

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CLARA SANS SALOMÃO

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DA INFLUÊNCIA DE *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax NA
CICATRIZAÇÃO**

**CURITIBA
2009**

ANA CLARA SANS SALOMÃO

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DA INFLUÊNCIA DE *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax NA
CICATRIZAÇÃO**

Monografia apresentada à disciplina
Estágio em Farmacologia como requisito
parcial à conclusão do curso de Ciências
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela de
Almeida Cabrini

**CURITIBA
2009**

À minha vózinha Edi (*in memoriam*),
por todas as velinhas acesas durante
esses anos de graduação.

À Sofia, que trará luz, amor e união
para todos ao seu redor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha mãe e ao meu pai, por sua presença, apoio, compreensão e incentivo contínuos; por seus conselhos e ensinamentos; por seu amor; por sua ajuda e seus sacrifícios; e finalmente, por serem o meu maior e melhor exemplo.

À minha irmã, por ser a minha companheira de vida, dividindo comigo os bons e maus momentos.

Ao meu “Pig”, pela sua paciência, ajuda e carinho; e mais importante, por despertar em mim amor, alegria, paz e esperança.

Enfim, à minha família, que eu amo mais do que tudo, e que é a responsável por eu ter me tornado a pessoa que sou hoje.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Daniela Cabrini, por me abrir as portas da pesquisa; por sua confiança, seus ensinamentos, sua dedicação e pelas palavras de auxílio e incentivo.

À Prof^a. Dr^a. Kátia Christina Zuffellato-Ribas e à sua aluna Bárbara Guerreira do Departamento de Botânica da UFPR, pela coleta e identificação das folhas de *S. glandulatum*.

Às professoras Dr^a. Maria Consuelo Marques e Dr^a. Joice Cunha, pela disponibilidade em avaliar tão cuidadosamente este trabalho.

Às minhas amigas Pati Sotomaior, Pati Gaúcha, Palominha, Paloma Minervini e Cami, que tornaram a graduação muito mais agradável e que foram tão importantes durante esses anos.

Aos meus colegas de laboratório, especialmente à Cintia, à Evelise e ao Bruno Riveiros, pelos ensinamentos e momentos compartilhados; ao Daniel e à Bruna, pela preparação do extrato.

Ao departamento de Biologia Celular, em especial aos professores Manoel Quintilham, Ruth Schadek e ao Seu Nino, por todo o auxílio e atenção; e pelo empréstimo de equipamentos e reagentes para realização deste trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica, pelo empréstimo do liofilizador.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas, pela ótima formação oferecida.

Aos camundongos, sem os quais esse trabalho não poderia ter sido realizado.

“Não haverá borboletas se a vida não
passar por longas e silenciosas
metamorfoses.”

Rubem Alves

RESUMO

Algumas plantas do gênero *Sapium* possuem propriedades anti-inflamatórias, antibióticas e/ou cicatrizantes, enquanto outras revelam atividades pró-inflamatórias e/ou irritativas. Sabendo-se que a cicatrização envolve uma série de reações entre células e mediadores inflamatórios, pode-se dizer que estes dados indicam potenciais cicatrizantes contraditórios. Dessa forma, estudou-se o possível efeito do uso tópico do extrato hidroalcoólico das folhas de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax na cicatrização de feridas. Primeiramente, foi realizada a avaliação do edema de orelha em camundongos Swiss, antes e 6 h após a aplicação do óleo de cróton (0,4 mg/orelha). No tratamento utilizou-se o extrato (3%), o veículo permulên ou a dexametasona (0,1 mg/orelha, dissolvida em acetona). No modelo de cicatrização por excisão, os animais tiveram a camada cutânea do seu dorso removida (6 mm). Nos 15 dias que se seguiram, eles foram tratados topicamente (12/12 h) com o extrato (3%) ou com o veículo permulên. Os halos das feridas foram medidos diariamente e analisados no programa Image Tool 3.0. Ao final do experimento os animais foram sacrificados e foram retiradas amostras para quantificação da hidroxiprolina, indicativa de colágeno. Durante a realização do experimento de excisão, 2 e 5 dias após a cirurgia, amostras da região da lesão foram coletadas de animais sacrificados, fixadas e preparadas para análise histológica em microscópio ótico, sendo coradas com HE. No experimento de lesão por incisão, os camundongos tiveram o seu dorso submetido a um corte de 3 cm, suturado a cada 1cm. Durante 10 dias, os animais foram tratados topicamente (12/12 h) com o veículo permulên ou com o extrato (3%). No 6º dia, as suturas foram retiradas e no 10º dia, os animais foram sacrificados para a medição da elasticidade de suas cicatrizes. O extrato não alterou o tempo de fechamento da área da ferida no modelo de excisão, no entanto diminuiu significativamente a elasticidade do tecido, em 45,3% se comparado ao grupo veículo, e reduziu em 42,9% a quantidade de hidroxiprolina presente na cicatriz formada. Apresentou atividade anti-edematogênica similar à dexametasona, promovendo a redução de 50,6% do edema formado com a utilização do óleo de cróton, e foi responsável por inibir 52,9% da migração leucocitária no 5º dia após a lesão por excisão. Os resultados obtidos sugerem que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Sapium glandulatum* apresenta efeito significativo sobre a cicatrização de lesões de pele, sendo capaz de reduzir a quantidade de colágeno e a elasticidade das cicatrizes formadas, além de exibir efeito anti-inflamatório.

Palavras-chave: Cicatrização. *Sapium glandulatum*. Hidroxiprolina. Pele. Elasticidade. Colágeno.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 PELE.....	8
1.2 CICATRIZAÇÃO.....	9
1.3 USO DE PRODUTOS NATURAIS.....	14
1.4 <i>Sapium glandulatum</i> (Vell.) Pax.....	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	20
3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO.....	20
3.3 ANIMAIS E MANUTENÇÃO.....	20
3.4 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE ÓLEO DE CRÓTON.....	21
3.5 LESÃO POR EXCISÃO.....	21
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE HIDROXIPROLINA.....	22
3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	23
3.8 LESÃO POR INCISÃO.....	23
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
4 RESULTADOS	25
4.1 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE ÓLEO DE CRÓTON.....	25
4.2 LESÃO POR EXCISÃO.....	26
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE HIDROXIPROLINA.....	27
4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	28
4.5 LESÃO POR INCISÃO.....	31
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	37
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 PELE

A pele recobre a superfície do corpo e apresenta-se constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Abaixo se encontra uma camada de células adiposas, a hipoderme, que age como isolante térmico, tecido de reserva de energia e acolchoamento das protuberâncias ósseas (IRION, 2005). Alguns autores consideram a hipoderme como tecido constituinte da pele, enquanto outros afirmam que esta camada não faz parte da pele, servindo apenas como união entre a derme e os órgãos subjacentes. Glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, pêlos e unhas estão presentes na pele, sendo considerados anexos cutâneos (SAMPAIO e RIVITTI, 2000). A epiderme é composta principalmente por queratinócitos em vários estágios de diferenciação, formando um epitélio no qual se reconhecem distintas camadas celulares (SAMPAIO e RIVITTI, 2000). Os queratinócitos são as células responsáveis por produzir queratina e manter a função impermeabilizante da epiderme, à medida em que amadurecem e migram para a superfície. Na epiderme, ainda estão presentes as células de Langerhans, responsáveis por participar da função imunológica, e os melanócitos, que contribuem na determinação da cor da pele e a protegem da radiação UV ao produzirem melanina (IRION, 2005). Células de Merkel, conhecidas por serem mecano-receptores (sensíveis ao tato), também podem ser encontradas nesta camada (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A derme, responsável por conferir resistência mecânica às compressões à pele, compreende um verdadeiro gel rico em mucopolissacarídeos (conhecido como substância fundamental); material fibrilar de três tipos: fibras colágenas, fibras elásticas e fibras reticulares; e células próprias: fibroblastos, histiócitos, mastócitos, células mesenquimais indiferenciadas e células de origem sanguínea, como plasmócitos e leucócitos (SAMPAIO e RIVITTI, 2000). A derme é formada por uma camada papilar, constituída de tecido conjuntivo frouxo, que adere e nutre a epiderme, e uma camada reticular, constituída de tecido conjuntivo denso (IRION, 2005; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Além dos vasos sanguíneos e linfáticos, e das estruturas nervosas, também são encontrados na

derme os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A organização das fibras colágenas e elásticas na derme é responsável pela tensão e elasticidade da pele (IRION, 2005). A pele desempenha múltiplas funções: age como barreira, protegendo o organismo contra a penetração de substâncias exógenas e contra o atrito; devido a sua impermeabilização, impede a perda de água; através de terminações nervosas sensitivas, recebe e envia informações sobre o ambiente; colabora na termorregulação do corpo por meio dos seus vasos sanguíneos, glândulas e tecido adiposo; excreta catabólitos pelas glândulas sudoríparas e também tem função protetora contra os raios ultravioleta (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

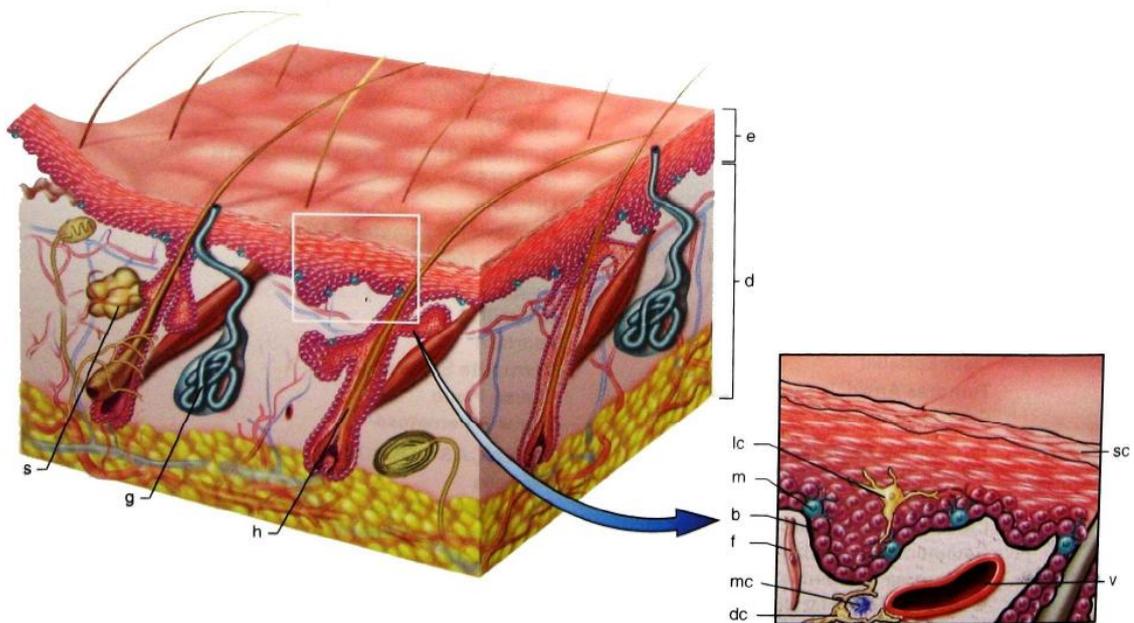


Figura 1. Esquema de uma seção transversal da pele. Epiderme (e); derme (d); folículos pilosos (h); glândulas sudoríparas (g); glândulas sebáceas (s). A projeção demonstra a epiderme e a derme subjacente, indicando as células da camada epidérmica basal (b); células escamosas superficiais cornificadas do estrato epidérmico córneo (sc); melanócitos (m); células de Langerhans (lc); pequenos vasos (v); fibroblastos (f); mastócitos (mc) e dentrócitos (dc). (Fonte: ROBBINS e COTRAN, 2005).

