



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**TRATAMENTO TÓPICO COM FRIEDELINA ACELERA A CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS E INDUZ A ATIVAÇÃO
DE FIBROBLASTOS *IN VITRO***

JULIANDERSON DE OLIVEIRA DOS SANTOS CARMO

MACEIÓ – AL,
2019

JULIANDERSON DE OLIVEIRA DOS SANTOS CARMO

**TRATAMENTO TÓPICO COM FRIEDELINA ACELERA A CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS E INDUZ A ATIVAÇÃO
DE FIBROBLASTOS *IN VITRO***

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emiliano Barreto

MACEIÓ – AL,
2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

- C287t Carmo, Julianderson de Oliveira dos Santos.
Tratamento tópico com friedelina acelera a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos e induz a ativação de fibroblastos *in vitro* / Julianderson de Oliveira dos Santos Carmo. - 2019.
87 f.: il. color.
- Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2019.
- Bibliografia: f. 80-87.
1. Friedelina. 2. Cicatrização. 3. Diabetes mellitus. 4. Matriz extracelular. 5. Camundongos. 6. Fibroblastos I. Título.

CDU: 616-003.9:616.379-008.64



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Julianderson de Oliveira dos Santos Carmo

Tratamento tópico com friedelina acelera a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos e induz a ativação de fibroblastos in vitro

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 13 de Fevereiro de 2019.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto (Orientador)

Prof.ª Dr.ª Maria Danielma dos Santos Reis – (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Klayza Moreira Ramos – (UNCISAL)

“Educação é uma descoberta progressiva de nossa própria ignorância.”

Voltaire

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que mais uma etapa de minha formação seja concluída, por me proporcionar sabedoria, força e direcionamento nessa caminhada.

A minha família, que me proporciona uma base incrível. Em especial, aos meus pais, Elian e Francisco de Assis, por todo carinho, amor, força e ensinamentos. Agradeço por todas as abdicções que foram feitas durante a minha criação, por todas as noites em claro e todos os sacrifícios. Obrigado por toda motivação e incentivo. Hoje, tudo que faço é buscando, um dia, poder retribuir tudo isso a vocês. Agradeço as minhas irmãs e meu sobrinho, Juliete, Julielle e Pedro por compartilharem comigo momentos especiais, por todas os pequenos desentendimentos (alguns), mas principalmente por todo amor.

Agradeço ainda a minha namorada Ketlenn, que em tão pouco tempo já faz parte da família, estando presente em momentos especiais. Obrigado, meu amor, por todo carinho, companheirismo, dedicação e amor que você vem me proporcionando. Obrigado por me aguentar em todos os momentos. Você, sem sombras de dúvidas, faz parte dessa conquista.

A todos os meus amigos, em especial, Neilson, Alanderson e William, por toda a parceria durante toda a adolescência até a vida adulta. Muito obrigado pelos momentos de descontrações, pelas conversas sobre os assuntos mais diversos, e principalmente, por sempre confiar em meu potencial. Agradeço aos meus amigos que conheci na graduação, em especial Alana e Fábio. Muito obrigado por todo suporte emocional.

A UFAL, pelo apoio institucional e as agências de fomento, capes, CNPq e FAPEAL. Gostaria ainda de agradecer a coordenação e todos os docentes do programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, que direta ou indiretamente participaram de minha formação.

A todos os integrantes da família do Laboratório de Biologia Celular (LBC). Obrigado por todo o carinho, ensinamentos, e pelo ótimo ambiente de trabalho. A todas as pessoas que acompanharam de perto a minha pequena trajetória: Flávio, Lilian Mariane, Marvin, Karen, Návylla (Nalvinha), Liliane (Lili), Rayane Botelho, Ana Lúcia, Fernanda (Nanda), Clarice, Sâmario, Polliane, Jordana, Tácio, João Paulo Noé, Porto (Felipe), Ruan, Andressa, Keyla, Jaque, Lylyan, Camilla e Fagner (queridinho). Muito obrigado por todos os conhecimentos trocados, colaborações e momentos de descontrações. Em especial, gostaria de agradecer a técnica do laboratório, Juliane, por todo carinho e conselhos.

A professora Ana Carolina, por todos os ensinamentos e o pela importante contribuição durante a minha caminhada. Obrigado por participar ativamente da execução deste trabalho, por todas as contribuições científicas e orientação.

Em especial, a amiga, professora e conselheira Janylle Nunes. Por ser um referencial, um exemplo de profissional a ser seguido. Obrigado por todos os ensinamentos, por todo carinho e todos os conselhos. Valorizo muito estar ao lado de uma grande pessoa, aprendendo e sendo direcionado em termos acadêmicos e até pessoal. Muito obrigado por toda ajuda, por me ensinar a pegar na pipeta, imobilizar o animal e hoje ter autonomia metodológica para realizar os experimentos.

A todos os professores que fazem parte do LBC: prof^a Salette Smaniotto, Danielma Reis e prof^o Alexandre Borbely. Muito obrigado pela disponibilidade em todos os momentos que precisei da ajuda de vocês.

Ao meu orientador, professor Emiliano Barreto, o qual vejo um padrão a ser seguido, um profissional extraordinário e uma pessoa maravilhosa. Obrigado por fazer parte de minha formação, por todos os ensinamentos e direcionamentos ao longo desse tempo de convivência. Obrigado por todas as oportunidades e pelos horizontes que o senhor me proporcionou e proporciona.

Aos professores que fizeram parte da banca de qualificação, professora Danielma, professor Lázaro e professora Salette pela disponibilidade e todos os apontamentos que foram essenciais para melhorar o trabalho.

A banca de defesa. Muito obrigado pela disponibilidade e por contribuir nesta etapa de minha formação.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que, direta ou indiretamente, participaram da realização desse sonho. Muito obrigado!

RESUMO

O comprometimento do processo de cicatrização é uma complicação frequente do diabetes mellitus (DM) que contribui para a formação de feridas crônicas. Desta forma, substâncias que aceleram o processo de cicatrização despertam interesses na prática clínica. Neste contexto, o triterpeno pentacíclico natural friedelina tem sido relatado na literatura como possuidor de diversas atividades biológicas, incluindo efeitos gastroprotetores, antibacterianos e anti-inflamatórios, no entanto, seus efeitos sobre a cicatrização na condição diabética ainda não foram descritos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade cicatrizante deste triterpeno em feridas cutâneas de camundongos diabéticos e avaliar seu efeito sobre funções de fibroblastos *in vitro*. Para isso, uma ferida excisional foi provocada no dorso de camundongos Swiss não diabéticos e diabéticos induzidos por aloxana. Após 21 dias do estímulo diabetogênico, os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1) Animais não diabéticos tratados com salina (NDB); 2) Animais diabéticos tratados com salina (DB); 3) Animais diabéticos tratados com 0,1% de friedelina (DB-FD 0,1%); 4) Animais diabéticos tratados com 1% de friedelina (DB-FD 1%). No sétimo dia após a indução da ferida, amostras de pele foram coletadas para a avaliação do padrão histopatológico, da expressão de MMP e TIMP, da deposição de colágeno total e da angiogênese. Adicionalmente, fibroblastos expostos à friedelina *in vitro* tiveram o seu potencial de migração, e capacidade de produção de matriz extracelular e de TGF- β 1 avaliados por *scratch assay* e imunofluorescência, respectivamente. Nossos resultados demonstraram que a aplicação tópica de friedelina acelerou a contração da ferida por estimular a formação do tecido de granulação devido a maior presença de fibroblastos no local da ferida. Além disso, verificamos que a friedelina reduziu a expressão de MMP e aumentou a expressão de TIMP na ferida diabética. Também foi demonstrado que o tratamento tópico com friedelina aumentou a deposição de colágeno total, assim como estimulou o processo de angiogênese em camundongos diabéticos. A análise *in vitro* revelou que a friedelina estimulou a migração, bem como a produção de fibronectina, laminina e TGF- β 1 em fibroblastos. Com base nesses resultados, sugerimos que a friedelina pode ser uma importante alternativa terapêutica para o desenvolvimento de fármacos visando o tratamento de feridas diabéticas.

Palavras-chave: Friedelina. Cicatrização. Diabetes. Matriz extracelular.

ABSTRACT

The impairment of the healing process is a frequent complication of Diabetes mellitus (DM), contributing to the formation of chronic wounds. Thus, treatments that improve the healing process have important applications in clinical practice. In this context, the pentacyclic triterpene friedelin (FD) have been reported in the literature as having several biological activities, such as gastroprotective, antibacterial and anti-inflammatory effects, but there are no studies that demonstrate its healing ability in the diabetic condition. Thus, the aim of this study was to evaluate the healing capacity of this triterpene in cutaneous wounds of alloxan-induced diabetic mice and to evaluate its effect on fibroblast functions in vitro. An open excisional wound was created on the back of diabetic and non-diabetic mice, which were divided into 4 groups as following: 1 – Non-diabetic control mice treated with saline (Non-diabetic, NDB); 2 – Diabetic control mice treated with saline (Diabetic, DB); 3 – Diabetic mice treated with 0.1% of friedelin (DB-FD 0.1%); 4 – Diabetic mice treated with 1% of friedelin (DB-FD 1%). Photographs were taken at distinct times for macroscopic evaluation. Wound samples were taken on specific days post-wounding for histopathologic evaluations, collagen deposition and new blood vessels formation evaluation. In addition, in vitro studies were carried out on fibroblasts, and the effects of friedelin on fibroblast migration and extracellular matrix production were performed by scratch wound assay and immunofluorescence, respectively. Moreover, we observed that friedelin reduced the MMP expression at same time that stimulated the TIMP expression in diabetic wound. Topical application of friedelin cause an increase in the wound closure with a better formation of granulation tissue with marked fibroblast presence into the wound site. It was also showed that topical treatment with friedelin increases the total collagen deposition, as well as regulates the angiogenesis process in diabetic mice. In vitro analysis showed that friedelin presented a stimulatory effect on fibroblast by increasing the migration and fibronectin, laminin and TGF- β 1 production in these cells. On the basis of these results, we suggest that friedelin may be an important therapeutic alternative for the treatment of diabetic wounds.

Keywords: Friedelin. Wound healing. Diabetes. Extracellular matrix.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fatores que afetam a cicatrização de feridas.....	36
Tabela 2	Oligonucleotídeos.....	45
Tabela 3	Inibidores farmacológicos	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama representativo da estrutura da pele.....	22
Figura 2	Camadas da epiderme.....	23
Figura 3	A derme sustenta a epiderme de maneira estrutural e nutricional.....	24
Figura 4	Diagrama representativo da fase inflamatória do reparo tecidual.....	26
Figura 5	Recrutamento das diferentes populações de células imunes e fibroblastos correlacionadas com as fases da cicatrização de feridas.....	28
Figura 6	Os macrófagos possuem plasticidade fenotípica.....	29
Figura 7	Diagrama representativo da fase proliferativa do reparo tecidual.....	30
Figura 8	Diagrama mostrando a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos.....	32
Figura 9	Diagrama representando a via de sinalização PKA/CREB.....	33
Figura 10	Diagrama representativo da fase de remodelamento do reparo tecidual.....	35
Figura 11	Estrutura molecular do triterpeno pentacíclico friedelina.....	39
Figura 12	O tratamento tópico com friedelina restaura o processo de cicatrização em animais diabéticos.....	51
Figura 13	Efeito da aplicação tópica de friedelina no perfil histopatológico das feridas.....	53
Figura 14	Friedelina aumenta a deposição de colágeno total em camundongos diabéticos.....	55
Figura 15	Friedelina regula a expressão de MMP-9 e TIMP-1.....	56
Figura 16	O tratamento tópico com friedelina regula a angiogênese em feridas cutâneas de animais diabéticos.....	58
Figura 17	Friedelina não altera a viabilidade de fibroblastos in vitro.....	59
Figura 18	Friedelina acelera a migração de fibroblastos in vitro.....	61

Figura 19	Friedelina estimula a produção de fibronectina em fibroblastos in vitro.....	63
Figura 20	Friedelina estimula a produção de laminina em fibroblastos in vitro	64
Figura 21	Friedelina estimula a produção de TGF- β 1 em fibroblastos in vitro	66
Figura 22	Friedelina promove a migração de fibroblastos de maneira dependente da sinalização pela via PKA.....	68
Figura 23	Friedelina promove a migração de fibroblastos de maneira dependente da atividade de CREB.....	69
Figura 24	Esquema representando as consequências do tratamento tópico com friedelina em feridas cutâneas de animais diabético	79

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
α-SMA	α-actina de músculo liso (do inglês, α-Smooth Muscle Actin)
cDNA	DNA complementar
Cm	Centímetro
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMPc (do inglês, cAMP Response Element-binding)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	Pirocarbonato de dietila (do inglês, diethylpyrocarbonate)
DFU	Úlcera do pé diabético (do inglês Diabetic Foot Ulcer)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, Deoxyribonucleic acid)
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato (do inglês, Deoxyribonucleotide triphosphate)
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês, Epidermal Growth Fator)
EMT	Transição epitélio mesenquimal (do inglês, Epithelial-mesenchymal transition)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos (do inglês, Fibroblast Growth Fator)
GAR-FITC	<i>Goat anti-Rabbit FITC</i>
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mg/dL	Miligramas por decilitro
mg/kg	Miligramas por quilograma
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases de matriz (do inglês Matrix Metalloproteinases)
mRNA	RNA mensageiro

MTT	Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
nm	Nanômetro
NIH3T3	Linhagem de fibroblasto embrionário
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês, Phosphate Buffered Saline)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas, (do inglês, Platelet-Derived Growth Factor)
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotélio-plaquetária 1 (do inglês, Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule)
PKA	Proteína quinase A (do inglês, Protein Kinase A)
RNA	ácido rribonucleico (do inglês, Ribonucleic acid)
RT-PCR	Transcrição reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia (do inglês, Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction)
SBF	Soro Bovino fetal
TGF-β1	Fator de crescimento transformador (do inglês, Transforming Growth factor)
TIMPs	Inibidor tecidual de metaloproteinases (do inglês Tissue Inhibitors of Metalloproteinases)
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês, Vascular endothelial Growth factor)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Pele.....	21
2.2	Processo de cicatrização de feridas.....	25
2.2.1	Fase inflamatória	26
2.2.2	Fase proliferativa (formação do tecido de granulação)	30
2.2.2.1	Ativação dos fibroblastos.....	31
2.2.2.2	Processo de angiogênese.....	34
2.2.3	Fase de remodelamento	34
2.3	Fatores que afetam a cicatrização de feridas cutâneas	35
2.3.1	Diabetes e cicatrização de feridas.....	37
2.4	Tratamento de feridas crônicas.....	37
2.5	Produtos naturais.....	38
2.6	Friedelina.....	39
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	Objetivo geral.....	41
3.2	Objetivos específicos.....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1	Reagentes.....	42
4.2	Animais.....	42
4.3	Indução do diabetes mellitus.....	42
4.4	Indução da lesão excisional.....	43
4.5	Divisão dos grupos e regime de tratamento.....	43
4.6	Análise macroscópica.....	43
4.7	Análise histopatológica da ferida.....	44
4.8	Avaliação da deposição de colágeno.....	44
4.9	Extração de RNA, síntese de cDNA e RT-PCR.....	44

4.10	Imunohistoquímica para a proteína CD31.....	46
4.11	Cultura celular.....	46
4.12	Avaliação da viabilidade celular.....	46
4.13	Contagem celular.....	47
4.14	Ensaio de migração celular.....	47
4.15	Imunofluorescência.....	48
4.16	Análise estatística.....	49
5	RESULTADOS.....	50
5.1	O tratamento tópico com a friedelina restaura o fechamento da ferida em animais diabéticos.....	50
5.2	Friedelina melhora a formação do tecido de granulação em feridas diabéticas.....	52
5.3	A aplicação tópica com friedelina aumenta a deposição de colágeno total em feridas de animais diabéticos.....	54
5.4	Tratamento tópico com friedelina afeta a expressão gênica de MMP-9 e TIMP-1 nas feridas de camundongos diabéticos.....	56
5.5	Friedelina favorece o processo de angiogênese na ferida de camundongos diabéticos.....	57
5.6	Efeito do friedelina sobre a viabilidade de fibroblastos.....	59
5.7	Friedelina aumenta a migração de fibroblastos <i>in vitro</i>	59
5.8	Friedelina induz produção de fibronectina e laminina em fibroblastos.....	62
5.9	Friedelina induz produção de TGF- β 1 em fibroblastos <i>in vitro</i>	65
5.10	Envolvimento da via de sinalização PKA/CREB na migração de fibroblastos estimulada pela friedelina <i>in vitro</i>	67
6	DISCUSSÃO.....	70
7	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

A pele consiste no maior órgão do corpo e desempenha um papel importante na defesa dos organismos, uma vez que este órgão atua como uma barreira física, química e microbiológica que protege o corpo de diversos agentes nocivos, incluindo produtos químicos, radiação ultravioleta (UV), calor e micro-organismos (YEH et al., 2017). Assim, quando a integridade da pele é quebrada, sua função protetora é comprometida, e com isso, uma série de eventos celulares e moleculares são iniciados, o que resulta no reparo da ferida (TANG et al., 2014).

A cicatrização de feridas é uma importante resposta tecidual às lesões de diversas naturezas e consiste em um processo dinâmico e bem orquestrado, que leva a ativação celular e produção de diversas citocinas, que acarretam na restauração da homeostase tecidual (SAARISTO et al., 2006). Didaticamente, este processo é dividido em três fases não mutuamente excludentes, mas que se sobrepõem no tempo: (1) inflamação, (2) formação do tecido de granulação e (3) remodelamento (SINGER; CLARK, 1999).

A fase inflamatória é caracterizada por eventos vasculares e celulares, que permitem a restauração da integridade dos vasos sanguíneos, mediante ao processo de coagulação sanguínea e o recrutamento de leucócitos da circulação, como neutrófilos e macrófagos, que fagocitam bactérias e células mortas, além de produzirem uma gama de citocinas e fatores de crescimento que são essenciais, não apenas na inflamação, mas em todo o processo de reparo (KOH; DIPIETRO, 2011). Enquanto esta fase é atenuada, inicia-se a formação do tecido de granulação, principalmente através da síntese da matriz extracelular e do processo de angiogênese.

Durante a formação do tecido de granulação, a migração e a proliferação de vários tipos celulares, como os fibroblastos, as células endoteliais e os queratinócitos, são essenciais para promover a produção de matriz extracelular, angiogênese e reepitelização, respectivamente (CHEN et al., 2014). De fato, a ativação dos fibroblastos é um evento chave durante a formação do tecido de granulação e a contração da ferida, visto que essas células são responsáveis pela produção e deposição de proteínas da matriz extracelular, como colágenos, fibronectinas e lamininas (KANAZAWA et al., 2010; XUAN et al., 2014). Além disso, as células endoteliais desempenham um papel proeminente durante o processo de

cicatrização, pois essas células estão envolvidas na angiogênese, que é um evento essencial relacionado à entrega de oxigênio, nutrientes e células sanguíneas no leito da ferida (KANT et al., 2015).

Na fase de remodelamento, por sua vez, ocorre uma intensa renovação do tecido, que se torna mais acelular, uma vez que a maioria das células recrutadas são estimuladas a sofrer apoptose (GURTNER et al., 2008).

Diversos fatores locais e sistêmicos, como idade, estresse, medicamentos, nutrição e infecção, podem afetar negativamente o processo de cicatrização (GUO; DIPIETRO, 2010). Entre esses fatores, a condição diabética é uma das causas mais importantes e prevalentes na formação de feridas crônicas, o que pode levar ao desenvolvimento de úlceras do pé diabético (RAM et al., 2015, 2016).

O diabetes mellitus (DM) é caracterizado por uma hiperglicemia crônica e é uma das doenças metabólicas mais significativas, com prevalência mundial. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que 422 milhões de adultos são afetados com diabetes em todo o mundo, e que 1,6 milhão de mortes são atribuídas diretamente ao diabetes a cada ano (OMS, 2014)

Esta patologia é um distúrbio que envolve múltiplos sistemas e suas complicações induzem alterações fisiológicas em tecidos que prejudicam o processo normal de reparo tecidual. O atraso no processo de cicatrização em pacientes com diabetes está associado a diversos fatores, incluindo a exacerbação e prolongamento da resposta inflamatória (FAHEY et al., 1991), um prejuízo na neovascularização (MARTIN et al., 2003), bem como uma diminuição na produção e deposição de colágenos (GALEANO et al., 2004; GOODSON e HUNG, 1977; SINGER e CLARK, 1999).

Embora várias práticas clínicas tenham sido testadas com o intuito de evitar atrasos no processo de cicatrização de feridas, as opções para o tratamento de feridas crônicas ainda são escassas (PEREIRA; BÁRTOLO, 2016). Desta forma, torna-se necessária a busca de alternativas terapêuticas para o tratamento de feridas crônicas.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os produtos naturais derivados de plantas têm a capacidade de acelerar o processo de cicatrização (KANT et al., 2015; KIM et al., 2013; SHARATH et al., 2010; SHUKLA et al., 1999; YEH et al., 2017). Entre os produtos naturais, os triterpenos pentacíclicos consistem

em metabólitos secundários presentes nos frutos, folhas e cascas de várias plantas medicinais (HILL e CONNOLLY, 2013).

Inúmeros estudos têm mostrado as múltiplas propriedades farmacológicas dos triterpenos, como por exemplo, efeito anticancerígeno (LASZCZYK, 2009; LU, Mingxia et al., 2018), antioxidante (RAMACHANDRAN e PRASAD, 2008) e anti-inflamatório (AGRA et al., 2016; ALMEIDA et al., 2015; WANG, Xu-Tao et al., 2018). Além disso, vários triterpenos foram caracterizados na literatura científica como importantes agentes pró-cicatrizantes (AGRA et al., 2015).

Nesse contexto, a friedelina (FD), um triterpeno pentacíclico natural, tem sido relatada na literatura como possuidora de diversas atividades biológicas, incluindo efeitos gastroprotetores em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos (ANTONISAMY et al., 2015), atividade hipolipidêmica (DURAIPANDIYAN et al., 2016), efeitos antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos (ANTONISAMY et al., 2011), efeitos antioxidante e protetor hepático (SUNIL et al., 2013), bem como atividade citotóxica em linhagens celulares de câncer *in vitro* (LU, Baiyi et al., 2010; SUBASH-BABU et al., 2017).

Adicionalmente, estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa evidenciaram que a friedelina possui um efeito pró-cicatrizante em animais não diabéticos, por aumentar a taxa de contração da ferida destes animais, assim como aumentar a deposição de colágeno total no tecido cicatricial (FERRO et al, 2014).

