

Luciana Xavier Pereira

**“Análises morfológicas de lesões de pele de camundongos submetidos
ao tratamento com extratos vegetais e plaquetas de descarte”**

**Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro – 2013**

Luciana Xavier Pereira

**Análises morfológicas de lesões de pele de
camundongos submetidos ao tratamento com extratos
vegetais e plaquetas de descarte.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dr^a. Gleydes Gambogi Parreira.
Universidade Federal de Minas Gerais.

Co-orientadora: Dr^a. Rosy Iára Maciel A. Ribeiro
Universidade Federal de São João Del-Rei.

**Belo Horizonte
2013**

Apoio

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFSJ – Universidade Federal de São João Del Rey

HEMOMINAS - Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pelas bênçãos e por proporcionar força para seguir essa caminhada.

Aos meus pais, pelo incentivo, confiança e todo amor e carinho de sempre.

A minha irmã, pelo apoio e carinho, sempre dando forças para continuar.

A toda minha família que de uma forma ou de outra foram importantes nesta etapa de minha vida.

Ao Heder, pelo carinho, atenção e ajuda nesta reta final.

À Profa. Rossana pelos ensinamentos, confiança e incentivo para que eu seguisse a caminhada acadêmica.

À Profa. Gleydes, por me receber tão bem, pela orientação e ensinamentos, pela paciência, atenção, carinho, conselhos e amizade que se fizeram tão importantes durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Rosy, pela orientação, por ter me recebido em seu laboratório, pelos ensinamentos, atenção e carinho, muito obrigada.

Aos Profs. Fernanda e Hélio Chiarini, por terem me recebido com tanto carinho, pela amizade, atenção, ensinamentos e apoio sempre que precisei.

À Malu, Olga, Ivete, Maristane, Diêgo e Roberta pela atenção e auxílio nas atividades técnicas, vocês foram essenciais.

Ao Prof. Hélio Batista e Prof. Ralph pela atenção e apoio durante os experimentos e análises em Divinópolis.

Ao Prof. Remo pela disponibilidade em ajudar.

Ao Prof. Geovanni Cassali por nos ter cedido o anticorpo.

Ao Prof. Adriano Paglia, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Profa. Raquel pela atenção e auxílio.

À coordenação e funcionários do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e aos professores do programa por terem contribuíram para minha formação. E também a todos os funcionários do departamento de Morfologia pela atenção.

Aos alunos da UFSJ que trabalharam neste projeto durante os experimentos, na preparação dos extratos vegetais, no processamento das plaquetas, na manipulação dos animais, coleta das amostras e tantas outras atividades.

Obrigada pelo companheirismo durante todo o trabalho, vocês foram essenciais! Muito obrigada!

Às (ao) amigas (o) do Laber, Mandinha, Mirna, Paty Loira, Paty Preta, Tati, Gabi, Ray, Camilinha, Nath, André, por todo carinho, aprendizado, amizade e momentos agradáveis que tornaram nossos trabalhos mais prazerosos. Por toda ajuda e apoio durante este tempo no Laber; a presença de vocês foi muito importante. Vocês estão para sempre no meu coração. Muito obrigada!

Aos colegas do mestrado pelo carinho e troca de conhecimentos. A Kátia pela amizade e companheirismo durante esta etapa. À Lets pelo carinho e ajuda nesta reta final.

Às amigas de república, Fane, Ló, Tamys e Jack pelo companheirismo, paciência e amizade. Thabata pela companhia e amizade no início desta etapa.

Às (aos) amigas (os) do coração, Lalá, Ju, Jô, Cassinha e João, que apesar da distância se mostraram sempre presentes. Obrigada por poder contar com vocês mesmo de longe!

Aos amigos de Divi pelo apoio e carinho.

Bom, meu muito obrigada a todos que de alguma maneira participaram e contribuíram para a realização deste trabalho! Sou eternamente grata a todos vocês!

“O bom é que sempre dá certo!”

H.J.R.

SUMÁRIO

Lista de figuras -----	IX
Resumo -----	XI
Abstract -----	XII
1 Introdução -----	1
2 Literatura consultada -----	2
2.1 Pele-----	2
2.2 Processo de reparo da pele por cicatrização-----	4
2.2.1 Hemostasia-----	4
2.2.2 Fase Inflamatória-----	5
2.2.3 Fase Proliferativa-----	6
2.2.4 Fase de Remodelação-----	8
2.3 Mastócitos na cicatrização-----	10
2.4 Fibroblastos e miofibroblastos na cicatrização-----	12
2.5 Complicações no processo de cicatrização-----	14
2.6 Uso de plantas na cicatrização-----	15
2.7 Uso de plaquetas na cicatrização-----	16
3 Justificativa -----	17
4 Objetivos -----	18
4.1 Objetivo Geral-----	18
4.2 Objetivos específicos-----	18
5 Material e Métodos -----	19
5.1 Animais-----	19
5.2 Coleta, identificação e obtenção dos extratos do material vegetal-----	19
5.3 Obtenção do liofilizado de plaquetas-----	20
5.4 Indução da lesão, tratamento e coleta do tecido-----	20
5.5 Processamento das amostras-----	22
5.5.1 Processamento histológico para análise de fibras colágenas e reticulares-----	22
5.5.1.1 Coloração com tricrômico de Gomori-----	23
5.5.1.2 Coloração com reticulina-----	23
5.5.2 Processamento histológico para análise de mastócitos-----	23
5.5.3 Processamento imunohistoquímico para análise de miofibroblastos-----	23
5.5.4 Processamento do material para análises à microscopia eletrônica de transmissão-----	25
5.6 Análises morfométricas-----	26
5.6.1 Fibras colágenas e reticulares-----	26
5.6.2 Análise quantitativa de mastócitos-----	26
5.6.3 Análise quantitativa de miofibroblastos-----	27
5.7 Análise estatística-----	28

6 Resultados	29
6.1 Quantificação dos mastócitos na região de cicatrização nove dias após a indução da lesão	29
6.2 Quantificação dos miofibroblastos marcados por α -SMA através de imunohistoquímica	30
6.3 Avaliação histológica e morfométrica	35
6.3.1 Caracterização das fibras de colágeno na região de cicatrização nome e 21 dias após indução da lesão	35
6.3.1.1 Histologia	35
6.3.1.2 Morfometria	38
6.3.2 Caracterização das fibras reticulares (colágeno do tipo III) na região de cicatrização nove e 21 dias após indução da lesão	39
6.3.2.1 Histologia	39
6.3.2.2 Morfometria	42
6.4 Avaliação ultraestrutural da região de cicatrização nove dias após indução da lesão	43
6.4.1 Fibrilas de colágeno	43
6.4.2 Fibroblastos	45
6.4.3 Miofibroblastos	50
7 Discussão	52
8 Conclusão	58
9 Referências Bibliográficas	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da pele _____	02
Figura 2: Mecanismos do processo de reparo _____	03
Figura 3: Etapas do processo de cicatrização _____	09
Figura 4: Mastócito _____	11
Figura 5: Fibroblasto e miofibroblasto _____	13
Figura 6: Lesão excisional de 1cm de diâmetro induzida nos animais _____	22
Figura 7: Micrografia representativa da área de análise dos mastócitos, mostrando as delimitações de borda e tecido de granulação _____	27
Figura 8: Micrografias de luz da área de tecido de borda da lesão de pele de camundongos Swiss, mostrando marcação para mastócitos _____	30
Figura 9: Gráfico mostrando o número de mastócitos por mm ² de área da região de cicatrização, compreendendo borda e tecido de granulação, nove dias após a indução da lesão nos diferentes grupos _____	31
Figura 10: Micrografias de luz da área de tecido de granulação de lesão de pele de camundongos Swiss, mostrando marcação para miofibroblastos _____	33
Figura 11: Gráfico mostrando o número de miofibroblastos por mm ² de área de tecido de granulação, nove dias após a indução da lesão nos diferentes grupos _____	34
Figura 12: Micrografias de luz da área de tecido de granulação de lesão de pele de camundongos Swiss, corados com tricrômico de Gomori, nove dias _____	37
Figura 14: Gráfico da análise morfométrica de áreas marcadas em verde pelo tricrômico de Gomori, mostrando a % de deposição de colágeno na região de tecido de granulação, nove e 21 dias após indução da lesão nos diferentes grupos _____	38
Figura 15: Micrografias de luz da área de tecido de granulação de lesão de pele de camundongos Swiss, mostrando características das fibras reticulares, nove dias _____	40
Figura 16: Micrografias de luz da área de tecido de granulação de lesão de pele de camundongos Swiss, mostrando características das fibras reticulares, 21 dias _____	41

Figura 17: Gráfico da análise morfométrica de áreas marcadas em negro pela reticulina, mostrando a % de deposição de fibra reticular na região de tecido de granulação, nove e 21 dias após a indução da lesão nos diferentes grupos _ 42

Figura 18: Eletromicrografias da região de tecido de granulação de lesões de pele de camundongo Swiss, nove dias após a indução da lesão evidenciando fibrilas de colágeno _____ 44

Figura 19: Eletromicrografias da região de tecido de granulação de lesões de pele de camundongo Swiss, nove dias após a indução da lesão evidenciando fibroblastos _____ 49

Figura 20: Eletromicrografias da região de tecido de granulação de lesões de pele de camundongo Swiss, nove dias após a indução da lesão caracterizando miofibroblastos _____ 51

Resumo

Aspectos morfológicos do processo de cicatrização de feridas de pele de camundongos foram investigados em grupos submetidos a diferentes tratamentos tópicos. As análises levaram em conta parâmetros como a caracterização de células (fibroblastos, mastócitos e miofibroblastos) e de componentes da matriz extracelular (fibras colágenas e reticulares). Os resultados foram obtidos de fragmentos de pele coletados do local da lesão aos nove e 21 dias pós-tratamento a partir de análises morfométricas realizadas através da microscopia de luz (ML) e da descrição da ultraestrutura através da microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os animais foram distribuídos em seis grupos (G) que receberam os seguintes tratamentos: gel base (G1); gel contendo planta A (G2); gel contendo planta A + plaquetas (G3); gel contendo planta B (G4); gel contendo planta B + plaquetas (G5); gel contendo plaquetas (G6). O tratamento com plaquetas induziu substancialmente o recrutamento de mastócitos, diferente do ocorrido nos animais tratados com o complexo plaquetas + plantas, onde o número de mastócitos não apresentou diferença estatística em relação ao G1, o que pode indicar que as plantas reverteram a reação inflamatória por mastócitos causada pelas plaquetas. Os resultados de fibras reticulares demonstraram que aos nove dias houve menor deposição nos grupos tratados com a planta A (G2) e planta B (G4) e aos 21 dias não houve diferença. Já a deposição de colágeno foi maior e uniforme entre os grupos tratados no dia nove, com destaque para uma maior deposição no grupo tratado com a planta A (G2) no dia 21. Embora detectados em todos os grupos, os miofibroblastos ocorreram com menor frequência nos grupos tratados, o que seria um indicativo da ação anti fibrótica. As análises à MET permitiram a detecção das características ultraestruturais das fibrilas colágenas e dos fibroblastos. Em conjunto, os resultados demonstraram que há uma efetiva renovação da matriz extracelular e controle anti fibrótico durante o processo de reparo tecidual após os tratamentos, sendo que os tratamentos com a planta A e planta B mostraram melhor eficácia. Esta dupla propriedade leva a sugeri-las no tratamento de lesões, além do benefício de serem matérias-primas de acesso relativamente fácil e de baixo custo.

Palavras-chave: cicatrização; pele; plaquetas; extratos de plantas, microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão; colágeno; mastócitos; miofibroblastos.

Abstract

Morphological aspects of the healing process of skin wounds in mice were investigated in groups undergoing different topical treatments. The analyzes took into account parameters such as the characterization of cells (fibroblasts, myofibroblasts and mast cells) and extracellular matrix components (collagen and reticular fibers). The results were obtained from skin fragments collected from the lesion at nine and 21 days post treatment, from morphometric analyzes under light microscopy (LM) and the ultrastructure description by transmission electron microscopy (TEM). The animals were divided into 6 groups (G), treated as followed: gel base (G1); gel containing plant A (G2); gel containing plant A + platelets (G3); gel containing plant B (G4); gel containing Plan B + platelets (G5); gel containing platelets (G6). Treatment with platelets induced mast cell recruitment substantially different from what occurred in the animals treated with the complex platelets + plants in which there was no statistically significant difference about the number of mast cells compared to G1. It might indicate that the plants reverted to inflammatory reaction caused by mast by platelets. The results of reticular fibers showed that at nine days showed less deposition in the groups treated with the plant A (G2) and plant B (G4) and at 21 days there was no difference. Regarding to the collagen fibers the deposition was higher and uniform among treated groups at nine days, highlighting a greater deposition in the group treated with plant A (G2) at 21 days. Although detected in all groups, myofibroblasts occurred less frequently in the treated groups, which would be indicative of anti fibrotic action. The TEM analyzes allowed the detection of ultrastructural features of collagen fibrils and fibroblasts. Taking together, the results showed that there is an effective extracellular matrix renewal and anti-fibrotic control during the tissue repair process after application of treatments, mostly to treatments with plant A and plant B, which demonstrated better efficacy. This dual property leads to suggest them to treat lesions in addition to the benefit of raw materials are relatively easy access and low cost.

Keywords: healing process; skin; platelets; plant extract, light microscopy, transmission electron microscopy; collagen fibers, mast cell; myofibroblast.

1. INTRODUÇÃO

O mecanismo de reparo tecidual é um processo complexo que requer o envolvimento de uma diversidade de células e moléculas da matriz extracelular (MEC). Alterações decorrentes de enfermidades e/ou infecções, podem levar a um atraso no processo de reparo que resulta em feridas crônicas ou à formação de cicatriz em excesso. A utilização de extratos de plantas tem sido amplamente utilizada como tratamento de lesões teciduais, estratégia favorecida pela rica flora nacional que permite ampliar os estudos realizados nesta área. Além de plantas, produtos sintéticos ou de origem animal, são também utilizados na investigação do processo de cicatrização, dentre os quais citam-se os mediadores moleculares de plaquetas que parecem agir efetivamente na cicatrização estimulando o crescimento e reparo de diferentes tecidos. A utilização de plaquetas descartadas em centros de transfusão sanguínea vem demonstrando êxito no tratamento de úlceras crônicas. O presente trabalho teve como objetivo conjugar os potenciais ativos acima citados, analisando o potencial de reparo tecidual de duas espécies de plantas, essas associadas ou não às plaquetas, através das técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Para a realização deste estudo, fragmentos de pele com lesão submetida aos tratamentos foram processados para análises histológicas, morfométricas, imunohistoquímicas e análises à microscopia eletrônica de transmissão. O estudo das alterações morfológicas resultantes dos tratamentos poderão auxiliar na indicação de novos agentes terapêuticos para a cura de feridas, que sejam mais eficazes em tempo e qualidade.