1.2 CICATRIZAÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo complexo que requer a colaboração de diferentes tecidos e linhagens celulares (MARTIN, 1997). Após uma lesão, ocorre

uma sequência ordenada de reações e interações entre células e substâncias químicas, levando à correção do defeito e à restauração da superfície da pele (BROUGHTON et al., 2006). A profundidade da lesão determina a sequência de eventos que ocorrerão: feridas com lesão somente epidérmica apresentam cicatrização apenas por reepitelização; feridas de espessura parcial, com lesão também em parte da derme, e feridas de espessura total, com lesão em toda a camada cutânea, apresentam um processo de cicatrização mais complexo. As feridas de espessura total podem ser fechadas com auxílio de suturas ou grampos, ou seja, com intervenção cirúrgica, ou mesmo podem ser submetidas à cicatrização normal (IRION, 2005).

O processo de cicatrização foi tradicionalmente dividido em três fases distintas denominadas inflamação, proliferação e remodelamento (BROUGHTON et al., 2006). Durante estas fases ocorre uma sequência ordenada e superposta dos processos de ativação da homeostasia, ativação da inflamação, reepitelização, formação do tecido de granulação, contração e remodelamento (IRION, 2005). Estes eventos são precisamente regulados, resultando na restauração da estrutura e função do tecido danificado (MOULIN, 1995).

A primeira ação a ser desempenhada pelo organismo após a lesão é o controle do sangramento, evitando a excessiva perda de líquidos, células e proteínas (IRION, 2005). Dessa forma, ocorre vasoconstrição enquanto o endotélio capilar e as plaquetas ativam a cascata de coagulação (BROUGHTON et al., 2006). O coágulo que se forma, constituído de colágeno, plaquetas, trombina e fibronectina, libera citocinas e fatores de crescimento que iniciam a resposta inflamatória (WITTE e BARBUL, 1997).

Através de vasos sanguíneos preservados, dilatados pela ação de mediadores inflamatórios e prostaglandinas, neutrófilos migram para o local lesionado, recrutados pela presença de moléculas quimiotáticas como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de plaquetas 4 (PF4) e produtos de bactérias (MARTIN, 1997; POHLMAN et al., 1986; BEVILACQUA et al., 1985). Os neutrófilos combatem a contaminação bacteriana e digerem o tecido não viável ao liberar proteases (BROUGHTON et al., 2006). Entretanto, devido à natureza inespecífica dessas células, em uma resposta inflamatória exacerbada, também podem danificar o tecido

sadio, liberando um excesso de enzimas e radicais livres e neutralizando os inibidores de proteases presentes no tecido saudável (YAGER, 1999; BROUGHTON et al., 2006). Após alguns dias, quando a ferida se torna limpa, a infiltração de neutrófilos cessa e ocorre, por estímulo ainda desconhecido, apoptose dos neutrófilos que ainda se encontram ali, limitando a destruição das células na área da lesão. O início da fagocitose de neutrófilos pelos macrófagos marca o fim da inflamação inicial. Entretanto, a contaminação de feridas causa a persistência da infiltração de neutrófilos (IRION, 2005).

O acúmulo de macrófagos, que se inicia em 48 a 96 horas após a lesão (BROUGHTON et al., 2006), continua independentemente da atividade dos neutrófilos, devido à presença de quimiotaxia seletiva para macrófagos (IRION, 2005). Os macrófagos fagocitam bactérias, neutrófilos e material desvitalizado das células (IRION, 2005). Além disso, medeiam a angiogênese ao sintetizar fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e TNF- α ; a fibroplasia, ao sintetizar TGF- β , fator de crescimento endotelial (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), IL-1 e TNF- α (BROUGHTON et al., 2006); e produzem óxido nítrico (NO), por ativação da NO sintase (NOS) pela ação da IL-1 e TNF- α (WITTE e BARBUL, 2002).

Durante o trauma ocorre a degranulação dos mastócitos, liberando uma grande quantidade de sinalizadores químicos, tais como histamina, heparina, IL-4, TNF- α e TGF- β (BAUER, 2000; GOTTWALD et al., 1998). A histamina produz vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, mantendo assim o fluxo sanguíneo ao tecido adjacente e permitindo o acesso das células responsáveis pela imunidade e pelo reparo da área da lesão (IRION, 2005). A heparina controla a hemostasia, evitando uma coagulação excessiva e uma possível lesão dos tecidos vizinhos com a interferência no suprimento de nutrientes (IRION, 2005). E, por fim, a IL-4, assim como o TNF- α e o TGF- β , aumenta a síntese de colágeno dos tipos I e III, laminina e fibronectina (IRION, 2005).

A matriz extracelular danificada é limpa pela ação das metaloproteases de matriz (MMP), expressas por queratinócitos, fibroblastos, monócitos e macrófagos em resposta à liberação de TNF- α (BROUGHTON et al., 2006). Dessa forma, a atividade das MMP possibilita a facilitação da migração celular pela matriz (GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ et al., 2007).

A inflamação termina quando lipoxinas são sintetizadas por plaquetas e leucócitos em conjunto ou somente por leucócitos, através da ação da enzima lipoxigenase (SERHAN e CHIANG, 2004).

Durante a Fase Proliferativa ocorre a reepitelização, a formação de tecido de granulação e a contração da ferida (IRION, 2005). A reepitelização se inicia já nas primeiras 24 horas, embora não seja percebida macroscopicamente durante os 3 primeiros dias, e a formação do tecido de granulação começa em 3 a 5 dias (IRION, 2005). É este novo tecido em formação que dará origem à derme, perdida ou destruída anteriormente (ALBERTS et al., 2004). Fibroblastos migram para o tecido lesionado, são ativados e em resposta ao PDGF e EGF (secretados por macrófagos e plaquetas) e passam a sintetizar grande parte das proteínas e polissacarídeos que compõem a neomatriz extracelular, como o colágeno III, a elastina, a fibronectina, a laminina e uma infinidade de glicosaminoglicanos (BROUGHTON et al., 2006; ALBERTS et al., 2004). A matriz de tecido conjuntivo depositada fornece o substrato para a migração de macrófagos e fibroblastos para dentro da ferida e a angiogênese fornece nutrientes para as células (IRION, 2005). Os fibroblastos que já estavam no local lesionado se transformam em miofibroblastos para fazer a contração da ferida, induzidos pelo TGF- β . Este também é reponsável pela síntese de colágeno I pelos fibroblastos, pela diminuição da produção de MMP e pelo aumento da produção de proteínas de adesão celular (BROUGHTON et al., 2006).

A reepitelização, primeiramente estimulada pela liberação de citocinas e pela perda das células vizinhas e posteriormente pelo TGF- α e pelo EGF, é obtida através da replicação e movimentação dos queratinócitos a partir das bordas livres para dentro da ferida (BROUGHTON et al., 2006). Fibroblastos secretam fatores de crescimento de queratinócitos (KGF-1 e KGF-2) e IL-6, os quais estimulam a migração e proliferação e diferenciação dos queratinócitos vizinhos para a lesão (BROUGHTON, 2006; SMOLA et al., 1993; XIA et al., 1999). À medida em que são formadas novas células nas bordas da ferida, elas aderem ao tecido de granulação abaixo, e as células replicadas migam por epibolia (IRION, 2005).

A Fase de Remodelação ocorre por um período prolongado. A matriz extracelular e os fibroblastos controlam-se mutuamente até que uma matriz estável se forme em meses a anos. O principal evento aqui é a deposição de colágeno em fibras mais grossas, de maneira ordenada, formando uma complexa rede

responsável pela elasticidade e resistência da cicatriz e da pele, enquanto que as fibras sempre paralelas à pele do tecido de granulação são reabsorvidas (BROUGHTON et al., 2006). Apesar de a resistência de ferida aumentar com a deposição de colágeno, esta força sofre um aumento de magnitude superior àquela que poderia ser atribuída apenas ao acúmulo de colágeno. As razões sugeridas para este fenômeno incluem a degradação seletiva de fibras de colágeno não submetidas a tensão, reforço das fibras tensas e reforço das fibras de colágeno pelos glicosaminoglicanos (IRION, 2005). A matriz do tecido de granulação, formada por cerca de 30% de colágeno do tipo III, é substituída por uma mais forte e organizada, composta somente por 10% a 20% de colágeno do tipo III e o restante de colágeno do tipo I, exatamente como no tecido não-lesionado (EHRLICH e KRUMMEL, 1996).

Todo o processo cicatricial dura em média uma ou duas semanas, entretanto, o produto final nem sempre estética ou funcionalmente perfeito, sendo que a cicatriz formada a partir de uma cicatrização normal, 3 meses após a lesão, tem aproximadamente 80% da força de tensão da pele normal, não é volumosa e é plana (DOILLON et al., 1985). O colágeno da cicatriz nunca se tornará tão organizado quanto o encontrado no tecido íntegro e a elasticidade nunca voltará a ser 100% (BROUGHTON et al., 2006).