Apesar de numerosos estudos terem mostrado diversas atividades biológicas da friedelina, os efeitos desse triterpeno sobre o processo de cicatrização cutânea na condição diabética ainda não foram descritos. Assim, neste estudo foi avaliado o efeito da friedelina na cicatrização de feridas cutâneas em camundongos tornados diabéticos por aloxana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pele

A pele consiste no maior órgão do corpo humano e é caracterizada por ser a interface entre o organismo e o ambiente. Este órgão possui um importante papel na recepção de estímulos, agindo como órgão sensorial, além de atuar como regulador primário da temperatura do corpo, e apresentar funções endócrinas e exócrinas, agindo na absorção e secreção de substâncias. Além disso, a pele possui um importante papel na imunidade inata, por atuar como a primeira linha de defesa dos organismos, representando uma barreira física, química e microbiológica contra diversos patógenos, além de prevenir a perda de componentes essenciais, como a água, e proteger o corpo de diversos agentes nocivos, incluindo produtos químicos, radiação UV e calor (KONDO e ISHIDA, 2010; MARTIN, Paul, 1997).

Classicamente, a pele é caracterizada por atuar como uma efetiva linha de defesa externa contra fatores exógenos, e desta forma, possui um importante impacto na manutenção da homeostase corporal (LEE et al., 2012; TANG et al., 2014).

A fisiologia da pele está diretamente ligada à sua complexidade estrutural. Histologicamente, a pele é constituída por duas camadas de tecidos distintos que desempenham funções fundamentais para a manutenção da homeostasia: a epiderme e a derme, originadas embriologicamente do ectoderma superficial e do mesoderma, respectivamente (Figura 1, p. 22) (LEE, Jeong-Hyun et al., 2012; MINUTTI et al., 2017).

Figura 1 - Diagrama representativo da estrutura da pele.

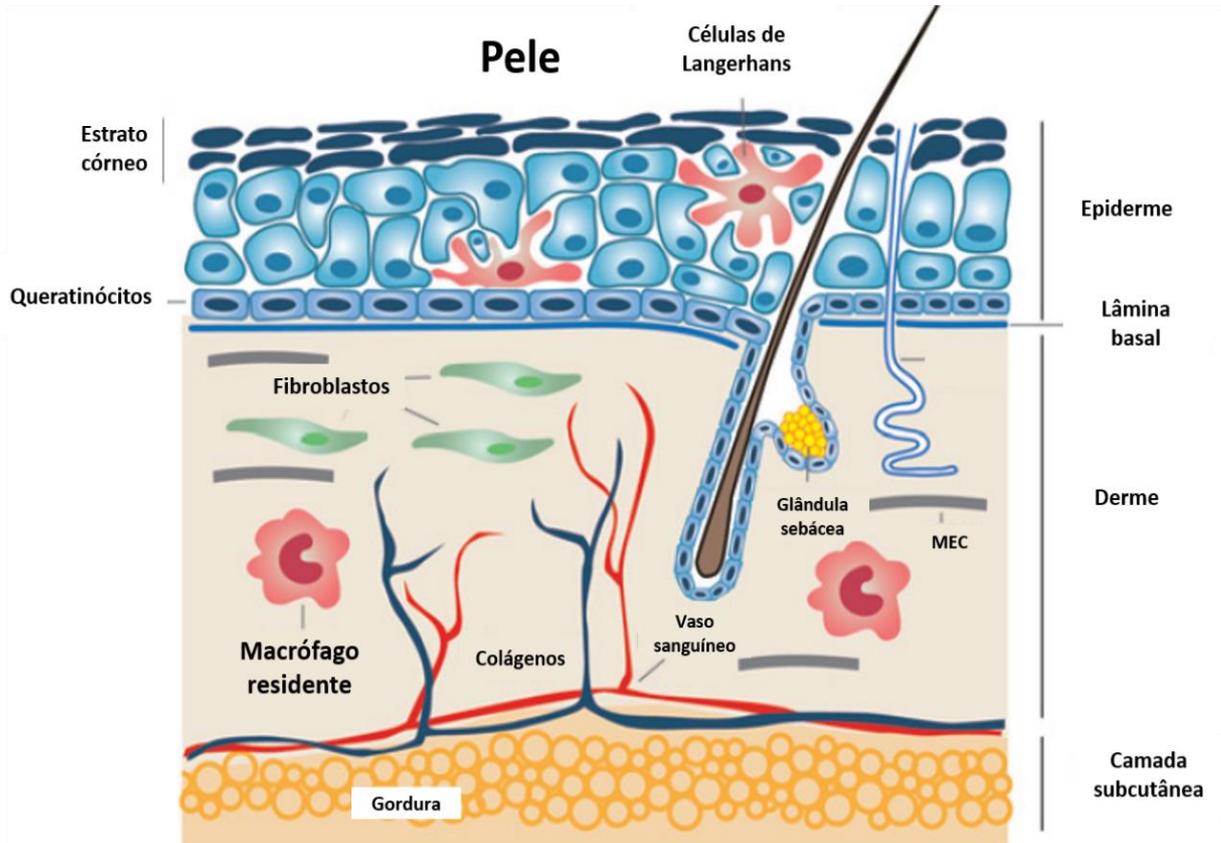
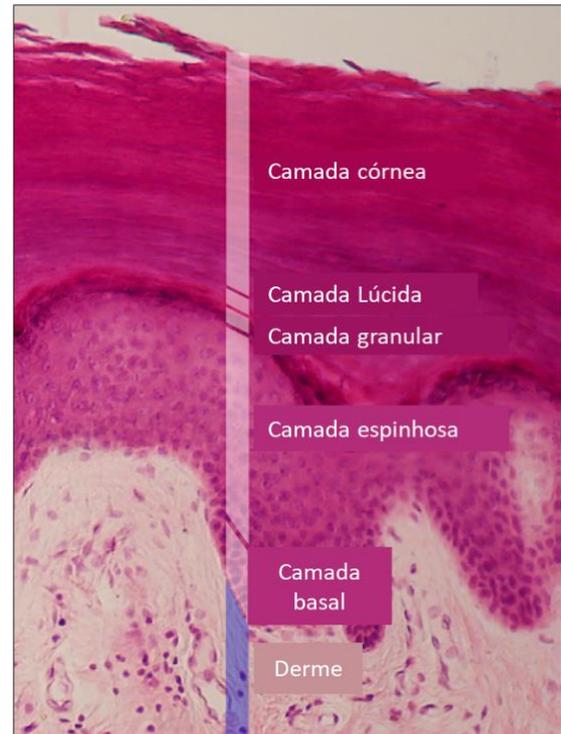


Diagrama ilustrando os componentes da pele. Histologicamente, a pele é constituída por duas camadas de tecidos distintos: a epiderme, um tecido epitelial pavimentoso estratificado, e a derme, um tecido conjuntivo propriamente dito. Este órgão repousa sob uma camada de tecido subcutâneo de espessura variável nos organismos. Fonte: Adaptado (MINUTTI et al., 2017).

A epiderme consiste em um tecido epitelial avascular, classificado como estratificado pavimentoso queratinizado, onde as células são justapostas e dispostas em várias camadas, repousando em uma lâmina basal. Este tecido é composto principalmente por queratinócitos, células epiteliais capazes de produzir vastas quantidades de queratinas, além de outros tipos celulares, tais como melanócitos e células de Langerhans (KHAVKIN; ELLIS, 2011). A epiderme é subdividida ainda em cinco camadas, de acordo com a morfologia e a localização dos queratinócitos, incluindo a camada basal, camada espinhosa, camada granular, camada lúcida e camada córnea, sendo esta última a mais externa (Figura 2, p.23).

Figura 2 - Camadas da epiderme.



Corte histológico da epiderme mostrando as cinco camadas distintas, da camada mais superficial até a camada mais profunda: camada córnea, camada lúcida, camada granular, camada espinhosa e camada basal. Fonte: Adaptado (GANTWERKER; HOM, 2011).

A camada basal, também chamada de estrato germinativo, é composta por queratinócitos que repousam diretamente sob a lâmina basal. Estas células apresentam intensa atividade proliferativa e são responsáveis por originar as células das camadas epidérmicas externas. A capacidade de autorrenovação da epiderme é devido, principalmente, a presença de uma população de células troncos mitoticamente ativas nesta camada (Figura 2) (DEBEER et al., 2013).

A manutenção do número de células na epiderme é dada pelo balanço entre a proliferação e a morte celular dos queratinócitos. Desta maneira, a medida que os queratinócitos proliferam e migram para as camadas mais externas, formam as demais camadas da epiderme, se diferenciam e então, são estimuladas a entrar em apoptose (GANTWERKER; HOM, 2011).

Além destas características histológicas peculiares, a epiderme dá origem a alguns apêndices, que consistem em estruturas epiteliais especializadas localizadas principalmente na derme e tecido subcutâneo, mas conectadas à epiderme (MARTIN, 1997). Eles incluem folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

Subjacente à epiderme, encontra-se uma camada de tecido conjuntivo propriamente dito denominado de derme. A derme possui a função de sustentar a epiderme, tanto estruturalmente como nutricionalmente. Por ser um tecido avascular, toda a suplementação de nutrientes e gases que ocorrem na epiderme é mediado pelos vasos sanguíneos presentes na derme (Figura 3) (DARBY; LAVERDET, 2014). Além de receber o maior suprimento de sangue, a derme contém a maioria dos apêndices da pele.

Figura 3 - A derme sustenta a epiderme de maneira estrutural e nutricional.

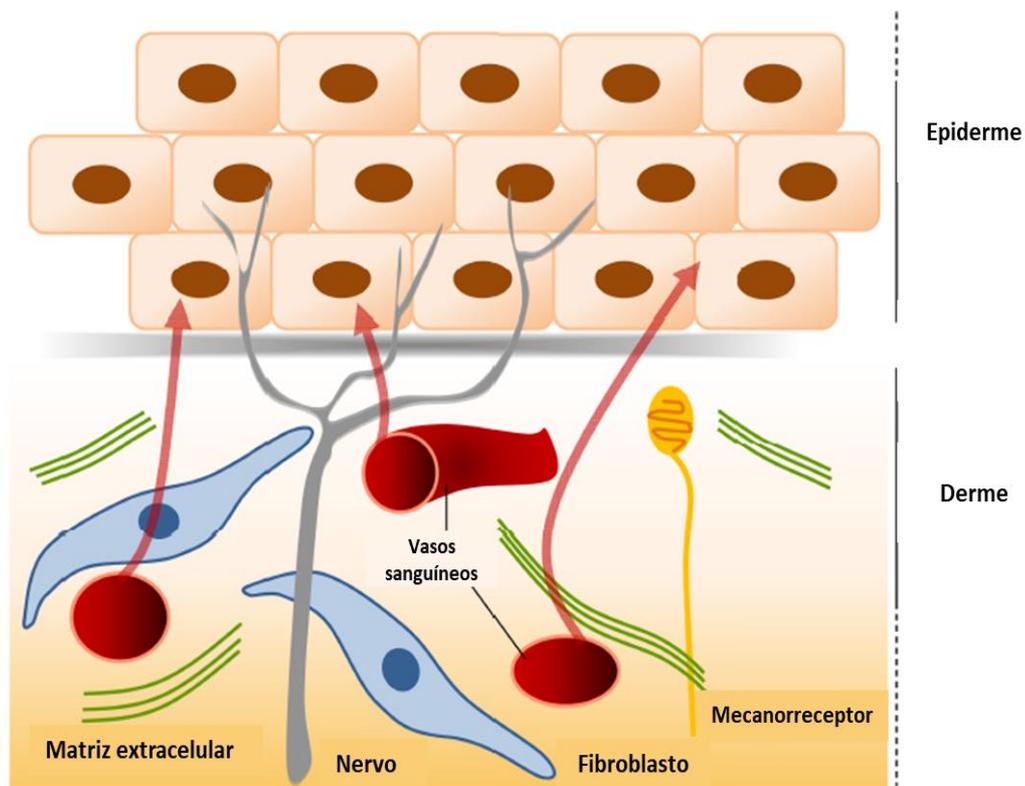


Ilustração demonstrando que apenas a derme é vascularizada, e desta forma, a epiderme obtém todos os nutrientes através dos vasos sanguíneos presentes na derme. FONTE: Adaptado (DARBY; LAVERDET, 2014).

Esta camada pode ser dividida em duas camadas com propriedades e composições discretamente distintas: uma derme superficial ou papilar e uma derme reticular mais profunda. Enquanto que a derme papilar é composta por feixes de colágeno, fibras elásticas, fibrócitos, vasos sanguíneos e terminações nervosas fracamente organizados, a derme reticular contém fibras colágenas compactas e

fibras elásticas mais grossas. Neste sentido, histologicamente, a derme papilar é caracterizada por ser constituído por um tecido conjuntivo frouxo, enquanto que a derme reticular é formada por tecido conjuntivo denso não modelado (GANTWERKER; HOM, 2011).

A derme é caracterizada por possuir uma rica matriz extracelular composta por diversas proteínas e glicoproteínas, incluindo colágenos, principalmente dos tipos I e III, que consiste em mais de 90% das fibras dérmicas, fibronectinas, lamininas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e fibras elásticas, que proporcionam resistência à tração e resistência mecânica à pele (GANTWERKER; HOM, 2011; MINUTTI et al., 2017).

Os fibroblastos consistem no principal tipo celular presente neste tecido, sendo responsáveis pela produção das diversas proteínas e glicoproteínas da matriz extracelular. Além disso, é possível encontrar outros componentes celulares, como mastócitos, células dendríticas e macrófagos (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

2.2 Processo de cicatrização de feridas

Quando a barreira protetora da pele é quebrada por lesões de diversas naturezas, incluindo trauma, radiação, lesão química ou queimaduras, o processo de cicatrização de feridas é imediatamente acionado, e uma série de eventos celulares e moleculares é iniciado, visando reparar a estrutura da pele e restaurar a homeostasia tecidual (HORNG et al., 2017; YEH et al., 2017). O processo de cicatrização envolve uma complexa rede de interações celulares que permitem a restauração da integridade vascular, a ativação e recrutamento de células inflamatórias, a diferenciação e a proliferação de células mesenquimais no leito cicatricial, assim como a formação de novos vasos, que garantem o desenvolvimento e o remodelamento de um novo tecido (DIPIETRO, 2016; PONUGOTI et al., 2013; SINGER e CLARK, 1999).

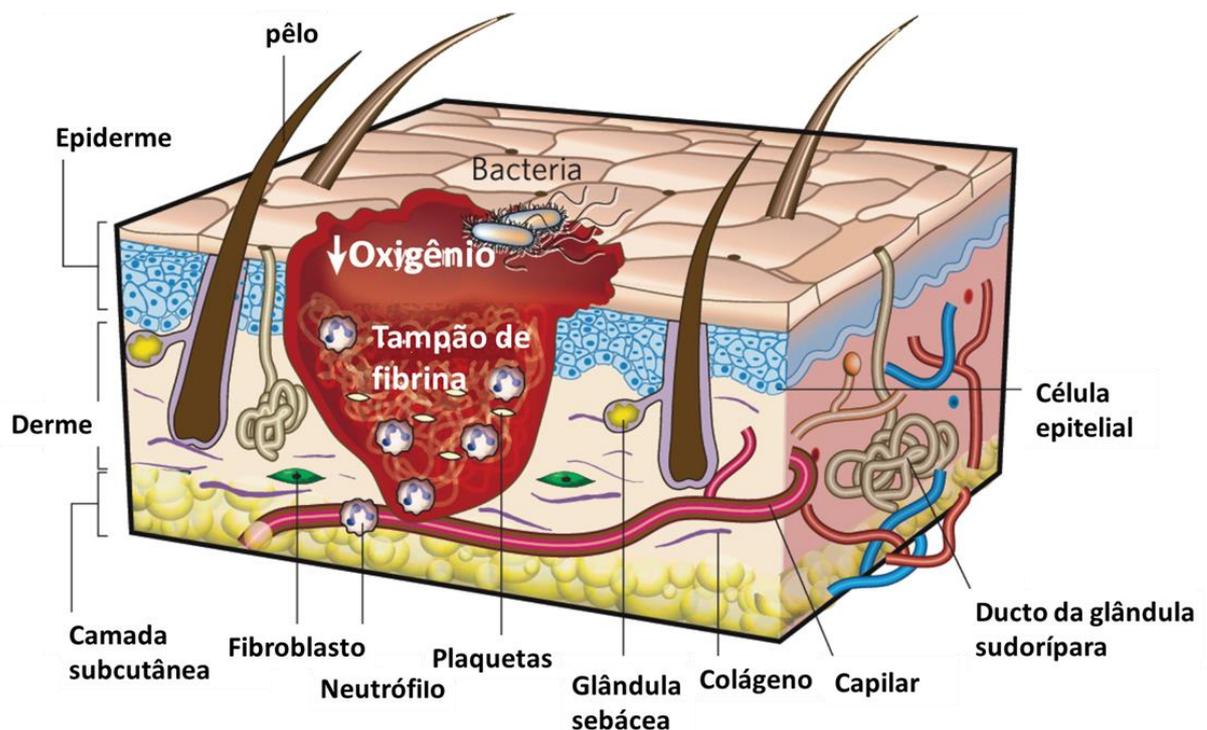
A cicatrização de feridas, comumente ocorre em três fases: (1) inflamação, (2) formação do tecido de granulação e (3) remodelamento. É importante ressaltar que essa divisão é meramente didática, já que estas fases são interdependentes e se sobrepõem no tempo, e com isso, devem ocorrer de maneira altamente regulada, na sequência correta, no período específico e na intensidade ideal (SINGER; CLARK, 1999). Sabe-se que a desregulação durante uma ou mais fases deste processo

acarreta no comprometimento na cicatrização, levando à formação de feridas crônicas.

2.2.1 Fase inflamatória

A resposta inflamatória desempenha papéis importantes tanto na cicatrização de feridas normais quanto em feridas crônicas. Após a lesão, eventos vasculares são iniciados, o que permite a restauração da homeostasia dos vasos sanguíneos através do processo de coagulação, e o sistema imunológico inato é ativado, instaurando uma resposta inflamatória local que inclui o recrutamento de leucócitos da circulação para o tecido lesado (Figura 4) (KOH; DIPIETRO, 2011; MARTIN; LEIBOVICH, 2005).

Figura 4 - Diagrama representativo da fase inflamatória durante o reparo tecidual.



Durante esta fase ocorre a restauração da homeostase dos leitos vasculares pelo processo de coagulação sanguínea, além do recrutamento de leucócitos da corrente sanguínea para o leito da ferida. Os neutrófilos e macrófagos atuam na fagocitose e na liberação de citocinas e de fatores de crescimento importantes durante todo o processo de reparo. FONTE: Adaptado (GURTNER et al., 2008)

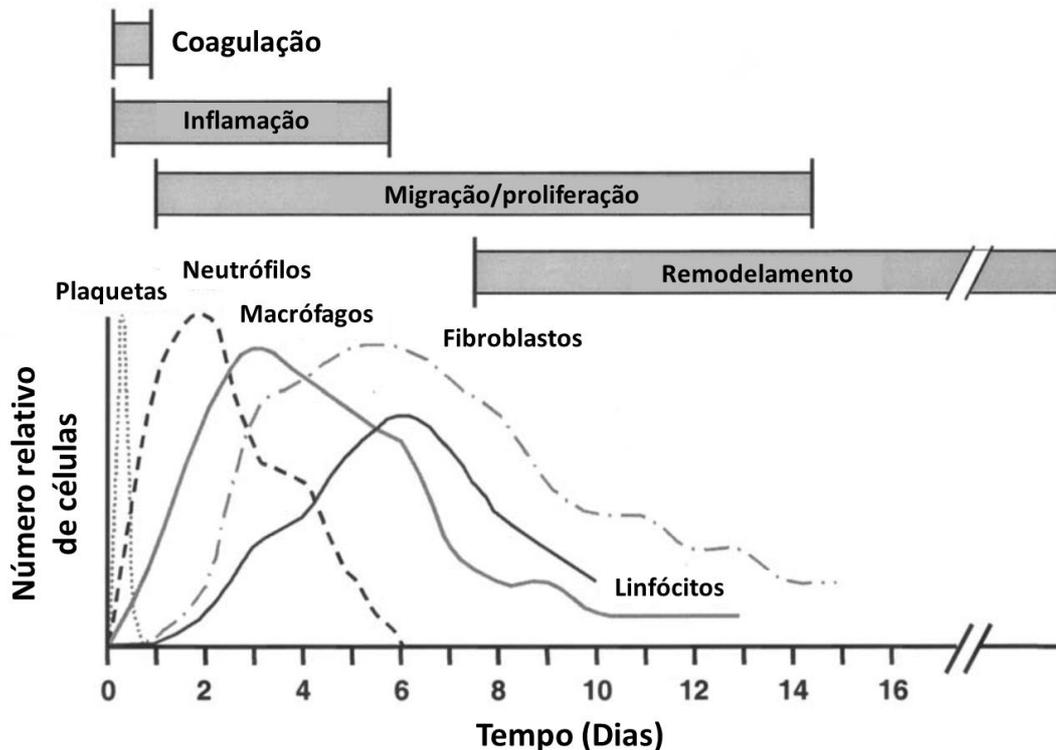
Com a lesão tecidual, a integridade estrutural dos vasos sanguíneos é rompida, o que acarreta na perda de constituintes sanguíneos. Desta forma,

imediatamente após o ferimento, ocorre uma rápida constrição vascular e a formação de coágulos de fibrina. Durante esta fase, a exposição das plaquetas ao colágeno subendotelial induz a agregação plaquetária e a formação de um coágulo, que atua como uma barreira temporária, impedindo a perda dos constituintes plasmáticos e protegendo os tecidos lesionados, além de fornecer uma matriz provisória, que sustenta a migração de células, importante durante o processo de reparo (BROCKMANN et al., 2017; MINUTTI et al., 2017).

De fato, as plaquetas desempenham um importante papel, não somente por facilitar a formação de um tampão hemostático, mas também por secretar uma gama de citocinas e fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês, Platelet-Derived Growth Factor) e o fator de crescimento transformador (TGF do inglês, Transforming Growth Fator), que atuam no recrutamento de leucócitos e fibroblastos para o leito da ferida (GURTNER et al., 2008; KONDO; ISHIDA, 2010).

Posteriormente, em resposta aos agentes quimiotáticos, os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o sitio da injúria e atuam majoritariamente liberando mediadores químicos capazes de destruir agressores, permitindo que resíduos celulares sejam fagocitados por macrófagos posteriormente mobilizados para a área da lesão (KANT et al., 2014). Os neutrófilos mostram-se importantes efetores da resposta imune inata, além de estimular eventos-chave durante o curso cicatricial, como por exemplo a angiogênese, que ocorre mediante a liberação do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, do inglês, Vascular Endotelial Growth Fator) (WANG, Jing, 2018). À medida que o recrutamento destas células é diminuído, os macrófagos tornam-se a população de células mais frequente no tecido cicatricial (Figura 5, p. 28).

Figura 5 - Recrutamento das diferentes populações de células do sistema imune e fibroblastos correlacionadas com as fases da cicatrização de feridas.



Esquema representativo do curso temporal e de número de células, do recrutamento das diferentes células que surgem na ferida durante o processo de cicatrização. Macrófagos e neutrófilos são células predominantes durante a inflamação, enquanto que os fibroblastos são predominantes durante a fase proliferativa. FONTE: Adaptado (PARK e BARBUL, 2004).