2. Literatura consultada

2.1 Pele

A pele, o maior órgão do corpo humano, abrange funções tais como proteção mecânica, barreira impermeável, regulação da temperatura corporal (conservação e dissipação de calor), barreira imunológica, excreção de sais, síntese de vitamina D e como órgão sensorial. Sua estrutura morfológica compreende três camadas firmemente aderidas umas as outras: a epiderme, mais superficial, a derme, intermediária e mais desenvolvida e a hipoderme ou camada subcutânea (GANTWERKER & HOM, 2011) (Figura 01).

A epiderme é subdividida em camadas córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal, constituídas por diferentes tipos celulares: os queratinócitos, mais abundantemente distribuídos e responsáveis pela síntese de queratina; os melanócitos, cujo principal produto é a melanina; as células de Langerhans, células apresentadoras de antígenos; e as células de Merckel, com funções sensoriais de tato. A derme, mais interna, é formada por duas camadas, embora sem limites nítidos, constituída por diferentes tipos celulares e variados elementos da MEC. Dentre as células citam-se principalmente os fibroblastos, além de células residentes do sistema imune. E dentre os componentes da MEC listam-se as fibras colágenas, elásticas e reticulares, além dos proteoglicanos e glicosaminoglicanos, importantes moléculas que se interagem entre si (GANTWERKER & HOM 2011).

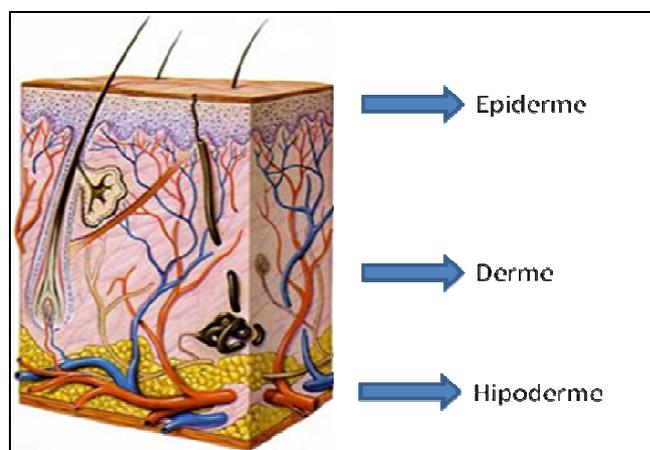


Figura 01: Esquema da estrutura da pele identificando as três camadas em que é composta. Fonte: http://sinnapse.blogspot.com.br/2010_02_01_archive.html

Assim como citado acima, a pele é uma eficiente barreira protetora que se danificada, requer um eficiente processo de reparo, que pode ocorrer seja por mecanismos de regeneração ou de cicatrização. O processo de regeneração consiste da reconstituição completa do tecido, com sua arquitetura original, por meio de células do parênquima do próprio tecido. Já no processo de cicatrização o local lesionado é reconstituído pela deposição de tecido conjuntivo fibroso (GURTNER et al., 2008; REINKE & SORG, 2012) (Figura 02) .

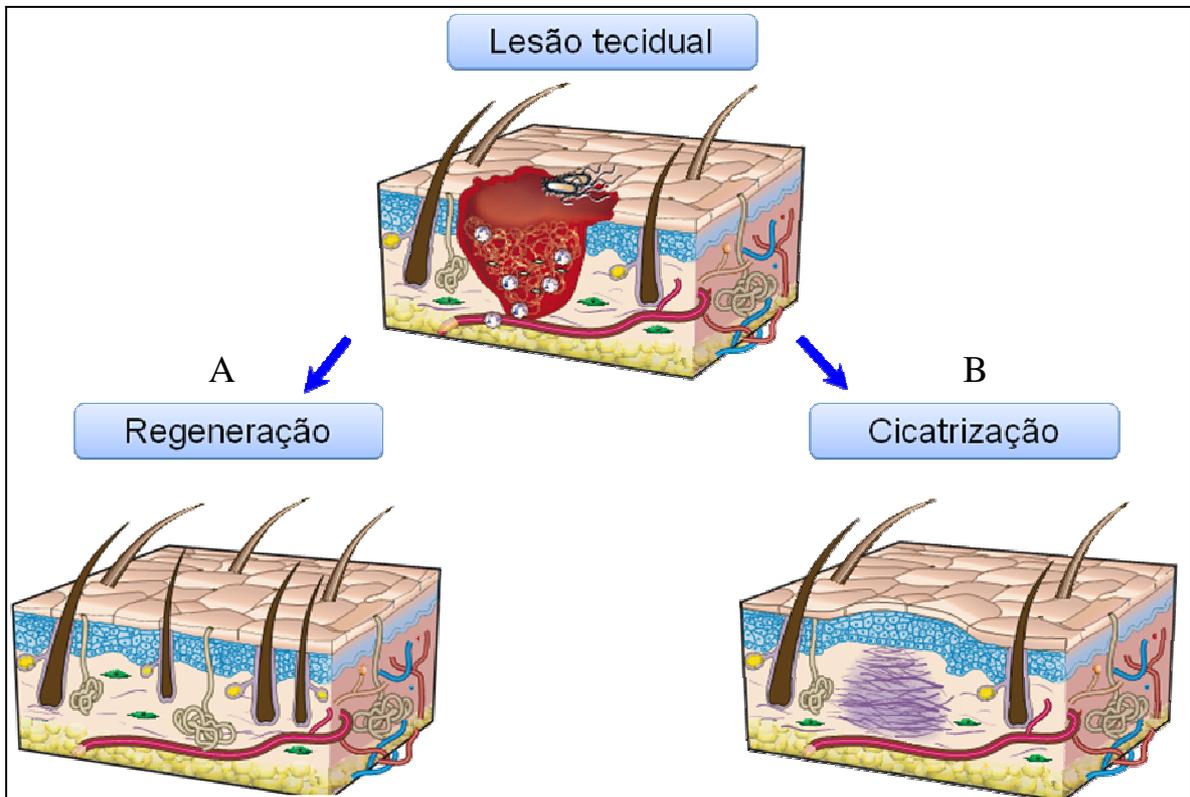


Figura 02: O esquema ilustra o processo de reparo após lesão e perda tecidual, o qual pode seguir por um dos seguintes mecanismos: A) mecanismo de regeneração, no qual o tecido desenvolve sua arquitetura original; B) mecanismo de cicatrização, no qual forma-se tecido conjuntivo fibroso no local lesionado. Fonte: modificado de GURTNER et al., 2008.

2.2 Processo de reparo da pele por cicatrização

A cicatrização é um processo complexo e dinâmico, consistindo de uma resposta coordenada de diferentes células, mediadores moleculares como citocinas e quimiocinas e componentes da matriz extracelular. Seu mecanismo segue uma importante sequência de eventos que são didaticamente divididos em quatro fases: hemostasia, inflamatória, proliferativa e remodelação tecidual (GURTNER et al., 2008; REINKE & SORG, 2012).

2.2.1 Hemostasia

Imediatamente após a lesão, a pele entra em estágio de hemostasia, cuja reação procura evitar a perda de sangue e fluido tissular. Primeiramente, ocorre uma reação de vasoconstrição dos vasos sanguíneos localizados próximos à lesão, a qual é seguida por uma vasodilatação com consequente extravasamento de plaquetas. Como reação, inicia-se o processo que culminará em uma cascata de eventos que inclui a ação de fatores intrínsecos, resultando na clivagem da protrombina em trombina que leva à clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina, que por sua vez se agregam, formando um coágulo fibrinoso. Glicoproteínas adesivas, importantes constituintes da matriz, como a fibronectina e trombospondina, podem ser liberadas dos grânulos plaquetários, estimulando ainda mais a agregação entre as plaquetas (MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009; WOLBERG, 2012; MERCER & CHAMBERS, 2013).

A formação deste tampão hemostático é essencial não somente por conter a perda sanguínea como já dito, mas também por atuar como uma matriz provisória para os processos subsequentes. Essa matriz do coágulo provê estrutura para migração de células inflamatórias, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, além de ser reservatório de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (MONROE & HOFFMAN, 2012; REINKE & SORG, 2012).

2.2.2 Fase Inflamatória

Mediadores liberados das plaquetas durante a hemostasia, como a trombina, o fator de crescimento transformante- β e - α (TGF- β e TGF- α), o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento epidérmico (EGF), dentre outros, ditam a migração das células inflamatórias e de outras células essenciais para o desenvolvimento das etapas seguintes no processo de cicatrização. Citam-se, dentre as células atraídas ao local lesionado por quimiotaxia, os mastócitos, neutrófilos e macrófagos, células atuantes nesta fase inflamatória (EMING et al., 2007).

Os mastócitos são derivados de células tronco hematopoiéticas e migram para os tecidos quando recrutados. São células com características particulares na síntese de eicosanóides, moléculas estas representadas pelos leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas importantes na indução da vasodilatação e expressão de moléculas de adesão nas membranas de células endoteliais. Os mastócitos também sintetizam histamina, mediador químico que potencializa a porosidade dos vasos. Todas essas características favorecem, em última análise, à migração de leucócitos e a infiltração destas células inflamatórias para o local lesionado (NOLI & MIOLO, 2001; BALBINO et al., 2005; NG, 2010).

Os neutrófilos são células cruciais nesta fase, sendo as primeiras células inflamatórias a infiltrarem no local da lesão, trazendo a peculiar função de impedir e/ou eliminar a possível invasão de prováveis microorganismos nos sistemas orgânicos, por liberarem substâncias antimicrobianas altamente ativas e diversas proteinases. Além disso, também atuam como quimioatraentes para outras células atuantes nesta fase (REINKE & SORG, 2012).

Após ação dos neutrófilos, os monócitos são recrutados para o local lesionado. Quando presentes no tecido, são ativados em macrófagos e dão continuidade ao processo de reparo, auxiliando na fagocitose dos microorganismos, além de eliminarem células mortas e resíduos teciduais. Alguns macrófagos após atuarem na promoção da limpeza da ferida sofrem apoptose, enquanto outros sobrevivem e permanecem no tecido lesionado exercendo outras funções. Dentre elas podemos citar a síntese de fatores de

crescimento que atuarão na proliferação celular, importante para as demais fases do processo de reparo, além do estímulo à síntese de moléculas da matriz pelas células residentes da pele (DELAVERY et al., 2011; REINKE & SORG, 2012). Desta forma, os macrófagos representam-se como células funcionalmente importantes na transição entre as fases de inflamação para as seguintes do processo cicatricial.

2.2.3 Fase Proliferativa

Em seguida à ação reativa das células inflamatórias, a pele lesionada evolui para sua recomposição, que abrange os processos de reepitelização, a formação de matriz extracelular e a angiogênese.

O processo de reepitelização conta com diferentes fatores de crescimento, que são responsáveis pela estimulação mitogênica e quimiotática dos queratinócitos para o local da lesão (MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009). Entre estes, pode-se citar o fator de crescimento epidermal ligado a heparina (HB-EFG) sintetizado e liberado pelos mastócitos (ARTUC et al., 2002). Folículos pilosos e glândulas apócrinas são fonte de células tronco que se diferenciam em queratinócitos os quais migram e se estabelecem formando novo estrato basal e nova membrana basal na área lesionada. Outros queratinócitos migram sobre aqueles já estabelecidos até serem sinalizados por inibição por contato (GANTWERKER & HOM, 2011).

Enquanto um novo epitélio é formado, uma nova matriz está sendo também estabelecida. O tecido de granulação consiste de células como fibroblastos, miofibroblastos, mastócitos, macrófagos, e de componentes da matriz, como fibronectina, glicosaminoglicanos e colágeno; além de novos vasos sanguíneos (MANDELBAUM et al., 2003; GANTWERKER & HOM 2011). A dinâmica entre todos estes componentes é importante, visto que os macrófagos estão liberando continuamente citocinas que atuarão sobre fibroblastos e sobre a angiogênese; a nova matriz produzida pelos fibroblastos ativados fornece suporte às células e os novos vasos sanguíneos as mantêm oxigenadas e nutridas (SINGER & CLARK, 1999; REINKE & SORG 2012). Em resposta a fatores liberados ainda na fase inflamatória, como TGF- β e PDGF, os fibroblastos migram, por quimiotaxia, para a área de lesão, e através da

integrina, uma proteína transmembrana, tais células fixam-se no tecido de granulação. Este processo favorece o amadurecimento funcional dos fibroblastos para uma síntese de colágeno eficiente (BALBINO et al., 2005), e, juntamente com a ação dos fatores de crescimento, para a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, células responsáveis pela contração da lesão (DELAVARY et al., 2011; REINKE & SORG, 2012). Os fibroblastos sintetizam não só os componentes estruturais da MEC, como também liberam moléculas como o fator de crescimento de queratinócitos (KGF), estimulando a proliferação e mobilidade destas células (MAAS-SZABOWSKI et al., 2001). Além disso, os fibroblastos liberam fatores de célula-tronco (SCF), envolvidos com a proliferação, quimiotaxia e a ativação de mastócitos (NG, 2010).

A angiogênese consiste na formação de novos vasos sanguíneos, que pode ocorrer através de dois processos, a saber, a partir de células precursoras endoteliais e a partir de vasos pré-existentes. Embora não seja ainda bem descrito, o primeiro mecanismo baseia-se em células tipo angioblastos chamadas de EPCs (*Endothelial Progenitor Cells*) presentes na medula óssea de organismos adultos e que são recrutadas para o tecido lesionado iniciando a angiogênese. São células que expressam marcadores de células tronco hematopoiéticas e marcadores específicos endoteliais. Já no segundo processo a formação de novos vasos inicia-se a partir da vasodilatação e aumento da permeabilidade daqueles já existentes e segue com a ação de metaloproteinases de matriz (MMPs) desfazendo o contato entre as células endoteliais, as quais migram em direção ao estímulo, proliferam e amadurecem em novas células endoteliais formando novos vasos (CONWAY et al., 2001; JAIN, 2003). Estes vasos recém formados provém o local da lesão com nutrientes e oxigênio, oferecendo condições fundamentais para a reconstituição do novo tecido.

2.2.4 Fase de Remodelação

O processo de reparo conclui-se com a remodelação tecidual, fase caracterizada pela redução da proliferação celular, apoptose de células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos. O local do reparo tecidual passa a conter principalmente colágeno e outros componentes da matriz (GURTNER et al., 2008; KONDO & ISHIDA, 2010). Nesta fase, o organismo busca um equilíbrio entre a produção e degradação dos componentes da MEC, processo mediado pelas MMPs, proteases responsáveis pelos vários ciclos de degradação e que podem ser liberadas por macrófagos e outras células (DEVALARY et al., 2011). Em conjunto, ocorre uma reorganização das fibrilas de colágeno recém-sintetizadas, ressíntese e rearranjo dos componentes da matriz, dentre eles a substituição de colágeno do tipo III pelo colágeno do tipo I, de forma a tornar o novo tecido mais resistente (BALBINO et al., 2005; DELAVARY et al., 2011; REINKE & SORG, 2012).