A cicatrização de feridas pode ser retardada por diversos fatores. A ferida pode deixar de passar pelas etapas normais da cicatrização devido à cronicidade ou o não-início de uma das fases (IRION, 2005). Tanto as condições que evitam como as que mantêm a inflamação são comumente responsáveis. Estas condições incluem a presença de tecido necrótico, infecção ou de agentes citotóxicos no interior da ferida; manipulação inadequada; e imunidade comprometida (IRION, 2005). Uma série de patologias altera também a cicatrização normal, tais como hipóxia, infecções, tumores, diabetes, hipertensão, hipotireodismo, sepse, além do consumo de fumo e álcool, problemas renais, hepáticos e respiratórios (BROUGHTON et al., 2006). Devido à formação ineficaz do coágulo, indivíduos com hemofilia ou outras doenças relacionadas a alteração na população de plaquetas, apresentam cicatrização ineficaz (MARTIN, 1997). O tratamento ótimo é obtido pela manutenção de um leito da ferida úmido e pela manutenção da umidade da pele circundante (IRION, 2005). Além disso, o bom estado nutricional do paciente tem grande importância durante o processo cicatricial, pois a regeneração da pele

depende de fatores como sangue e nutrientes (MACKAY e MILLER, 2003). A impossibilidade de manter estas condições lentifica a cicatrização, causando dessecação, hipergranulação ou maceração (IRION, 2005).

Atualmente, muitos estudos se concentram na busca de um tratamento cicatrizante que origine rapidamente uma pele íntegra e com morfologia normal, sem cicatrizes, similar ao que ocorre em feridas fetais. As características conhecidas da cicatrização fetal são a ausência de neutrófilos e de inflamação aguda, baixa concentração de TGF β , uma reepitelização rápida, pouca vascularização, colágeno altamente organizado e uma matriz rica em ácido hialurônico (IRION, 2005). Portanto, pode-se dizer que a cicatrização ideal possui fase inflamatória eficaz e rápida, capaz de remover microorganismos eficientemente e de estimular adequadamente a formação do tecido de granulação. Assim, a aplicação de um anti-inflamatório moderado poderia beneficiar a cicatrização. Estudos sugerem que em muitos processos cicatriciais a inflamação estendida ocorre porque a ferida geralmente está contaminada (GALEANO et al., 2006). O uso de uma substância com atividade antimicrobiana poderia evitar infecções, que causariam prolongamento da fase inflamatória. Dessa forma, este trabalho visa elucidar a função das propriedades de *Sapium glandulatum* durante o processo da cicatrização, visto que os dados encontrados na literatura se mostraram contraditórios.

1.3 USO DE PRODUTOS NATURAIS

O conhecimento sobre a utilização de produtos naturais para o tratamento de doenças permanece por milênios na humanidade, sendo transmitido oralmente para cada nova geração (SAMUELSSON, 2004; SILVA e CARVALHO, 2004). Uma das estratégias da indústria farmacêutica é justamente utilizar este conhecimento popular para o desenvolvimento de novos fármacos. Estima-se que 40% dos medicamentos da terapêutica atual foram originados de fontes naturais e, destes, 25% derivaram de plantas (CALIXTO, 2003). As opções de tratamento de doenças seriam muito escassas caso substâncias ativas provenientes de plantas medicinais não tivessem sido descobertas (SIMÕES et al., 1999). Durante séculos, os produtos naturais têm se revelado uma importante fonte de fármacos, como foi demonstrado

no isolamento de substâncias como a cocaína, a codeína, a digitoxina e a quinina (BUTLER, 2004; NEWMAN et al., 2000). A diversidade molecular encontrada na natureza é o principal motivo do interesse da indústria farmacêutica em direcionar seus estudos na busca de substâncias com atividade em alvos biológicos (TURNER, 1998). Dessa forma, a biodiversidade do reino vegetal representa uma importante oportunidade para o desenvolvimento de novas terapias, especialmente se for considerado que somente 8% a 12% das 250.000 espécies conhecidas foram investigadas sob o ponto de vista químico (HOSTETTMANN, 1991; WILLIAMSON et al., 1996). As substâncias biologicamente ativas presentes nas plantas são conhecidas como metabólitos secundários e são sintetizadas a partir dos metabólitos primários (carboidratos, proteínas e lipídios, por exemplo), os quais são essenciais para as funções vitais da planta (POSER e MENTZ, 2004). Se utilizados como fitofármacos, os metabólitos secundários das plantas podem atuar em diversos sistemas do organismo animal, além de auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos nos processos fisiológicos ou fisiopatológicos (CALIXTO et al., 1998).

A Organização Mundial de Saúde afirma que cerca de 65% a 80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento utiliza plantas medicinais como tratamento primário de diversas doenças. Isso ocorre principalmente devido à dificuldade de acesso aos medicamentos modernos e à falta de recursos financeiros de grande parte da população (CALIXTO, 2000). Outro aspecto a ser considerado em relação ao uso de plantas medicinais é o crescente interesse mundial no uso de fitofármacos como medicamentos complementares ou alternativos na prevenção ou alívio de muitas doenças (CALIXTO et al., 1998).

A maioria das plantas medicinais ainda não foram submetidas a estudos que comprovem a sua qualidade, eficácia e segurança, apesar de o número de pesquisas para validar a sua utilização pela medicina popular aumentar expressivamente (SIMÕES et al., 2000). Este tipo de pesquisa faz-se necessária e deve ser incentivada. A comprovação da qualidade, eficácia e segurança de um produto natural deve ser realizada de acordo com os parâmetros científicos modernos e normas éticas definidas internacionalmente.

1.4 *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax

Planta pertencente à família Euphorbiaceae, composta por cerca de 300 outros gêneros e aproximadamente 6000 outras espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais. No Brasil, ocorrem cerca de 70 gêneros e 1000 espécies (LORENZI, 1992). Conhecida popularmente como pau-de-leite, mata-ôlho, pela-cavalo ou toropi, *S. glandulatum* (Vell.) Pax é uma árvore decídua, característica da floresta ombrófila mista do planalto do sul do Brasil, com ocorrência desde o Rio Grande do Sul até o sul de Minas Gerais (LORENZI, 1992). *S. glandulatum* (Vell.) Pax é encontrada com frequência em sub-bosques de pinheirais devastados e em capões e capoeirões de zonas de altitudes. (LORENZI, 1992). Devido ao seu caráter pioneiro, propicia uma cobertura inicial do solo e facilita a entrada de outras espécies, sendo assim potencialmente recomendada para a recuperação de áreas degradadas (SANCHOTENE, 1985; LORENZI, 1992).

Esta árvore apresenta altura de 5-20 m; copa globosa e caducifólia, com folhas dispostas geralmente na ponta dos ramos; tronco cilíndrico, nodoso e reto com diâmetro de 30-50 cm, coloração amarelo-acinzentada e textura curto-fibrosa; folhas simples, alternas, glabras, membranáceas, com ápice acuminado e base atenuada, contendo duas glândulas alongadas no ápice do pecíolo; sementes escuras, lustrosas e enrijecidas, com aproximadamente 5 mm de comprimento; frutos no formato de cápsulas globosas, deiscentes, de coloração avermelhada; e flores do tipo inflorescência espiga, terminais, amarelas e unissexuadas (SANCHOTENE, 1985; LORENZI, 1992). A floração ocorre de outubro a janeiro, e de janeiro a março os frutos amadurecem. (LORENZI, 1992).

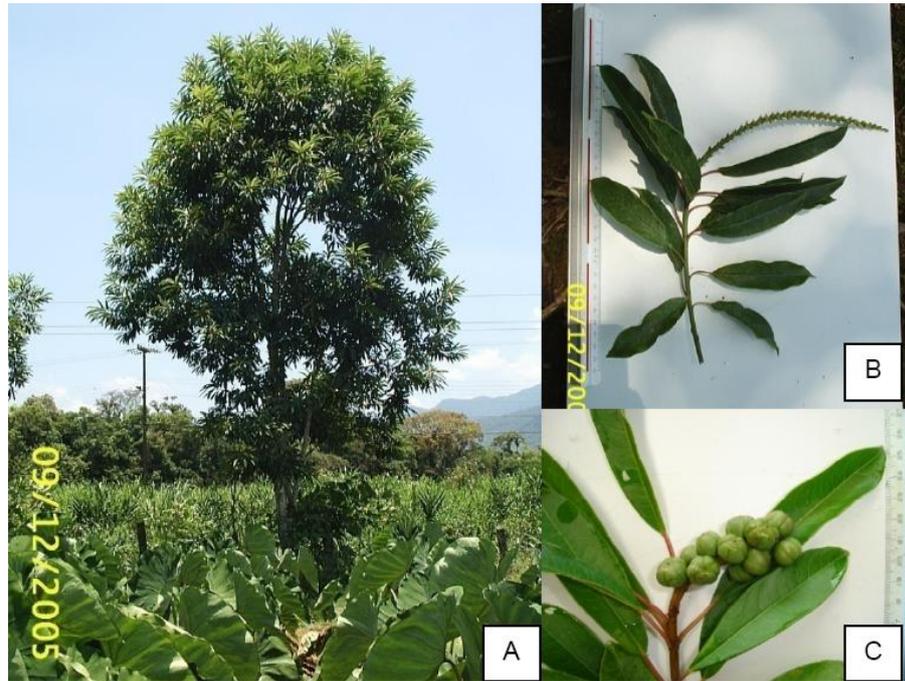


Figura 2. *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax. Árvore localizada no município de Morretes – Paraná. Planta adulta (A); Inflorescência (B); Frutos imaturos (C). (Fonte: FERREIRA, 2005).

S. glandulatum (Vell.) Pax contém em abundância um látex branco altamente cáustico quando em contato com os olhos (LORENZI, 1992). Estudos revelam tanto *S. glandulatum* como outras espécies do gênero, como *Sapium sebiferum* (L.) Roxb. e *Sapium indicum* Willd., apresentam propriedades tóxicas que causam irritação na pele (VALLE e KAPLAN, 1999; SEIPH et al., 1983; EDWARDS et al., 1983). Nas sementes de *S. sebiferum* (L.) Roxb. foram isolados ésteres que se mostraram estimulantes da proteína kinase C, sendo assim pró-inflamatórios e oncogênicos (BROOKS et al., 1987).

Outros estudos identificam que determinadas plantas do gênero possuem propriedades anti-inflamatórias. A partir de *Sapium baccatum* Roxb. se obtém o alcalóide “bukittingine”, altamente eficaz como anti-inflamatório, analgésico e anti-pirético, possuindo efeito comparável ao ácido acetilsalicílico. (PANTHONG et al., 1998). Da mesma forma, em *Sapium insigne* (Royle) Benth. foi isolado um composto derivado do forbol com atividade anti-inflamatória. *Sapium insigne* (Royle) Benth. também é responsável por produzir um látex azedo, utilizado como cicatrizante (TAYLOR, 2007). Existem até mesmo relatos da atividade analgésica e anti-

inflamatória de extratos aquosos das folhas de *Sapium glandulatum* (VALLE e KAPLAN, 1999).