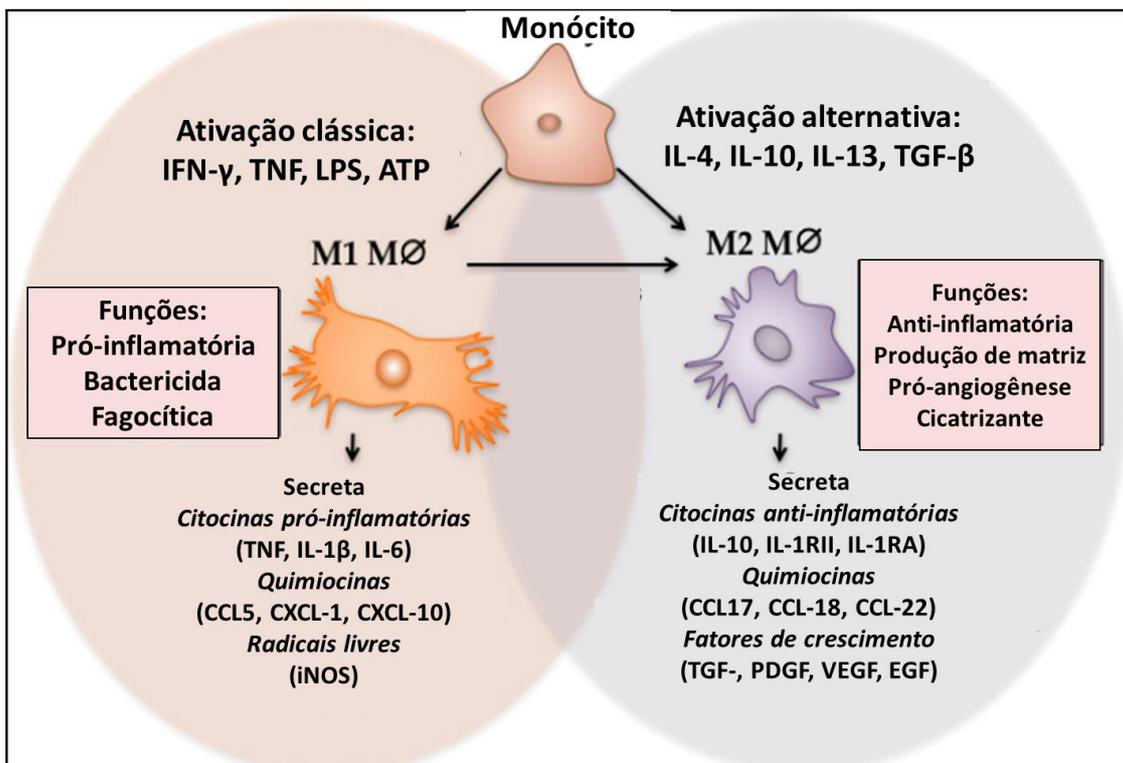
Os macrófagos são agentes essenciais após danos aos tecidos, e a depleção de macrófagos resulta em danos na cicatrização de feridas (MIRZA et al., 2009). Além de atuar na fagocitose de neutrófilos apoptóticos e corpos estranhos, estas células possuem a importante função de regular as fases subsequentes da cicatrização, mediante a liberação de fatores de crescimento, como TGF- β e VEGF, que atuam no recrutamento, na ativação e na diferenciação de fibroblastos e de células endoteliais, respectivamente (DELAVARY et al., 2011).

Como mostrado na figura 5, o recrutamento celular ocorre de uma maneira altamente regulada, em termos temporal e de número de células. Evidências na literatura apontam que a desregulação no recrutamento destas células é um dos motivos para a formação de feridas crônicas (PARK; BARBUL, 2004).

É possível notar que os macrófagos são importantes reguladores da resposta cicatricial e devido a sua plasticidade funcional, essas células atuam em todas as

etapas do processo de reparo (Figura 5, p.28 e 6.). Está bem estabelecido na literatura que o fenótipo dos macrófagos evolui com os estágios da cicatrização (KOH; DIPIETRO, 2011). Inicialmente, os macrófagos são recrutados e ativados com um fenótipo pró-inflamatório, classicamente denominado como macrófagos M1. No entanto, mediante a progressão do processo cicatricial e a mudança no microambiente da ferida, estas células adquirem um fenótipo anti-inflamatório/regulador M2, que medeia a migração e a ativação de células, como queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais (DELAVARY et al., 2011; KOH; DIPIETRO, 2011; MANTOVANI et al., 2002). Desta maneira, os macrófagos são células envolvidas tanto na instauração quanto na resolução da resposta inflamatória durante a cicatrização das feridas.

Figura 6 - Os macrófagos possuem plasticidade fenotípica.



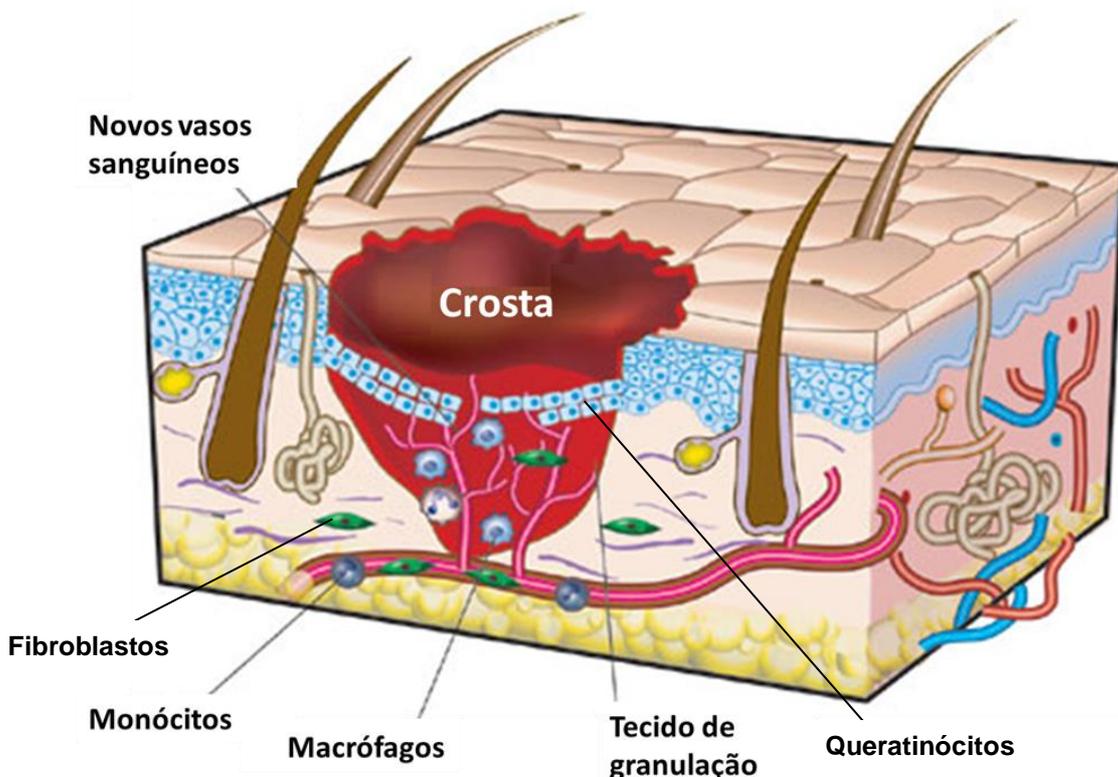
Esquema diferenciando a polarização M1 e M2 de macrófagos. Os monócitos podem ser classicamente ou alternativamente ativados para formar macrófagos M1 e M2, respectivamente. Os macrófagos M1 também podem se diferenciar em macrófagos M2 mediante a interação com fatores do microambiente. O fenótipo M1 é pró-inflamatório, fagocítico e bactericida, enquanto os macrófagos M2 atuam na resolução da inflamação e induz a produção de matriz extracelular, angiogênese e o fechamento da ferida. FONTE: Adaptado (HESKETH et al., 2017)

A desregulação nesse processo parece contribuir para o prejuízo na reparação tecidual (JETTEN et al., 2014; KHANNA et al., 2010). Em suma, a fase inflamatória é essencial para a limpeza do tecido lesado, assim como para a produção e para a liberação de citocinas e de fatores de crescimento que atuam estimulando células importantes durante o processo de reparo.

2.2.2 Fase proliferativa (formação do tecido de granulação)

À medida que a fase inflamatória é atenuada, ocorre uma intensa ativação de diversos tipos celulares, como queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, que são responsáveis por desempenhar papéis importantes na reepitelização, produção de matriz extracelular e angiogênese, respectivamente, eventos essenciais durante a formação do tecido de granulação (GURTNER et al., 2008; LEE, Jeong-Hyun et al., 2012).

Figura 7 - Diagrama representativo da fase proliferativa durante o reparo tecidual.



Durante a fase proliferativa ocorre a intensa ativação de diversos tipos celulares, incluindo queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, que desempenham funções importantes durante a restauração do epitélio, a produção da nova matriz extracelular e a formação de novos vasos sanguíneos, respectivamente. FONTE: Adaptado (GURTNER et al., 2008).

Nesta fase, intensifica-se o processo de reepitelização. Fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês Epidermal Growth Fator), TGF- β e fator de crescimento de fibroblastos (FGF, do inglês Fibroblast Growth Fator), produzidos, principalmente por macrófagos, estimulam a ativação dos queratinócitos, o que permite a restauração da integridade estrutural e funcional do epitélio (Figura 7, p.30) (KONDO; ISHIDA, 2010; MARTIN, Paul, 1997). A reepitelização auxilia no fechamento da ferida e depende de mudanças morfofuncionais dos queratinócitos, que se diferenciam de um fenótipo epitelial, com pouca motilidade celular, para um fenótipo proliferativo e migratório (KANT et al., 2014; LEE, JEONG-HYUN et al., 2012). Estas mudanças morfofuncionais englobam a dissolução dos contatos célula-célula e célula-matriz, seguida pelo aumento da migração de queratinócitos sobre a matriz extracelular provisória.

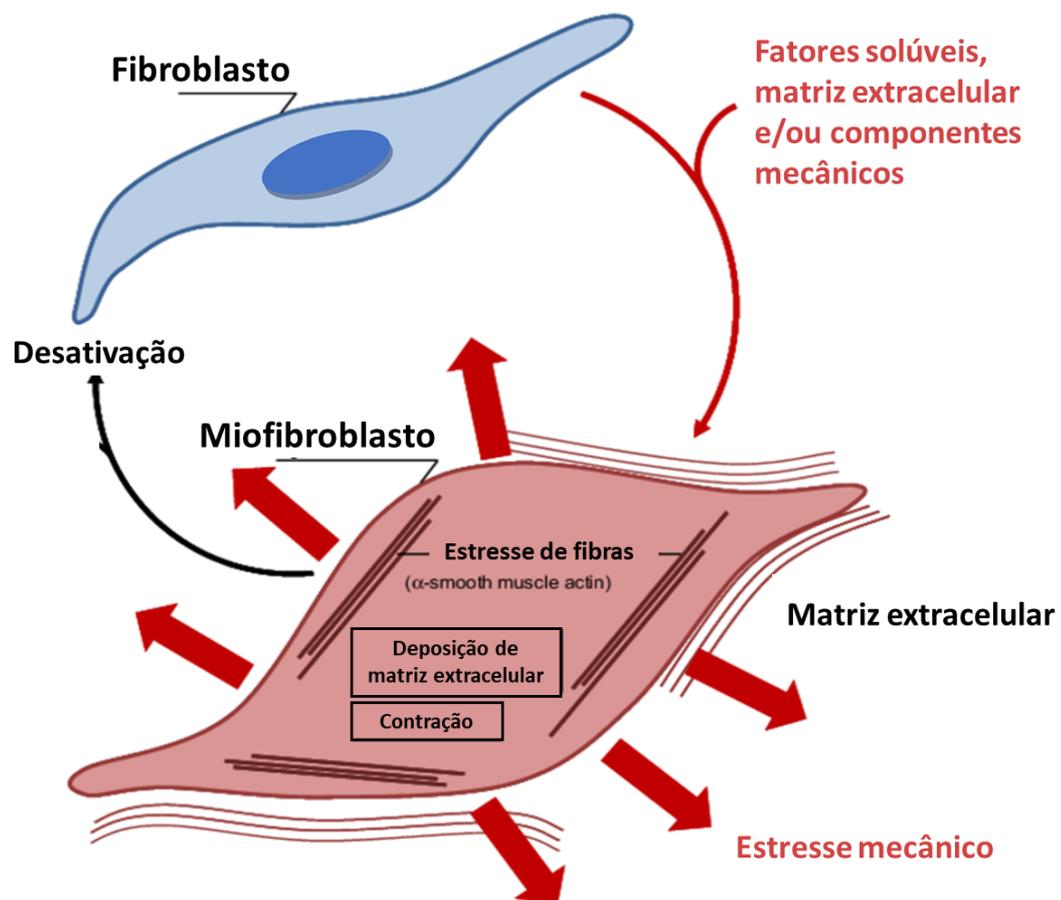
Neste sentido, evidências científicas indicam que o processo de transição epitélio mesenquimal (EMT, do inglês, Epithelial-mesenchymal transition) é fundamental durante a restauração do epitélio. Diversos fatores de crescimento, especialmente o TGF- β 1, estimulam os queratinócitos a entrar em processo de transição epitélio mesenquimal, tornando estas células com características mesenquimais, com maior capacidade motora, favorecendo a migração dos queratinócitos da borda para o centro da ferida, o que promove a reepitelização (HO et al., 2014). Uma vez alcançada a completa reepitelização, os queratinócitos sofrem estratificação, se diferenciam e produzem a nova lâmina basal, o que restaura a barreira protetora funcional deste tecido (LEE, et al., 2018; PONUGOTI et al., 2013).

2.2.2.1 Ativação dos fibroblastos

Além da restauração epitelial, a ativação dos fibroblastos é um evento chave durante a fase proliferativa, visto que a proliferação e a migração destas células possuem implicações importantes para a formação do tecido de granulação, síntese de colágeno e contração da ferida (LEE et al., 2010). Os fibroblastos infiltram para área da ferida e degradam o coágulo de fibrina recém-formado mediante a produção e liberação de metaloproteinases de matriz (MMPs), o que favorece a substituição da matriz de fibrina por tecido de granulação, formando um novo substrato para migração de queratinócitos em estágios posteriores do processo reparo.

De fato, os fibroblastos desempenham um importante papel na formação do tecido de granulação. Diversos fatores presentes no microambiente da ferida, incluindo moléculas solúveis, matriz extracelular e forças mecânicas, podem levar a ativação dos fibroblastos, que passam a expressar α -actina de músculo liso (α -SMA, do inglês, α -Smooth Muscle Actin) e tornam-se miofibroblastos (Figura 8). Dentre os fatores solúveis, o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1) é um importante modulador da função fibroblástica, levando a ativação e diferenciação destas células (DARBY; LAVERDET, 2014).

Figura 8 - Diagrama mostrando a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos.



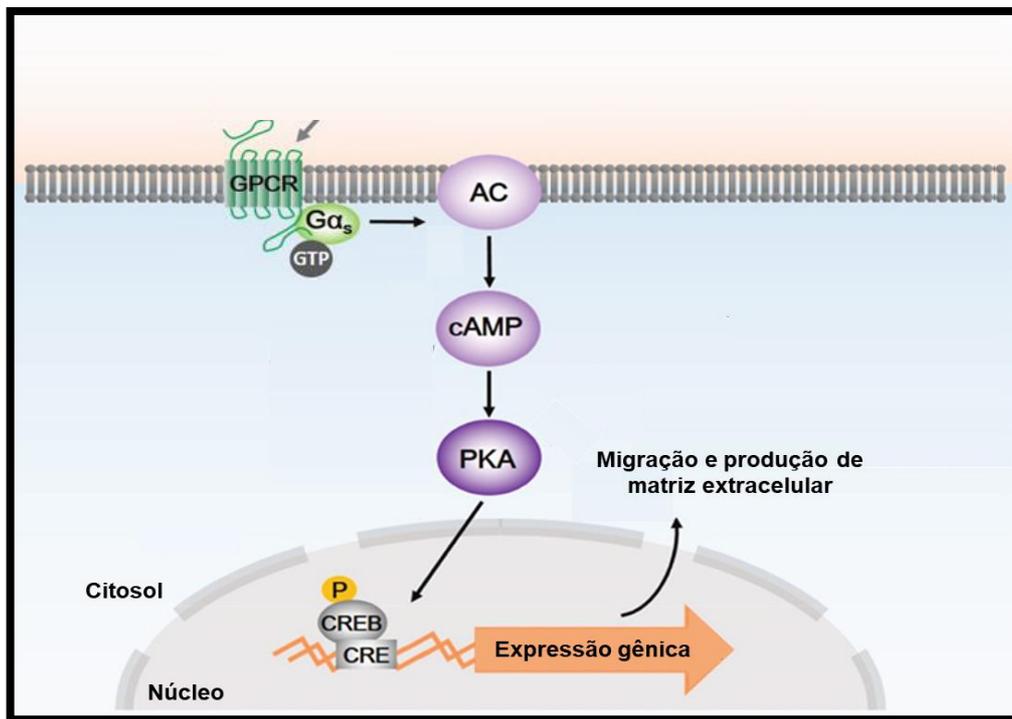
Diversos fatores, como moléculas solúveis, matriz extracelular e forças mecânicas, induzem a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos. FONTE: (DARBY e LAVERDET, 2014)

Uma vez diferenciadas em miofibroblastos, estas células apresentam atividade contrátil, que auxilia a contração da ferida, e produzem altas quantidades

de proteínas de matriz extracelular, incluindo colágenos, fibronectinas, proteoglicanos, lamininas, glicosaminoglicanos (GAGs) e ácido hialurônico, que além de formar a nova matriz, medeiam eventos migratórios e proliferativos de outros tipos celulares (DARBY e LAVERDET, 2014; KANAZAWA et al., 2010).

Os processos de migração e de produção de matriz extracelular podem ser regulados por diversas vias de sinalização intracelulares. Algumas evidências científicas vêm demonstrando o papel da via PKA/CREB em mediar diversos eventos celulares em fibroblastos. Esta via é caracterizada por regular a resposta dos fibroblastos a estímulos extracelulares, assim como por mediar o processo de migração, principalmente por induzir a transcrição gênica de fatores de crescimento e de componentes da matriz extracelular, além de regular mudanças no citoesqueleto das células (Figura 9) (EDIN et al., 2001; DELGHANDI et al., 2005).

Figura 9 - Diagrama representando a via de sinalização PKA/CREB.



A via PKA/CREB consiste em uma via importante durante a ativação dos fibroblastos. Diversos fatores externos podem ativar receptores acoplado a proteína G e deflagram uma cascata de sinalização intracelular, o que acarreta na ativação da enzima adenilato ciclase, que converte ATP em cAMP, que por sua vez ativa PKA. Uma vez ativada, PKA induz a fosforilação de CREB, que medeia a transcrição de genes envolvidos na migração e produção de matriz extracelular. FONTE: Adaptado (LI et al., 2017)

2.2.2.2 Processo de angiogênese

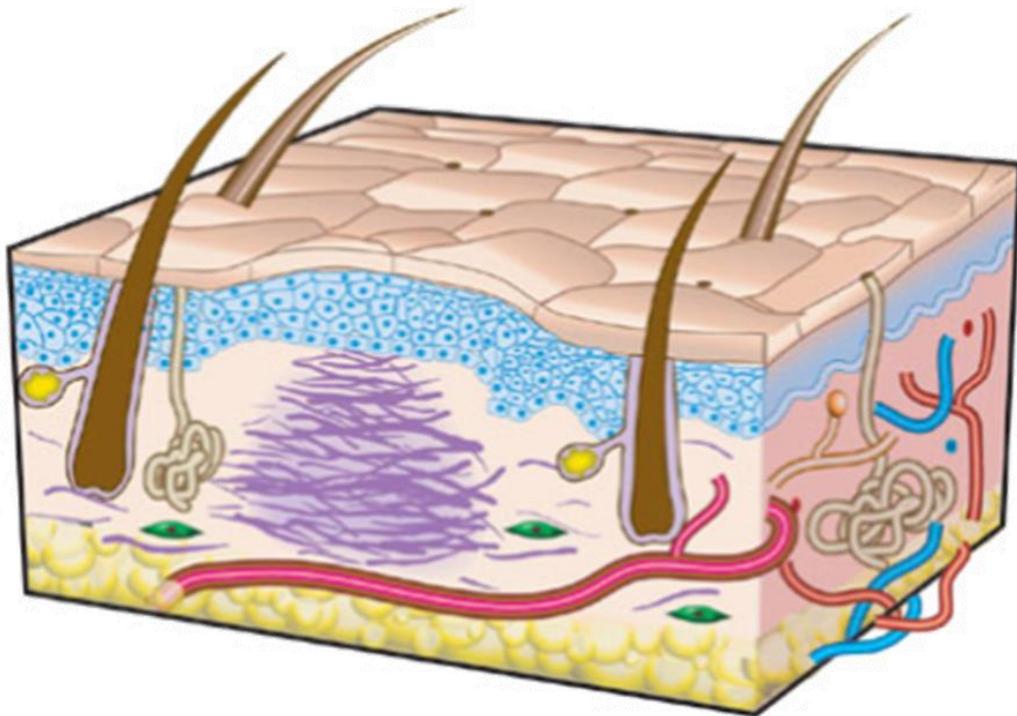
Outro evento importante que acontece durante esta fase, é o processo de angiogênese, que conceitualmente, consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. A angiogênese ocorre na matriz extracelular recém-formada, mediante a migração e a estimulação mitogênica das células endoteliais, e é responsável por restaurar a densidade vascular do tecido em reparação (DIPIETRO, 2016).

A angiogênese é caracterizada por alguns eventos celulares importantes. Para iniciar a formação de novos capilares, as células endoteliais devem degradar a lâmina basal subjacente e invadir o estroma do tecido circundante. Desta forma, fatores angiogênicos, como o VEGF, por exemplo, estimulam as células endoteliais a produzir e secretar MMPs, que atuam degradando a lâmina basal e a matriz extracelular perivascular, permitindo a migração e a invasão das células. Posteriormente, as células endoteliais migram de acordo com um gradiente quimiotático, e se estabelecem na área perivascular, diferenciando-se em novos vasos (LIEKENS et al., 2001). Todo este processo é essencial durante a formação do tecido de granulação, tendo em vista que o tecido cicatricial possui uma taxa metabólica alta, sendo requerido uma alta vascularização, o que permite um fornecimento adequado de nutrientes e oxigênio, assim como de células imunocompetentes, ao tecido (KANT et al., 2015).

2.2.3 Fase de remodelamento

Durante este estágio, todos os processos celulares e moleculares que foram ativados nas fases anteriores são atenuados. Desta forma, a maioria das células recrutadas, incluindo macrófagos, células endoteliais, e miofibroblastos sofrem apoptose, o que torna o tecido mais acelular, contendo poucas células e uma alta quantidade de proteínas de matriz extracelular, principalmente colágenos (Figura 10, p. 35) (GURTNER et al., 2008).

Figura 10 - Diagrama representativo da fase de remodelamento durante o reparo tecidual.