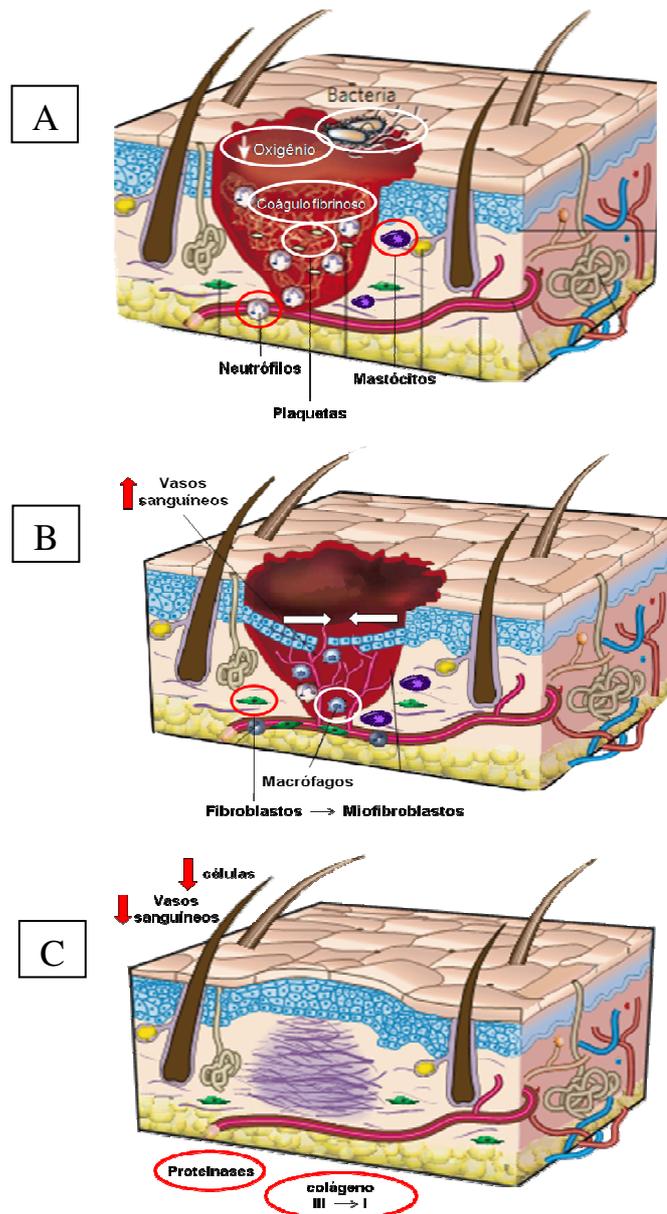


Figura 03: A ilustração mostra as principais etapas do processo de cicatrização. A) Hemostasia - caracterizada pela agregação plaquetária com a formação do tampão hemostático. Inflamatória - recrutamento de células de defesa, os mastócitos e os neutrófilos. Além disto há um influxo de monócitos para a região com conseqüente diferenciação em macrófagos para a fagocitose de restos celulares. B) Proliferação – formação de novos vasos sanguíneos proliferação de queratinócitos para a reepitelização e migração de fibroblastos, estes para a renovação da matriz e, que sob estímulos específicos se diferenciam em miofibroblastos, células importantes para a contração da lesão. C) Remodelação – redução dos vasos sanguíneos e de células; atuação de proteínases e substituição dos tipos de colágeno, induzindo maior resistência ao tecido. Fonte: modificado de GURTNER et al., 2008.

2.3 Mastócitos na cicatrização

Os mastócitos células que derivam de precursores hematopoiéticos, são caracterizadas morfologicamente pelo citoplasma rico em grânulos metacromáticos e funcionalmente pela capacidade de migração para os tecidos periféricos. Funcionalmente importantes em processos inflamatórios e nas reações de hipersensibilidade imediata, carregam em seus grânulos mediadores biologicamente ativos que são liberados por exocitose mediante estímulos externos, mecanismo descrito como desgranulação (STONE et al., 2010).

Dentre alguns importantes mediadores constituintes dos grânulos citoplasmáticos listam-se os mediadores primários, a saber, heparina, histamina, proteases neutras (triptase, quimase e carboxipeptidases), fator quimiotático para eosinófilos (ECF) e fator quimiotático para neutrófilos (NCF). Credita-se ainda aos mastócitos recém ativados a importante função na síntese de mediadores secundários de ação parácrina, convertidos do ácido araquidônico para o grupo dos eicosanóides, quais sejam os leucotrienos (C_4 , D_4 , e E_4), tromboxanos (TXA_2 e TXB_2) e prostaglandinas (PDG_2), além de citocinas como bradicininas, interleucinas (IL-4, IL-5, IL-6) e fator de necrose tumoral ($TNF-\alpha$) (NOLI & MIOLO, 2001; STONE et al., 2010).

Visto a localização dos mastócitos e os mediadores por eles liberados, estas células mostram-se atuantes no processo de reparo e diversos estudos tem evidenciado o papel destas células durante a cicatrização (NISHIKORI et al., 1998; SASAKI et al., 2003, WELLER et al., 2006; NG, 2010; FOLEY et al., 2011; YOUNAN et al., 2011).

Durante a fase inflamatória, células endoteliais tornam-se ativadas e liberam moléculas como fatores-célula tronco (SCF) e IL-3, que atuam nos mastócitos, levando a sua proliferação e migração (METCALFE et al., 1997). $TGF-\beta$, importante citocina do processo de reparo tecidual, também atua na quimiotaxia dos mastócitos (HALOVA et al., 2012). Estas células são importantes nesta fase por liberarem mediadores que ditam a vasodilatação, como a histamina, prostaglandinas e leucotrienos; mediadores que levam a maior permeabilidade dos vasos, como o fator de crescimento endotelial vascular; e mediadores que levam a degradação de parte da MEC, como as

proteases, o que, desta maneira, favorece a quimiotaxia para as primeiras células inflamatórias a atuarem no reparo, os neutrófilos (NG, 2010).

Na fase proliferativa do processo de cicatrização, em que fibroblastos estão em plena atividade, participando na deposição de nova MEC, a liberação de SCF ajuda a manter a proliferação, quimiotaxia e ativação de mastócitos (METCALFE et al., 1997; ZOOG et al., 2009). Estudos com mastócitos humanos tem mostrado que estes por sua vez podem promover a proliferação e ativação dos fibroblastos (GRUBER et al., 1997; TRAUTMANN et al., 2000; GARBUZENKO et al., 2002; STONE et al., 2010). Os mastócitos também podem participar do controle dos processos de reepitelização e angiogênese que se dão nesta fase, por secretarem HB-EFG e fatores de crescimento endoteliais (ARTUC et al., 1999 e 2002).

Na fase de remodelação, os mastócitos atuam através da liberação de serino proteases, MMPs e seus inibidores, levando a um equilíbrio entre síntese e degradação da nova MEC (NG, 2010).

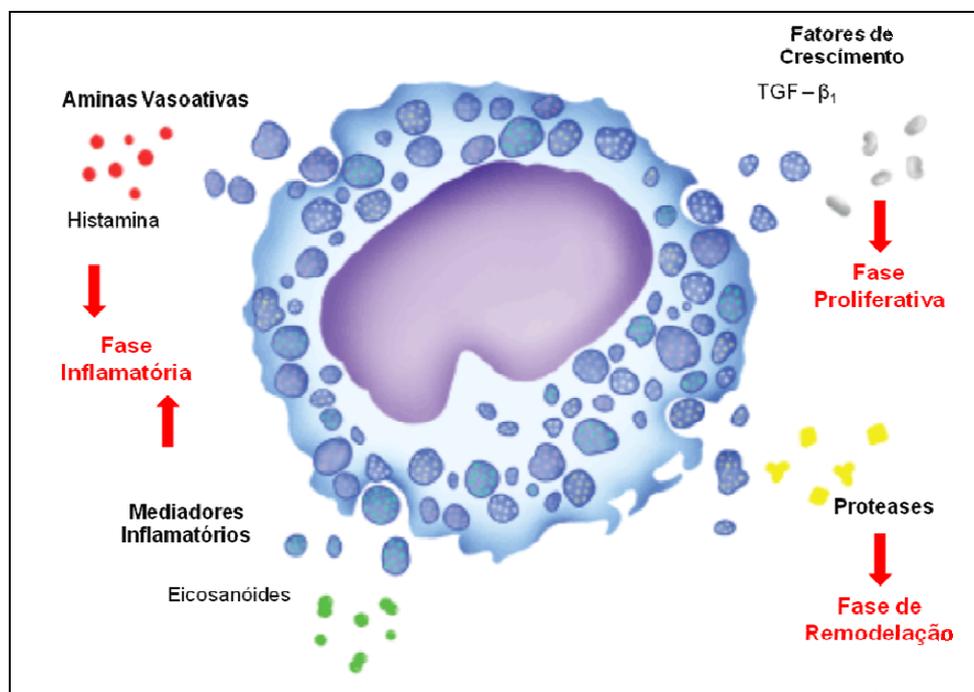


Figura 04: Esquema de mastócito indicando exemplos de mediadores liberados por esta célula e em qual fase do processo de reparo eles atuam. Fonte: modificado de NG, 2010.

2.4 Fibroblastos e miofibroblastos na cicatrização

Uma das principais células presentes no tecido de granulação durante a cicatrização são os fibroblastos. Tais células derivam de células tronco mesenquimais, são caracteristicamente fusiformes e apresentam-se dispersas na MEC que sintetizam. Entre os componentes da matriz, os fibroblastos são responsáveis por sintetizarem diferentes tipos de colágeno e glicoproteínas adesivas. Estas células também sintetizam e liberam as proteases que participam da degradação da matriz, exercendo papel importante para o equilíbrio entre produção e quebra desta durante o processo de reparo. (TOMASEK et al., 2002; KALLURI & ZEISBERG, 2006; BUCALA, 2012).

Quando o tecido sofre uma lesão, alguns estímulos, como diversos fatores de crescimento liberados pelas células epiteliais lesionadas e células do infiltrado inflamatório, levam os fibroblastos a aumentarem sua atividade e estes são classificados como estando ativados (ZEISBERG et al., 2000). Nesta condição de ativação durante o processo de reparo, os fibroblastos passam a sintetizar grande quantidade de constituintes da matriz, função que o caracteriza com núcleo predominantemente eucromático, retículo endoplasmático rugoso (RER) bem desenvolvido e proeminentes complexos de Golgi (KALLURI & ZEISBERG 2006).

No decorrer do processo de reparo, alguns fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, cuja principal característica é a expressão de actina de músculo liso- α . Esta diferenciação se dá em resposta a modificações na organização, composição e propriedade mecânica da matriz e em resposta a citocinas liberadas de células inflamatórias, como fator de crescimento transformante (TGF β 1) (HINZ, 2007; MICALLEF et al., 2012). Sua identificação à microscopia eletrônica é possível graças principalmente à presença de feixes de microfilamentos dispostos paralelos ao longo do eixo da célula, além de outras características, como proeminente RER e presença de fibronexus que consistem de pontos na superfície celular de convergência de miofilamentos intracelulares e filamentos extracelulares de fibronectina (EYDEN 2001; ITO et al., 2011; SANDBO & DULIN 2011). Estas células exercem também a função de síntese de matriz, participando da remodelação do tecido de granulação,

além da função de desenvolver força contrátil, atuando na contração da ferida. No final do processo de reparo em condições fisiológicas, tais atividades secretórias e contráteis dos miofibroblastos cessam e estas células sofrem apoptose (REINKE & SORG, 2012). Porém, em casos de fibrose e formação excessiva de cicatriz, verifica-se a permanência da ativação dos miofibroblastos (THANNICKAL, 2012; MICALLEF et al., 2012).

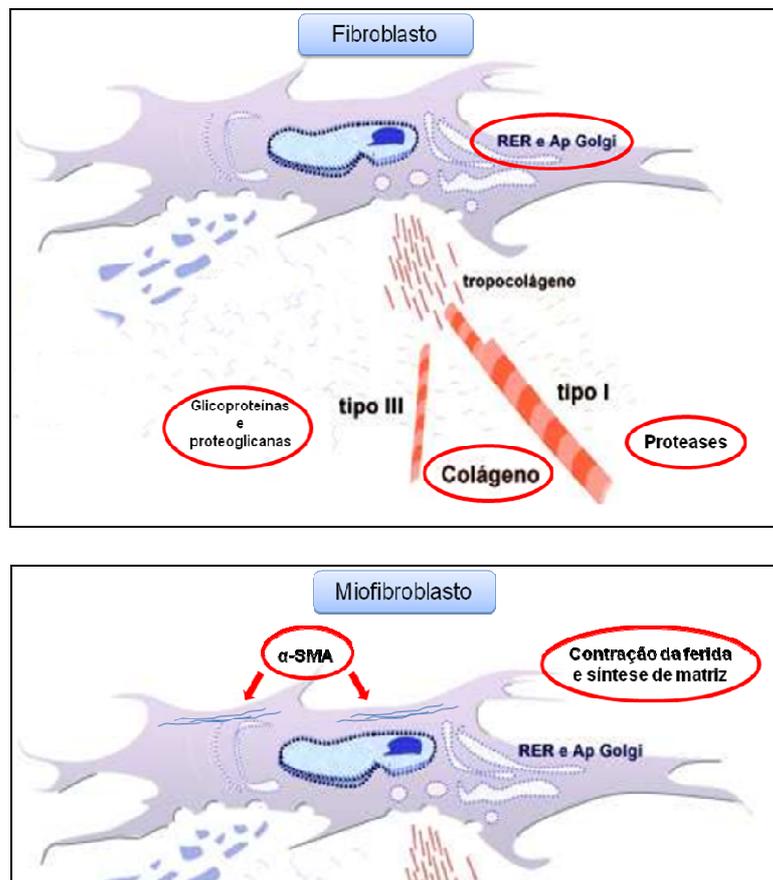


Figura 05: O esquema ilustra duas células importantes durante o processo de reparo. Em **A** observa-se um fibroblasto com algumas particularidades de atividade sintética, como a presença de organelas especializadas em síntese (RER e complexo de Golgi). Em **B** observam-se os miofibroblastos, células que carregam como fundamental característica a expressão de actina de músculo liso (esquema). Além de também contribuírem para a síntese de matriz, os miofibroblastos agem na contração da ferida. Fonte: modificado de DELABIO-FERRAZ et al., 2010.

2.5 Complicações no Processo de Cicatrização

Por se caracterizar como um mecanismo complexo, o processo de cicatrização está sujeito a alterações bioquímicas e fisiológicas, decorrentes de enfermidades e/ou infecções. A ocorrência de um distúrbio no processo reparativo pode levar a duas consequências: atraso do reparo da lesão, ocasionando feridas crônicas ou formação de cicatriz em excesso, o que pode levar ao desenvolvimento de quelóides (BRAN et al., 2009).