Algumas plantas do gênero *Sapium* apresentam atividade antibiótica. Ésteres isolados dos frutos de *Sapium indicum* Willd. exibiram ação antimicobacteriana, mesmo quando aplicados em baixas concentrações (CHUMKAEW et al., 2003). Outros exemplares do gênero possuem componentes que são considerados vasodilatadores, como é o caso de *Sapium sebiferum* (L.) Roxb. (HSU et al., 1994), ou antioxidantes, no caso de *Sapium ellipticum* (Hochst.) Pax (ADESEGUN et al., 2008).

Portanto, na literatura disponível, podem-se encontrar tanto dados que corroborem com o potencial cicatrizante de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax, como as informações sobre as atividades anti-inflamatórias, antibióticas e/ou cicatrizantes das plantas do gênero; quanto dados que discordem deste potencial, como os estudos que revelam propriedades irritativas e/ou pró-inflamatórias de espécies do gênero ou mesmo propriedades anti-inflamatórias ou antibióticas exacerbadas. Dessa forma, este trabalho procura elucidar a possível influência que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax apresentaria durante o processo de cicatrização.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax aplicado topicamente em modelos de lesão da pele em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o tempo de fechamento das feridas tratadas com o extrato hidroalcoólico de *Sapium glandulatum* em modelo de excisão em camundongos.
- Avaliar a elasticidade de feridas tratadas com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Sapium glandulatum* em modelo de incisão em camundongos.
- Avaliar a intensidade da infiltração leucocitária (parâmetro inflamatório) nas feridas tratadas com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Sapium glandulatum* através de análise histológica de amostras da região da lesão em diferentes etapas do processo, obtidas nos modelos de excisão.
- Avaliar a quantidade de hidroxiprolina, molécula indicativa da presença de colágeno, na região das feridas tratadas com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Sapium glandulatum*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

As folhas de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax foram coletadas, identificadas e fornecidas pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Kátia Christina Zuffellato-Ribas do Departamento de Botânica da UFPR.

3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO

O extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax foi produzido pelo Mestre Daniel A. G. Bueno Mendes, no Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmacologia da UFPR. As folhas secas da planta foram maceradas em etanol 50% durante 7 dias, sendo que neste período foram feitas três trocas do etanol. Todo o extrato obtido foi concentrado em um rotaevaporador para a eliminação do solvente, e posteriormente submetido à liofilização.

3.3 ANIMAIS E MANUTENÇÃO

Camundongos Swiss fêmeas (20-30g) foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água e ração. Antes do início de cada experimento os animais permaneceram no laboratório por no mínimo 12 horas para adaptação. Nenhum animal foi reutilizado em testes posteriores e todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios (CEEA, 2003). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR sob o número 154.

3.4 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE ÓLEO DE CRÓTON

O óleo de cróton (*Croton tiglium* L.) apresenta ésteres de forbol que atuam como potentes agentes flogísticos e promotores de tumor, sendo capazes de promover uma resposta inflamatória e hiperproliferativa intensa, semelhante ao que ocorre em algumas doenças cutâneas (GÁBOR, 2003).

Para avaliar a atividade da *Sapium glandulatum* neste modelo, o edema foi induzido pela aplicação tópica de 0,4 mg/orelha de óleo de cróton, dissolvido em 20 µL de acetona. Os tratamentos com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Sapium glandulatum* (3%, dissolvida em permulen), com o permulen e com a dexametasona, controle positivo (0,1 mg/orelha, dissolvida em 20 µL de acetona), foram aplicados topicamente logo após o uso do óleo de cróton. A espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrômetro digital (GREAT MT – 045B) antes e 6 horas após a indução do processo inflamatório pelo óleo de cróton. A medição foi realizada todas as vezes na extremidade medial da orelha direita. O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura da orelha (em µm) de acordo com a metodologia revisada por Hecker e Schmidt (1974).

3.5 LESÃO POR EXCISÃO

Para início do experimento, foi realizada a tricotomia da região do dorso dos animais. Depois de 24 horas, uma ferida circular foi gerada nos animais anestesiados com xilazina e quetamina (intraperitoneal), removendo-se toda a camada cutânea do local com a utilização de um “punch” de 6 mm. Durante 14 dias, a cada 12 horas, os animais foram tratados topicamente com o veículo permulen ou com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Sapium glandulatum* (3%, dissolvido em permulen). Diariamente os halos das feridas foram fotografados a distância constante e tiveram a sua área mensurada no programa ImageTool 3.0. Os resultados foram expressos em porcentagem de área remanescente após comparação à área lesionada na cirurgia.



Figura 3. Lesão por excisão. Dorso de um animal submetido à excisão, dois dias após a cirurgia.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE HIDROXIPROLINA

No modelo de excisão, após a utilização dos diferentes tratamentos durante 14 dias (duas vezes/dia; aplicação tópica do veículo ou do extrato hidroalcoólico de *Sapium glandulatum*), os animais foram eutanasiados e amostras das cicatrizes foram retiradas, homogeneizadas em salina e congeladas à temperatura -70°C . Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e 0,006 g de cada amostra foi retirado para a dissolução em 300 μL de água destilada e 75 μL de NaOH na concentração 10 mol/L. A solução foi então submetida à temperatura 120°C por 20 min. Passado este tempo, foi retirado 50 μL da solução e adicionado 450 μL de reagente oxidante de cloramina T. Após 20 min foi acrescentado 500 μL de reagente de Erlich e a solução ficou incubada à 65°C por mais 20 min. A leitura da concentração de hidroxiprolina na amostra foi feita em um leitor de placas à 560 nm. O valor de absorbância encontrado para cada amostra foi convertido de nm para μg de hyp/ml de solução e posteriormente para μg de hyp/mg de tecido (REDDY e ENWEMEKA, 1996). O cálculo foi feito por regressão linear com base em uma curva padrão realizada no mesmo dia do ensaio das amostras.

3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Durante a realização do experimento de excisão, no 2º e no 5º dia após a cirurgia, foram sacrificados alguns animais de cada grupo e amostras da região da lesão foram coletadas. Estas amostras foram fixadas em solução ALFAC por 16 horas, sendo em seguida conservadas em álcool 70%. Posteriormente, as amostras foram submetidas a um processo de desidratação e blocadas em parafina. Utilizando-se um micrótomo, foram feitos cortes de 5 µm, dispostos em lâminas, e então submetidos a uma bateria de re-hidratação, corados com hematoxilina e eosina. Após passarem por uma bateria de montagem, estes cortes tiveram lâminulas posicionadas sobre eles, finalizando o processo de montagem das lâminas. A análise das lâminas foi feita em microscópio ótico. A infiltração de leucócitos na derme lesionada foi avaliada pela quantificação dessas células em três campos de mesmo tamanho em cada uma das três áreas representativas analisadas por lâmina, com aumento de 400x. O programa Image J foi utilizado para a contagem do número de células presentes no tecido.

3.8 LESÃO POR INCISÃO

Com o intuito de se avaliar diretamente o efeito do extrato da *Sapium glandulatum* sobre a elasticidade da cicatriz formada e indiretamente a quantidade, qualidade e forma de distribuição das fibras colágenas após a cicatrização do local lesionado, foi realizado este experimento.

Passadas 24 horas da tricotomia, aproximadamente 0,5 cm à direita da coluna vertebral dos animais anestesiados, foi realizada uma incisão de 3 cm de comprimento com o auxílio de um bisturi, sendo que o corte atingiu toda a espessura da camada cutânea. Para aproximar igualmente as extremidades direita e esquerda das feridas, foram feitas suturas a cada 1 cm de comprimento da incisão, totalizando duas suturas por animal. A cada 12 horas, durante 10 dias, os animais foram tratados topicamente com o veículo permulen ou com o extrato de *Sapium glandulatum* (3%, dissolvido em permulen). No 6º dia, as suturas que ainda permaneciam na pele foram retiradas. No 10º dia, os animais foram sacrificados com

éter e as amostras das cicatrizes foram retiradas e posicionadas em fixadores de um aparelho contendo um dinamômetro com a finalidade de medir a elasticidade das cicatrizes. A medição neste dia foi embasada em outros estudos, os quais sugeriram o 10º dia como um bom período para a detecção do aumento da elasticidade da cicatriz (PEREZ et al., 2005). A espessura da pele no local cicatrizado (em μm) foi mensurada com o auxílio de um micrômetro digital (GREAT MT – 045B) e a força máxima na qual houve o rompimento da cicatriz (em N) foi anotada. A elasticidade da amostra foi considerada como o resultado do cálculo: força máxima de rompimento/(espessura da pele x extensão da incisão).



Figura 4. Aparelho para medição da elasticidade da cicatriz. Cicatriz posicionada no aparelho, presa por fixadores a uma parte fixa e outra móvel, acoplada a um dinamômetro responsável por fornecer o valor da força máxima utilizada para o rompimento da cicatriz com o arrastar da parte móvel do aparelho.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados obtidos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação Newman Keuls. Valores P menores do que 0,05 foram considerados significativos. O software estatístico GraphPad Prism 3.0 (San Diego, CA, EUA) foi utilizado para a produção dos gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE ÓLEO DE CRÓTON

Para avaliar se a formulação de 3% de extrato hidroalcolico de *Sapium glandulatum* em permulên teria atividade farmacológica foi realizado o ensaio de edema de orelha induzido por óleo de cróton. Conforme demonstrado na figura 5, a aplicação tópica de óleo de cróton na orelha dos animais induziu um aumento efetivo da espessura da orelha após a sexta hora da aplicação deste agente flogístico. Esse aumento foi significativamente revertido pela aplicação tópica de *Sapium glandulatum* (3%, dissolvido em permulên). A inibição do edema causada pelo produto com *Sapium grandulatum* foi de 50,6%. O controle positivo utilizado, dexametasona (0,1 mg/orelha), também reduziu o edema causado pelo óleo de cróton em 60,4%. Ainda, a aplicação tópica do veículo permulên não promoveu a redução do edema causado pelo agente flogístico

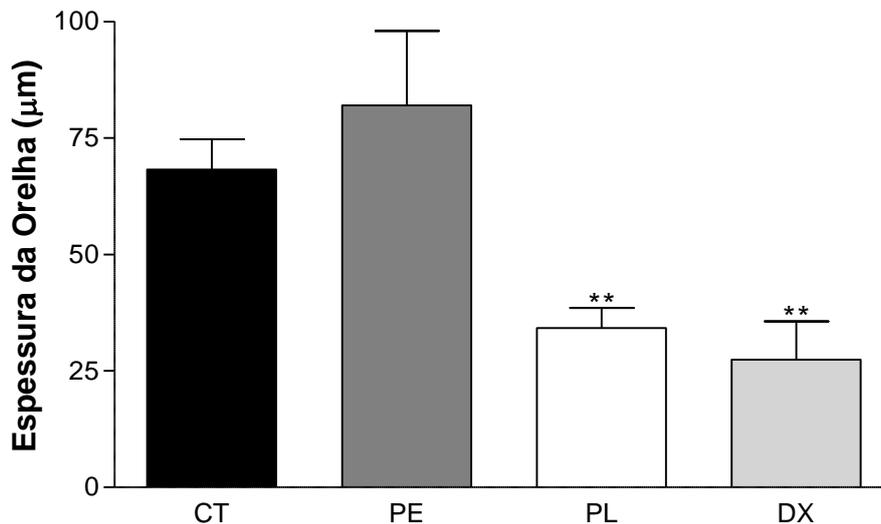


Figura 5. Edema de orelha Induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton. Os animais foram tratados com óleo de cróton (CT, 0,4 mg/orelha, dissolvido em acetona, tópico) e logo em seguida com o veículo permulên (PE, tópico), *S. glandulatum* (PL, 3%, dissolvida em permulên, tópico) ou dexametasona (DX, 0,1 mg/orelha, dissolvida em acetona, tópico). Após 6 horas, a espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrômetro. As barras representam a média \pm E.P.M. (n=5) do aumento da espessura da orelha em micrômetros (μm). ** P<0,01 representa o nível de significância em relação ao controle (CT).