Durante a fase de remodelamento, a maioria das células que foram recrutadas no tecido de granulação sofrem apoptose, o que torna o tecido mais acelular, com uma abundante matriz extracelular, que se torna remodelada ao longo do tempo. FONTE: Adaptado (GURTNER et al., 2008)

O remodelamento da matriz de colágeno depende da síntese e degradação continuada desta proteína. A degradação do colágeno na ferida é controlada por diversas enzimas proteolíticas da classe das MMPs, que são secretadas pelos macrófagos, células endoteliais, e principalmente, fibroblastos. O processo de remodelamento é essencial para proporcionar um aumento na resistência à tração ao tecido lesionado. No entanto, é importante ressaltar que o tecido nunca recupera as propriedades de uma pele não lesionada (SINGER; CLARK, 1999).

2.3 Fatores que afetam a cicatrização de feridas cutâneas

Uma série de fatores, locais e sistêmicos, possuem a capacidade de afetar, negativamente, o processo normal de cicatrização, interferindo em uma ou mais fases desse processo, o que pode acarretar na formação de feridas crônicas que não cicatrizam (GUO; DIPIETRO, 2010).

Os fatores capazes de interferir no curso normal da cicatrização podem ser agrupados em duas categorias distintas: os fatores locais e os sistêmicos (Tabela 1). Enquanto que os fatores locais são condições que ocorrem localmente e exclusivamente no microambiente da ferida, como por exemplo, uma baixa na oxigenação e a presença de infecção, os fatores sistêmicos são aqueles que afetam o metabolismo de forma geral, incluindo algumas patologias, como o diabetes, por exemplo (GUO e DIPIETRO, 2010).

Tabela 1 - Fatores que afetam a cicatrização de feridas.

Fatores Locais	Fatores Sistêmicos
Oxigenação	Idade
Infecção	Hormônios sexuais
Corpos estranhos	Estresse
	Isquemia
	Doenças: diabetes, fibrose, desordens hereditárias
	Obesidade
	Medicação: Glicocorticóides, fármacos anti-inflamatórios, quimioterapia
	Alcoolismo e tabagismo
	Condições imunodepressoras: câncer, terapia radioativa, AIDS
	Nutrição

Uma série de fatores, locais e sistêmicos, podem afetar, negativamente, o processo normal de cicatrização de feridas cutâneas. FONTE: Adaptado (GUO e DIPIETRO, 2010).

2.3.1 Diabetes e cicatrização de feridas

O diabetes mellitus é em um distúrbio multissistêmico, caracterizado por um quadro de hiperglicemia crônica, que induz uma série de alterações fisiológicas em tecidos e células que comprometem o estado homeostático do indivíduo, levando ao comprometimento de diversos processos biológicos essenciais, incluindo o processo de reparo tecidual (SINGER; CLARK, 1999).

O retardo no processo de cicatrização em pacientes com diabetes está associado a diversas alterações celulares e moleculares nos tecidos. Dentre as alterações, pode-se citar um quadro inflamatório prolongado, neovascularização prejudicada, síntese diminuída de colágeno, aumento dos níveis de proteinases (MMPs) e função defeituosa de células, como macrófagos e fibroblastos (FAHEY et al., 1991; GALEANO et al., 2004; GOODSON e HUNG, 1977; GUO e DIPIETRO, 2010; MARTIN, ALEXANDRA et al., 2003).

2.4 Tratamento de feridas crônicas

Feridas crônicas causam grandes complicações na prática clínica, incluindo um alto número de hospitalizações prolongadas e a necessidade do uso de produtos específicos, que levam a custos consideráveis. Embora diversas abordagens tenham sido testadas com o intuito de evitar atrasos no processo de cicatrização de feridas, as opções para o tratamento de feridas crônicas ainda são escassas (PEREIRA; BÁRTOLO, 2016).

O cuidado com feridas tem se tornado cada vez mais importante devido ao aumento de feridas crônicas e à morbidade associada a elas. Dentre os tratamentos disponíveis, encontra-se o desbridamento, que consiste na remoção de material de tecido não viável. Adicionalmente, o uso de alguns curativos também é utilizado para tentar proteger a ferida da infecção e também ajudar a promover o próprio processo de cicatrização de feridas. De fato, tem sido desenvolvido mais recentemente, curativos associados com compostos antimicrobianos. Estes materiais combinam curativos tradicionais para feridas, tais como espumas de poliuretano ou hidrogéis, com compostos com propriedades antimicrobianas, incluindo quitina e polihexametileno biguanida (HAN; CEILLEY, 2017).

Apesar das abordagens terapêuticas disponíveis, um fármaco eficaz direcionado para o tratamento de feridas que não cicatrizam, ainda não foi desenvolvido. Tendo em vista que as feridas crônicas representam um sério problema de saúde pública, a busca por alternativas terapêuticas para o tratamento desta complicação torna-se necessária.

Neste contexto, um grande número de plantas e produtos derivados de vegetais têm sido usados em práticas medicinais tradicionais em todo o mundo para o tratamento de lesões, feridas e queimaduras (AGRA et al., 2015). Assim, a prospecção de produtos de origem vegetal com potenciais para favorecer a cicatrização mostra-se como uma alternativa interessante para o desenvolvimento de novos fármacos.

2.5 Produtos naturais

Os produtos naturais e seus derivados são utilizados durante muito tempo como a base para o tratamento de diversas patologias. Os produtos de origem vegetal são fontes de substâncias potencialmente aplicáveis com propriedades biológicas, farmacológicas ou terapêuticas (CALIXTO, 2005). Estima-se que cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto 50% são de origem sintética, mas relacionados aos princípios isolados de plantas medicinais (SILVA; CECHINEL, 2002).

Dentre os produtos naturais, os triterpenos são abundantes no reino vegetal e estão presentes nos frutos, folhas e cascas de plantas medicinais (HILL e CONNOLLY, 2013). Inúmeros trabalhos *in vitro* e *in vivo* tem mostrado as múltiplas propriedades farmacológicas dos triterpenos, como por exemplo efeito anticancerígeno (LASZCZYK, 2009; LU, MINGXIA et al., 2018), antioxidante (RAMACHANDRAN; PRASAD, 2008), anti-inflamatório (AGRA et al., 2016; ALMEIDA et al., 2015; WANG et al., 2018) e pró-cicatrizante (AGRA et al., 2015). Desta forma, considerando a ampla gama de atividades biológicas dos triterpenos, torna-se interessante utilizá-los em estudos farmacológicos com o objetivo de desenvolver novas alternativas terapêuticas para diferentes condições patológicas

Dentre as diversas atividades farmacológicas dos triterpenos, o efeito pró-cicatrizante destas moléculas tem sido bem documentado. Recentemente, foi mostrado que diversos triterpenos naturais, incluindo asiaticoside, astragaloside IV,

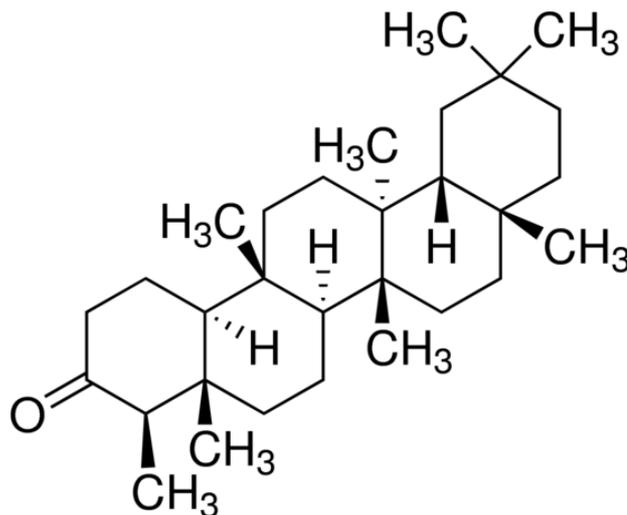
bacoside A, cicloastragenol, cicloocantósido E, ginsenosídeo Rd, lupeol, madecosídeo, ácido oleanólico e ácido ursólico, têm efeitos benéficos durante o processo de cicatrização, acelerando a reepitelização, e/ou aumentando a deposição de colágeno no tecido da ferida (AGRA et al., 2015).

2.6 Friedelina

Dentre os triterpenos, destaca-se o triterpeno pentacíclico natural friedelina, por ser possuidor de diversos efeitos biológicos importantes. Esta molécula pode ser encontrada em diversas fontes vegetais, incluindo plantas do gênero *Vismia*, *Azima* e *Clusia*. Algumas espécies destes gêneros possuem atividade farmacológicas, como por exemplo a espécie *Clusia nemorosa* (FERRO et al, 2013).

Este triterpeno possui uma estrutura molecular característica dos terpenos, sendo constituído por três unidades isoprênicas em cinco anéis carbônicos formados por ligações saturadas. Além disso, avaliando a estrutura química do composto, pode-se observar a presença de oito grupamentos CH_3 e um grupamento metil no esqueleto da molécula (Figura 11).

Figura 11– Estrutura molecular do triterpeno pentacíclico friedelina.



Friedelina consiste em um metabólito secundário vegetal da classe dos terpenos. FONTE: Sigma Aldrich

A friedelina é caracterizada por possuir diversas propriedades farmacológicas, incluindo efeitos gastroprotetores em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos (ANTONISAMY et al., 2015), atividade hipolipidêmica (DURAI PANDIYAN et al., 2016), efeitos antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos (ANTONISAMY et al., 2011), efeitos antioxidante e protetor hepático (SUNIL et al., 2013), bem como atividade citotóxica em linhagens celulares de câncer *in vitro* (LU, BAIYI et al., 2010; SUBASH-BABU et al., 2017). Adicionalmente, estudos do nosso grupo de pesquisa evidenciaram que este triterpeno possui um efeito pró-cicatrizante em feridas de animais não diabéticos, por aumentar a taxa de contração da ferida destes animais, assim como aumentar a deposição de colágeno total no tecido cicatricial (FERRO et al, 2014).

No entanto, o efeito da friedelina sobre a cicatrização de feridas cutâneas na condição diabética ainda não foi descrito.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade cicatrizante do triterpeno pentacíclico natural friedelina sobre feridas cutâneas em camundongos diabéticos, assim como o efeito deste triterpeno sobre a ativação de fibroblastos *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

De maneira mais específica, objetivou-se:

- Avaliar, nas lesões cutâneas de animais diabéticos, o efeito da friedelina sobre:
 - a. A contração da ferida
 - b. O padrão histopatológico tecidual;
 - c. A produção de colágeno total;
 - d. A expressão de MMP-9/TIMP-1;
 - e. A formação de novos vasos (angiogênese).
- Avaliar *in vitro*, o efeito da friedelina sobre a:
 - a. A viabilidade de fibroblastos
 - b. A migração de fibroblastos;
 - c. A produção de matriz extracelular e TGF- β 1 por fibroblastos.
- Identificar possíveis vias de sinalizações envolvidas durante o processo de migração dos fibroblastos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

A friedelina (PubChem CID: 91472) (sigma, 855022), aloxana, PBS, meio de cultura DMEM, MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)], os anticorpos anti-fibronectina (sigma, F3648), anti-laminina (sigma, L9393) e Goat anti-habbit IgG -FITC (sigma F0382), assim como os inibidores farmacológicos, Protein Kinase A Inhibitor Fragment 6-22 amide (sigma, P6062) e KG-501 (70485) foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich, MO, USA). O soro fetal bovino e gentamicina foram adquiridos da Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 25-40 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BioCen-UFAL). Os animais tiveram livre acesso à água e ração durante todos os experimentos e foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os experimentos foram realizados após aprovação pela Comissão de Ética no Uso Animal da UFAL (CEUA/UFAL, protocolo número 16/2014).

4.3 Indução do *diabetes mellitus*

A indução do *diabetes mellitus* tipo 1 foi realizada mediante a administração de aloxana. A aloxana (C₄H₂N₂O₄) é um derivado da pirimidina amplamente utilizado para induzir, em animais de experimentação, o estado diabético semelhante a diabetes humana tipo 1. Seu mecanismo de ação resulta da necrose seletiva das células beta pancreáticas decorrente do acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) (IGHODARO et al., 2018).

Neste estudo, para a indução do estado diabético os animais foram mantidos em jejum durante 12 horas, e em seguida, foram submetidos a uma única injeção por via intravenosa de aloxana (65 mg/kg, intravenosa no plexo orbital). No 21º dia após a indução do diabetes, o índice glicêmico dos animais foi mensurado utilizando

um glucosímetro (TRUEread®), e os animais com a glicemia ≥ 300 mg/dL foram considerados diabéticos e selecionados para o experimento.

4.4 Indução da lesão excisional

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos foram confeccionados campos cirúrgicos fenestrados e todo instrumental cirúrgico e as compressas de gaze foram esterilizados sob calor úmido (autoclave). As seringas, agulhas, luvas e lâminas de bisturi foram de uso descartável e todas as técnicas de assepsia foram observadas durante todo o protocolo experimental. O dorso foi escolhido para confeccionar as feridas por ser um local com o melhor sítio para incisão, pois evita irritação por contato e auto-canibalismo. Após 22 dias da indução do diabetes, os camundongos foram anestesiados com xilazina (5 mg/kg) e cetamina (35 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p) e submetidos ao resseccionamento de um fragmento cutâneo circular de aproximadamente 1 cm de diâmetro, até a exposição da fáscia muscular na região dorsal de animais diabéticos e não-diabético (AGRA et al., 2013).

4.5 Divisão dos grupos e regime de tratamento

Após 24 h da indução da lesão, os animais foram separados nos grupos experimentais descritos abaixo e tratados topicamente com salina ou friedelina uma vez ao dia por 11 dias consecutivos:

- Grupo NDB: Animais não diabéticos e tratados diariamente com salina;
- Grupo DB: Animais diabéticos e tratados diariamente com salina;
- Grupo DB-FD 0,1%: Animais diabéticos e tratados diariamente com FD 0,1%;
- Grupo DB-FD 1%: Animais diabéticos e tratados diariamente com FD 1%.

4.6 Análise macroscópica

Para a análise macroscópica e a análise da taxa de contração da ferida ao longo do tempo, foi realizada aquisição de fotografias das lesões com câmera digital, nos dias 0, 3, 7 e 12. Em seguida, as fotografias foram analisadas no software ImageJ, onde foi possível mensurar a área do ferimento, e o cálculo da contração da ferida foi realizado através da seguinte fórmula:

$$\text{Contração da ferida (\%)} = \frac{\text{Área do dia 0} - \text{Área do dia n}}{\text{Área do dia 0}} \times 100$$

4.7 Análise histopatológica da ferida

Para avaliar o microambiente da ferida, os animais foram eutanasiados com aprofundamento anestésico (tiopental, 200 mg/Kg) no sétimo dia após a indução da ferida, e as amostras de tecido, incluindo a ferida e a pele normal adjacente, foram coletadas. Em seguida, as amostras de pele foram fixadas em formalina por 24 horas, embebidas em parafina e cortadas em seções de 5 µm de espessura em um micrótomo. Posteriormente, os espécimes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas foram visualizadas sob um microscópio de luz (Olympus BX51) na ampliação 40X. Adicionalmente, as lâminas coradas foram utilizadas para realizar a contagem diferencial de células no tecido da ferida. Para tanto, dez campos aleatórios foram avaliados no aumento de 1000X. Neutrófilos e fibroblastos foram diferenciados pela morfologia dos núcleos.

4.8 Avaliação da deposição de colágeno

A deposição de colágeno total foi avaliada mediante a coloração Tricrômio de Masson. Resumidamente, os tecidos de pele fixados em formalina foram cortados em seções de 5 µm de espessura em um micrótomo e os espécimes foram corados com tricrômico de Masson. As seções foram visualizadas em microscópio de luz (Olympus BX51) e a quantificação do colágeno total foi realizada utilizando o software ImageJ.

4.9 Extração de RNA, síntese de cDNA e RT-PCR

A expressão gênica de MMP-9 e TIMP-1 no tecido cicatricial foi avaliada mediante ao método de RT-PCR semi-quantitativo. Para isso, as amostras de pele foram coletadas, trituradas, e em seguida o RNA total foi extraído utilizando Trizol (Invitrogen). Posteriormente, o RNA total foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de 260 e 280 nm utilizando o leitor NanoDrop (NanoDrop

Technologies, Wilmington, DE), e a qualidade do RNA total foi avaliada por eletroforese em gel.

A síntese do cDNA foi realizado utilizando o Kit RT M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*). Resumidamente, 2000 ng de RNA total foi tratado com DNase I (Invitrogen) para remover traços de contaminação de DNA e os cDNAs foram sintetizados usando a enzima transcriptase reversa (StrataScript®), de acordo com os protocolos do fabricante.

A RT-PCR foi realizada utilizando oligonucleotídeos específicos para MMP-9 e TIMP-1 (Tabela 2). Para isso, as amostras de cDNAs obtidas foram incubadas com tampão PCR buffer 1x, 1,25 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTPs, 0,5 U de TaqPolimerase, 20 pM de oligonucleotídeos e água DEPC, no volume final de 25 µL. A reação de amplificação foi realizada utilizando um termociclador (TECHNE, TC-5000), com condições específicas mostradas na tabela 2. Posteriormente, 10 µL de cada amostra foram submetidas a eletroforese em gel de agarose com corante intercalante (brometo de etídio), e visualizadas utilizando um transluminador (Loccus, L-Pix EX 20x20). As análises semiquantitativas foram realizadas por meio do software ImageJ, onde foi possível mensurar a intensidade das bandas, e a expressão do mRNA foi quantificada pela razão entre o gene alvo (MMP-9 ou TIMP-1) e o gene endógeno (β-actina).

Tabela 2 – Oligonucleotídeos

Genes		Oligonucleotídeos (5'---3')	Δt Anelamento	Ciclos	Amplicon	Sequência GenBank
β-actina	Forward	ACACAGTGCTGTCTGGTGGT	56 °C	31	125 bp	NM_007393.5
	Reverse	GTAAGTGGCGCTCAGGAGGAG				
MMP-9	Forward	TCGCGTGGATAAAGGAGTTCT	56 °C	31	104 bp	NM_013599.4
	Reverse	TCACACGCCAGAAGAATTTG				
TIMP-1	Forward	GACCTATAGTGCTGGCTGTGG	56 °C	31	121 bp	NM_011593.2
	Reverse	GTAGTCCTCAGAGCCCACGA				

Oligonucleotídeos utilizados neste estudo. β-actina foi utilizado como gene constitutivo.

4.10 Imunohistoquímica para a proteína CD31

Cortes congelados das feridas foram utilizados para a análise imunohistoquímica através do método padrão de estreptavidina-biotina-peroxidase (BD Biosciences). Este ensaio foi realizado para evidenciar a molécula de adesão celular endotélio-plaquetária 1 (PECAM-1, do inglês, Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) (CD31), presente nas células endoteliais no tecido cicatricial. Os cortes foram fixados em acetona, e posteriormente hidratados com PBS e expostos a uma solução a 0,3% de peróxido de hidrogênio à temperatura ambiente durante 10 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente, os cortes foram expostos a uma solução, contendo 10% de soro fetal bovino em PBS, para o bloqueio das ligações não específicas durante 40 minutos. Em seguida, foi feita a incubação com o anticorpo primário monoclonal anti-CD31 (1:100) por 60 minutos, seguido da exposição ao anticorpo secundário biotilado, na concentração de 10 µg/mL por 30 minutos. Foi utilizado diaminobenzidina (DAB), para a revelação da marcação, e os cortes foram contra corados com hematoxilina.

Os vasos sanguíneos foram evidenciados pela cor acastanhada em contraste com um fundo discretamente azulado, e analisadas utilizando o software ImageJ para a obtenção dos gráficos, onde a quantificação em pixels das áreas que sofreram reatividade com o anticorpo é diretamente proporcional a porcentagem de vasos.

4.11 Cultura celular

Fibroblastos embrionários da linhagem NIH/3T3 provenientes de camundongos *swiss* foram semeados em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 2 µM de L-glutamina e 40 µg/mL de gentamicina. As células foram mantidas em estufa com atmosfera úmida de CO₂ a 5% à 37 °C.

4.12 Avaliação da viabilidade celular

O efeito da friedelina (Sigma-Aldrich - EUA) sobre a viabilidade de fibroblastos foi avaliado mediante ao ensaio de MTT. Este ensaio consiste em um método

colorimétrico que avalia, de forma indireta, a viabilidade celular por mensurar a atividade mitocondrial das células (MOSMAM, 1983). Para este ensaio, os fibroblastos (7×10^3 células/poço) foram semeados em microplacas de 96 poços e mantidas *overnight* em estufa de CO₂ para adesão celular. Posteriormente, as células foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de friedelina (1, 10, 50 e 100 µM) ou apenas meio DMEM 2% SBF (controle). Após a incubação com o tratamento por 24 h, foi adicionado 22,5 µL/poço de MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] (5 mg/mL em PBS). Seguido o período de incubação por 4 h com MTT, foi adicionado 150 µL de dimetilsufóxido (DMSO), para solubilizar o formazan produzido. A absorbância de cada poço foi mensurada usando um espectrofotômetro de microplacas e a densidade óptica (DO) foi medida a 540 nm. A porcentagem de célula viáveis foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{Densidade óptica das células tratadas}}{\text{Densidade óptica das células não tratadas}} \times 100$$

4.13 Contagem celular

Para confirmar o ensaio de MTT, foi realizada a contagem celular utilizando a câmara de Neubauer. As células (5×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 6 poços, *overnight*. Em seguida, as células foram tratadas com 100 µM de friedelina ou apenas com meio DMEM 2% SBF (controle) por 24 h. Após o período de incubação com o tratamento, as células foram tratadas com tripsina para desadesão e contadas, pelo método de exclusão com tripan, utilizando a câmara de Neubauer.

4.14 Ensaio de migração celular

A capacidade da friedelina em induzir a migração em fibroblastos foi avaliada pelo ensaio de migração horizontal (*scratch-wound healing*). Para este experimento, os fibroblastos (7×10^4 células/poço) foram semeados em placas de 24 poços e mantidos *overnight* em estufa para a adesão celular e formação de uma monocamada com aproximadamente 90% de confluência. Após este período, as células foram incubadas por 2 h com 5 µg/mL de mitomicina C para inibir a

proliferação celular. Posteriormente, foi realizado um risco linear na monocamada de células, utilizando uma ponteira p200 e, em seguida, o meio foi desprezado. Os poços foram lavados com PBS e as células tratadas com friedelina (1 e 100 μM) ou apenas meio DMEM 2% SBF (controle).

Com o objetivo de avaliar as possíveis vias moleculares envolvidas na migração celular induzida pela friedelina, as células foram pré-tratadas, por 2 h antes do risco, com os inibidores de algumas quinases importantes (Tabela 3) durante o processo de migração e produção de matriz extracelular.

Tabela 3 - Inibidores farmacológicos

Alvo	Inibidor farmacológico	Concentração utilizada (μM)
PKA	Proteína quinase A fragmento inibidor 6-22 amida (iPKA)	10
CREB	KG-501 (iCREB)	25

Inibidores farmacológicos utilizados neste estudo a fim de avaliar as possíveis vias moleculares envolvidas nos efeitos induzidos pela friedelina sobre a migração celular.