Feridas crônicas são frequentes em pacientes que apresentam enfermidades como diabetes, doença arterial periférica, as quais muitas vezes estão associadas à hipertensão, obesidade e aterosclerose. Tais doenças podem levar a inadequada perfusão sanguínea e inadequada oxigenação de tecido, características relacionadas ao atraso da cicatrização de feridas podendo levar ao quadro de úlceras crônicas (ESCANDON et al., 2011). Alterações metabólicas nos casos de diabetes estão muitas vezes associadas às úlceras crônicas de membros inferiores, o que aumenta o risco de amputação em pacientes diabéticos (FANG & GALIANO, 2008), fato preocupante visto que o número de indivíduos diabéticos tende a crescer nas próximas décadas (WILD et al., 2004). Além das enfermidades já citadas, a anemia falciforme também tem sido relacionada ao desenvolvimento de úlceras de perna, apresentando um quadro de cicatrização lenta e lesão recorrente (PALADINO, 2007). Além disso, úlceras decorrentes do desenvolvimento de tumores também tem sido relatadas na literatura (BHATTACHARJEE et al., 2010; DINATO et al., 2011).

Já as cicatrizes hipertróficas ou quelóides podem ser decorrentes de alguma desordem fibroproliferativa, que levem a síntese excessiva de matriz e/ou impedimento de sua degradação (BRAN et al., 2009). Esse desequilíbrio da fase de remodelação pode ter vários fatores relacionados, tais como o descontrole da apoptose de fibroblastos, a atividade anormal de fatores de crescimento e citocinas que estimulam a proliferação, migração celular e a produção de matriz, além da síntese deficiente de fatores que degradam a matriz e tensão mecânica (LUO et al., 2001; BRAN et al., 2009; LI et al., 2011).

2.6 Uso de plantas na cicatrização

O Brasil, pela sua rica biodiversidade, apresenta em seus recursos naturais possibilidades reais de cura para diversas enfermidades (MACIEL et al., 2002), dentre elas a ação dos extratos de plantas no processo de cicatrização. A utilização tópica de extrato de ipê-roxo (*Tabebuia avellanedae*) e barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) mostrou ação efetiva no processo de cicatrização em feridas cutâneas de ratos sob hipertensão venosa (COELHO et al., 2010). O extrato aquoso do babaçu (*Orbignyaphalerata*), aplicado intraperitonealmente um dia antes do processo operatório em ratos, também apresentou resposta positiva na cicatrização tecidual destes animais (MARTINS et al., 2006). O óleo de pequi (*Caryocar coriaceum*) quando utilizado no tratamento de feridas de pele em camundongos Swiss, reduziu área da lesão e aumentou porcentagem de contração da lesão (DE OLIVEIRA et al., 2010). Uma lectina extraída de *Cratylia mollis*, leguminosa conhecida como camaratuba, mostrou-se efetiva no tratamento de lesões cutâneas experimentais em camundongos Swiss (DE MELO et al., 2011).

Frente a estes resultados, sugere-se que os princípios ativos de plantas promovam efeitos que podem controlar os mecanismos de inflamação e/ou o recrutamento de células como macrófagos, mastócitos, fibroblastos ou a ação destas células no local da lesão. Qualquer interferência em algum processo das fases da cicatrização que desencadeie um reparo melhor e em menor tempo torna-se interessante para a busca de novos tratamentos de lesões.

Selecionamos duas plantas para o desenvolvimento do presente estudo reconhecidas na medicina popular por suas ações analgésica e antiinflamatória em disfunções gastrointestinais. Para uma das plantas já foram feitos estudos farmacológicos que demonstraram seus efeitos como antiinflamatórios, antioxidantes, hepatoprotetor, antihiperglicêmico, antiviral e antibacteriano. No caso da segunda planta os estudos científicos são ainda incipientes, embora já se tenha o conhecimento etnobotânico, que demonstraram seus efeitos, semelhantes à primeira planta.

2.7 Uso de plaquetas na cicatrização

Além de plantas, vários produtos sintéticos ou de origem animal, são também utilizados na investigação para um melhor processo de reparo.

As plaquetas são fonte de diversos fatores de crescimento e outros mediadores, como citocinas e quimiocinas, conhecidos por promover proliferação celular e quimiotaxia, processos importantes no desenvolvimento cicatricial (NURDEN, 2011). Dentre os procedimentos normais da rotina de trabalho dos órgãos institucionais de coleta voluntária de sangue, é realidade e necessário o descarte de plaquetas já estocadas por cinco dias de armazenagem, devido ao seu curto prazo de validade. No entanto, foi demonstrado que mesmo após seu vencimento, as plaquetas continuam a apresentar sua eficácia no tratamento de úlceras (SUM et al., 2007). Desta forma, nos últimos anos, muitos pesquisadores focaram nesta característica relevante e estudos avaliando a utilização de plaquetas no favorecimento da cicatrização de feridas de pele tem sido bastante presentes na literatura. HARRISON-BALESTRA et al (2002) mostraram que um gel baseado em fator de crescimento derivado de plaquetas humanas foi efetivo no tratamento de úlceras crônicas. Em outro estudo com pacientes apresentando úlceras crônicas, o tratamento com gel de plaquetas autólogo levou a uma melhora significativa das feridas (MAZZUCCO et al., 2004). Em estudo com modelo animal diabético, a aplicação de plasma rico em plaquetas em lesão cutânea induzida nestes animais, resultou em melhor desenvolvimento do tecido de granulação e resposta angiogênica (PIETRAMAGGIORI et al., 2006, 2008). O uso de gel de plaquetas alógenas também demonstrou resultado positivo no início do processo cicatrização em um estudo piloto realizado com pacientes que apresentavam úlceras de pressão (SCEVOLA et al., 2010). Em outro recente estudo piloto, pacientes com úlcera crônica de pele decorrente de esclerose sistêmica tratados com gel de plaquetas mostraram significativas melhoras em curto intervalo de tempo (GIUGGIOLI et al. 2011). Camundongos cujas lesões excisionais foram tratadas com plasma humano rico em plaquetas apresentaram rápida regeneração dermal e epidermal (YANG et al., 2011).

3. Justificativa

Na expectativa de se descrever novos tratamentos para lesões de pele, buscou-se analisar o potencial de reparo tecidual de duas espécies de plantas associadas ou não às plaquetas, através das técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão.

As análises histológicas de fragmentos de tecido lesionado no decorrer do seu processo de cicatrização sob diferentes tratamentos podem traduzir a dinâmica do processo cicatricial, indicando possíveis alterações celulares e teciduais. Em última análise, os estudos podem sugerir como determinado tratamento atua na reparação do tecido, seus benefícios ou não, na proposta de efetivar a cicatrização com qualidade.

4 Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de reparo tecidual de duas espécies de plantas e de plaquetas através das técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão.

4.2 Objetivos específicos

- Quantificar os mastócitos presentes na região de cicatrização através de microscopia de luz;
- Identificar e quantificar os miofibroblastos presentes na região de cicatrização através da técnica de imunohistoquímica;
- Analisar as fibras de colágeno e fibras reticulares da matriz extracelular na área de cicatrização, através de análises morfométricas à microscopia de luz;
- Caracterizar a ultraestrutura de fibrilas de colágeno, fibroblastos e miofibroblastos presentes na região de cicatrização de todos os grupos experimentais, através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

5. Material e métodos

O presente trabalho foi desenvolvido segundo as recomendações éticas em experimentação animal, de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, consoante à legislação brasileira que regulamenta esta atividade, sendo o mesmo aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo animais (UFSJ-CEPEA nº 08/2009).

5.1 Animais

Para a execução dos experimentos foram utilizados 60 camundongos machos da linhagem Swiss com idades entre 4 e 6 semanas, acondicionados em gaiolas plásticas individuais, com livre acesso a água e ração e mantidos em controle de fotoperíodo de doze horas claro/escuro em gabinete de experimentação, no biotério do Campus Centro-Oeste Dona Lindu da Universidade Federal de São João Del-Rei.

5.2 Coleta, identificação e obtenção dos extratos do material vegetal

As amostras das plantas selecionadas para o estudo foram coletadas e preparadas para a obtenção do extrato. A parte da planta utilizada para obtenção do extrato foram as flores. Realizou-se então a secagem das flores em estufa sem circulação de ar, empregando temperaturas entre 35 e 40°C. Após secagem, a planta foi pulverizada (triturada) em moinho obtendo assim amostras da droga vegetal.

A extração da droga foi feita pelo método de percolação cujo processo consiste na deposição da droga vegetal (100g) em um funil de separação sobre a qual é vertido inicialmente 400 mL do líquido extrator (álcool 70%) e assim permanece por 16 horas. Este procedimento de maceração resulta na impregnação dos princípios solúveis da planta no líquido. Após este tempo, o funil é aberto para filtração com velocidade de gotejamento de 20 gotas por minuto, aproximadamente, sendo realizada renovação constante do líquido extrator. O extrato bruto líquido resultante foi acondicionado em tubos tipo falcon, os quais foram mantidos em ultrafreezer e posteriormente seguiram

para o processo de desidratação por liofilização (liofilizador LiobrasK105), para obtenção do extrato bruto em pó, o qual foi adicionado ao gel base.

5.3 Obtenção do liofilizado de plaquetas

As plaquetas consideradas para descarte foram doadas pelo Serviço de Hemoterapia e Hematologia, Divinópolis (MG). 50 mL de plaquetas foram diluídas em 200 mL de solução ACD pH 6.8. Em seguida esta solução foi dividida em 3 tubos falcon estéreis e centrifugados à 1500G por 15min. Após a centrifugação os sobrenadantes foram desprezados e os pellets ressuspensos em 5 mL de Tampão Tyrodes. Estas soluções, contendo as plaquetas, permaneceram sob agitação por 2 horas. Após este período foi adicionada Albumina de soro bovino (BSA) a 5% do volume total (g/v). A solução foi congelada à -20°C por aproximadamente 1 hora e em seguida, transferido para superfreezer (-80°C). Antes da liofilização as amostras foram resfriadas em Nitrogênio líquido. O liofilizado foi adicionado ao gel na mesma proporção usada no preparo dos extratos vegetais.

5.4 Indução da lesão, tratamento e coleta do tecido

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos com 10 animais cada. Posteriormente, os animais de cada grupo foram divididos em 2 subgrupos de acordo com o tempo de sacrifício, após nove e 21 dias de tratamento (Tabela 1). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais identificadas.

GRUPOS	ANIMAIS	TRATAMENTOS	TEMPO DE SACRIFÍCIO
Grupo 1	1A até 1E 1F até 1J	Gel base – controle	9 dias 21 dias
Grupo 2	2A até 2E 2F até 2J	Extrato da planta A em gel	9 dias 21 dias
Grupo 3	3A até 3E 3F até 3J	Extrato da planta A + plaquetas em gel	9 dias 21 dias
Grupo 4	4A até 4E 4F até 4J	Extrato da planta B em gel	9 dias 21 dias
Grupo 5	5A até 5E 5F até 5J	Extrato da planta B + plaquetas em gel	9 dias 21 dias
Grupo 6	6A até 6E 6F até 6J	Plaquetas em gel	9 dias 21 dias

Tabela 01: Tabela especificando os grupos experimentais, identificação dos animais e tratamentos aplicados a cada grupo.

Os grupos receberam códigos de estudo “cego”, ou seja, ocultando a natureza do tratamento administrado, até o término das análises.

Após pesagem, os animais foram anestesiados com solução de Ketamina 50mg/Kg, Xilazina 20mg/Kg. Em seguida, realizou-se a tricotomia na região torácico-dorsal, área selecionada para evitar o contato do próprio animal, além ser a comumente usada para a indução de feridas, conforme literatura (LEE et al., 2011; SILVA SANTOS et al., 2010). Uma vez tricotomizada, uma área de 1 cm de diâmetro delimitada e marcada com azul de violeta era submetida à uma excisão circular com material cirúrgico. (Figura 06).

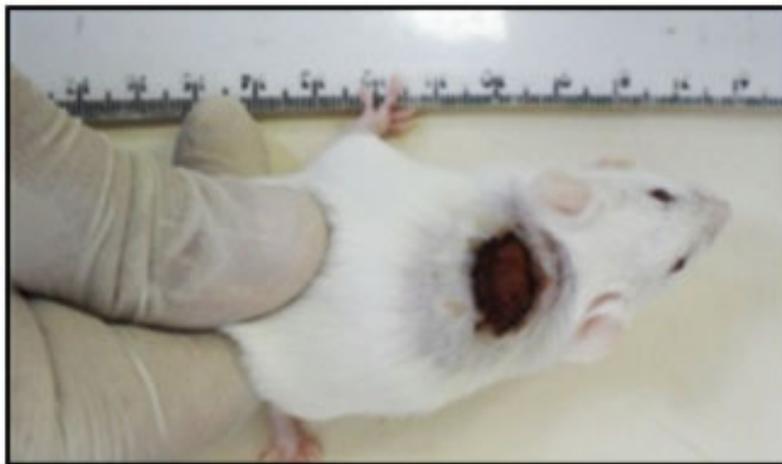


Figura 06: Lesão excisional de 1cm de diâmetro induzida nos animais.

O tratamento consistiu da aplicação de 45 mg do gel, quantidade suficiente para cobrir toda a área da lesão, sendo que cada animal recebeu o gel especificado de acordo com os grupos apresentados na Tabela 01. Este procedimento foi iniciado no mesmo dia da indução da lesão e seguiu durante nove e 21 dias, sendo os géis aplicados uma vez ao dia, sempre no mesmo horário.

As coletas para as análises foram realizadas no 9º e 21º dias após o início do tratamento, de acordo com a literatura (PIETRAMAGGIORI et al., 2008). No presente trabalho, foram sacrificados cinco animais de cada grupo tratado no 9º dia, e os demais no 21º dia. De cada animal foram coletados fragmentos de pele da área lesionada, estes conduzidos aos processamentos metodológicos destinados às análises que serão descritas abaixo.

5.5 Processamento das amostras

5.5.1 Processamento histológico para análise de fibras colágenas e reticulares

Fragmentos coletados no 9º e 21º dias foram fixados em por imersão em líquido de Bouin por 24 horas e processados para as análises das fibras colágenas e reticulares à microscopia de luz. Os fragmentos foram submetidos às etapas de desidratação, em série crescente de álcool (70º, 80º, 90º,

absoluto I, absoluto II e absoluto III) seguido das etapas de diafanização em solução de xilol e impregnação e inclusão de rotina em parafina. Os blocos foram submetidos à microtomia, obtendo-se secções de 5 µm de espessura coletadas em lâminas histológicas.

As análises das fibras colágenas e das reticulares seguiram metodologias de coloração específicas.