	Espessura basal da orelha (μm)	Espessura da orelha após 6 h da aplicação do O.C. (μm)	Edema formado
Controle	0,266 \pm 0,007	0,335 \pm 0,013	69,2 \pm 6,49
Permulen	0,288 \pm 0,006	0,370 \pm 0,015	82,0 \pm 15,98
<i>S.glandulatum</i>	0,267 \pm 0,006	0,301 \pm 0,004	34,2 \pm 4,31**
Dexametasona	0,266 \pm 0,006	0,293 \pm 0,010	27,4 \pm 8,20**

Tabela 1. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton. Os animais foram tratados com óleo de cróton (CT, 0,4 mg/orelha, dissolvido em acetona, tópico) e logo em seguida com o veículo permulen (PE, tópico), *S. glandulatum* (PL, 3%, dissolvida em permulen, tópico) ou dexametasona (DX, 0,1 mg/orelha, dissolvida em acetona, tópico). Após 6 horas, a espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrômetro. Os valores representam a média \pm E.P.M. (n=5) da espessura da orelha em micrômetros (μm). ** P<0,01 representa o nível de significância em relação ao controle (CT).

4.2 LESÃO POR EXCISÃO

Os resultados apresentados na figura 6 mostram que as feridas fecharam por completo nos dias 13 e 14. O tratamento com *Sapium glandulatum* em permulen não causou alteração no processo de contração da ferida e nem no fechamento final quando comparado com o grupo veículo. É importante ressaltar que os grupos veículo e controle, sem tratamento, também não apresentaram nenhuma diferença estatística. Logo, a porcentagem de fechamento das feridas destes três grupos foi semelhante, culminando no fechamento total das mesmas simultaneamente.

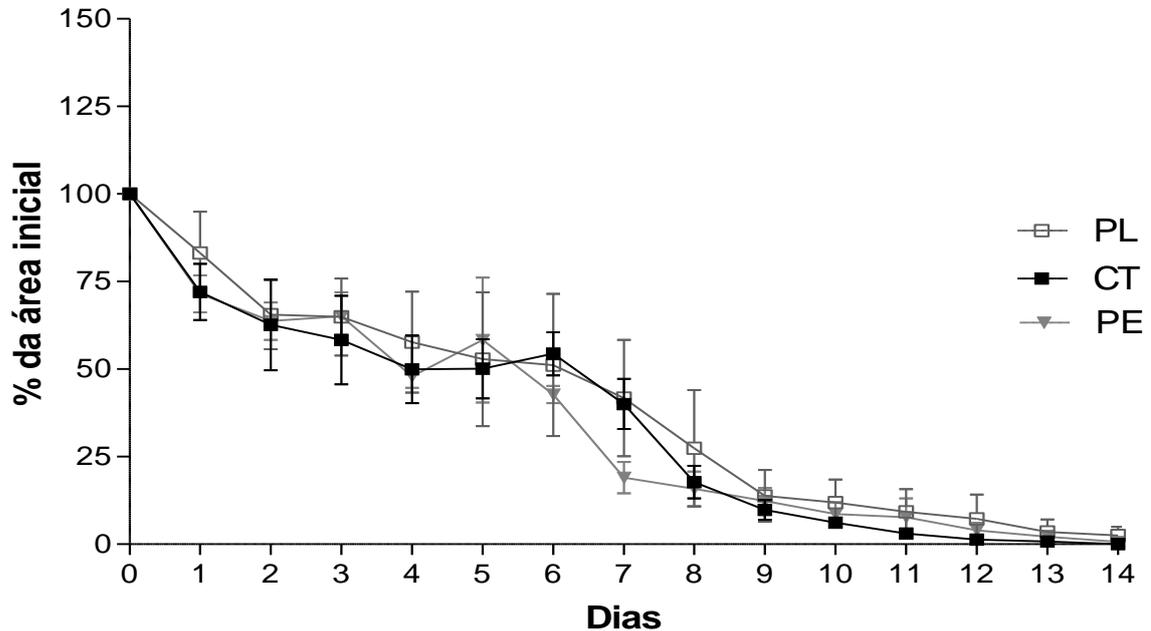


Figura 6. Lesão por excisão. Efeito da *S. glandulatum* (PL, 3%, dissolvida em permulên, tópico) e do veículo permulên (PE, tópico) administrados a cada 12 horas durante 14 dias no modelo de excisão no dorso de camundongos para avaliação do fechamento das lesões. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=3) da % da área da ferida se comparada a sua área inicial, no dia da lesão.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14	Dia 15
Controle	100 \pm 0,0	72,0 \pm 8,0	62,6 \pm 12,9	58,3 \pm 12,6	50,0 \pm 8,4	54,4 \pm 6,2	40,0 \pm 7,7	17,7 \pm 4,6	9,8 \pm 2,8	6,2 \pm 1,4	3,0 \pm 0,6	1,3 \pm 0,3	0,8 \pm 0,2	0 \pm 0,0	0 \pm 0,0
Permulên	100 \pm 0,0	83,1 \pm 11,8	65,5 \pm 9,8	64,9 \pm 10,9	57,7 \pm 14,4	52,8 \pm 19,1	51,2 \pm 20,3	41,7 \pm 16,6	27,4 \pm 16,6	13,8 \pm 7,4	11,9 \pm 6,6	9,2 \pm 6,5	7,2 \pm 7,0	3,5 \pm 3,5	2,4 \pm 2,4
<i>S. glandulatum</i>	100 \pm 0,0	71,5 \pm 5,3	63,7 \pm 5,3	65,1 \pm 6,8	48,0 \pm 3,3	58,3 \pm 17,8	42,8 \pm 2,5	19,0 \pm 4,5	15,8 \pm 4,9	12,3 \pm 3,7	8,6 \pm 3,4	7,7 \pm 5,4	4,0 \pm 2,1	2,1 \pm 1,7	0,7 \pm 0,3

Tabela 2. Lesão por excisão. Efeito da *S. glandulatum* (PL, 3%, dissolvida em permulên, tópico) e do veículo permulên (PE, tópico) administrados a cada 12 horas durante 14 dias no modelo de excisão no dorso de camundongos para avaliação do fechamento das lesões. Cada valor representa a média \pm E.P.M. (n=3) da % da área da ferida se comparada a sua área inicial, no dia da lesão.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE HIDROXIPROLINA

Este experimento foi realizado com a finalidade de investigar possíveis diferenças na concentração de hidroxiprolina, e consequentemente de colágeno, entre os grupos tratados. As amostras utilizadas para a realização deste teste foram coletadas ao final do experimento de lesão por excisão. De acordo com a figura 7, o tratamento tópico com o veículo permulên não alterou a quantidade de colágeno na

ferida quando comparado ao grupo controle (sem tratamento). Já o tratamento tópico com *Sapium glandulatum* (3%, dissolvida em permulen) resultou em redução de 42,9% na quantidade de hidroxiprolina (em comparação ao grupo veículo, permulen).

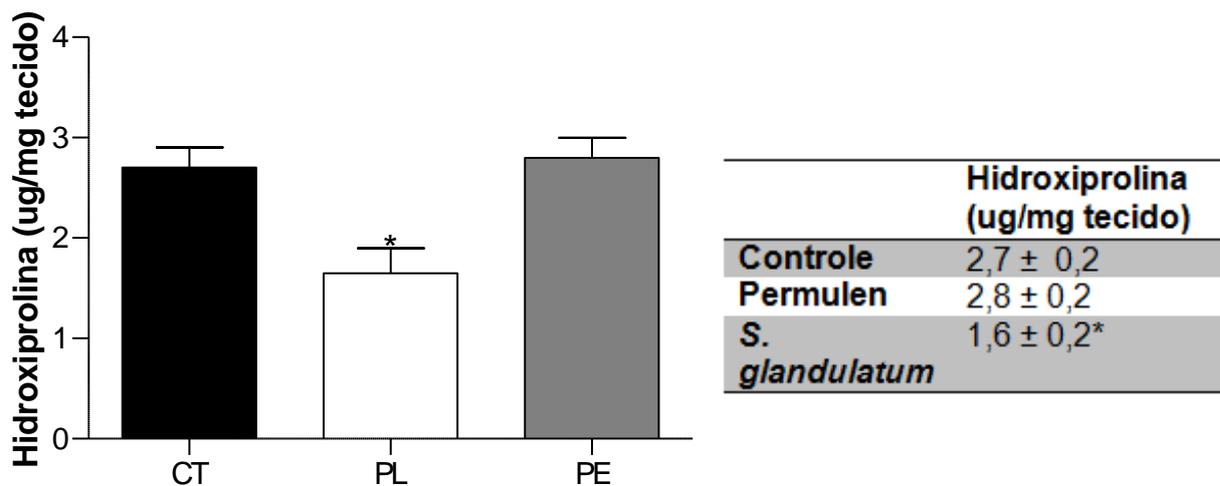


Figura 7. Quantificação de hidroxiprolina. Concentração de hidroxiprolina (em µg/mg tecido) nas amostras das cicatrizes obtidas ao final do experimento de lesão por excisão, após o tratamento com o veículo permulen (PE, tópico) ou com *S. glandulatum* (PL, 3%, dissolvida em permulen, tópico). Os valores representam a média ± E.P.M. (n=3) de cada grupo.*P<0,05 representa o nível de significância em relação ao veículo (PE).