A migração celular foi documentada mediante a aquisição de fotomicrografias nos tempos 0 e 24 h após o risco, que foram analisadas utilizando o software ImageJ, de modo que foi determinada quantitativamente a porcentagem de fechamento da área inicial formada. O valor da migração das células em porcentagem foi obtido mediante o seguinte cálculo:

$$\% \text{ Migração} = \frac{(\text{Área do tempo 0h} - \text{Área do tempo 24h})}{\text{Área do tempo 0h}} \times 100$$

4.15 Imunofluorescência

O efeito da friedelina sobre a produção de fibronectina, laminina e TGF- β 1 foi avaliado através da técnica de imunofluorescência indireta. Para isso, as células (7×10^3) foram semeadas em lâminas LabTeks e mantidas *overnight* em atmosfera

úmida de CO₂ a 37 °C. Após a adesão, as células foram tratadas com 100 µM de friedelina ou meio DMEM 2% SBF (controle) por 24 h. Em seguida, as células foram fixadas com metanol por 10 minutos. Para o bloqueio dos sítios de ligações inespecíficos foi utilizado PBS/BSA (1%). As células foram incubadas em temperatura ambiente e em câmara escura e úmida com anticorpo primário anti-fibronectina, anti-laminina ou anti-TGF-β1 (1:50) por 1 hora. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo GAR-FITC por 45 minutos. Os núcleos foram contra-corados com DAPI. Para a montagem das lâminas utilizou-se uma solução de PBS/glicerina e lamínulas de vidro.

As fotomicrografias foram obtidas por microscopia de fluorescência e avaliadas utilizando o software ImageJ. A intensidade de fluorescência em pixels das áreas que sofreram reatividade com o anticorpo é diretamente proporcional a produção da molécula analisada. As marcações em verde indicam a marcação específica da fibronectina, laminina ou TGF-β1 e as marcações em azul evidenciam os núcleos celulares.

4.16 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), realizados em triplicata e analisados estatisticamente empregando-se o teste t ou a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste de Newman Keuls. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Todos os resultados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc, San Diego CA, EUA).

5 RESULTADOS

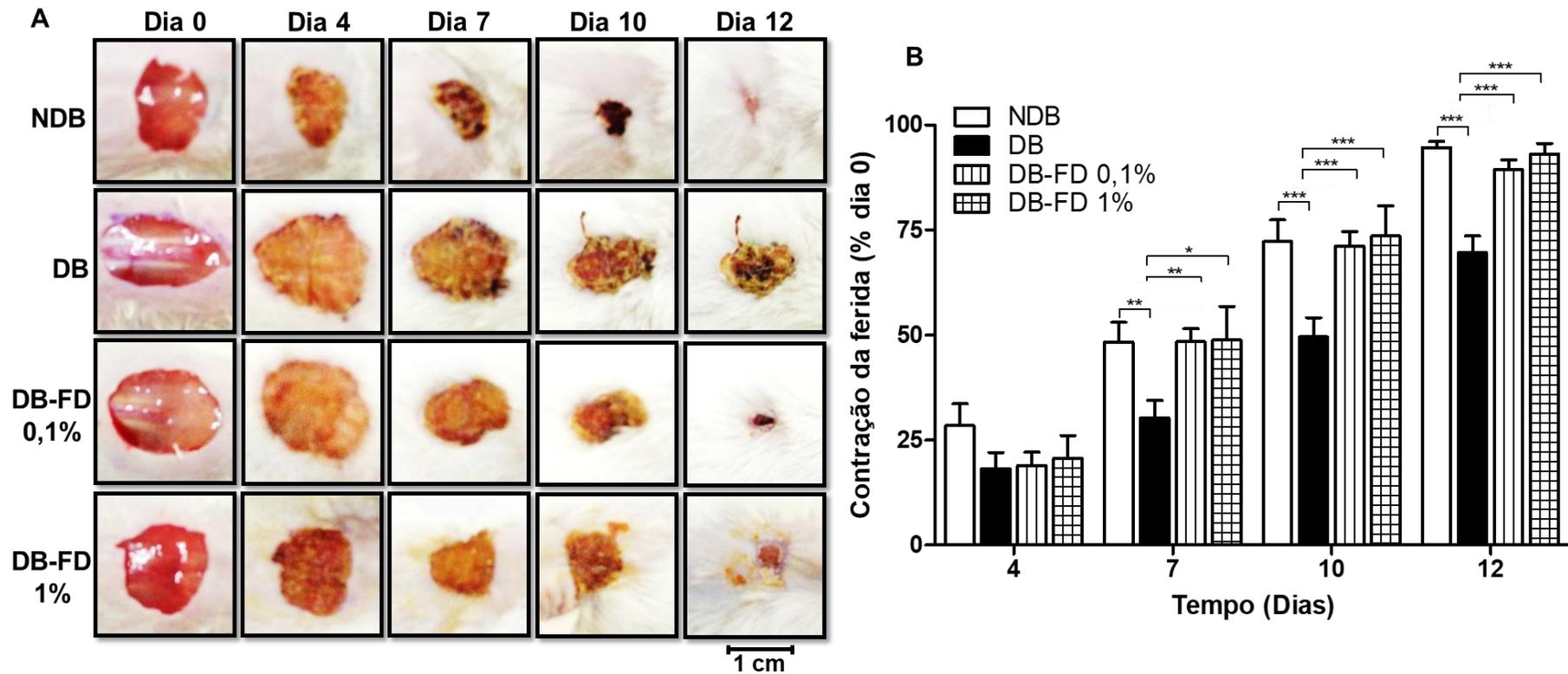
5.1 O tratamento tópico com a friedelina restaura o fechamento da ferida em animais diabéticos

Durante o curso da cicatrização, o fechamento da ferida consiste em um evento importante para a restauração da homeostasia tecidual, o que torna este parâmetro um importante indicador do reparo tecidual.

Como evidenciado na figura 12 (p. 51), após 7 dias da indução da lesão os animais diabéticos (DB) apresentaram um retardo significativo na contração da ferida quando comparados com os animais não-diabéticos (NDB), característica que persistiu ao longo dos demais dias de análise. No dia 12 pós ferida, os animais não diabéticos apresentaram uma contração da ferida de $94,7 \pm 1,5\%$ enquanto os diabéticos apresentaram uma taxa de contração de $69,6 \pm 4,1\%$, o que reproduz o comprometimento do processo cicatricial associado à condição diabética.

Animais diabéticos tratados topicamente com friedelina (DB-FD), independentemente das concentrações utilizadas, mostraram um aumento na contração da ferida em comparação com os camundongos diabéticos. Conforme apresentado na figura 12B (p. 51), no sétimo dia de análise, foram observadas diferenças estatísticas significativas no perfil de contração da ferida entre os grupos DB e DB-FD e essa diferença foi mantida até o dia 12 pós-ferimento.

Figura 12 – O tratamento tópico com friedelina restaura o processo de cicatrização em animais diabéticos



(A) Fotografias representativas da análise macroscópica e (B) Contração da ferida (%) dos grupos controle não diabéticos (NDB), diabéticos (DB) e diabéticos tratados com friedelina (DB-FD) nas doses de 0,1% e 1%. As colunas e as barras verticais representam a média \pm EPM, respectivamente. A análise estatística foi realizada mediante ao teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls ($n=7$), $*p < 0,01$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

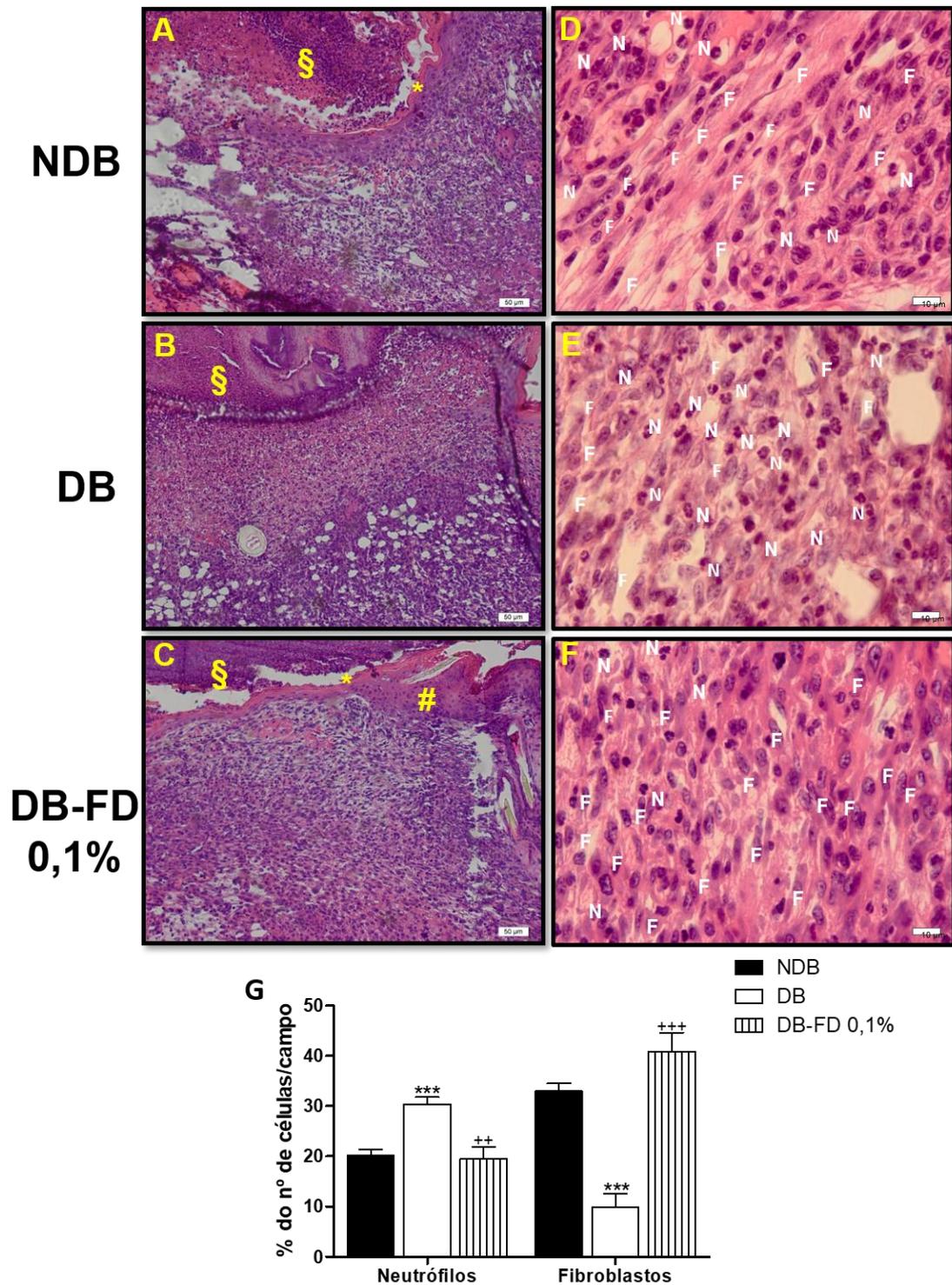
5.2 Friedelina melhora a formação do tecido de granulação em feridas diabéticas

Considerando que o tratamento tópico com a friedelina nas concentrações de 0,1% e 1% exibiram o mesmo perfil de fechamento de ferida, decidiu-se seguir com as análises utilizando apenas a menor concentração testada (0,1%) de friedelina.

A figura 13 (p.53) é referente às fotomicrografias representativas de cortes histopatológicos corados por HE de feridas cutâneas proveniente de animais não-diabéticos (NDB), diabéticos (DB) e diabéticos tratados com friedelina a 0,1% (DB-FD 0,1%) no sétimo dia de análise.

No sétimo dia pós-ferimento, foi observado a presença de uma crosta acima do epitélio em todos os grupos analisados. Nos camundongos não-diabéticos notou-se ainda uma intensa área de reepitelização, com uma evidente quantidade de queratinócitos (Figura 13A, p.53), característica que não foi observada nos animais diabéticos (Figura 13B, p.53). Entretanto, a aplicação tópica de friedelina proporcionou a reepitelização nas feridas de animais diabéticos (Figura 13C, p.53). Além disso, os camundongos diabéticos apresentaram um tecido de granulação com alto infiltrado inflamatório, com um elevado número de neutrófilos e limitada proliferação de fibroblastos. Quando as feridas destes animais diabéticos foram tratadas com friedelina (DB-FD) observou-se uma diminuição no infiltrado de neutrófilos e um aumento no número de fibroblastos em comparação com os animais diabéticos.

Figura 13 – Efeito da aplicação tópica de friedelina no perfil histopatológico das feridas.

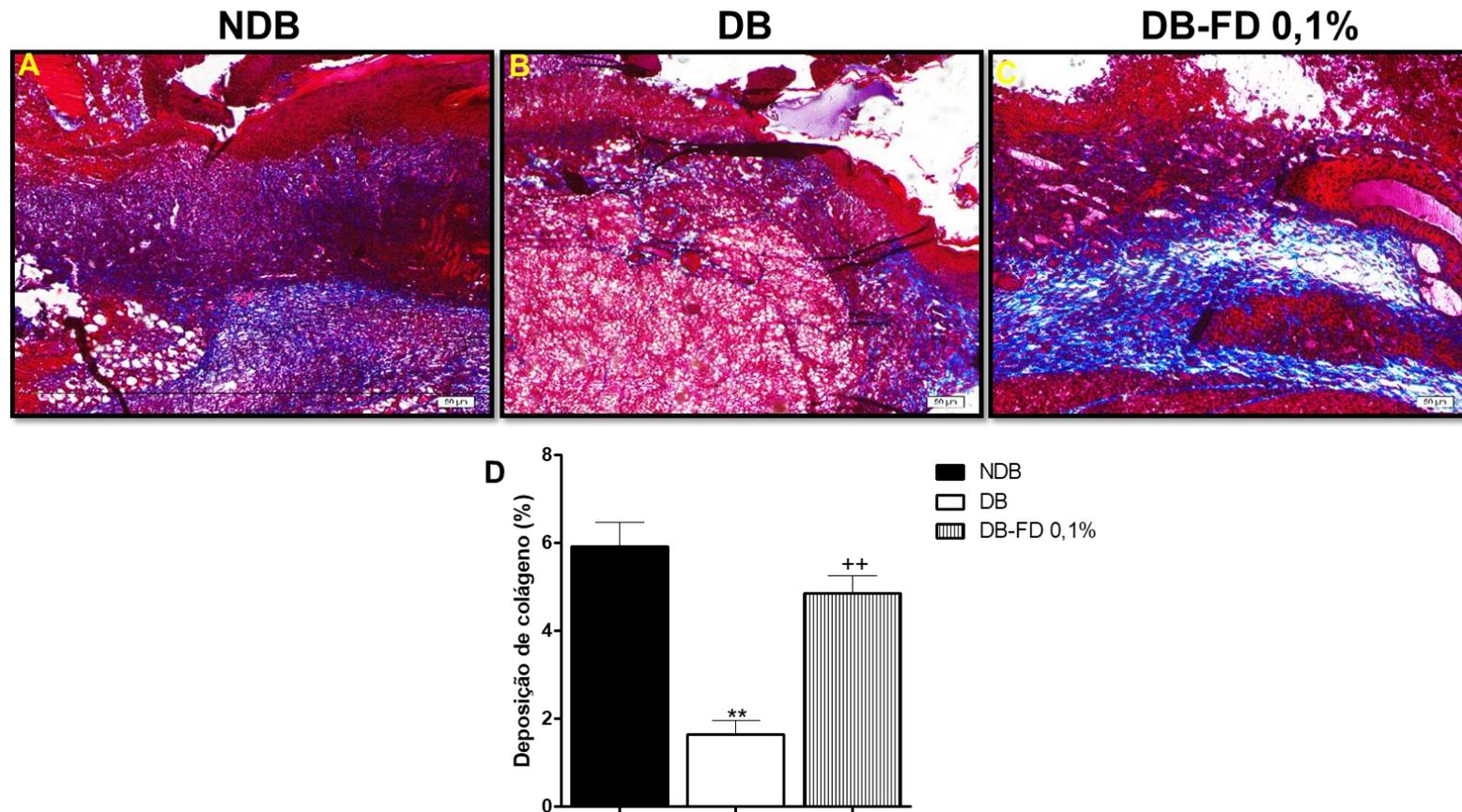


(A-F) Fotomicrografias representativas de seções histopatológicas coradas por H&E de feridas cutâneas de animais não-diabéticos (NDB), diabéticos (DB) e diabéticos tratados topicamente com friedelina a 0,1% (DB-FD 0,1%) no sétimo dia de análise. § presença de crosta; * queratinócitos em atividade; # Organização do epitélio recém-formado. (G) Quantificação do número de neutrófilos e fibroblastos na área da ferida. As colunas e as barras verticais representam a média \pm EPM, respectivamente. A análise estatística foi realizada mediante ao teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls, *** $p < 0,001$ (NDB vs. DB), ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (DB vs. DB-FD 0,1%).

5.3 A aplicação tópica com friedelina aumenta a deposição de colágeno total em feridas de animais diabéticos.

Conforme apresentado na figura 14 (p. 55), no sétimo dia após a indução da ferida, os camundongos diabéticos (DB) apresentaram uma diminuição acentuada na deposição de colágeno em comparação aos animais não-diabéticos (NDB). Tal redução na deposição de colágeno foi completamente revertida após aplicação tópica de friedelina nas feridas de animais diabéticos, o que indica uma provável ação da friedelina sobre as funções dos fibroblastos.

Figure 14 – Friedelina aumenta a deposição de colágeno total em camundongos diabéticos.

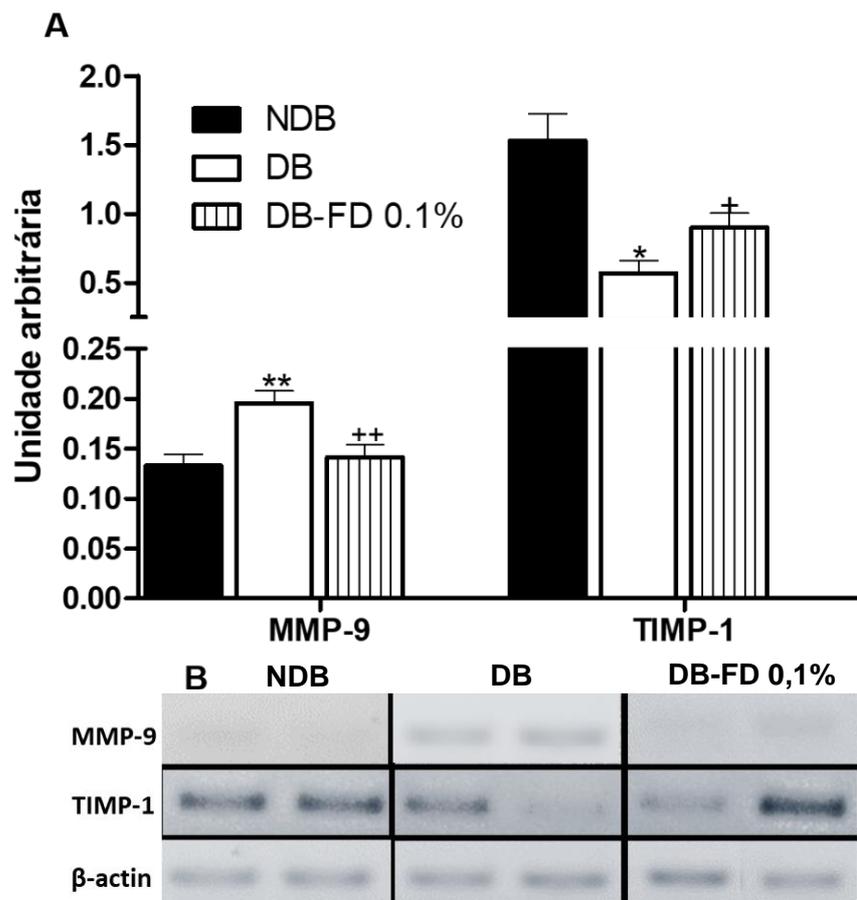


(A-C) Fotomicrografias representativas das lâminas de pele coradas com tricrômico de Masson provenientes de animais não-diabéticos (NDB), diabéticos (DB) e diabéticos tratados topicamente com friedelina (DB-FD 0,1%) no sétimo dia após a indução da ferida. (D) A quantificação da deposição de colágeno, representado pela coloração azul, foi realizada utilizando o software ImageJ. As colunas e as barras verticais representam a média \pm EPM, respectivamente. A análise estatística foi realizada mediante ao teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls, $**p < 0,01$ (NDB vs. DB), $++p < 0,001$ (DB vs. DB-FD 0,1%).

5.4 Tratamento tópico com friedelina afeta a expressão gênica de MMP-9 e TIMP-1 nas feridas de camundongos diabéticos

Como apresentado na figura 15, os camundongos diabéticos (DB) apresentaram um aumento na expressão do mRNA para MMP-9 no sétimo dia após a indução da ferida, quando comparados com os animais do grupo controle (NDB). Ao mesmo tempo, o tratamento tópico com friedelina em animais diabéticos foi capaz de diminuir a expressão do mRNA desta proteína. Além disso, os animais diabéticos apresentaram diminuição na expressão de TIMP-1 quando comparados ao grupo controle, enquanto que os animais diabéticos tratados com friedelina mostraram um aumento na expressão de TIMP-1. Estes dados indicam o potencial da friedelina em induzir a regulação da expressão destes genes.

Figure 15 – Friedelina regula a expressão de MMP-9 e TIMP-1.