5.5.1.1 Coloração com tricrômico de Gomori

Esta técnica marca as fibras colágenas na cor verde. Após os procedimentos de desparafinar e hidratar as lâminas, estas foram lavadas e re-fixadas em Bouin por 1 hora em estufa de 56°C. Após nova lavagem de 10 minutos em água corrente, foram coradas com Hematoxilina por 1 minuto, lavadas em água corrente por mais 10 minutos e coradas com Gomori por 20 minutos. Em seguida, eliminou-se o excesso do corante com banhos de água corrente (30'') e imersão em solução de ácido acético e ácido fosfotúngstico, por 2 minutos. O processo seguiu com a desidratação e diafanização, finalizando com a montagem das lâminas.

5.5.1.2 Coloração com reticulina

Esta técnica é utilizada para marcação das fibras reticulares (colágeno do tipo III). Para esta coloração, após os procedimentos de desparafinar e hidratar as lâminas, estas são lavadas em água destilada e acondicionadas em solução de 0,3 ml de ácido sulfúrico em permanganato de potássio a 0,5% (o qual deve ser preparado 3 dias antes do uso) durante 2'. Após lavagem das lâminas em água corrente (5') e em água destilada, estas são imersas em ácido oxálico (5%) até descoloração dos cortes ($\pm 25''$). Posteriormente, lava-se as lâminas em água corrente (5') e água destilada e estas são tratadas com alúmen de ferro (sulfato ferroso amoniacal) a 2% durante 2'. Lava-se novamente as lâminas em água corrente (10') e em água destilada e estas são imersas em solução de carbonato de prata durante 2'. Após lavagem em água destilada rapidamente (10''), as lâminas permanecem em formol a 6% sob agitação e são posteriormente lavadas em água corrente. Segue-se com

imersão das lâminas em cloreto de ouro a 0,2% até os cortes ficarem cinza (5') e em seguida lava-se em água corrente (5'). As lâminas são então tratadas com hipossulfito de sódio a 5% por 2' e lavadas em água corrente por 5'. Segue-se então com os processos de desidratação, diafanização e montagem das lâminas.

5.5.2 Processamento histológico para análise de mastócitos

Para esta análise foram utilizados fragmentos coletados no 9º dia, período com sinais típicos de atividade de cicatrização. As amostras seguiram procedimentos para inclusão em resina de metacrilato, técnica padronizada pelo nosso grupo e que já foi utilizada para análise de mastócitos (Chiarini-Garcia & Pereira, 1999; Chiarini-Garcia et al., 2000) e que tem mostrado melhor resultado quanto ao detalhamento dos componentes teciduais. O material foi fixado em solução de Karnovisk modificado (paraformaldeído a 2% + glutaraldeído a 2,5%) durante 18h e seguiu para o procedimento de desidratação em série alcoólica crescente (70º, 80º, 90º, 95º e absoluto) por 40' em cada. Posteriormente, as amostras seguiram para a fase de infiltração (na proporção de resina de metacrilato usada 1x onde permaneceram durante 30'. Após esse tempo, a resina usada foi substituída por resina nova, onde as amostras permaneceram *overnight*, sob agitação. Nova solução de resina de metacrilato foi preparada no momento da inclusão, na qual foi adicionada uma solução endurecedora. As amostras foram então incluídas nesta resina recém preparada e permaneceram em temperatura ambiente até a polimerização completa. Seguiu-se para a etapa de microtomia obtendo-se secções semi-seriadas de 3µm de espessura e 10µm de espaçamento entre elas. Os cortes foram corados com azul de toluidina, para evidenciação dos mastócitos.

5.5.3 Processamento imunohistoquímico para análise de miofibroblastos

Fragmentos coletados no 9º dia foram fixados em formol 10%, mantidos em temperatura ambiente e submetidos aos procedimentos padrão para impregnação e inclusão em parafina. Os blocos foram submetidos à microtomia, obtendo-se secções de 5 µm espessura coletadas em lâminas

histológicas silanizadas. Após as etapas de desidratação e diafanização as lâminas foram imersas em meio de citrato de sódio para recuperação antigênica, em banho-maria por 20 minutos. Em seguida as lâminas foram incubadas com peróxido de hidrogênio (3%) para bloqueio da peroxidase endógena, lavadas em PBS e incubadas com albumina de soro bovino (BSA) 2% por 40 minutos para o bloqueio protéico. Após o bloqueio, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo primário α - actina de músculo liso (α -Smooth Muscle Actin – α -SMA) (DAKO®) diluído (1:100) por 1h em câmara úmida. Como controle utilizamos uma lâmina para a qual foi omitido o anticorpo primário. Após lavagem em PBS, as lâminas foram então incubadas com link (amarelo) durante 40 minutos, seguido de lavagem em PBS e posterior incubação com streptavidina (vermelho) durante 30 minutos, seguido de nova lavagem em PBS. Então, devolveu-se a atividade da peroxidase com DAB (1:2). As lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, contra-coradas com Hematoxilina por 20” e lavadas novamente em água corrente durante 5 minutos. Seguiram então para os processos de desidratação, diafanização e montagem.

5.5.4 Processamento do material para análises à microscopia eletrônica de transmissão

Para esta análise, seguimos com os procedimentos de rotina para MET já padronizados por nosso grupo. Fragmentos coletados no 9º dia foram fixados em Karnovsky modificado (PA 2% + GA 2,5%) por cerca de 18 horas, lavados em tampão fosfato 0,1M e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio reduzido (solução de 1% de tetróxido de ósmio e 1,5% de ferrocianeto de potássio) por 1h em câmara escura. Após lavagem com água destilada, os fragmentos de pele foram contrastados em bloco com solução aquosa de acetato de uranila a 2% *overnight*. Seguiu-se então para a etapa de desidratação em série crescente de álcool 50º, 70º, 85º, 95º (2 vezes de 10 minutos cada), absoluto (3 vezes de 10 minutos) e acetona (2 vezes de 20 minutos). A etapa seguinte foi de infiltração em solução de acetona-resina Epon, nas seguintes proporções respectivamente: 2:1 durante 1h, 1:1 durante mais 1h e posterior proporção de 1:2 *overnight*. No dia seguinte, os fragmentos

foram transferidos para resina Epon pura, na qual permaneceram por 5h. Os fragmentos foram mantidos sob homogeneização lenta, à temperatura ambiente durante toda a etapa de infiltração. Os fragmentos foram então incluídos em solução pura de resina Epon, acondicionados em cápsulas BEEM (Ted Pella, Inc. Cat # 660-2) e mantidas em estufa a 60 °C. Após 48h, seguiu-se para a etapa de microtomia com a obtenção de cortes semi-finos de 1µm de espessura, corados com azul de toluidina, etapa imprescindível para a seleção das áreas destinadas para a obtenção de secções ultra-finas (50 nm de espessura) e análise ao microscópio eletrônico de transmissão.

5.6 Análises morfométricas

5.6.1 Fibras colágenas e reticulares

A quantificação do colágeno foi realizada segundo RUSSO et al. (2009), com algumas adaptações para nosso material. Imagens digitais do material preparado nas lâminas foram capturadas com uma câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio, utilizando objetiva de 40x. Foram analisadas 10 imagens da região de cicatrização para cada animal, com n=3-5 por grupo para cada tempo (9 e 21 dias), sendo as áreas coradas em verde pelo tricrômico de Gomori (correspondentes ao colágeno) e em negro pela reticulina (correspondentes as fibras reticulares) medidas através do *software Axion Vision 4.8*. Este programa permite a seleção de *pixels* de cor específicos e automaticamente o programa seleciona *pixels* semelhantes, individualizando diferentes cores selecionadas. Desta forma, foi possível calcular a média das áreas marcada por mm², sendo este índice utilizado para descrever a deposição de colágeno na região de cicatrização.

5.6.2 Análise quantitativa de mastócitos

A quantificação dos mastócitos foi realizada à microscopia de luz utilizando objetiva de 40x, percorrendo as áreas de borda e as de tecido de granulação, em 4 secções de cada animal, sendo o n=3-5 por grupo para o

tempo de nove dias. Somou-se a contagem das secções de cada animal, calculou-se o número de mastócitos por mm^2 de área de borda e de área de tecido de granulação, que foram somados a fim de se obter este valor para a área total. Para medir as áreas analisadas, imagens digitais foram obtidas utilizando câmera fotográfica digital *Q-Color 3* da *Olympus* acoplada ao microscópio *Olympus BX-51*, utilizando objetiva de 4x e analisadas através do software *Image Pro Express*. As áreas de epitélio, folículos e glândulas foram excluídas para a medida da área (Figura 07).

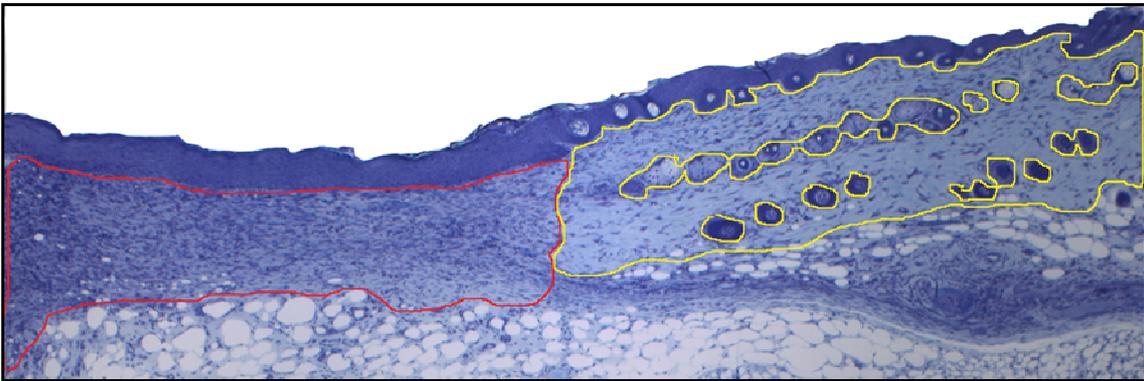


Figura 07: A área delimitada em vermelho corresponde à área de tecido de granulação. A área delimitada em amarelo corresponde à área de borda.

5.6.3 Análise quantitativa de miofibroblastos

A quantificação de miofibroblastos foi realizada na área de tecido de granulação da região de cicatrização. Células fusiformes marcadas com α -SMA foram identificadas, realizando sua contagem em microscópio de luz, utilizando objetiva de 100x com óleo de imersão, percorrendo 15 campos. A área do campo analisada foi medida com régua acoplada à ocular. Fez-se a média da contagem dos campos e utilizando a medida da área, calculou-se o número de células por mm^2 de área analisada.

5.7 Análise estatística

Para as variáveis porcentagem da deposição de fibras reticulares e porcentagem da deposição de colágeno foi utilizado o delineamento experimental inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 6x2, sendo 6 o número de plantas e 2 o número de dias avaliados. Para as variáveis número de mastócitos/mm² e número de miofibroblastos/mm² utilizou-se delineamento inteiramente ao acaso composto por 6 tratamentos.

As variáveis foram submetidas ao teste de Cochran e Shapiro-Wilk para verificar a homogeneidade de variâncias e distribuição de normalidade dentro do grupo experimental. Como os dados respeitaram estes princípios foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos resultados comparadas pelo teste SNK para as variáveis porcentagem da deposição de fibras reticulares e porcentagem da deposição de colágeno; e pelo teste t para as variáveis número de mastócitos/mm² e número de miofibroblastos/mm².

6. Resultados

6.1 Quantificação dos mastócitos na região de cicatrização nove dias após indução da lesão

Os mastócitos apresentaram-se com sua característica metacromasia quando corados com azul de toluidina, permitindo sua identificação e contagem (Figura 08).

O número de mastócitos foi significativamente maior em feridas tratadas apenas com plaquetas, quando comparado aos demais grupos. Foi observado que o grupo tratado com a planta A exibiu um número significativamente maior de mastócitos em relação ao grupo controle. (Figura 09).

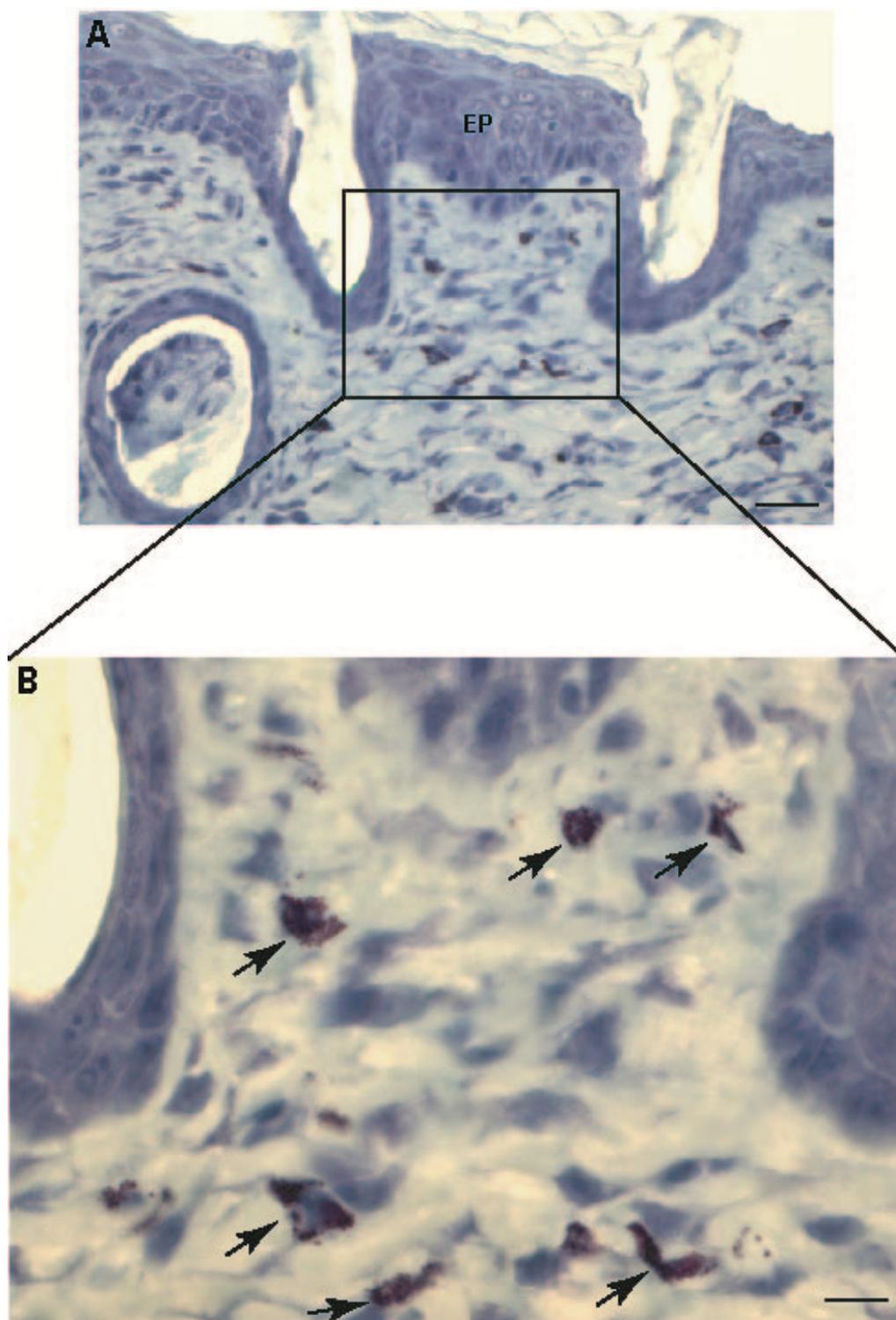


Figura 08: Micrografia de luz representativa da marcação para mastócitos através de coloração com azul de toluidina. Em A observa-se região da pele da borda da lesão com mastócitos distribuídos na derme. EP indica região do epitélio. Barra = 30 μ m. Em B observa-se ampliação da área delimitada em A com mastócitos indicados pelas setas. Barra = 12 μ m.