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

O parâmetro inflamatório infiltração leucocitária foi avaliado através da análise histológica, para que se tivesse conhecimento da quantidade dessas células nas feridas dos diferentes grupos, em diferentes etapas da cicatrização, e das possíveis consequências geradas a partir disto. Neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos são as células classificadas como leucócitos. Os leucócitos participam das defesas celulares e imunocelulares do organismo, sendo atraídos por quimiotaxia para atuar no sítio inflamatório (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Durante a realização desta análise não foi feita a diferenciação entre os tipos leucocitários devido à dificuldade de visualização e reconhecimento dos núcleos celulares.

Conforme representado nas figuras 8, 9 e 10, todos os tratamentos foram comparáveis ao controle no quesito infiltração de leucócitos no 2º dia após a lesão por excisão, sendo que todos apresentaram intensa concentração de leucócitos. Já no 5º dia após a cirurgia, pôde-se notar na área lesionada tratada com *Sapium glandulatum* (3%, dissolvida em permulên, tópico) uma quantidade de células leucocitárias significativamente menor do que no restante dos grupos. Em comparação com o grupo veículo, a redução da migração leucocitária foi de 52,9%.

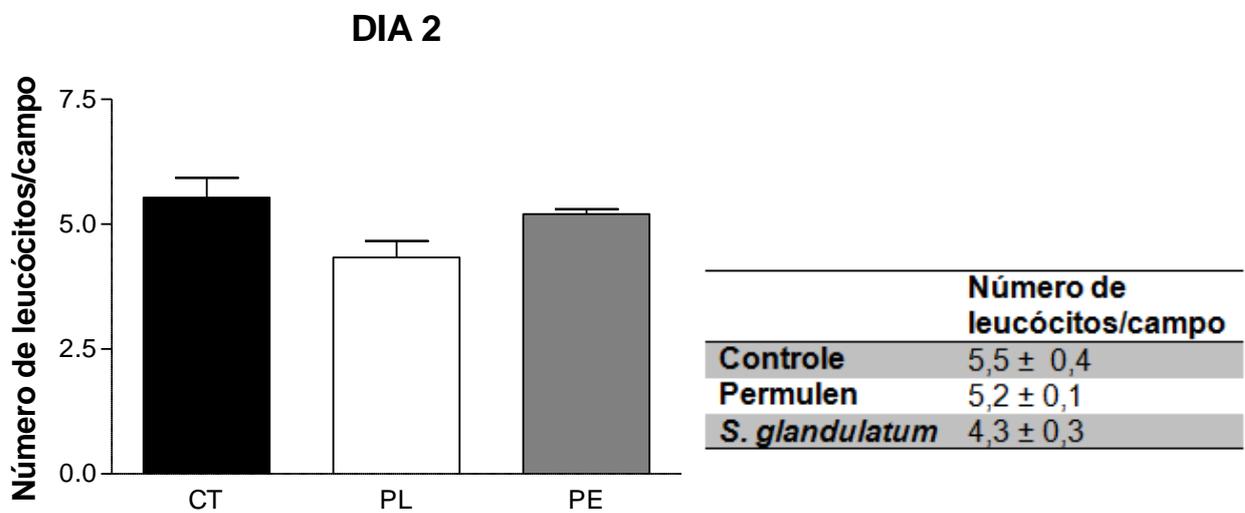


Figura 8. Quantificação de leucócitos no dia 2. Número de leucócitos presentes por campo observado em microscópio ótico (400X). Foram analisados cortes de feridas obtidas durante o experimento de lesão por excisão, no dia 2, após o tratamento com o veículo permulên (PE, tópico) ou com *S. glandulatum* (PL, 3%, dissolvida em permulên, tópico). Os valores representam a média ± E.P.M. (n=3) de cada grupo.

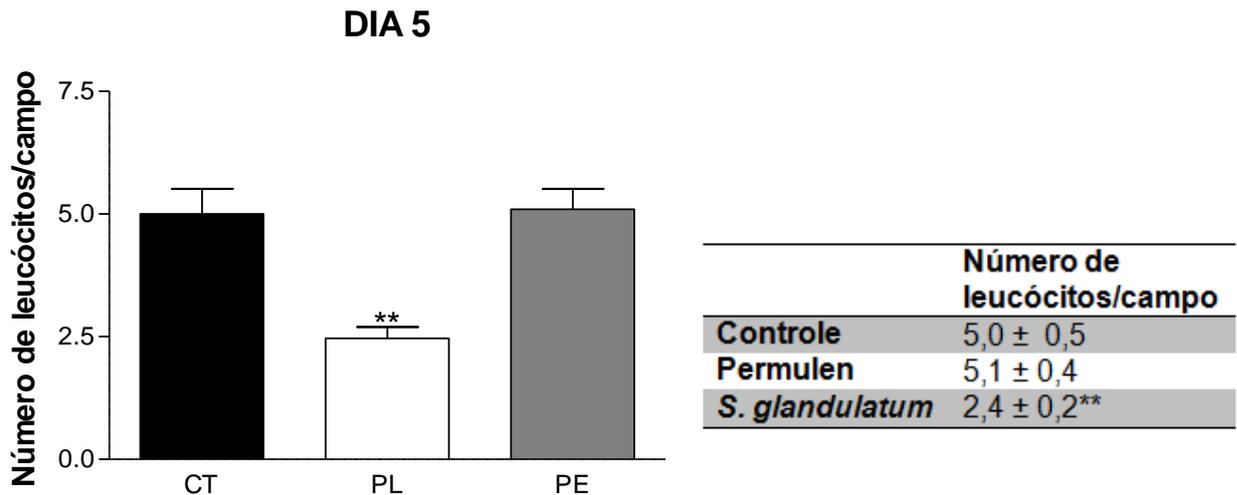


Figura 9. Quantificação de leucócitos no dia 5. Número de leucócitos presentes por campo observado em microscópio ótico (400X). Foram analisados cortes de feridas obtidas durante o experimento de lesão por excisão, no dia 5, após o tratamento com o veículo permulyen (PE, tópico) ou com *S. glandulatum* (PL, 3%, dissolvida em permulyen, tópico). Os valores representam a média ± E.P.M. (n=3) de cada grupo. **P<0,01 representa o nível de significância em relação ao veículo (PE).

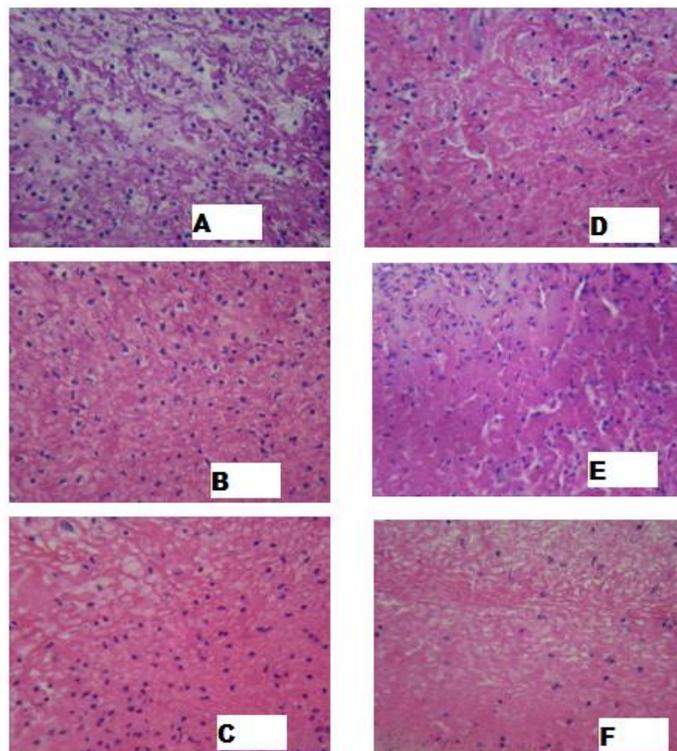


Figura 10. Análise histológica do efeito de *Sapium glandulatum* sobre o infiltrado leucocitário durante o experimento de excisão. Fotos representativas da infiltração de leucócitos na derme do sítio de cicatrização no 2º e no 5º dia após a cirurgia (coloração: HE; aumento de 400x). Controle, dia 2 (A); veículo permulyen, dia 2 (B); *Sapium glandulatum* (3% em permulyen), dia 2 (C); controle, dia 5 (D); veículo permulyen, dia 5 (E); *Sapium glandulatum* (3% em permulyen), dia 5 (F).

4.5 LESÃO POR INCISÃO

Os valores obtidos em relação aos parâmetros avaliados no modelo de lesão por incisão estão expostos na tabela 1 e na figura 11. As feridas tratadas com *Sapium glandulatum* (3%, dissolvida em permulen) apresentaram redução de 45,3% na elasticidade quando comparadas às feridas do grupo veículo. Não houve diferença significativa entre os valores encontrados para os grupos controle, sem tratamento, e veículo (permulen).

	Força máxima de rompimento (N)	Área "cross-sectional" (cm ²)	Elasticidade (N/cm ²)
Controle	7,400 ± 0,675	0,131	56,770 ± 5,478
Permulen	8,883 ± 0,497	0,136	65,226 ± 1,364
<i>S. glandulatum</i>	4,817 ± 0,188**	0,136	35,720 ± 1,999**

Tabela 3. Lesão por incisão. Efeito da *S. glandulatum* (3%, dissolvida em permulen) e do veículo permulen quando administrados topicamente a cada 12 horas durante 10 dias no modelo de incisão no dorso de camundongos para avaliação da elasticidade das cicatrizes formadas. Os valores representam a média ± E.P.M. (n=3) de cada grupo. **P<0,01 representa o nível de significância em relação ao veículo permulen.