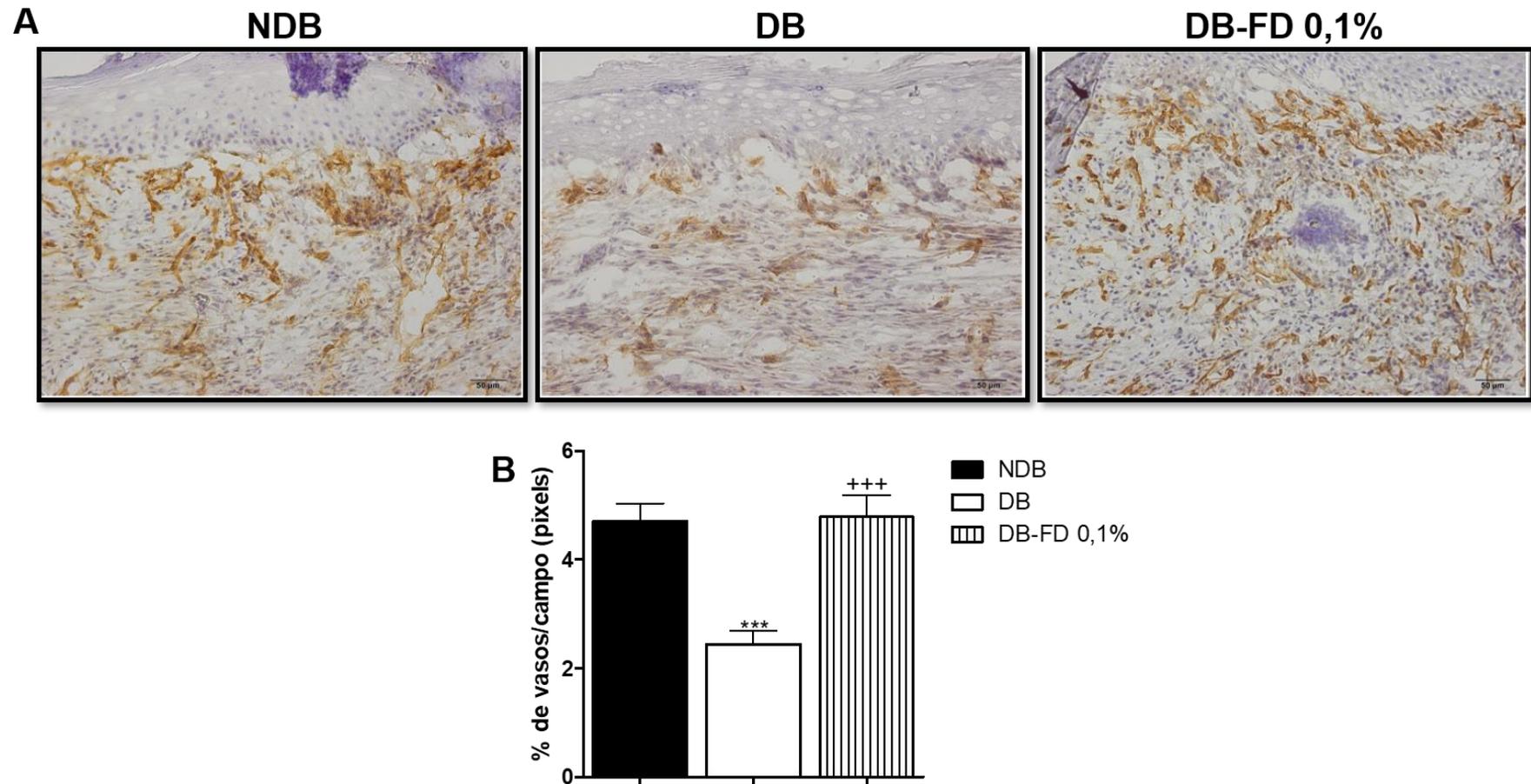
(A) Quantificação por densitometria das bandas de expressão de MMP-9 e TIMP-1 normalizada pela expressão de β -actin. (B) Expressão de mRNA para MMP-9, TIMP-1 e β -actina. As colunas e as barras verticais representam a média \pm EPM, respectivamente. A análise estatística foi realizada mediante ao teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (NDB vs. DB), *** $p < 0,05$ (DB vs. DB-FD 0,1%).

5.5 Friedelina favorece o processo de angiogênese na ferida de camundongos diabéticos

No tecido de granulação a identificação da presença da proteína CD31 mostra-se como uma abordagem amplamente utilizadas para identificar o processo de angiogênese. Esta proteína CD31, que é uma molécula de adesão presente nas células endoteliais, determina o nível de vascularização no tecido cicatricial (VINAY et al., 2014). Logo, decidiu-se utilizar a identificação por imuno-histoquímica da proteína CD31 nos tecidos para avaliar o efeito da friedelina sobre a angiogênese.

A figura 16A (p. 58) apresenta as fotomicrografias representativas dos cortes congelados obtidos das feridas de animais não diabéticos (NDB), diabéticos (DB) e diabéticos tratados com friedelina (DB-FD 0,1%) submetidos à análise imunohistoquímica para a proteína CD31. Foi evidenciado que, no sétimo dia após a indução da ferida, os camundongos diabéticos mostraram uma diminuição na imunomarcção para a proteína CD31, o que reflete em uma redução na densidade de vasos sanguíneos quando comparados com os camundongos não diabéticos. No entanto, quando os camundongos diabéticos foram tratados topicamente com friedelina (DB-FD 0.1%) ocorreu um aumento na imunomarcção para CD31, revelando um incremento no processo de angiogênese no tecido cicatricial. A quantificação da imunomarcção para CD31 é representada na figura 16B (p.58).

Figura 16 – O tratamento tópico com friedelina favorece a angiogênese em feridas cutâneas de animais diabéticos.

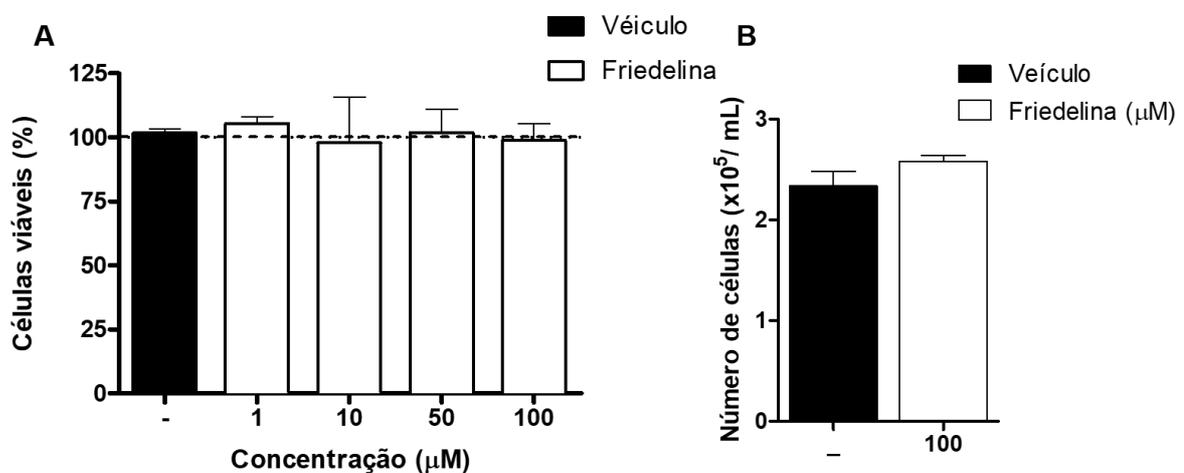


A formação de novos vasos sanguíneos foi avaliada mediante a imunomarcção para a proteína CD31. (A) Fotomicrografias representativas da marcação imunohistoquímica para CD31 no dia 7 pós-ferida. (B) A quantificação foi realizada utilizando o software ImageJ. As colunas e as barras verticais representam a média \pm EPM, respectivamente. A análise estatística foi realizada mediante ao teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls, $***p < 0,001$ (NDB vs. DB), $***p < 0,001$ (DB vs. DB-FD 0,1%).

5.6 Efeito da friedelina sobre a viabilidade de fibroblastos

Considerando o resultado anterior onde o tratamento tópico com a friedelina foi capaz de induzir a produção de colágeno no tecido de granulação, decidiu-se avaliar se este triterpeno apresenta algum efeito direto sobre as funções de fibroblastos. Para isso, inicialmente foi avaliado o efeito da friedelina sobre a viabilidade de uma linhagem de fibroblastos murino utilizando o ensaio de MTT. Como evidenciado na figura 17, o tratamento por 24 horas com friedelina, em todas as concentrações utilizadas (1, 10, 50 e 100 μM), não foi capaz de afetar o perfil da viabilidade dos fibroblastos. Além disso, o tratamento com a maior concentração (100 μM) de friedelina não alterou o número de fibroblastos (Figura 17B). Em conjunto, estes resultados demonstram que a friedelina não apresenta atividade citotóxica sobre este tipo celular.

Figura 17 – Friedelina não altera a viabilidade de fibroblastos *in vitro*



(A) A viabilidade celular foi avaliada mediante ao ensaio de MTT. A linha tracejada representa o grupo controle (células tratadas com veículo DMSO), enquanto que as colunas e as barras verticais representam a média \pm SEM de três experimentos independentes. (B) O número absoluto de células viáveis foi obtido mediante ao ensaio de contagem celular por Neubauer.

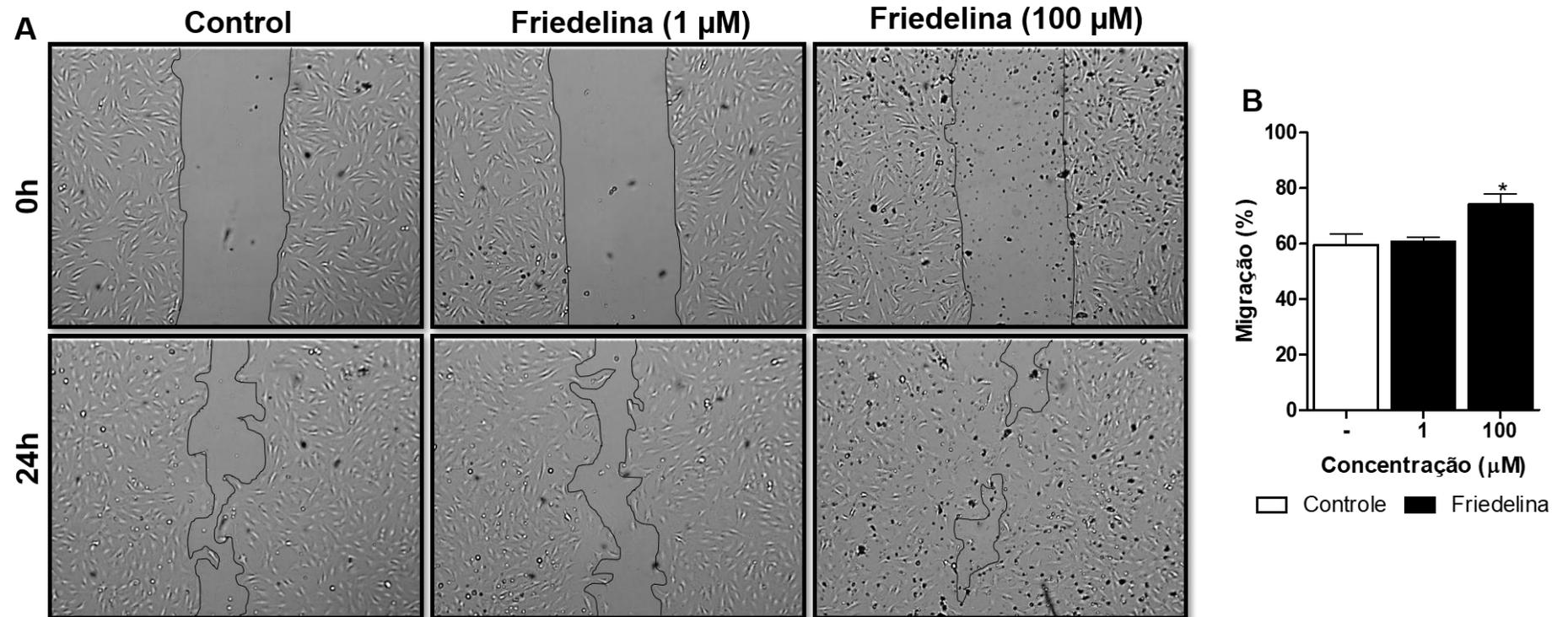
5.7 Friedelina aumenta a migração de fibroblastos *in vitro*

Tendo em vista que a migração dos fibroblastos consiste em um importante evento durante o processo de cicatrização, avaliou-se os efeitos da friedelina sobre a migração horizontal utilizando o modelo de *scratch assay*. Considerando que as

concentrações testadas de friedelina não comprometeram a viabilidade das células, decidiu-se seguir com o próximo experimento utilizando a menor (1 μM) e a maior (100 μM) concentração deste triterpeno utilizado no ensaio de viabilidade.

Como mostrado na figura 18 (p.62), foi evidenciado que os fibroblastos tratados com 1 μM de friedelina não apresentaram alteração na taxa de migração quando comparados ao controle (células mantidas apenas com meio de cultivo). Entretanto, o tratamento com 100 μM de friedelina foi capaz de induzir um aumento significativo na migração celular no tempo de 24 horas. Este resultado sugere que a friedelina possui um efeito estimulador direto sobre os fibroblastos, por aumentar a taxa de migração dessas células, um evento essencial durante o curso cicatricial.

Figura 18 – Friedelina acelera a migração de fibroblastos *in vitro*.



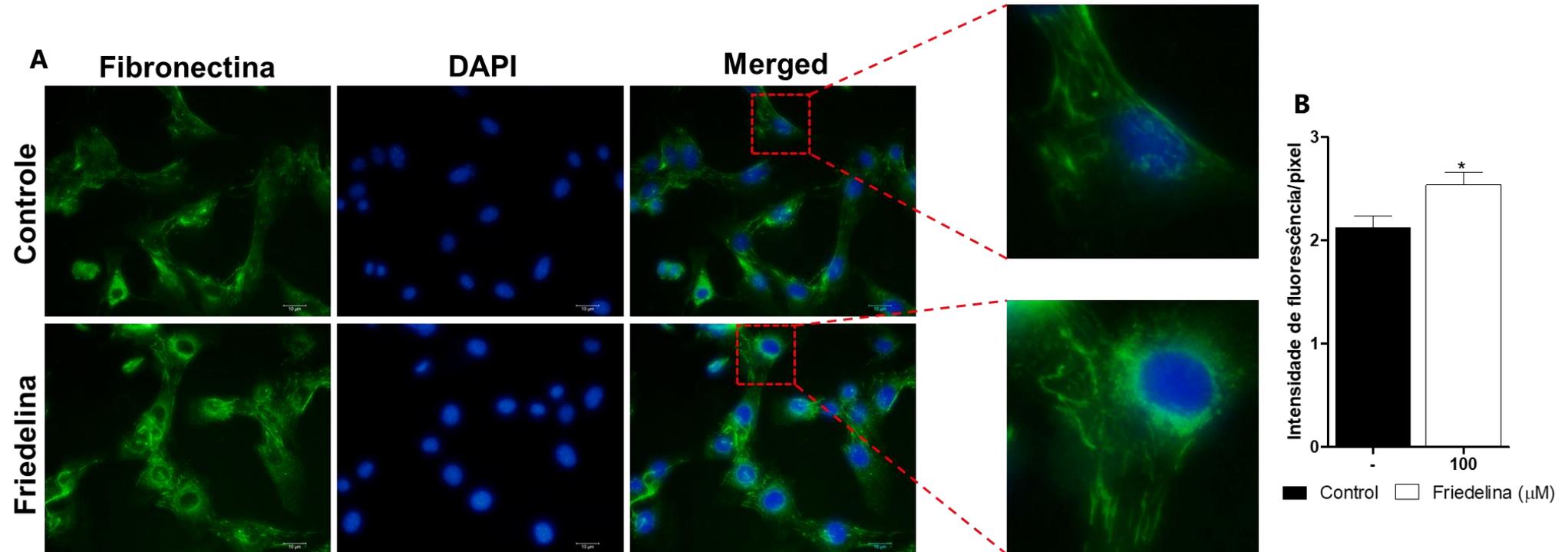
Os fibroblastos foram semeados em placas de 24 poços e mantidas *overnight* para adesão. Em seguida, foi feito um risco na monocamada de células utilizando uma ponteira amarela (p200). Em seguida, as células foram tratadas com friedelina (1 ou 100 μM) ou meio de cultura DMEM. (A) Fotomicrografias representativas das células nos tempos 0 e 24 h após o risco. (B) A análise da taxa de migração foi realizada utilizando o software ImageJ. As colunas e as barras verticais representam a média ± EPM, respectivamente. A análise estatística foi realizada mediante ao teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls, * $p < 0,05$ (Friedelina vs. controle).

5.8 Friedelina induz a produção de fibronectina e laminina em fibroblastos

A produção de matriz extracelular (MEC) é um evento-chave durante o processo de cicatrização, uma vez que as proteínas de MEC, como fibronectina, laminina e colágenos, atuam na formação do tecido de granulação, além de auxiliar eventos migratórios no leito da ferida. Por conta disso, decidiu-se avaliar se a friedelina poderia influenciar a produção de MEC em fibroblastos. Considerando que apenas a concentração de 100 μM foi capaz de induzir efeitos diretos sobre a migração dos fibroblastos, escolheu-se esta concentração para seguir com os experimentos.

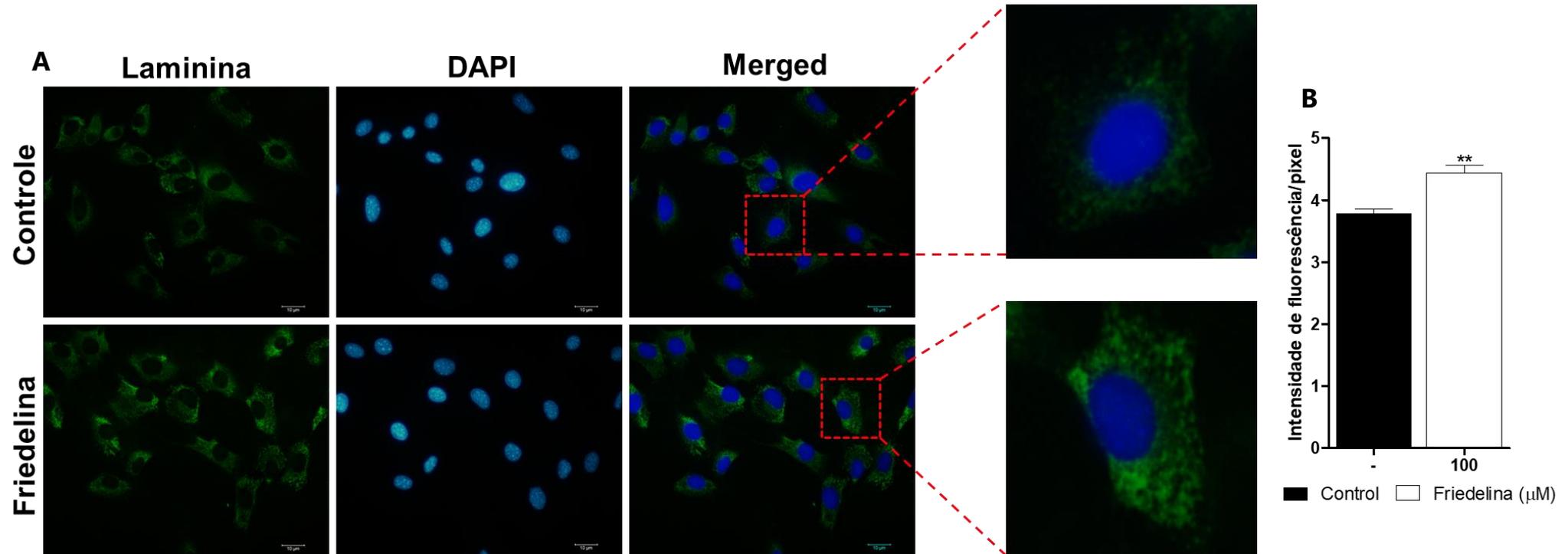
Análise das fotomicrografias, referentes a imunomarcação para fibronectina e laminina, evidenciaram que as células tratadas com 100 μM de friedelina apresentaram uma maior intensidade de fluorescência, quando comparada com as células do grupo controle, tratadas apenas com meio de cultura (Figura 19, p.63 e 20, p.64). Esses resultados indicam que o tratamento com friedelina é capaz de induzir um aumento na produção de fibronectina e laminina em fibroblastos.

Figura 19 – Friedelina estimula a produção de fibronectina em fibroblastos *in vitro*



Os fibroblastos foram semeados em lâminas LabTeks, mantidos *overnight* e posteriormente tratados com 100 μ M friedelina ou meio de cultura DMEM por 24 horas. Fotomicrografias representativas da marcação para fibronectina. **(A)** A marcação em verde representa a imunomarcação para fibronectina intracelular, enquanto que a marcação em azul indica o núcleo das células. **(B)** A intensidade de fluorescência foi quantificada utilizando o software ImageJ.

Figura 20 – Friedelina estimula a produção de laminina em fibroblastos *in vitro*

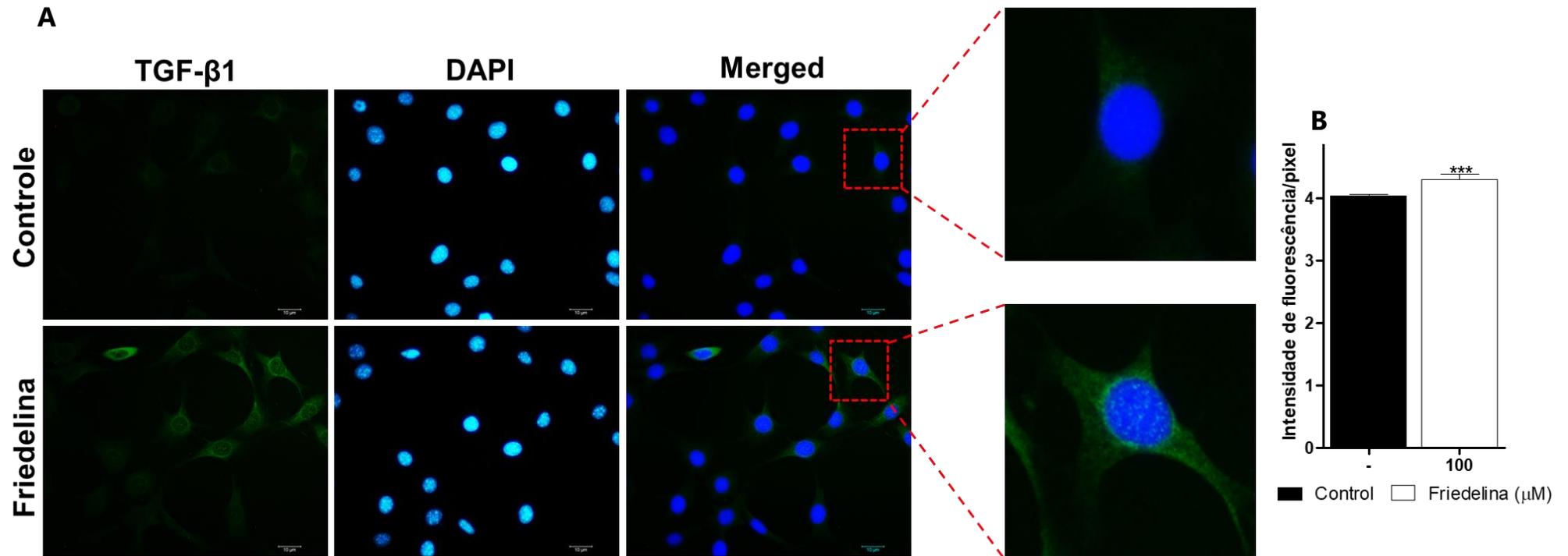


Os fibroblastos foram semeados em lâminas LabTeks, mantidos *overnight* e posteriormente tratados com 100 μ M friedelina ou meio de cultura DMEM por 24 horas. Fotomicrografias representativas da marcação para laminina. **(A)** A marcação em verde representa a imunomarcação para laminina intracelular, enquanto que a marcação em azul indica o núcleo das células. **(B)** A intensidade de fluorescência foi quantificada utilizando o software ImageJ.

5.9 Friedelina induz produção de TGF- β 1 em fibroblastos in vitro

Considerando a importância do TGF- β 1 para a indução da produção de componentes da matriz extracelular, decidiu-se avaliar se a friedelina teria algum efeito sobre a produção deste fator em fibroblastos. A análise por imunofluorescência revelou que as células tratadas com 100 μ M de friedelina apresentaram uma maior intensidade de fluorescência quando comparada com as células do grupo controle, tratadas apenas com meio de cultura, indicando que o tratamento com a friedelina aumentou a produção de TGF- β 1 em fibroblastos (Figura 21, p.66).

