente trituradas em moinho de facas, sendo as partículas classificadas quanto ao tamanho por meio do uso de peneiras (série Tyler). Para a realização dos procedimentos de extração de compostos bioativos foram selecionadas as partículas de 18 – 30 mesh (diâmetros de partículas entre 0,60 – 0,85 mm) retidas nas peneiras. As amostras secas foram acondicionadas em vidro âmbar em ambiente frio e seco até o momento de realização do processo extrativo.

B) Extração sequencial em solventes de polaridade crescente

Para a obtenção do extrato etanólico (EEHB) foi utilizado o método de extração com líquidos pressurizados (ELP) e os solventes utilizados na extração sequencial foram hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol (VETEC®, 99% de pureza). A célula extratora da Unidade de extração (anexo 2) foi carregada com 10 g da casca de *H. bracteatus* previamente triturada. O volume final da célula extratora foi completado com esferas de vidro a fim de reduzir a quantidade de solvente a ser utilizado no processo. Em seguida, foram ajustados os parâmetros de extração (25 °C, 1 mL/min, 100 Bar) (ALMEIDA, 2016; PEREIRA-FILHO, 2018). Foi adicionado 25 mL de cada solvente em uma proveta e então foi aberta a válvula micrométrica para despressurização. Cada extração ocorreu num tempo pré-definido de 25 min (na seguinte ordem: hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol) e o material coletado de cada extração sequencial era depositado em recipiente transparente de vidro. Entre o uso de cada solvente, o CO₂ era utilizado para remover remanescentes do solvente anterior na célula extratora. Após completa evaporação dos solventes, a massa dos extratos obtidos com o hexano, diclorometano e acetato de etila foi etiquetada e armazenada. Apenas a massa seca do extrato etanólico (EEHB) final foi utilizada nas

etapas seguintes do experimento. O rendimento percentual do EEHB foi calculado a partir da seguinte equação:

$$\%R = M_{ES} / M_{PC} \times 100$$

Onde: %R = Percentual de rendimento

M_{ES} = Massa do extrato sólido

M_{PC} = Massa do pó da casca da *H. bracteatus* (base seca)

C) Caracterização do extrato por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrometria de massa (CLUE-DAD-EM)

Amostra de EEHB (10 g) foi solubilizada em uma mistura de água:metanol (20%) e centrifugada por 10 min. Posteriormente, 1 mg/mL do extrato foi injetado e analisado no sistema CLUE-DAD-EM (Shimadzu) acoplado com um espectrômetro de massa de alta resolução (Bruker compacto Q Tof HRMS). A análise de dados foi efetuada no programa Compass 4.2, análise por ESI no modo negativo, com 4500 de tensão capilar, 500V end-plate, tensão de carregamento 2000 V, nebulizador em 5,5 bar, aquecedor a 220 °C, gás seco a 12,0 L/min e massa de m/z 50-1500 para EM. A separação foi realizada em coluna Shimpack ODS3 (100 x 2,0 mm, 2,1 mm). O fluxo foi de 0,3 mL/min com os solventes ácido fórmico a 0,1% (fase A) e acetonitrila (fase B) em gradiente de diluição de 3% até 70% da fase A durante 16 min (AMARAL *et al.*, 2013).

D) Preparação dopolímero metacrilado fotopolimerizável (GelMA e GelMA-HB)

O pré-polímero foi produzido de acordo com Nichol *et al.* (2010). Foram adicionados 10 g de colágeno hidrolisado (NP – Comércio de Produtos Alimentícios Ltda³) em 100 mL de solução de tampão fosfato (PBS) a 10% (m/v), sob agitação magnética à 60 °C até completa dissolução. Posteriormente, a solução foi resfriada em temperatura ambiente e a ela adicionado lentamente 1 mL de anidrido metacrílico (2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (Irgacure 2959 sob agitação mecânica por 2 min e, a seguir, mantida sob agitação mecânica por 3 h a 50 °C. Após resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 400 mL de PBS, sendo a solução final embalada em membranas de diálises e devidamente acondicionada em um becker contendo água destilada sob agitação mecânica. Para remover os sais e ácido metacrílico, a troca da água foi realizada a cada 2 h, durante cinco dias, à temperatura ambiente. O material foi liofilizado à -50 °C e 1,9 Pa produzindo um pré-polímero esponjoso poroso e branco, que foi pesado e armazenado em recipiente fechado, sendo mantido em dessecador a temperatura ambiente, até sua utilização.

³ Colágeno puro, lote LST – 9766;

Posteriormente, o pré-polímero a 10% (m/v) e o fotoiniciador a 0,5% (m/v) (IrgacureC612959 - CIBA Chemicals) foram dissolvidos em tampão fosfato (PBS) a temperatura de 80 °C (**GeIMA**). A mesma formulação foi preparada com adição do EEHB a 2,0% (**GeIMA-HB**) à solução.