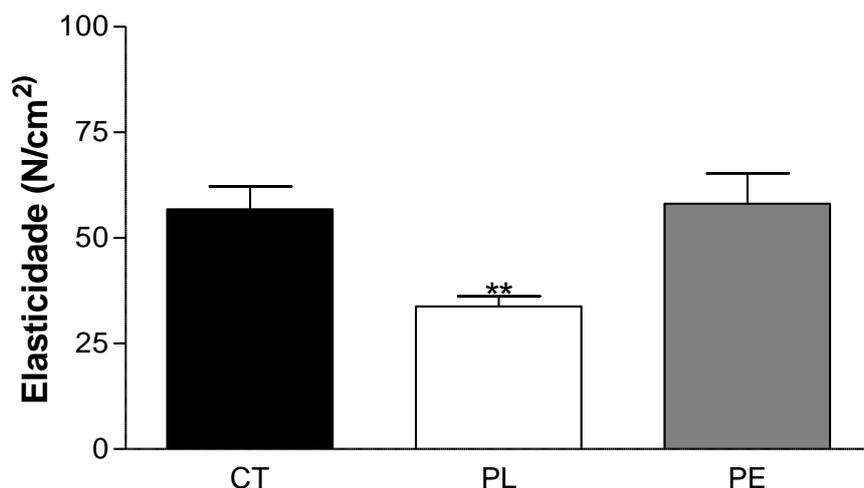


Figura 11. Lesão por incisão. Efeito da *S. glandulatum* (PL, 3%, dissolvida em permulen) e do veículo permulen (PE) quando administrados topicamente a cada 12 horas durante 10 dias no modelo de incisão no dorso de camundongos para avaliação da elasticidade (em N/cm²) das cicatrizes formadas. Os valores representam a média ± E.P.M. (n=3) de cada grupo. **P<0,01 representa o nível de significância em relação ao veículo (PE).

5 DISCUSSÃO

Estudos descrevem que enquanto algumas espécies do gênero *Sapium* apresentam propriedades pró-inflamatórias, tóxicas e irritativas (SEIPH et al., 1983; EDWARDS et al., 1983; BROOKS et al., 1987), outras possuem atividades anti-inflamatórias, analgésicas, antibióticas e cicatrizantes (PANTHONG et al., 1998; TAYLOR, 2007; CHUMKAEW et al., 2003). Apesar de haver na literatura dados que indiquem tanto a atividade irritativa como a ação anti-inflamatória de *Sapium glandulatum* (VALLE e KAPLAN, 1999), não há estudo algum a respeito da sua influência no processo de cicatrização. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico da *Sapium glandulatum* na cicatrização.

A fim de confirmar a liberação de possíveis propriedades farmacológicas pela *Sapium glandulatum* na preparação de 3% em permulên e também com a finalidade de investigar a existência de um efeito sobre a fase inflamatória no processo de cicatrização, foi testado o extrato hidroalcoólico de *Sapium glandulatum* no modelo de edema de orelha, um processo inflamatório agudo na pele. O óleo de cróton apresenta ação tópica e induz inflamação local como resultado da produção de mediadores pró-inflamatórios que promovem a vasodilatação, infiltração de células leucocitárias e extravasamento de plasma, conduzindo, assim, à instalação dos sinais clássicos da inflamação (DE BERNARDIS et al., 1994). O mecanismo específico pelo qual o óleo de cróton atua é através da ativação da proteína quinase C (PKC) e da via da proteína quinase ativadora de mitógeno (MAPK), que promove a liberação de fatores de transcrição nucleares, como o NF- κ B, responsável por regular diversas proteínas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-8, TNF- α (PASCUAL e GLASS, 2006). A PKC age também fosforilando a fosfolipase A2, o que resulta na liberação do ácido araquidônico e conseqüentemente na produção de PG e LT via COX e LOX (WANG et al., 2001; YOUNG et al., 1984). A aplicação tópica do produto com extrato hidroalcoólico de *Sapium glandulatum* (3%) foi capaz de prevenir a formação do edema por este modelo, da mesma forma que o controle positivo dexametasona. Assim, a planta possui atividade antiedematogênica, provavelmente atuando ao inibir alguma das etapas de instalação da inflamação pelo uso do óleo de cróton. Esta atividade antiedematogênica também foi observada por Soely et al. (2009), quando a aplicação de extrato de *Sapium glandulatum* dissolvido em

acetona (100%) apresentou efeito anti-inflamatório ao ser testado no modelo de edema de orelha causado pelo óleo de cróton. Neste estudo, a *Sapium glandulatum* reduziu o edema e a migração de leucócitos de modo dependente da dose. Devido à comprovação de que o extrato de *Sapium glandulatum* (3%) incorporado ao permulên mantém o seu efeito anti-inflamatório e que o permulên sozinho não interfere na formação do edema, é possível deduzir que o(s) composto(s) ativo(s) da planta está sendo liberado nesta dose e com a utilização deste veículo. Portanto estes foram a dose e o veículo escolhidos para a realização dos demais experimentos.

O passo seguinte foi avaliar o efeito da *Sapium glandulatum* na cicatrização. A cicatrização de lesões de pele se inicia imediatamente após a formação da ferida e consiste de três fases: inflamação, proliferação e remodelamento. Estas fases são caracterizadas por complicadas, porém organizadas interações entre tecidos, moléculas e células, que levam à reconstrução do tecido lesionado (MARTIN, 1997). Para tanto, foi verificado o efeito da planta no modelo de lesão por excisão. Feridas causadas por “punch”, que acometem toda a camada cutânea, são um modelo útil para avaliar a taxa de re-epitelização durante um processo de cicatrização auxiliado por um tratamento tópico (KIM et al., 2008). A comparação entre o grupo controle, veículo e o grupo tratado com *Sapium glandulatum* não evidenciou efeito significativo da planta na alteração do tamanho das áreas das feridas durante o processo de cicatrização. Portanto, supõe-se que a planta não interfira no tempo necessário para o fechamento de feridas.

A cicatrização resulta na formação de uma cicatriz fibrosa, da qual o colágeno é o constituinte predominante e também o responsável por conferir elasticidade à matriz extracelular do tecido (SARINGAT e SHEIK, 1999). Segundo os dados obtidos neste trabalho, a utilização tópica de *Sapium glandulatum* (extrato hidroalcoólico, 3%) como tratamento cicatrizante pode interferir no processo de cura da ferida, diminuindo a elasticidade das cicatrizes tratadas com o seu extrato, se comparadas às tratadas com o veículo ou às não tratadas. Durante a fase proliferativa da cicatrização, a síntese de colágeno e outras proteínas aumenta, para substituir o tecido necrosado (KONDO, 2006). A síntese de colágeno ocorre no interior dos fibroblastos, passando pelas mesmas etapas de formação que qualquer outra proteína passaria. A molécula gerada é caracterizada pela repetição da

sequencia glicina-X-Y, sendo X, frequentemente, prolina e Y, hidroxiprolina (BROUGHTON et al., 2006). Após a formação das moléculas de colágeno, elas são secretadas pelas células para o local lesionado, se tornando organizadas e interligadas ao se unirem em fibras. A elasticidade é adquirida com o remodelamento do colágeno, feito por proteínas responsáveis por criar a ligação inter- e intra-molecular (CHITHRA et al., 1998). Portanto, a *Sapium glandulatum* poderia estar agindo em alguma etapa deste processo, direta ou indiretamente, originando como produto final do reparo tecidual uma cicatriz menos elástica do que normalmente seria originada.

Por ser constituinte da molécula colágena, a presença de hidroxiprolina é considerada um indicativo da presença de colágeno. Os níveis de hidroxiprolina no tecido em formação indicam a intensidade da síntese de colágeno no local. O colágeno confere elasticidade e integridade à matriz extra celular, sendo um importante componente da mesma, essencial para o desenrolar da cicatrização. Os resultados obtidos indicam uma reduzida síntese de hidroxiprolina, e consequentemente de colágeno, nas feridas submetidas ao tratamento tópico com *Sapium glandulatum*. Assim, pode-se sugerir que a diminuição na elasticidade de cicatriz, causada pelo uso de *Sapium glandulatum*, poderia estar ocorrendo, pelo menos em parte, devido a uma redução na síntese de colágeno no local lesionado.

Os leucócitos são classificados como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos ou monócitos. Essas células participam das defesas celulares e imunocelulares do organismo, sendo atraídos por quimiotaxia para atuar no sítio inflamatório, instalado na primeira fase da cicatrização (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Dentre os leucócitos, as primeiras células a chegar ao local da lesão são os neutrófilos, que apresentam um pico de presença em 24 horas da formação da ferida, e têm a responsabilidade de secretar proteases e fagocitar organismos estranhos e tecido não viável, para depois sofrerem apoptose (BROUGHTON et al., 2006). Os macrófagos migram para a ferida entre 48 a 96 horas após a lesão, fagocitam patógenos e neutrófilos, e liberam citocinas e fatores de crescimento, essenciais para o recrutamento de outras células, como linfócitos e células endoteliais, para a migração e proliferação de fibroblastos e para a síntese de colágeno. Dessa forma, os macrófagos influenciam a angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular (BROUGHTON et al., 2006). A análise da quantidade

de leucócitos nas feridas no 2º dia, não verificou diferença significativa entre o influxo dessas células nos diferentes grupos. Já a administração tópica de *Sapium glandulatum* foi responsável por uma redução do fluxo de leucócitos para o tecido lesionado no 5º dia após a cirurgia. Sugere-se, a partir deste fato, que a infiltração inicial de neutrófilos não foi prejudicada pelo tratamento com a planta, visto que estas são as células características do tecido lesionado no 2º dia após a formação da ferida. Agora, no 5º dia, a ferida deveria estar infiltrada por macrófagos. Por ter sido notada uma redução no número de leucócitos justamente neste período, pode ser que a planta seja responsável por diminuir o número de macrófagos no local lesionado. Esta redução na quantidade de macrófagos acarretaria sérias consequências para a fase de fibroplasia, pois com a liberação deficiente de citocinas e fatores de crescimento, haveria um baixo recrutamento de fibroblastos e uma síntese prejudicada de colágeno na matriz extra celular (IRION, 2005). O menor número de leucócitos no grupo tratado pela *Sapium glandulatum* no 5º dia após a lesão pode ser devido à uma possível redução na liberação tardia de citocinas e quimiocinas responsáveis pela migração de leucócitos para o local da lesão.