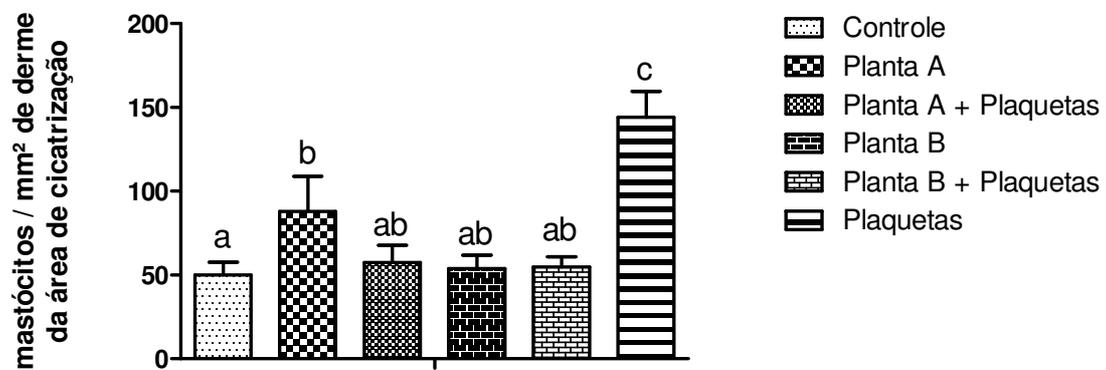


Figura 09: Gráfico mostrando o número de mastócitos por mm² de área da região de cicatrização, compreendendo borda e tecido de granulação, nove dias após a indução da lesão nos diferentes grupos. Resultado expresso como média (erro padrão).

(b) $P < 0.05$ (c) $P < 0,001$

6.2 Quantificação dos miofibroblastos marcados por α -SMA através de imunohistoquímica

Definiu-se como miofibroblastos células fusiformes que mostraram marcação citoplasmática para o anticorpo α -SMA, sendo a positividade indicada em tons escuros (marrom), e assim identificadas, realizou-se sua contagem (Figura 10).

Observou-se um número significativamente menor de miofibroblastos nos cinco tratamentos (planta A; planta A + plaquetas; planta B; planta B + plaquetas; plaquetas) quando comparados ao grupo controle. Além disso, notou-se número significativamente maior de miofibroblastos no grupo tratado com a planta A + plaquetas quando comparado aos demais tratamentos (figura 11).

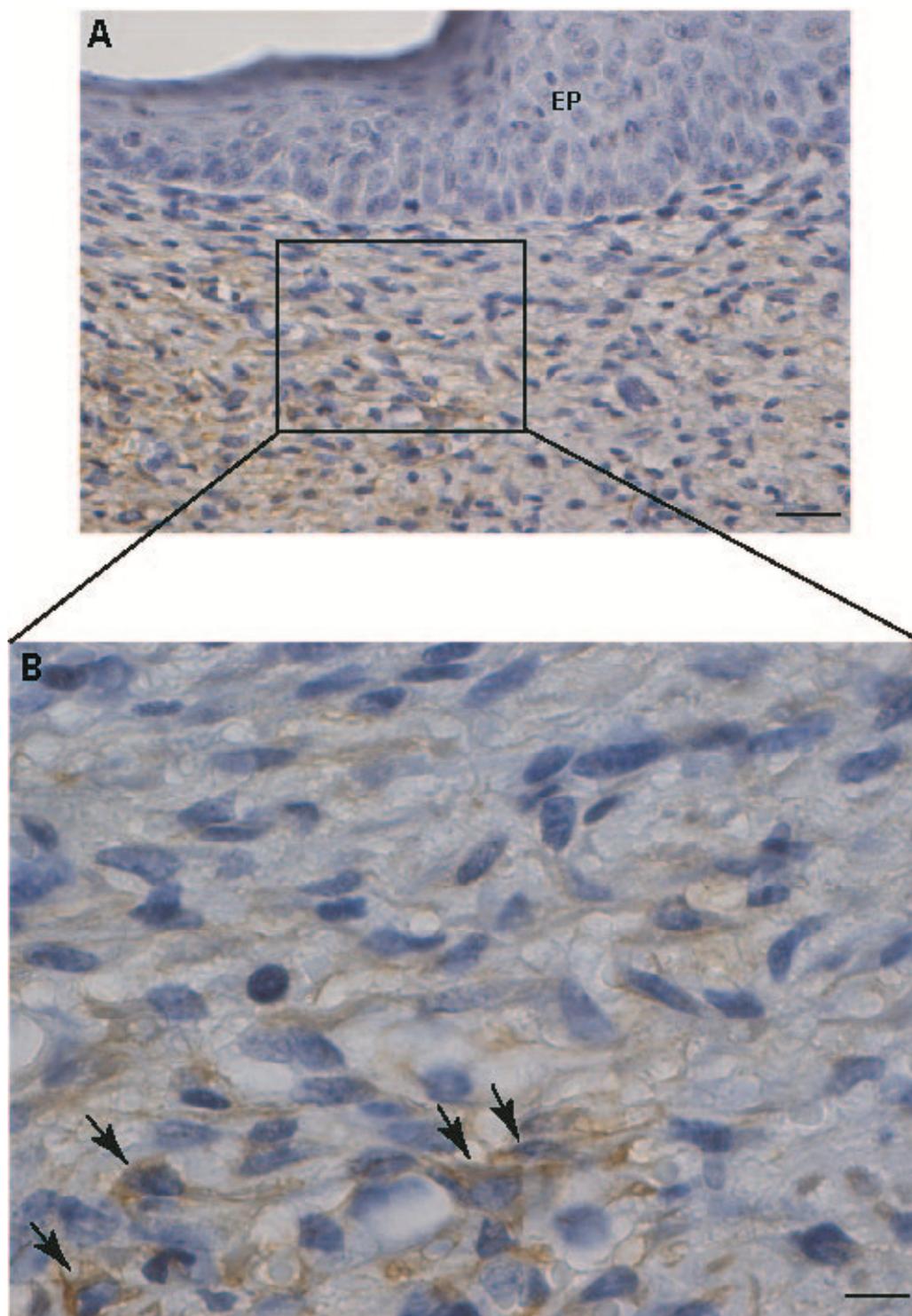


Figura 10: Micrografia de luz representativa da marcação para miofibroblasto através de imunohistoquímica para α -SMA. Em A observa-se região da pele da borda da lesão com marcação imunohistoquímica na derme. EP indica região do epitélio. Barra = $30\mu\text{m}$. Em B observa-se ampliação da área delimitada em A com miofibroblastos indicados pelas setas. Barra = $12\mu\text{m}$.

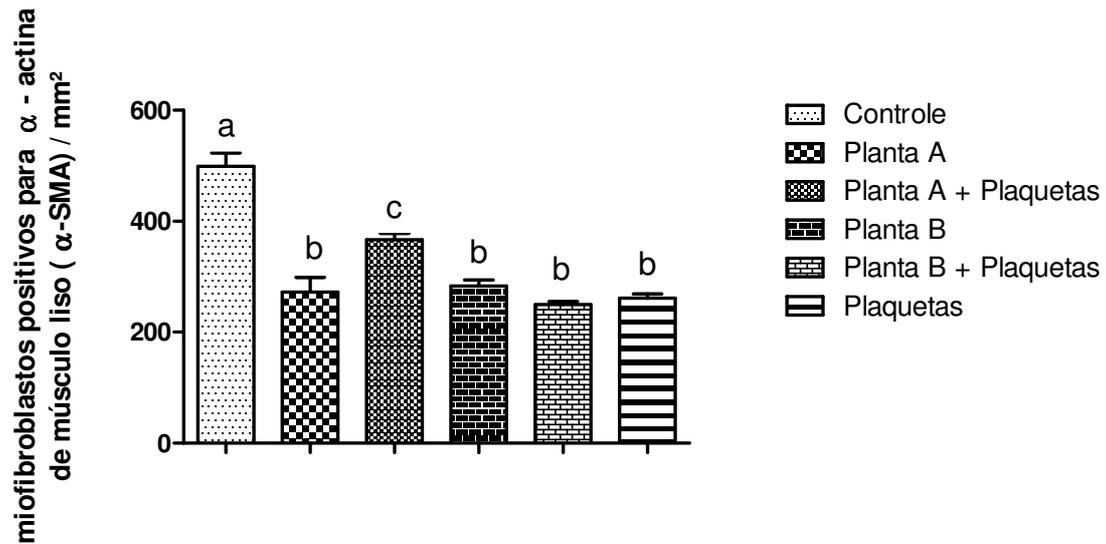


Figura 11: Gráfico mostrando o número de miofibroblastos por mm^2 de área de tecido de granulação, nove dias após indução da lesão nos diferentes grupos. Resultado expresso como média (erro padrão). (a) $P < 0.001$ (c) $P < 0,05$

6.3 Avaliação histológica e morfométrica

6.3.1 Caracterização de fibras de colágeno na região de cicatrização nove e 21 dias após indução da lesão

6.3.1.1 Histologia

No 9º dia de tratamento, o grupo controle demonstrou fibras de colágeno, presentes na matriz, delgadas e orientadas aleatoriamente. No grupo tratado com a planta A, observou-se uma variação da espessura das fibras de colágeno, que se mostraram mais densas e com regiões orientadas paralelamente. No grupo tratado com a planta A associada a plaquetas, a matriz apresentou fibras de colágeno que variaram de delgadas a espessas e com regiões organizadas seguindo um mesmo sentido. No grupo tratado com a planta B as fibras de colágeno também mostraram variação na espessura, de delgadas a espessas, porém dispostas em diferentes direções. No grupo tratado com a planta B associada a plaquetas, as fibras colágenas da matriz também mostraram variações na espessura de delgadas a espessas, com regiões onduladas e orientadas paralelamente. No grupo tratado com plaquetas as fibras de colágeno apresentaram de delgadas a espessas, não orientadas no mesmo sentido (Figura 12).

No 21º dia, observou-se grupo controle apresentando matriz com fibras de colágeno delgadas a espessas, as quais mostraram-se mais definidas e orientadas paralelamente quando comparadas ao grupo controle analisado aos nove dias. No grupo tratado com a planta A, houve maior deposição de fibras de colágeno que se mostraram bastante espessas e dispostas de forma organizada. No grupo tratado com a planta A associada a plaquetas, a matriz apresentou fibras de colágeno espessas e com algumas regiões tendendo a se organizar num mesmo sentido, situação que se repetiu no tratamento com a planta B. No grupo tratado com a planta B associada a plaquetas, a matriz apresentava fibras de colágeno espessas e dispostas desordenadamente. No grupo tratado com plaquetas as fibras de colágeno apresentaram-se espessas e dispostas sem orientação definida (Figura 13).

Figura 12: Fotomicrografias do tecido de granulação de lesão de pele de camundongos Swiss, aos nove dias após indução da lesão nos diferentes grupos: A) Grupo controle; B) grupo tratado com a planta A; C) grupo tratado com a planta A associada a plaquetas; D) grupo tratado com a planta B; E) grupo tratado com a planta B associada a plaquetas; F) grupo tratado com plaquetas. A coloração com o tricrômico de Gomori permite a identificação das fibras colágenas (em verde) entremeadas por inúmeros núcleos de células (N) do tecido conjuntivo. As figuras mostram também vasos sanguíneos (vs), alguns sem hemácias e outros com hemácias em seu interior. Observe que os grupos tratados (B a F) mostraram notável área de deposição de colágeno quando comparados ao grupo controle (A). Barra = 30µm.