Figura 21 – Friedelina estimula a produção de TGF- β 1 em fibroblastos *in vitro*



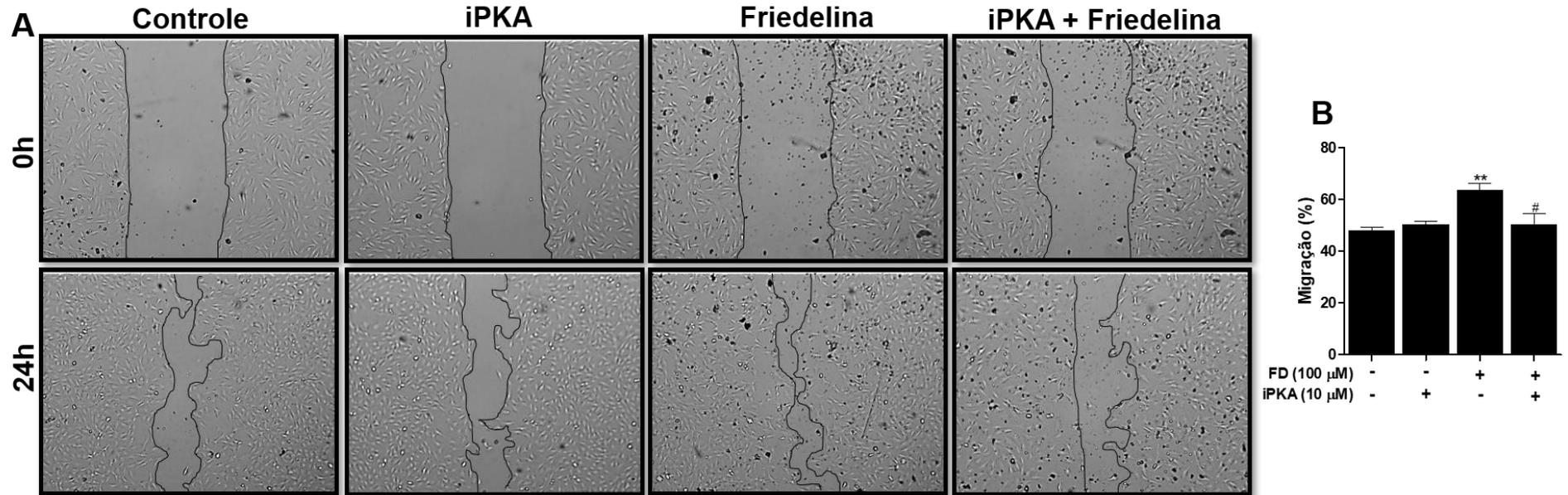
Os fibroblastos foram semeados em lâminas LabTeks, mantidos *overnight* e posteriormente tratados com 100 μ M friedelina ou meio de cultura DMEM por 24 horas. Fotomicrografias representativas da marcação para TGF- β 1. **(A)** A marcação em verde representa a imunomarcação para TGF- β 1, enquanto que a marcação em azul indica o núcleo das células. **(B)** A intensidade de fluorescência foi quantificada utilizando o software ImageJ.

5.10 Envolvimento da via de sinalização PKA/CREB na migração de fibroblastos estimulada pela friedelina *in vitro*

Com o objetivo de avaliar as possíveis vias de sinalização intracelulares que estariam envolvidas nos efeitos da friedelina sobre a migração dos fibroblastos, inibidores farmacológicos para algumas quinases envolvidas no processo de migração (Tabela 3, p. 48) foram utilizados.

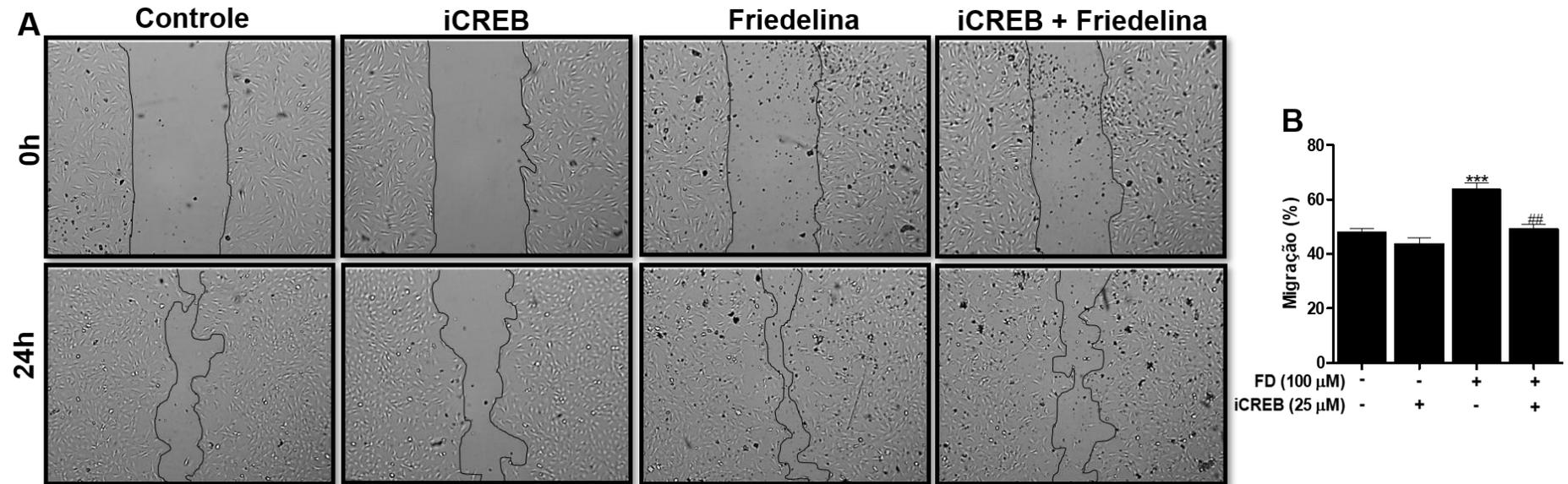
Desta forma, foi avaliado se o aumento da migração dos fibroblastos promovido pela friedelina envolveria a sinalização pela via da PKA/CREB. Para isso, foram utilizados os inibidores farmacológicos da PKA (iPKA) e CREB (iCREB). Como mostrado na figura 22 (p.68) e 23 (p.69), o tratamento com 100 μ M de friedelina foi capaz de acelerar a migração dos fibroblastos quando comparado com o grupo controle. Entretanto, quando estas células foram tratadas com friedelina na presença dos inibidores iPKA (figura 22, p.68) ou iCREB (figura 23, p.69) o aumento da migração promovido pela friedelina foi abolido. Estes resultados sugerem que o aumento na migração de fibroblastos induzido pela friedelina mostra-se dependente da via de sinalização intracelular PKA/CREB.

Figura 22 – Friedelina promove a migração de fibroblastos de maneira dependente da sinalização pela via PKA



Os fibroblastos foram semeados em placas de 24 poços e mantidos *overnight* para permitir a adesão. As células foram incubadas com o inibidor de PKA (PKAi-amida(6-22), 10 μ M) por 2 h antes do risco e tratamento com friedelina (100 μ M) ou meio de cultura DMEM. (A) Fotomicrografias representativas das células nos tempos 0 e 24 h após o risco. (B) A análise da taxa de migração foi realizada utilizando o software ImageJ. As colunas e as barras verticais representam a média \pm EPM, respectivamente. A análise estatística foi realizada mediante ao teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

Figura 23 – Friedelina promove a migração de fibroblastos de maneira dependente da atividade de CREB



Os fibroblastos foram semeados em placas de 24 poços e mantidos *overnight* para permitir a adesão. As células foram incubadas com inibidor de CREB (KG501, 25 μ M) por 2 h antes do risco e tratadas com friedelina (100 μ M) ou meio de cultura DMEM. (A) Fotomicrografias representativas das células nos tempos 0 e 24 h após o risco. (B) A análise da taxa de migração foi realizada utilizando o software ImageJ. As colunas e as barras verticais representam a média \pm EPM, respectivamente. A análise estatística foi realizada mediante ao teste ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

6 DISCUSSÃO

A pele é um órgão importante para a manutenção da homeostase do organismo, tanto que extensos danos na pele, ou ainda, falhas no processo de cicatrização, põem em risco a vida do organismo (KONDO; ISHIDA, 2010; MARTIN, 1997). Na condição diabética, o comprometimento da capacidade de cicatrização cutânea acarreta diversos tipos de prejuízos para o paciente, incluindo a evolução para amputações de membros inferiores (PEMAYUN et al., 2015). Apesar dos avanços no manejo/tratamento de feridas cutâneas na condição diabética, ainda há uma carência de fármacos disponíveis que sejam eficazes em acelerar o fechamento de feridas cutâneas em indivíduos diabéticos. Desta forma, optou-se por avaliar o efeito cicatrizante da friedelina nas feridas cutâneas de animais diabéticos, bem como seu efeito direto sobre fibroblastos *in vitro*. Os resultados revelaram que o tratamento tópico com a friedelina não apenas acelerou o fechamento da ferida cutânea na condição diabética, mas também, *in vitro*, induziu em fibroblastos a produção de elementos da matriz extracelular, e uma melhora na sua capacidade migratória por um mecanismo que parece envolver a via de sinalização PKA/CREB.

O *diabetes mellitus* consiste em distúrbio endócrino caracterizado por causar prejuízos em diversos aspectos da homeostase do organismo, incluindo o processo de cicatrização de feridas cutâneas (LEE et al., 2012). Pacientes portadores de diabetes geralmente apresentam um comprometimento no processo de cicatrização, o que resulta na formação de úlceras do pé diabético (DFU, do inglês Diabetic Foot Ulcer), acarretando em uma alta taxa de amputações dos membros inferiores, assim como em um alto número de hospitalizações prolongadas (PEMAYUN et al., 2015).

DFU é uma das complicações mais significativas e devastadoras do diabetes e representa um sério problema de saúde pública. Bommer e colaboradores (2017) evidenciaram que o custo global estimado para o diabetes em 2015 foi aproximadamente 1,3 trilhão de dólares, sendo que até um terço deste valor está relacionado a problemas nos membros inferiores (BOMMER et al., 2017). Além disso, projeções indicam que este custo pode chegar a 2,2 trilhões em 2030 (BOMMER et al., 2018).

Desta forma, a busca por alternativas terapêuticas para o tratamento de feridas diabéticas crônicas torna-se necessária, visto que, apesar de alguns avanços, um regime de tratamento eficaz em acelerar o processo cicatricial e

melhorar a qualidade de vida dos pacientes portadores de diabetes ainda não foi encontrado.

Neste contexto, os produtos de origem natural têm recebido destaque por suas atividades estimuladoras da cicatrização. Recentemente, foi evidenciado que triterpenos naturais ou sintéticos, como asiaticoside, astragaloside IV, bacoside A, cicloastragenol, cicloocantósido E, ginsenosídeo Rd, lupeol, madecosídeo, ácido oleanólico e ácido ursólico, têm efeitos benéficos durante o processo de cicatrização, acelerando a reepitelização, e/ou aumentando a deposição de colágeno no tecido da ferida (AGRA et al., 2015).

No presente trabalho, foi demonstrado que a aplicação tópica de friedelina, um triterpeno pentacíclico natural, mostrou-se capaz de acelerar a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos, por regular a deposição de colágeno e o processo de angiogênese, proporcionando uma melhor formação do tecido de granulação.

O estado diabético causa diversas alterações celulares e moleculares que levam a um retardo no processo cicatricial. Dentre essas alterações, o comprometimento na resposta inflamatória, associado com a diminuição da síntese de colágenos e da formação de novos vasos sanguíneos, prejudicam a formação do tecido de granulação, o que acarreta na falha da contração do ferimento proporcionando o surgimento de feridas crônicas (FAHEY et al., 1991; GALEANO et al., 2004; MARTIN, Alexandra et al., 2003).

Durante o curso da cicatrização, a contração da ferida consiste em um evento importante para a restauração da homeostasia tecidual. Desta a forma, este parâmetro é caracterizado como indicador do reparo tecidual. Evidências científicas indicam que animais diabéticos apresentam um evidente retardo na contração de feridas cutâneas (KANT et al., 2015; LEE, Yen-Hsien et al., 2012).

Com o objetivo de avaliar o efeito da friedelina sobre a contração das feridas em animais diabéticos, foi utilizado o modelo de ferida excisional, onde a cicatrização ocorre a partir das margens da ferida para o centro. Este modelo permite a avaliação mais ampla dos diversos mecanismos envolvidos na cicatrização de feridas, incluindo a reepitelização, a formação do tecido de granulação, a angiogênese e a contração da ferida. Além disso, as feridas são facilmente coletadas e podem ser submetidas a análises posteriores, como análises histopatológicas, imunohistoquímica e métodos moleculares (GALIANO et al., 2004).

Os resultados da análise macroscópica das feridas mostraram que os animais tornados diabéticos apresentam um retardo considerável na contração das feridas quando comparados com os animais não diabéticos. Por outro lado, o tratamento com a friedelina foi capaz de acelerar a contração da ferida em camundongos diabéticos (Figura 12, p.51). Para confirmar o efeito cicatrizante da friedelina, análises histopatológicas foram realizadas. A avaliação microscópica dos cortes da ferida corados por H&E revelaram uma melhor formação do tecido de granulação, com um menor recrutamento inflamatório e uma maior presença de fibroblastos nas feridas do grupo tratado com friedelina em comparação com os animais diabéticos tratados com salina (Figura 13, p.53).

Estudos demonstram que embora os neutrófilos possam fornecer proteção contra a infecção, eles podem retardar fechamento de ferida. Dovi e colaboradores (2003), por exemplo, evidenciaram que a depleção de neutrófilos acelera a contração da ferida tanto em animais normais como em animais diabéticos (DOVI et al., 2003). Interessantemente, a contagem diferencial de células no tecido da ferida revelou que animais diabéticos apresentam um maior recrutamento de neutrófilos no tecido cicatricial quando comparado com o grupo controle, e que o tratamento com friedelina foi capaz de diminuir o número destas células (Figura 13, p.53).

Em conjunto, estes resultados sugerem que o tratamento tópico com a friedelina mostra-se promissor para o tratamento de feridas cutâneas diabéticas, tendo em vista que este triterpeno acelerou o processo de contração de feridas e levou a uma melhor formação do tecido de granulação, parâmetros importantes durante a reparo tecidual.

A formação do tecido de granulação é um passo importante durante o curso cicatricial. Nessa fase, a produção de matriz extracelular, sintetizada principalmente por fibroblastos, é essencial para suportar a migração de vários tipos celulares e auxiliar na formação de novos vasos (KANT et al., 2014).

Dentre as proteínas de matriz extracelular, o colágeno é o principal componente do tecido de granulação, no entanto, a produção desta proteína está comprometida na pele diabética. Black e colaboradores (2003) demonstraram, por exemplo, que pacientes com diabetes tipo I apresentam uma diminuição na deposição de colágenos (BLACK et al., 2003). Neste trabalho, as análises histopatológicas das feridas evidenciaram que animais diabéticos apresentam uma redução considerável na deposição de colágeno total no tecido da ferida, quando

comparado com os animais normais não diabéticos (Figura 14, p.55), o que corrobora com a literatura científica. De forma interessante, os resultados mostraram que o tratamento tópico com a friedelina tem a capacidade de aumentar a deposição de colágeno total em feridas de animais diabéticos.

Diversos produtos naturais têm sido caracterizados como importantes alternativas para o tratamento de feridas cutâneas diabéticas. De maneira semelhante aos efeitos deflagrados pela friedelina, Kant e colaboradores (2014), evidenciaram que, o tratamento tópico com curcumina, um fitopolifenol natural, foi capaz de acelerar a taxa de contração de feridas de animais tornados diabéticos, levando uma melhora na formação do tecido de granulação, assim como um aumento na síntese e deposição de colágeno (KANT et al., 2014).

Além da produção e deposição de MEC, as metaloproteínases de matriz (MMPs, do inglês Matrix Metalloproteinases) desempenham um papel importante no processo de cicatrização de feridas, uma vez que estas proteínas atuam degradando a matriz extracelular, o que é essencial para o remodelamento do tecido. No entanto, na condição diabética, há um excesso de MMPs e uma diminuição dos inibidores teciduais de MMPs (TIMPs, do inglês Tissue Inhibitors of Metalloproteinases), que podem ser uma das causas da formação de feridas crônicas no diabetes (MULLER et al., 2008). Reiss e colaboradores (2010) mostraram que a administração de MMP-9 exógena retarda a contração da ferida em camundongos C57/BL6, por reduzir a área de reepitelização da ferida, assim como por diminuir a deposição de colágeno no tecido cicatricial (REISS et al., 2010). Também foi relatado que o tratamento com inibidores seletivos da MMP-9 revela efeitos benéficos na cicatrização de feridas diabéticas, por restaurar o processo de reepitelização (GOOYIT et al., 2014). Além disso, foi observado que pacientes com altas concentrações de MMP-9 no fluido da ferida predizem uma cicatrização deficiente em úlceras do pé diabético (LIU et al., 2009). Em conjunto, estes dados indicam que o aumento de MMP-9 parece retardar diretamente a cicatrização de feridas.

Como esperado, os resultados demonstraram que, no 7º dia após a indução da ferida, os camundongos diabéticos apresentaram um aumento na expressão do mRNA de MMP-9 quando comparados com o grupo controle. Por outro lado, o nível de expressão de mRNA de TIMP-1 foi diminuído em camundongos diabéticos em comparação com o grupo não-diabético (Figura 15, p.56). Curiosamente, os

resultados indicam que a friedelina parece regular a proporção de expressão de MMP-9 e TIMP-1 em camundongos diabéticos.

Além da produção e remodelação da matriz extracelular, a formação de novos vasos pelo processo de angiogênese é essencial no decorrer do processo cicatricial. No início, há um aumento considerável no número de capilares, que atuam na entrega de nutrientes necessários, células do sistema imune e oxigênio no tecido cicatricial (DIPIETRO, 2016; KANT et al., 2015). No entanto, diversas evidências científicas apontam que este processo se encontra comprometido na condição diabética (DIPIETRO, 2016; KANT et al., 2015; RAM et al., 2016). Análises imuno-histoquímicas para a proteína CD31 mostraram que no 7º dia após a indução da ferida, os camundongos diabéticos apresentaram uma menor quantidade de vasos sanguíneos na ferida quando comparados com os animais não diabéticos. Curiosamente, o tratamento tópico com friedelina foi capaz de aumentar o número de vasos na ferida de camundongos diabéticos, tornando o padrão de vascularização desses animais semelhante ao padrão encontrado nos animais não diabéticos (Figura 16, p.58). Dessa forma, pode-se inferir que a friedelina apresenta uma atividade moduladora da angiogênese na cicatrização de feridas em animais diabéticos.

A formação de novos vasos sanguíneos mediante o processo angiogênese parecer ser um parâmetro importante a ser modulado durante a cicatrização de feridas cutâneas. Diversos produtos naturais com atividades pro-cicatrizantes apresentam efeitos estimuladores neste processo. Chen e colaboradores (2012), evidenciaram que, em animais não diabéticos, o tratamento tópico com astragaloside IV, um triterpeno pentacíclico natural, foi capaz de acelerar a cicatrização por promover uma maior formação de vaso no tecido da ferida. Adicionalmente, de forma semelhante aos resultados obtidos neste trabalho, Kant e colaboradores (2015), evidenciaram que o tratamento tópico com a curcumina, é capaz de favorecer o processo de angiogênese no sétimo dia de feridas de animais tornados diabéticos (KANT et al., 2015).

Em conjunto, os resultados obtidos evidenciam que a friedelina possui uma ação direta sobre a formação do tecido de granulação em feridas diabéticas, tanto por regular parâmetros inflamatórios, assim como por aumentar a deposição de colágeno total e a formação de novos vasos sanguíneos no tecido da ferida, aspectos essenciais durante o processo de reparo.

O processo de cicatrização de feridas requer a ativação de diversos tipos celulares, incluindo queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos, que juntos desempenham um papel importante na formação do tecido de granulação e levam à contração da ferida (KANAZAWA et al., 2010). A migração e a diferenciação dessas células são etapas fundamentais durante o processo de reparo. Em particular, a migração de fibroblastos acarreta no aumento do recrutamento destas células para o leito da ferida, o que medeia a deposição de proteínas da matriz extracelular, que modulam o processo de angiogênese e apoiam a migração e a proliferação de outras células importantes durante o processo cicatricial (GURTNER et al., 2008).

Dada a importância dos fibroblastos durante o processo de cicatrização e o efeito da friedelina no aumento da deposição de colágeno total no tecido da ferida, avaliou-se os efeitos diretos da friedelina sobre este tipo celular. Para isso, uma série de ensaios *in vitro* foram realizados.

Inicialmente, foi avaliado o efeito da friedelina sobre a migração destas células. Para tanto, foi realizado o ensaio de migração horizontal, que consiste em um método fácil, de baixo custo e amplamente utilizado para medir a migração celular *in vitro* (LIANG et al., 2007). Os resultados mostraram que a friedelina possui um efeito estimulador direto em fibroblastos, uma vez que o tratamento com este triterpeno foi capaz de aumentar a migração destas células (Figura 18, p.61), evento primordial durante o reparo tecidual.

Alguns triterpenos têm sido mostrados na literatura como potentes ativadores de células importantes durante o processo de cicatrização. Bessera e colaboradores (2018) demonstraram que o tratamento com lupeol, um triterpeno pentacíclico natural, apresenta um efeito direto sobre queratinócitos e fibroblastos, aumentando a migração e a atividade contrátil dessas células, respectivamente (BESSERA et al., 2018).

Além da migração dos fibroblastos, a produção e deposição de proteínas de matriz extracelular, incluindo colágenos, fibronectinas e lamininas são eventos necessários durante o curso cicatricial. É mostrado na literatura, por exemplo, que os fibroblastos e a fibronectina compartilham uma relação dinâmica e recíproca. Enquanto o citoesqueleto dos fibroblastos influencia na orientação e deposição da fibronectina extracelular, a fibronectina modula eventos intracelulares, como por exemplo, a migração (TRACY et al., 2016). Estudos *in vivo* demonstraram que a

aplicação tópica de fibronectina acelera o processo de cicatrização em ratos, por acelerar o fechamento da ferida, e promover a migração de um maior número de fibroblastos para o leito cicatricial (KWON, QIU, HIRAO, 2007), corroborando com o papel essencial desta proteína durante o processo de cicatrização. Além disso, alguns estudos vêm demonstrando que a condição diabética causa um comprometimento na produção de matriz extracelular em diversos órgãos, tanto em relação à quantidade quanto em relação a sua composição (LAW et al., 2012). Neste sentido, decidiu-se avaliar o efeito da friedelina sobre a produção de glicoproteínas de matriz extracelular em fibroblastos. Interessantemente, os resultados indicam que o tratamento com este triterpeno foi capaz de aumentar a produção de fibronectina e laminina (Figura 19, p.63 e Figura 20, p.64)., duas glicoproteínas de matriz extracelular importantes durante a formação do tecido de granulação.