As cicatrizes resultantes do processo cicatricial normalmente já representam um fator de preocupação, porém quando resultam em uma formação patológica, essa preocupação adquire uma dimensão maior, pelo aspecto estético, sintomático e eventuais limitações funcionais que poderiam ser ocasionadas (PEREIRA, 2003). As cicatrizes hipertróficas e os quelóides são resultantes de um processo cicatricial alterado, no qual há ocorrência de fibrose, ou seja, uma acumulação excessiva de colágeno na matriz extracelular (CHAPMAN, 2004). Esse acúmulo de colágeno é induzido principalmente pela expressão aumentada de TGF- β (BABU et al., 1992). As cicatrizes originadas têm aspecto elevado e coloração rósea ou violácea, sendo que os quelóides, diferentemente das cicatrizes hipertróficas, apresentam ainda prurido, dor e ardor (sinais clássicos da inflamação) (PEREIRA, 2003). Deve-se sempre buscar como resultado uma cicatriz fisiológica, atuando preventivamente e tratando os casos patológicos. Baseando-se no caso do fitoterápico Cepalin (Extractum cepae) e do Contractubex®, utilizado na terapia de cicatrizes patológicas, pode-se dizer que um dos possíveis tratamentos para os casos de cicatrizes hipertróficas e quelóides a ser considerado seria a utilização de uma substância, ou de um conjunto de substâncias, como o que atuasse como anti-proliferativa, anti-

inflamatória, antiedematogênica e antimicrobiana; que inibisse a quimiotaxia para fibroblastos cutâneos e que reduzisse os componentes matriciais extra-celulares (proteoglicanos e colágeno) (PEREIRA, 2003). Dessa forma, a *S. glandulatum*, ao apresentar neste trabalho resultados que sugerem propriedades anti-inflamatórias, reduzindo o edema causado pela inflamação e a infiltração de leucócitos, e também diminuir a quantidade de colágeno na matriz extra celular, tem potencial para ser uma alternativa no tratamento da hipertrofia cicatricial, agindo como componente único ou mesmo em conjunto com outras substâncias. Para que se confirme este potencial, uma série de outros experimentos precisam ser realizados, como testes de toxicidade da planta, quantificação de TGF- β e PDGF e análise da organização das fibras colágenas e da quantidade de fibroblastos no local lesionado.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que o uso tópico do extrato hidroalcoólico das folhas de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax (3%) apresenta efeito significativo sobre a cicatrização de lesões de pele, sendo capaz de reduzir a quantidade de colágeno e a elasticidade das cicatrizes formadas. Além disso, esta planta pode atuar inibindo a migração leucocitária e também a formação do edema, exibindo, portanto um possível efeito anti-inflamatório.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESEGUN, S. A.; FLECHI, N. A. Antioxidant activities of methanolic extract of *Sapium ellipticum*. **Pak J Biol Sci**, v. 11, p. 453-457, 2008.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Ed. Artmed. 4^a ed. Porto Alegre.

BABU, M.; DIEGELMANN, R.; OLIVER, N. Keloid fibroblasts inhibit an altered response to TGF-beta. **J Invest Dermatol**, v.99, p.650-655, 1992.

BEVILACQUA, M.; POBER, J.; WHEELER, M, et al. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. **J Clin Invest**, v. 76, p. 2003, 1985.

BROOKS, G.; MORRICE, N. A. Toxic phorbol esters from chinese tallow stimulate prontein kinase. **C. J. Toxicon**, v. 25, p. 1229-1233, 1987.

BROUGHTON, G.; JANES, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plast Reconstr Surg**, v. 117, p. 1e-S-32e-S, 2006.

BUTLER, M. S.; The role of natural product chemistry in drug discovery. **J. Nat. Product**, v. 67 (12), p. 2141-2153, 2004.

CALIXTO, J. B. Twenty five years of research on medicinal plants in latin america. A personal view. **J Ethnopharmacol**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CHAPMAN, H. A. Disorders of lung matrix remodeling. **J Clin Invest**, v. 113, p. 148-157, 2004.

CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G. B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of Aloe vera on the healing of dermal wounds in diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v. 59, p. 195-201, 1998.

CHUMKAEW, P.; KARALAI C.; PONGLIMANONT C.; CHANTRAPROMMA K. Antimycobacterial activity of phorbol esters from the fruits os *fapium indicum*. **J Nat Prod**, v. 66, p. 540-543, 2003.

DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A., et al. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. **Agents Actions**, v. 42 (1-2), p. 29-33, 1994.

DOILLON, C.J.; DUNN, M.G.; BENDER, E. Collagen fiber formation in repair tissue. Development of strength and toughness. **Collagen Rel. Res**, v. 5, p. 481, 1985.

EDWARDS, M. C.; TAYLOR, S.E. New phorbol and deoxyphorbol esters: isolation and relative potencies in inducing platelet aggregation and erythema of skin. **Acta Pharmacol Toxicol (Conpenh)**, v. 53, p. 177-187, 1983.

ERLICH, H.; KRUMMEL, T. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. **Wound Repair Regen**, v. 4, p. 203, 1996.

FERREIRA, B. G. A. **Propagação de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax por estaquia, miniestaquia e sementes.** Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/14538/1/Disserta%20B%20G.%20A.%20Ferreira.pdf>. Acesso em: 30 de novembro de 2009.

GÁBOR, M. **Models of acute inflammation in the ear.** Humana Press, New Jersey, 2003.

GALEANO, M.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A.; MINUTOLI, L.; et al. Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. **Crit Care Med**, v. 4, p. 1139-1146, 2006.

GUTIERREZ-FERNANDEZ, A.; INADA, M., et al. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8), **J FASEB**, v. 21, pg 2580-2589, 2007.

HSU, F. L.; LEE, Y. X.; CHENG, J. T. Antihypertensive activity of 6-O-galloyl-D-glucose, a phenolic glycoside from *Sapium sebiferum*. **J. Nat Prod**, v. 57, p. 308-312, 1994.

IRION, G. **Feridas: Novas Abordagens, Manejo Clínico e Atlas em Cores.** Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

KIM, W. J. H., LEVINSON, H., GITTES, G. K., et al. **Molecular mechanisms in keloid biology.** Dekker, New York, 2000.

KONDO, T. Timing of skin wounds. **Legal Med**, v. xxx, p. xxx-xxx, 2007.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil.** Ed. Plantarum, Nova Odessa, 1992.

MACKAY D.; MILLER A. L. Nutritional support for wound healing. **Altern Med Rev**, v. 8, p. 359-77, 2003.

MARTIN, P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, p. 75-81, 1997.

MOULIN, V. Growth Factors in skin wound healing. **Eur J Cell Biol.** v. 68, p. 1-7, 1995.

NEWMANN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat Product Reports**, v. 17(3), p. 215-234, 2000.

PANTHONG, A.; KANJANAPOTHI, D. Anti-inflammatory activity of the alkaloid bukittinggine from *Sapium baccatum*. **J. Planta Med**, v. 64, p. 530-535, 1998.

PASCUAL, G.; GLASS, C. K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, p. 321-328, 2006.

PEREIRA, J. R. C. Tratamento de cicatrizes patológicas com a associação de cefalin, heparina e alantoína, **RBM**, v. 60, p. 603-608, 2003.

PEREZ, R. M.; VARGAS, R.; ORTIZ, Y.D. Wound healing properties of *Hylocereus undatus* on diabetic rats. **Phytother Res**, v. 19, p. 665-668, 2005.

POHLMAN, T.; STANNESS, K.; BEATY, P. An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism. **J Immunol**, v. 136, p. 45-48, 1986.

POSER, G. L.; MENTZ, L. A. **Diversidade biológica e sistemas de classificação.** UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2000.

REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C. S. A simplified method Y for the analysis of Hydroxiprolin in biological tissues. **Clin Biochem**, v. 29, p. 225-229, 1996.

REITZ, R.; KLEIN, R.; REIS, A. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. *Sellowia*, Itajaí, v. 34/35, p. 1-525, 1983.

ROBBINS; COTRAN. **Pathologic basis of disease.** Ed. Elsevier, Philadelphia, 2005.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia.** Ed. Artes Médicas, São Paulo, 2000.

SAMUELSSON, G. **Drugs of natural origin: a textbook of pharmacology.** Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, 2004.

SANCHOTENE, M. C. C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana.** Ed. FEPLAM, Porto Alegre, 1985.

SARINGAT, H. J. B.; SHEIKH, K. A. The wound healing properties of *Channa striatus* – cetrimide cream – tensile strength measurement. **J Ethnopharmacol**, v. 71, p. 93-100, 1999.

SILVA, C. S.; CARVALHO, J. C. T.; **Inflamação**. Ed. Tecmedd, São Paulo, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G., et al. **Farmacognisia: da planta ao medicamento**. UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2000.

SEIPH, E. H.; OTT, H. H.; HECKER, E. Skin irritant and tumor promoting diterpene esters of the tiglane type from the Chinese tallow tree (*Sapium sebiferum*). **J. Planta Med**, v. 49, p. 199-203, 1983.

SERHAN, C.; CHIANG, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution entrée for resolemics. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 30, p. 69, 2004.

SMOLA, H.; THIEKOTTER, G.; FUSENIG, N. Mutual induction of growth factor gene expression in by epidermal cell interaction. **J Cell Biol**, v. 122, p. 417, 1993

SOELY, B. S. **Avaliação da atividade antiinflamatória dos extratos brutos das plantas: *Vochysia bifalcata* Warm., *Psychotra nuda* (Cham. & Schlecht.) Wawra e *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax**. Trabalho apresentado no 17. Evento de Iniciação Científica da UFPR, Curitiba, 2009.

TAYLOR, C. M. Rubiaceae. In: T.S.A. Melhem; M.G.L. Wanderley; S.E. Martins; S.L. Jung-Mendaçolli; G.J. Shepherd & M. Kirizawa (eds). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Vol. 5. Ed. Fapesp, São Paulo, 2007.

TURNER, D. M. Natural product source material use in the pharmaceutical industry: the glaxo experience. **J Ethnopharmacol**, v. 51, p. 39-44, 1998.

VALLE, L. S.; KAPLAN, M. A. C. *Sapium Glandulatum* complex (Euphorbiaceae). **An Acad Bras Cienc**, v. 72 (2), p. 293-294, 1999.

WANG, B.; FUJISAWA, H.; ZHUANG, L., et al. CD4+, Th1 and CD8+ type 1 cytotoxic T-cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. **J. Immunol**, v. 165, p. 6783-6790, 2000.

WILLIAMSON, E. M. **Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material**. Ed. Willey and sons Ltd, Chinchester, 1996.

WITTE, M.; BARBUL, A. General Principles of wound healing. **Surg Clin North Am**, v. 77, p. 509, 1999.

WITTE, M.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. **Am J Surg**, v. 183, p. 406, 2002.

YAGER, D.; NWOMEH, B. The proteolytic environment of chronic wounds. **Wound repair Regen**, v. 7, p. 433, 1999.

YOUNG, J. M.; SPIRES, D. A.; BEDORD, C. J., et al. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **J Invest Derm**, v. 82, p. 367-371, 1984.

XIA, Y.; ZAO, Y.; MARCUS, J., et al. Effects of keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) on wound healing in an ischemia impaired rabbit ear model and on scar formation. **J Pathol**, v. 188, p. 431, 1999.