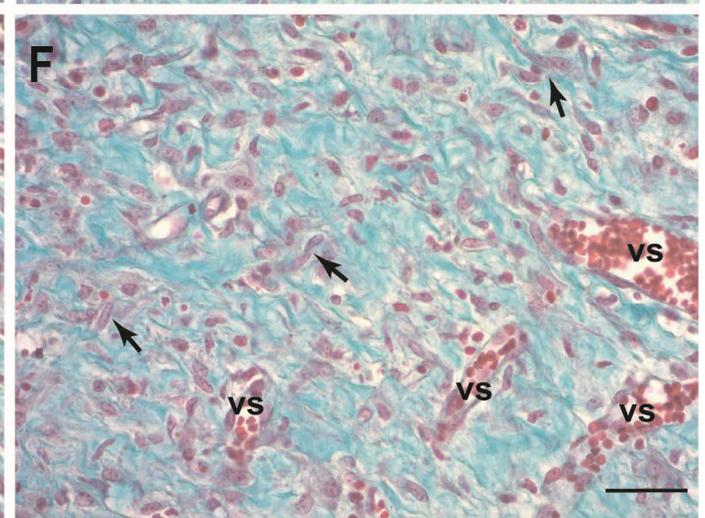
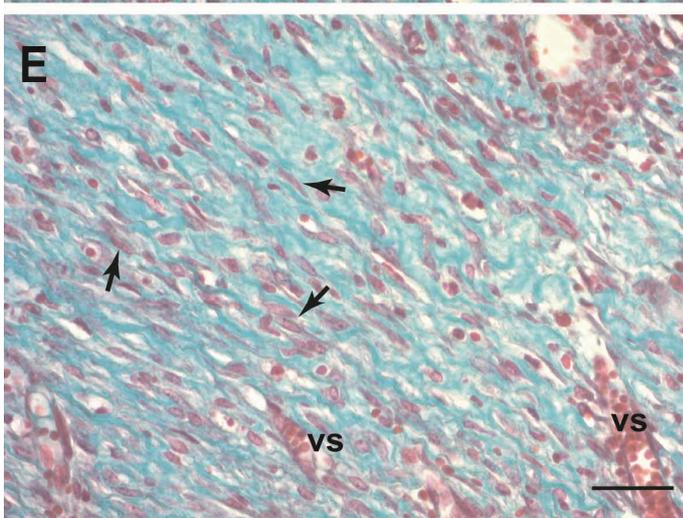
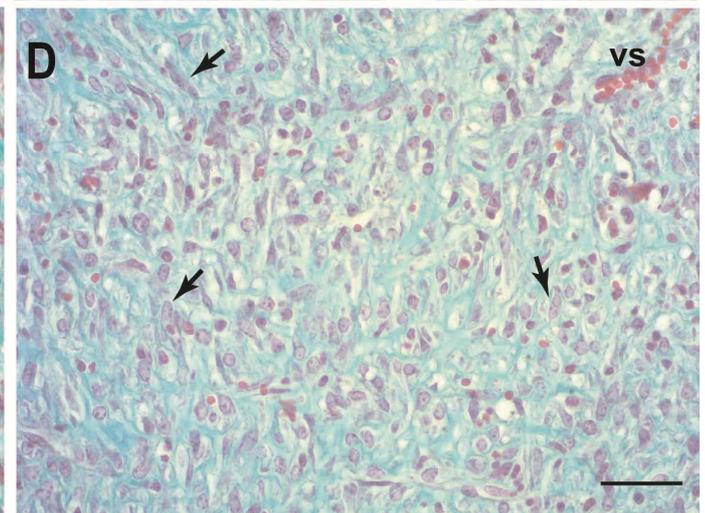
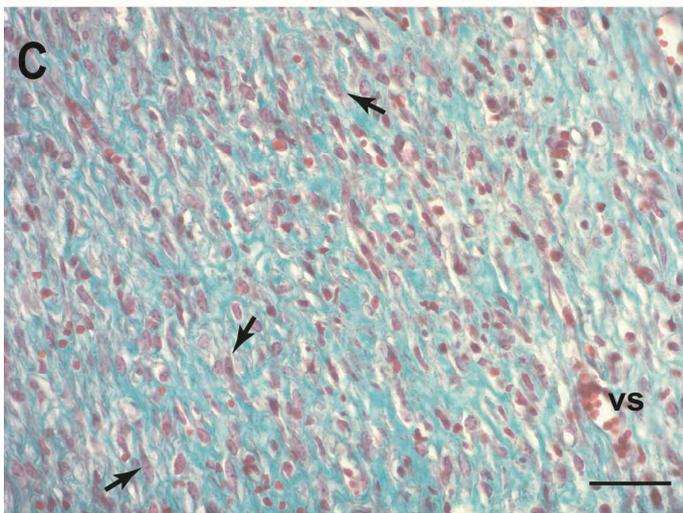
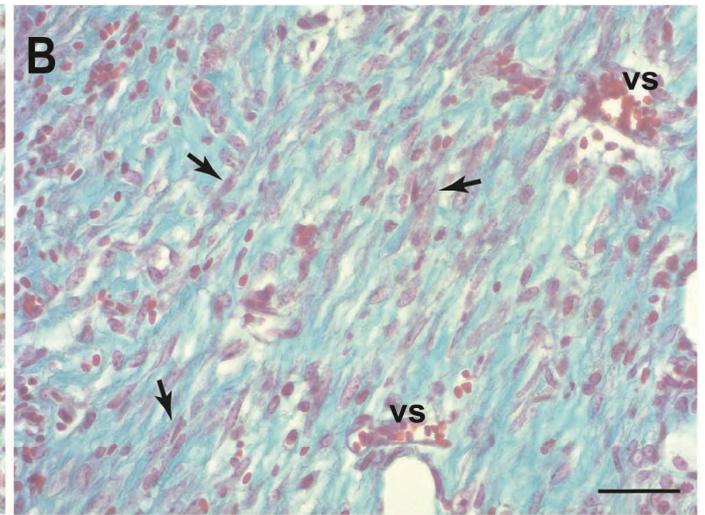
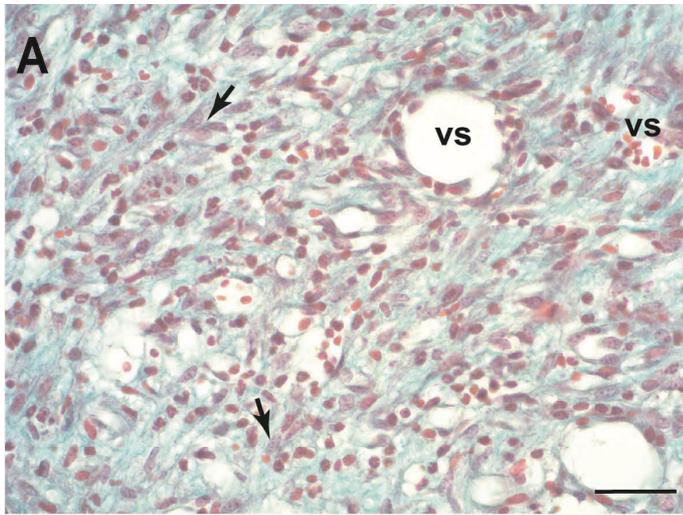
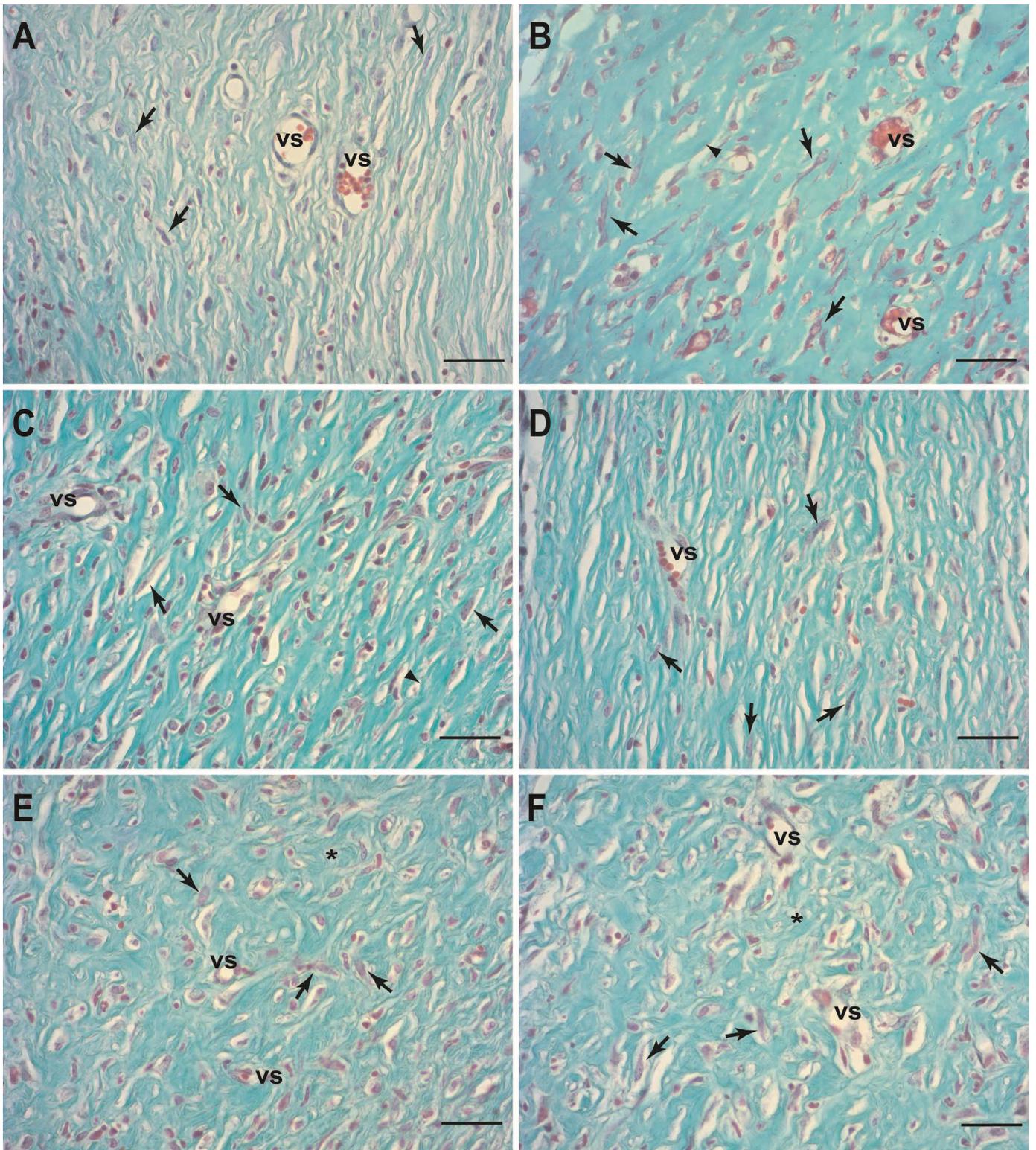


Figura 13: Fotomicrografias de luz do tecido de granulação de lesão de pele de camundongos Swiss, 21 dias após indução da lesão nos diferentes grupos. A) Grupo controle; B) grupo tratado com a planta A; C) grupo tratado com a planta A associada a plaquetas; D) grupo tratado com a planta B; E) grupo tratado com a planta B associada a plaquetas; F) grupo tratado com plaquetas. Observe as fibras colágenas (em verde) nos grupos tratados, embora alguns grupos apresentem fibras orientadas em sentidos diferentes (*) apresentam-se mais uniformemente distribuídas, sendo também possível identificar a ocorrência de fibras colágenas espessas em arranjos mais regulares (cabeças de setas). Núcleo de células do tecido conjuntivo (N); vasos sanguíneos (vs) com ou sem hemácias no seu interior. Barra = 30µm.



6.3.1.2 Morfometria

Através da avaliação morfométrica, observou-se que nove dias após a indução da lesão, todos os cinco grupos tratados (planta A; planta A + plaquetas; planta B; planta B + plaquetas; plaquetas) apresentaram deposição de colágeno significativamente maior quando comparado ao grupo controle. Comparando os dois tempos de análise, todos os grupos apresentaram maior deposição de colágeno aos 21 dias, e essa diferença só não foi significativa para o grupo tratado com a planta B + plaquetas. Analisando os tratamentos no dia 21, observou-se que o grupo tratado com a planta A foi o que mostrou maior deposição de colágeno, comparando ao controle e demais tratamentos (Figura 14).

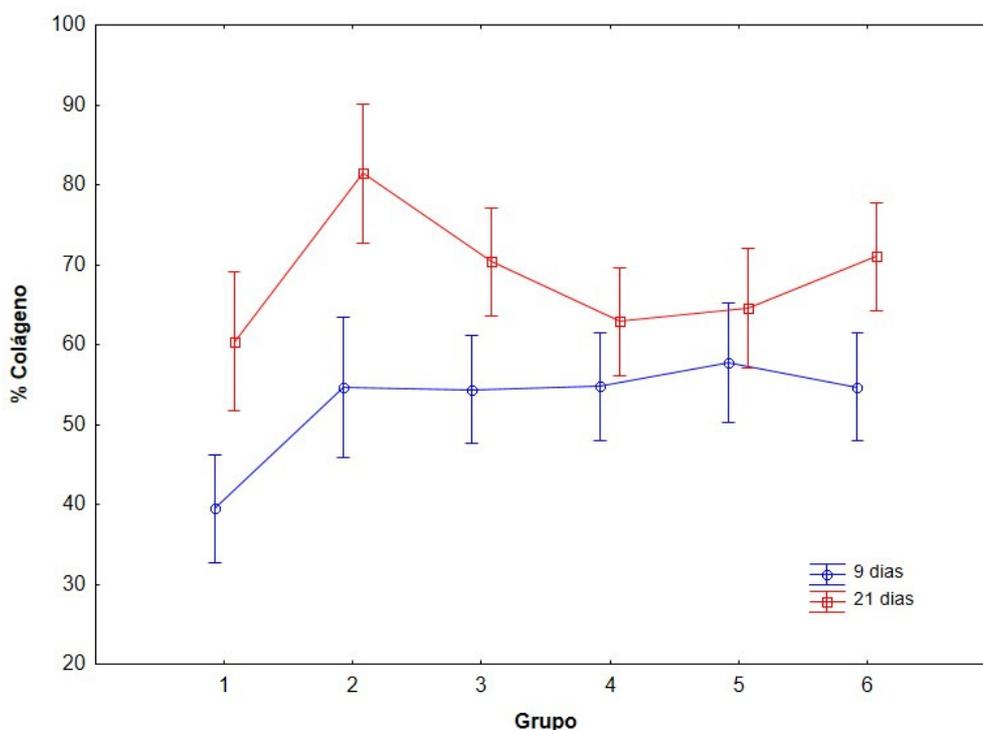


Figura 14: Gráfico da análise morfométrica de áreas marcadas em verde pelo tricrômico de Gomori, mostrando a porcentagem (%) de deposição de colágeno na região de tecido de granulação, nove e 21 dias após indução da lesão nos diferentes grupos: 1) Grupo controle; 2) grupo tratado com a planta A; 3) grupo tratado com a planta A associada a plaquetas; 4) grupo tratado com a planta B; 5) grupo tratado com a planta B associada a plaquetas; 6) grupo tratado somente com plaquetas.

6.3.2 Fibras reticulares (colágeno do tipo III) na região de cicatrização nove e 21 dias após indução da lesão

6.2.2.1 Histologia

No 9º dia, observou-se no grupo controle moderada freqüência de fibras reticulares, delgadas e orientadas aleatoriamente. No grupo tratado com a planta A, observou-se leve deposição de fibras reticulares dispostas sem orientação definida. No grupo tratado com a planta A associada a plaquetas, observou-se abundantes fibras reticulares que mostraram-se mais espessas e dispostas em vários sentidos. No grupo tratado com a planta B observou-se pouca deposição de fibras reticulares dispostas de forma organizada. No grupo tratado com a planta B associada a plaquetas, a matriz continha rica rede de fibras reticulares, com regiões orientadas paralelamente. No grupo tratado com plaquetas, observou-se maior freqüência de fibras reticulares orientadas de maneira tortuosa (Figura 15)

No 21º dia observou-se escassa deposição de fibras reticulares em todos os grupos, controle e tratados. As poucas fibras detectadas pela marcação histológica tendem a se distribuir ao redor de vasos sanguíneos (Figura 16).

Figura 15: Fotomicrografias das fibras reticulares da área de tecido de granulação de lesão de pele de camundongos Swiss, aos nove dias após indução da lesão nos diferentes grupos: A) Grupo controle; B) grupo tratado com a planta A; C) grupo tratado com a planta A associada a plaquetas; D) grupo tratado com a planta B; E) grupo tratado com a planta B associada a plaquetas; F) grupo tratado com plaquetas. A coloração com reticulina indica em B e D menor deposição das fibras reticulares (marcação em negro). Barra = 30 μ m.