Diversos fatores de crescimento atuam sobre os fibroblastos, induzindo a sua proliferação, migração e síntese de matriz extracelular (MARTIN, Paul e LEIBOVICH, 2005). Em especial, o TGF- β 1 tem sido mostrado como um importante indutor da migração e da síntese de colágeno e fibronectinas em fibroblastos (BETTINGER et al., 1996; HOCEVAR; BROWN; HOWE, 1999). Com isso, decidiu-se avaliar se o tratamento com a friedelina estaria modulando a produção de TGF- β 1. A análise por imunofluorescência evidenciou que a friedelina foi capaz de aumentar a produção intracelular deste fator de crescimento em fibroblastos (Figura 21, p.66).

Com base nesses resultados, pode-se sugerir que friedelina possui um efeito estimulador direto sobre os fibroblastos, aumentando sua migração e a produção de TGF- β 1 e glicoproteínas de matriz, como fibronectina e laminina.

Sabe-se que a migração e a produção de matriz extracelular dependem de diversas vias de sinalização. Em especial, estudos têm demonstrado o papel de diversas quinases durante a migração celular (HUANG et al., 2004). Essas proteínas podem mediar rearranjos no citoesqueleto das células, assim como a produção de proteínas de matriz extracelular e fatores de crescimento, favorecendo a motilidade celular.

Estudos na literatura vêm descrevendo o papel da via PKA/CREB em mediar diversos processos biológicos em fibroblastos. Edin e colaboradores (2001), por exemplo, evidenciaram que PKA atua como um importante regulador da migração nos fibroblastos (EDIN et al., 2001). Foi mostrado que migração de fibroblastos

estimulada por fatores de crescimento é diminuída quando PKA é inibido, sugerindo que PKA possui um importante papel na resposta dos fibroblastos a estímulos extracelulares e na migração celular. Além disso, Delghandi e colaboradores (2005) demonstraram que a fosforilação e ativação de CREB induzida por forskolin em fibroblastos é mediada diretamente ou indiretamente por PKA (DELGHANDI et al., 2005). Em conjunto, esses dados sugerem que PKA/CREB consiste em uma importante via de sinalização em fibroblastos, principalmente por mediar a migração destas células.

Tendo em vista o efeito direto da friedelina sobre a migração dos fibroblastos e o papel da via PKA/CREB sobre estas células, decidiu-se avaliar se a via PKA/CREB estaria envolvida no aumento da migração induzida pela friedelina. Para tanto, inibidores farmacológicos para estas proteínas intracelulares requeridas durante o processo de migração foram utilizados. Foi observado que quando os inibidores para PKA e CREB foram utilizados, em experimentos independentes, o efeito promotor da migração apresentado pela friedelina foi abolido (Figura 22, p.68 e Figura 23, p.69), mostrando que o aumento da migração dos fibroblastos induzido pela friedelina parece ser dependente da via PKA/CREB.

Portanto, este trabalho demonstra, pela primeira vez, que a aplicação tópica de friedelina acelera o processo de cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos, por aumentar a deposição de colágeno total, assim como por regular o processo de angiogênese. Além disso, foi evidenciado que a friedelina possui um efeito direto sobre a ativação dos fibroblastos, aumentando a migração e a produção de fibronectina e laminina nessas células, sendo estes efeitos dependente da via PKA/CREB. Em conjunto, estes resultados indicam que a friedelina pode ser uma alternativa terapêutica importante no tratamento da cicatrização de feridas cutâneas na condição diabética.

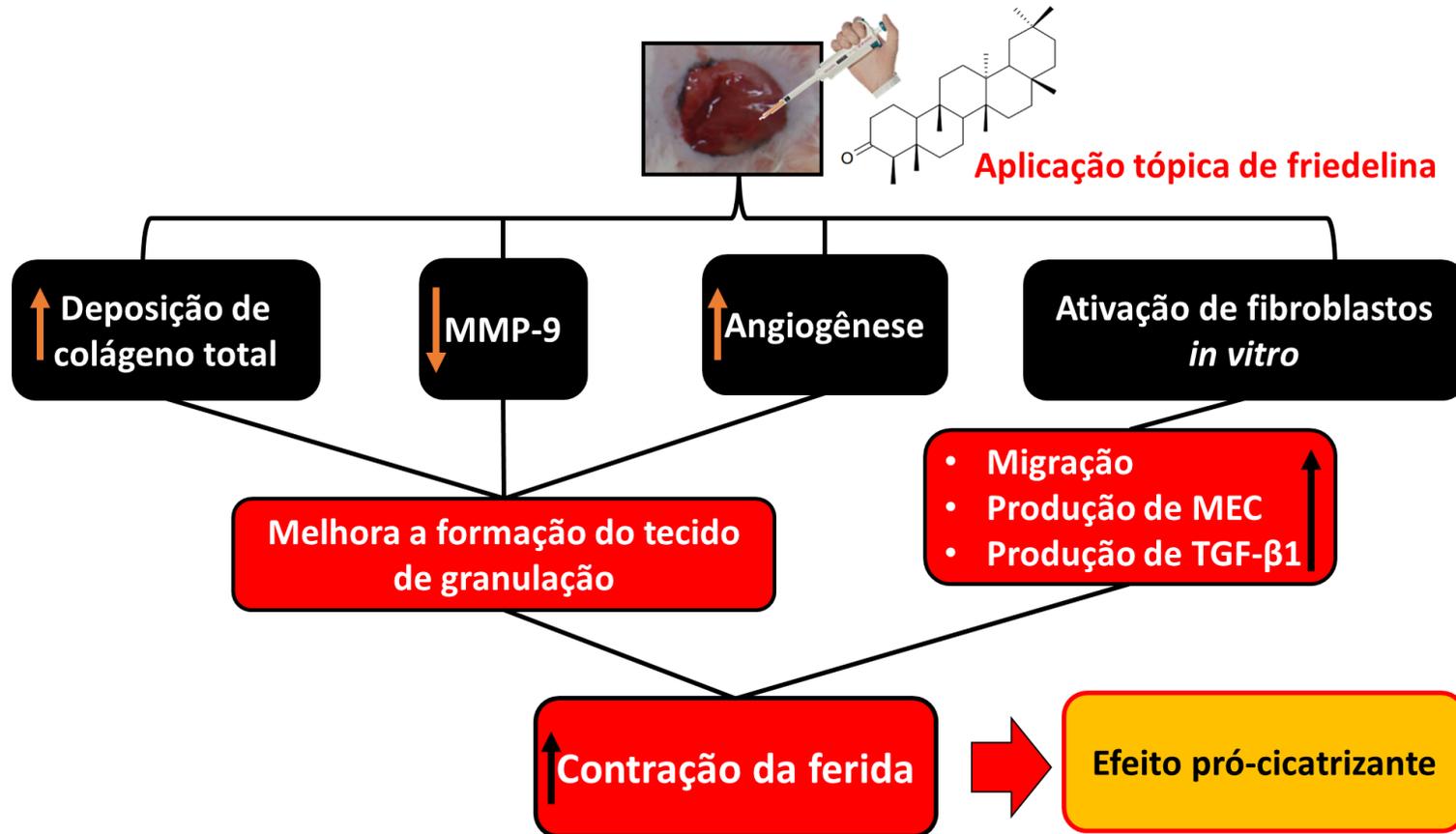
7 CONCLUSÃO

Estes resultados permitem concluir que o tratamento com friedelina acelera o processo de cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos e induz a ativação de fibroblastos *in vitro*, uma vez que este triterpeno:

- Acelerou a contração de ferida cutâneas de animais diabéticos;
- Aumentou a deposição de colágeno total na ferida;
- Regulou a expressão de moléculas envolvidas na remodelação tecidual, reduzindo a expressão de MMP-9 e aumentando a expressão de TIMP-1;
- Estimulou o processo de angiogênese na ferida por aumentar a formação de novos vasos sanguíneos;
- Acelerou a migração de fibroblastos *in vitro* de maneira dependente da via de sinalização intracelular envolvendo PKA/CREB;
- Estimulou *in vitro* a produção de glicoproteínas de matriz extracelular em fibroblastos, como fibronectina e laminina;
- Aumentou *in vitro* a produção de TGF- β 1 em fibroblastos;

Com base nesses resultados, a friedelina mostra-se como uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento de feridas cutâneas na condição diabética por estimular fenômenos favoráveis à cicatrização.

Figura 24 – Esquema representando as consequências do tratamento tópico com friedelina em feridas cutâneas de animais diabéticos



O tratamento tópico com a friedelina é capaz de aumentar a deposição de colágeno total, de regular os níveis de MMP-9 e induzir a formação de vasos sanguíneos no leito cicatricial de animais diabéticos, o que acarreta em uma evidente melhora na formação do tecido de granulação e no aumento da contração da ferida. Adicionalmente, foi observado que este triterpeno apresenta um efeito estimulador direto em fibroblastos, induzindo a migração e a produção de glicoproteínas de matriz e TGF-β1 *in vitro*.

REFERÊNCIAS

AGRA, ISABELA K.R. e colab. Evaluation of wound healing and antimicrobial properties of aqueous extract from *Bowdichia virgilioides* stem barks in mice. v. 85, p. 945–954, 2013.

AGRA, Lais C. e colab. Triterpenes with healing activity: A systematic review. *Journal of Dermatological Treatment*, v. 26, n. 5, p. 465–470, 2015.

AGRA, Lais C. e colab. Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 780, n. Immunopharmacology and inflammation, p. 232–242, 2016.

ALMEIDA, Patrícia D O De e colab. Anti-Inflammatory Activity of Triterpenes Isolated from *Protium paniculatum* Oil-Resins. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 1–10, 2015.

ANTONISAMY, Paulrayer e colab. Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetraantha* Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, v. 750, p. 167–175, 2015.

ANTONISAMY, Paulrayer e DURAI PANDIYAN, Veeramuthu e IGNACIMUTHU, Savarimuthu. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraantha* Lam. in mouse and rat models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 63, n. 8, p. 1070–1077, 2011.

BESERRA, Fernando Pereira e colab. Lupeol, a Pentacyclic Triterpene, Promotes Migration, Wound Closure, and Contractile Effect In Vitro: Possible Involvement of PI3K/Akt and p38/ERK/MAPK Pathways. *Molecules*, v. 23, p. 1–17, 2018.

BLACK, Eva e colab. Decrease of collagen deposition in wound repair in type 1 diabetes independent of glycemic control. *Archives of Surgery*, v. 138, n. 1, p. 34–40, 2003.

BOMMER, Christian e colab. Global Economic Burden of Diabetes in Adults: Projections From 2015 to 2030. *Diabetes Care*, v. 41, p. 963–970, 2018.

BOMMER, Christian e colab. The global economic burden of diabetes in adults aged 20 – 79 years: a cost-of-illness study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, v. 8587, n. 17, p. 1–8, 2017.

BROCKMANN, Leonie e colab. Regulation of T H 17 Cells and Associated Cytokines in Wound Healing , Tissue Regeneration , and Carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, p. 1–16, 2017.

CHEN, Ji Cai e colab. NGF accelerates cutaneous wound healing by promoting the migration of dermal fibroblasts via the PI3K/Akt-Rac1-JNK and ERK pathways. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–13, 2014.

DARBY, Ian A e LAVERDET, Betty. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, v. 7, p. 301–311, 2014.

DEBEER, Sabine e colab. Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin. *Eur J Dermatol*, v. 23, n. August, p. 456–466, 2013.

DELAVARY, Babak e colab. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*, v. 216, n. 7, p. 753–762, 2011.

DELGHANDI, Marit Pedersen e JOHANNESSEN, Mona e MOENS, Ugo. The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. *Cellular Signalling*, v. 17, p. 1343–1351, 2005.

DIPIETRO, Luisa A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 100, n. 5, p. 979–984, 2016.

DOVI, Julia V e HE, Li-ke e DIPIETRO, Luisa A. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 73, p. 448–455, 2003.

DURAIANDIYAN, Veeramuthu e colab. Hypolipidemic activity of friedelin isolated from *Azima tetraantha* in hyperlipidemic rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 26, n. 1, p. 89–93, 2016.

EDIN, Matthew L e colab. Inhibition of PKA Blocks Fibroblast Migration in Response to Growth Factors. *Experimental Cell Research*, v. 222, p. 214–222, 2001.

FAHEY, Thomas J. e colab. Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. *Journal of Surgical Research*, v. 50, n. 4, p. 308–313, 1991.

FERRO, Janylle e colab. Leaf extract from *Clusia nemorosa* induces an antinociceptive effect in mice via a mechanism that is adrenergic systems dependent. *Chinese Journal of Natural Medicine*, v.11, p. 385-390, 2013.

FERRO, Janylle e colab. Tratamento tópico com triterpeno pentacíclico friedelina acelera a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos. IX Reunião Regional da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, João Pessoa/PB. Anais da IX Reunião Regional da FeSBE, 2014.

GALEANO, Mariarosaria e colab. Recombinant Human Erythropoietin Stimulates Angiogenesis and Wound Healing in the Genetically Diabetic Mouse. *Diabetes*, v. 53, n. 15, p. 2509–2517, 2004.

GALIANO, Robert D e colab. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, v. 12, p. 485–492, 2004.

GANTWERKER, Eric A e HOM, David B. Skin: Histology and physiology of wound healing. *Facial Plast Surg Clin N Am*, v. 19, p. 441–453, 2011.

GOODSON, William H e HUNG, T. K. Studies of wound healing in experimental diabetes mellitus. *The Journal of surgical research*, v. 22, n. 3, p. 221–227, 1977.

GOOYIT, Major e colab. A Chemical Biological Strategy to Facilitate Diabetic Wound Healing Major. *ACS Chem Biol*. 2014, v. 9, n. 1, p. 105–110, 2014.

GUO, S. e DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, v. 89, n. 3, p. 219–229, 2010.

GURTNER, Geoffrey C. e colab. Wound repair and regeneration. *Nature*, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 2008.

HAN, George e CEILLEY, Roger. Chronic Wound Healing : A Review of Current Management and Treatments. *Advances in Therapy*, v. 34, n. 3, p. 599–610, 2017.

HESKETH, Mark e colab. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, p. 1–10, 2017.

HILL, Robert A. e CONNOLLY, Joseph D. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.*, v. 30, n. 7, p. 1028–1065, 2013.

HO, Manh Tin e colab. Effects of the Novel Compound DK223 on Migration and Proliferation of Human Keratinocytes and Primary Dermal Fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 0067, p. 13091–13110, 2014.

HORNG, Huann-cheng e colab. Estrogen Effects on Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, p. 1–14, 2017.

HUANG, C. e JACOBSON, K. e SCHALLER, M. MAP kinases and cell migration. *Journal of Cell Science*, v. 117, n. 20, p. 4619–4628, 2004.

IGHODARO, Osasenaga e MOHAMMED, Abiola e AKINLOYE, Oluseyi. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicine*, v. 53, p. 365–374, 2018.

JETTEN, Nadine e colab. Wound Administration of M2-Polarized Macrophages Does Not Improve Murine Cutaneous Healing Responses. *PLoS ONE*, v. 9, n. 7, p. 1–9, 2014.

KANAZAWA, Shigeyuki e colab. bFGF regulates PI3-Kinase-Rac1-JNK pathway and promotes fibroblast migration in wound healing. *PLoS ONE*, v. 5, n. 8, p. 1–12, 2010.

KANT, Vinay e colab. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Immunopharmacology*, v. 20, n. 2, p. 322–330, 2014.

KANT, Vinay e colab. Curcumin-induced angiogenesis hastens wound healing in diabetic rats. *Journal of Surgical Research*, v. 193, n. 2, p. 978–988, 2015.

KHANNA, Savita e colab. Macrophage Dysfunction Impairs Resolution of Inflammation in the Wounds of Diabetic Mice. *PLoS ONE*, v. 5, n. 3, p. 1–12, 2010.

KHAVKIN, Jeannie e ELLIS, David A F. Aging Skin: Histology, physiology and Pathology. *Facial Plastic Surgery Clinics of NA*, v. 19, n. 2, p. 229–234, 2011.

KIM, Wang Kyun e colab. Wound-healing effect of ginsenoside Rd from leaves of *Panax ginseng* via cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *European Journal of Pharmacology*, v. 702, n. 1–3, p. 285–293, 2013.

KOH, Timothy J. e DIPIETRO, Luisa Ann. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, v. 13, n. July 2011, p. 1–13, 2011.

KONDO, Toshikazu e ISHIDA, Yuko. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Science International*, v. 203, n. 1–3, p. 93–98, 2010.

LASZCZYK, Melanie N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Medica*, v. 75, n. 15, p. 1549–1560, 2009.

LAW, Brittany e colab. Diabetes-Induced Alterations in the Extracellular Matrix and Their Impact on Myocardial Function. *Microsc Microanal*, v. 18, n. 1, p. 22–34, 2012.

LEE, Jeong-hyun e colab. Asiaticoside enhances normal human skin cell migration , attachment and growth in vitro wound healing model. *Phytomedicine*, v. 19, n. 13, p. 1223–1227, 2012.

LEE, Sora e colab. ERK activating peptide , AES16-2M promotes wound healing through accelerating migration of keratinocytes. *Scientific Reports*, v. 8, n. September, p. 1–10, 2018.

LEE, Woo e colab. The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, v. 63, n. 4, p. 364–369, 2010.

LEE, Yen-hsien e colab. Antioxidant Sol-Gel Improves Cutaneous Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Experimental Diabetes Research*, v. 2012, p. 1–11, 2012.

LI, Yuanjun e colab. RGS19 upregulates Nm23-H1/2 metastasis suppressors by transcriptional activation via the cAMP/ PKA/CREB pathway. *Oncotarget*, p. 1–16, 2017.

LIANG, Chun Chi e PARK, Ann Y. e GUAN, Jun Lin. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

LIEKENS, Sandra e DE CLERCQ, Erik e NEYTS, Johan. Angiogenesis: Regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*, v. 61, n. 3, p. 253–270, 2001.

LIU, Yu e colab. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*, v. 32, n. 1, p. 117–119, 2009.

LU, Baiyi e colab. Anti-tumor activity of triterpenoid-rich extract from bamboo shavings (*Caulis bambusae in Taeniam*). *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 38, p. 6430–6436, 2010.

LU, Mingxia e FEI, Zhenghua e ZHANG, Ganlu. Synergistic anticancer activity of 20 (S)-Ginsenoside Rg3 and Sorafenib in hepatocellular carcinoma by modulating PTEN / Akt signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 97, n. 12, p. 1282–1288, 2018.

MANTOVANI, Alberto e colab. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. v. 23, n. 11, p. 549–555, 2002.

MARTIN, Alexandra e KOMADA, Michael R. e SANE, David C. Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Medicinal Research Reviews*, v. 23, n. 2, p. 117–145, 2003.

MARTIN, Paul. Wound Healing — Aiming for Perfect Skin Regeneration. *SCIENCE*, v. 276, p. 75–81, 1997.

MARTIN, Paul e LEIBOVICH, S Joseph. Inflammatory cells during wound repair : the good , the bad and the ugly. *TRENDS in Cell Biology*, v. 15, n. 11, p. 599–607, 2005.

MINUTTI, Carlos M e colab. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 61, p. 3–11, 2017.

MIRZA, Rita e DIPIETRO, Luisa A e KOH, Timothy J. Selective and Specific Macrophage Ablation Is Detrimental to Wound Healing in Mice. *The American Journal of Pathology*, v. 175, n. 6, p. 2454–2462, 2009.

MULLER, M. e colab. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: The ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabetic Medicine*, v. 25, n. 4, p.

419–426, 2008.

PARK, Julie E e BARBUL, Adrian. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery*, v. 187, n. May, p. 11–16, 2004.

PEMAYUN, Tjokorda Gde Dalem e colab. Risk factors for lower extremity amputation in patients with diabetic foot ulcers: a hospital-based case–control study. *Diabetic Foot & Ankle*, v. 6, n. 1, p. 29629, 2015.

PEREIRA, Rúben F. e BÁRTOLO, Paulo J. Traditional Therapies for Skin Wound Healing. *Advances in Wound Care*, v. 5, n. 5, p. 208–229, 2016.

PONUGOTI, Bhaskar e colab. FOXO1 promotes wound healing through the up-regulation of TGF- beta1 and prevention of oxidative stress. *The Journal of Cell Biology*, v. 203, n. 2, p. 327–343, 2013.

RAM, Mahendra e colab. Bilirubin modulated cytokines, growth factors and angiogenesis to improve cutaneous wound healing process in diabetic rats. *International Immunopharmacology*, v. 30, p. 137–149, 2016.

RAM, Mahendra e colab. Deferoxamine modulates cytokines and growth factors to accelerate cutaneous wound healing in diabetic rats. v. 764, p. 9–21, 2015.

RAMACHANDRAN, S e PRASAD, N Rajendra. Effect of ursolic acid , a triterpenoid antioxidant , on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity , lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. *Chemico-Biological Interactions journal*, v. 176, p. 99–107, 2008.

REISS, Matthew J. e colab. Matrix metalloproteinase-9 delays wound healing in a murine wound model. *Surgery*, v. 147, n. 2, p. 295–302, 2010.

S INGER, Adam J e CLARK, Richard A. F. C UTANEOUS W OUND H EALING. *The New England Journal of Medicine Review*, p. 738–746, 1999.

SAARISTO, Anne e colab. Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing. *American Journal of Pathology*, v. 169, n. 3, p. 1080–1087, 2006.

SHARATH, R. e colab. Wound healing and protease inhibition activity of bacoside-A, isolated from *Bacopa monnieri* Wetttest. *Phytotherapy Research*, v. 24, n. 8, p. 1217–1222, 2010.

SHUKLA, A e colab. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 65, n. 1, p. 1–11, 1999.

SUBASH-BABU, Pandurangan e LI, David K. e ALSHATWI, Ali A. In vitro cytotoxic potential of friedelin in human MCF-7 breast cancer cell: Regulate early expression of Cdkn2a and pRb1, neutralize mdm2-p53 amalgamation and functional stabilization of p53. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 69, n. 8, p. 630–636, 2017.

SUNIL, Christudas e colab. Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. leaves. *Food Chemistry*, v. 139, n. 1–4, p. 860–865, 2013.

TANG, Jing e colab. A small peptide with potential ability to promote wound healing. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, 2014.

TRACY, Lauren E. e MINASIAN, Raquel A. e CATERSON, E.J. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Advances in Wound Care*, v. 5, n. 3, p. 119–136, 2016.

WANG, Jing. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell and Tissue Research*, v. 371, p. 531–539, 2018.

WANG, Xu-tao e colab. Ursolic acid ameliorates oxidative stress, inflammation and fibrosis in diabetic cardiomyopathy rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 97, n. August 2017, p. 1461–1467, 2018.

XUAN, Yuan Hu e colab. High-glucose inhibits human fibroblast cell migration in wound healing via repression of bFGF-regulating JNK phosphorylation. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, p. 1–14, 2014.

YEH, Chung-ju e colab. The effects of artocarpin on wound healing : in vitro and in vivo studies. *Scientific Reports*, v. 7, p. 1–13, 2017.