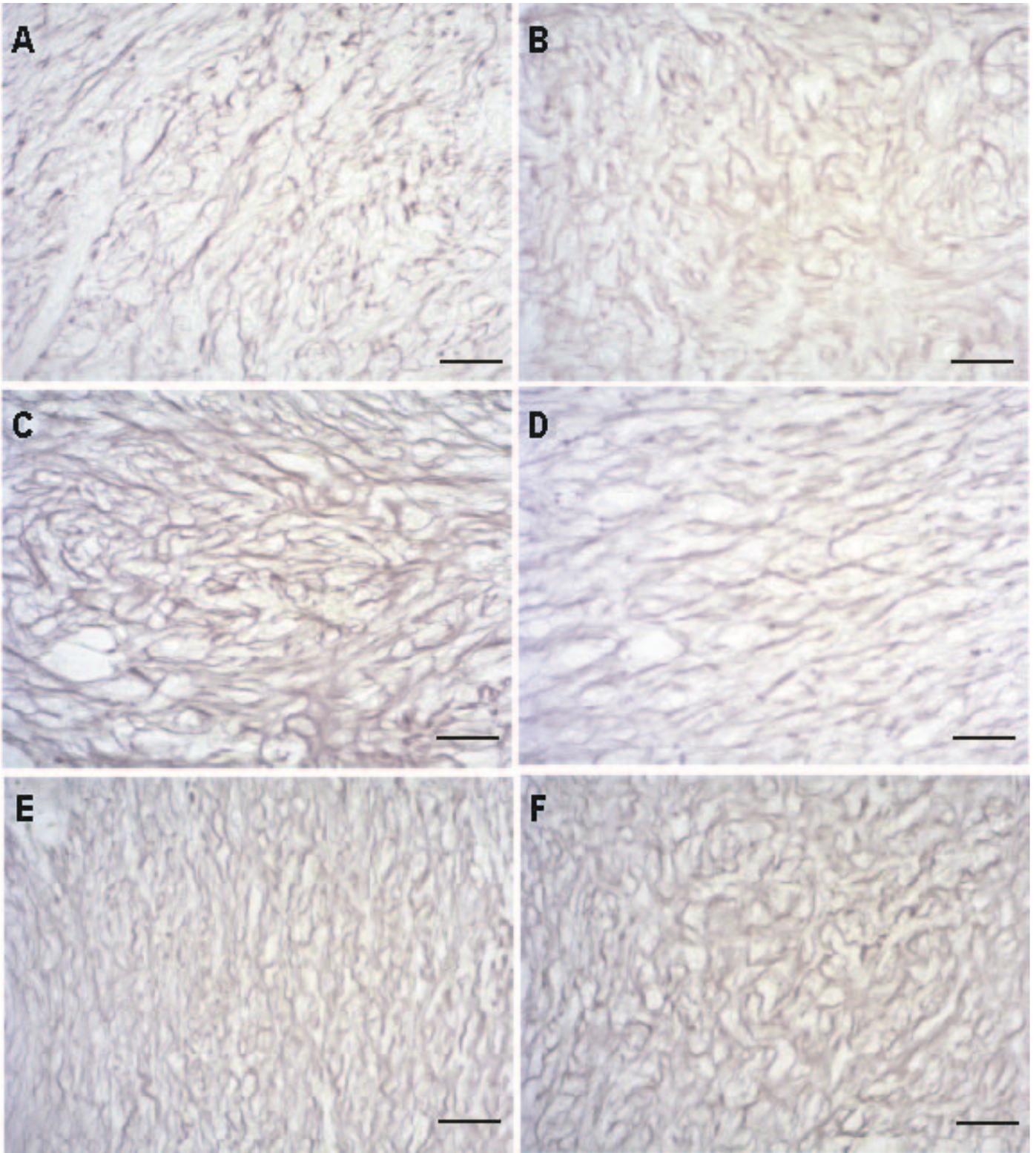
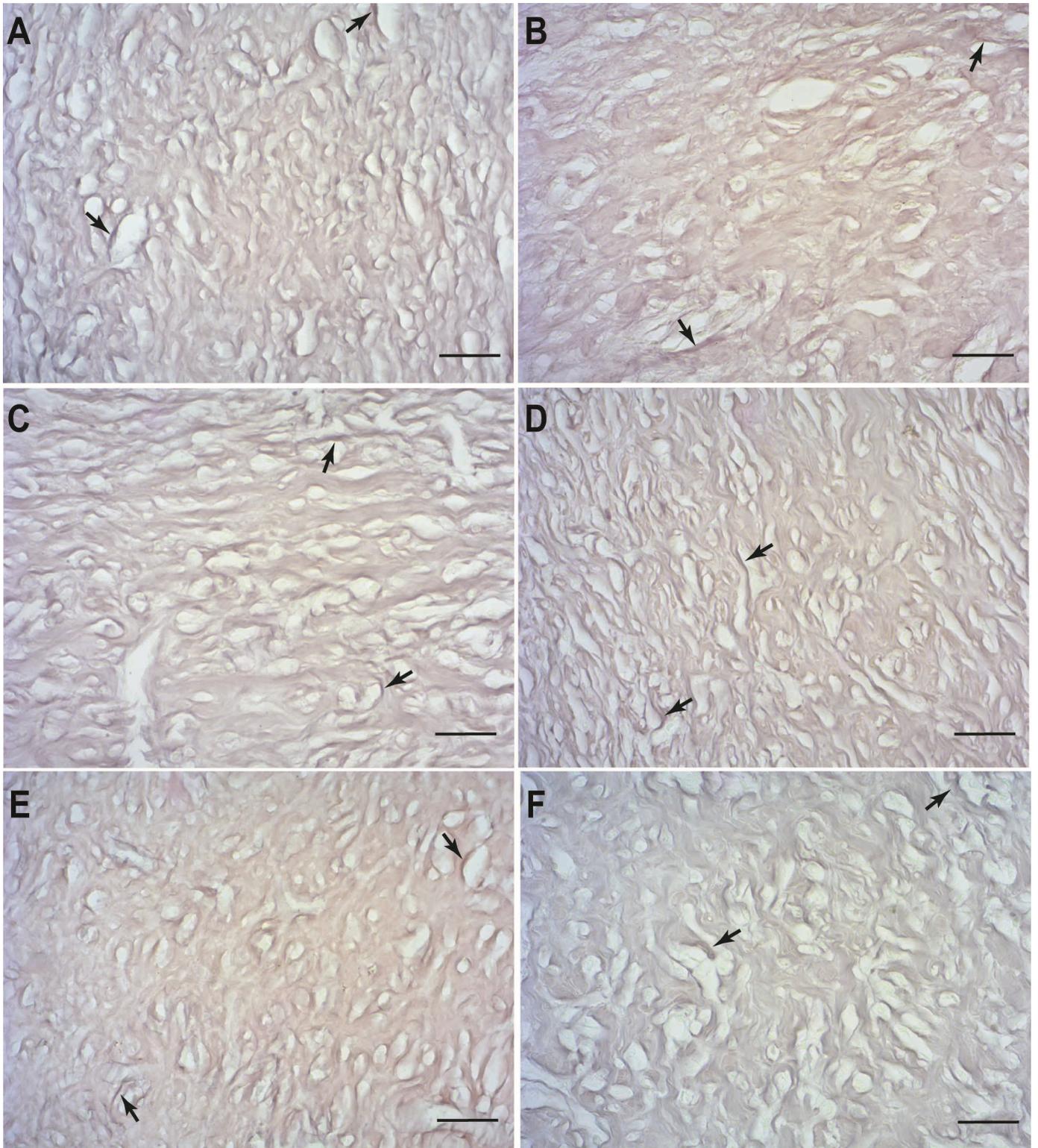


Figura 16: Fotomicrografias das fibras reticulares da área de tecido de granulação de lesão de pele de camundongos Swiss, 21 dias após indução da lesão nos diferentes grupos. A) Grupo controle; B) grupo tratado com a planta A; C) grupo tratado com a planta A associada a plaquetas; D) grupo tratado com a planta B; E) grupo tratado com a planta B associada a plaquetas; F) grupo tratado com plaquetas. Note a rara deposição de fibras reticulares em todos os grupos, pela baixa marcação em negro (setas pretas). Barra = 30µm.



6.3.2.2 Morfometria

Através da avaliação morfométrica, observou-se que nove dias após a indução da lesão, os grupos tratados com a planta A e tratados com a planta B apresentaram deposição de fibras reticulares significativamente menor quando comparado ao grupo controle e aos demais tratamentos. Comparando os dois tempos de análise, todos os grupos apresentaram menor deposição de fibras reticulares aos 21 dias. Analisando os tratamentos no dia 21, não foi detectada diferença significativa na deposição de fibras reticulares entre os grupos analisados (Figura 17).

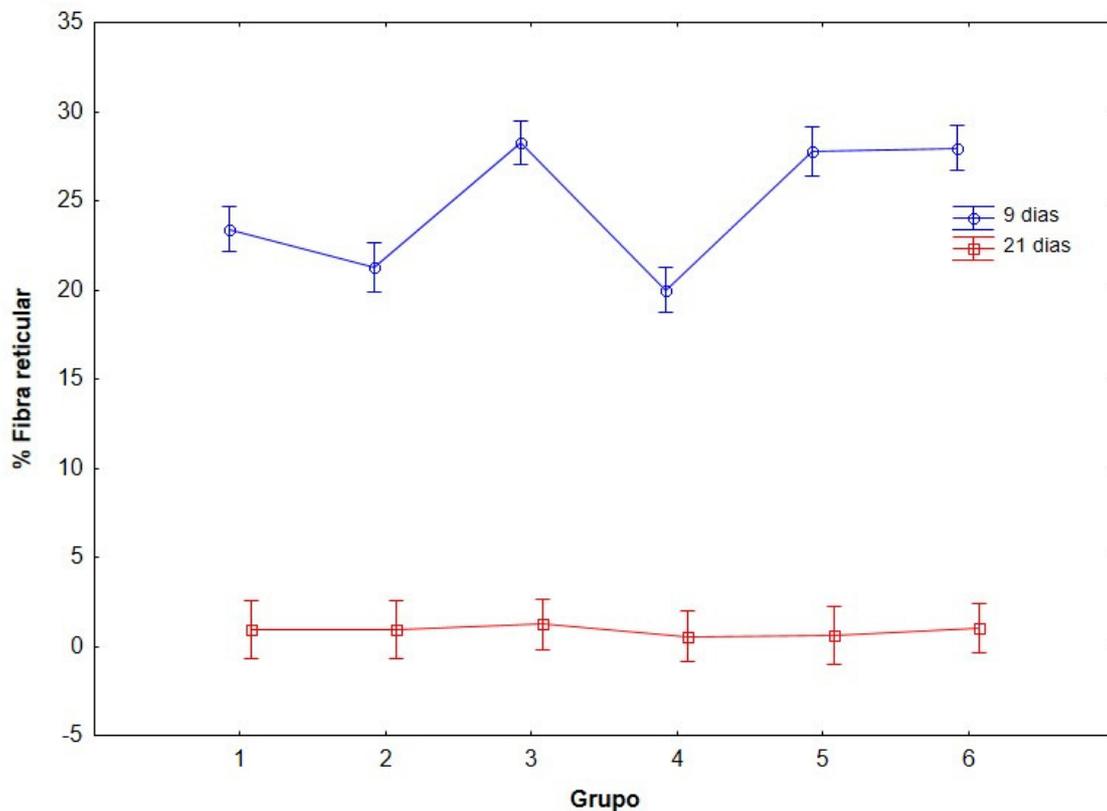


Figura 17: Gráfico representativo da análise morfométrica de fibras reticulares - áreas marcadas em negro pela reticulina, mostrando a porcentagem (%) de deposição de fibra reticular na região de tecido de granulação, 9 e 21 dias após a indução da lesão nos diferentes grupos: 1) Grupo controle; 2) grupo tratado com a planta A; 3) grupo tratado com a planta A associada a plaquetas; 4) grupo tratado com a planta B; 5) grupo tratado com a planta B associada a plaquetas; 6) grupo tratado somente com plaquetas.

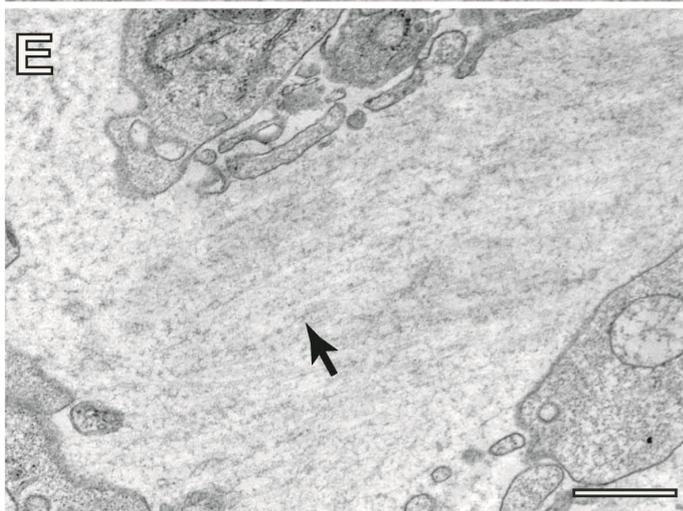
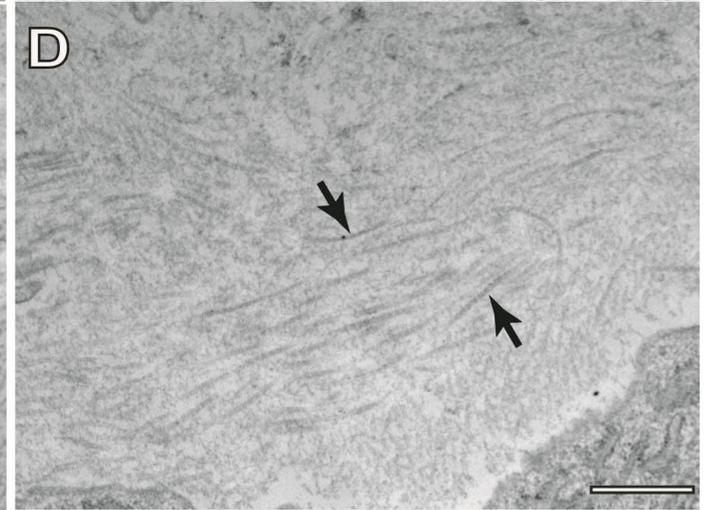
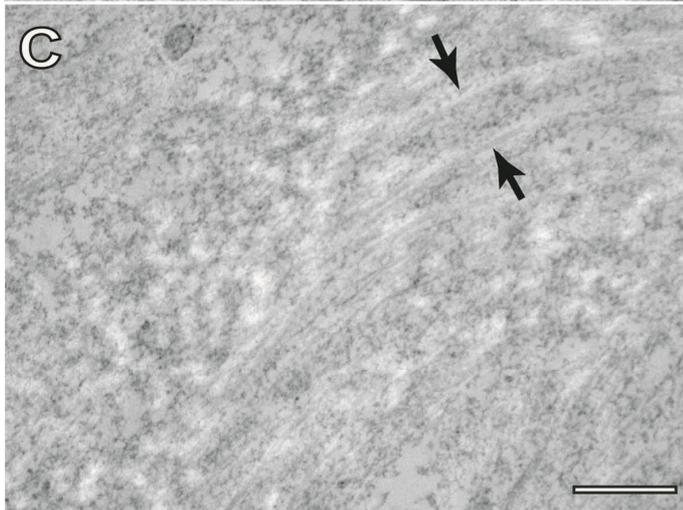
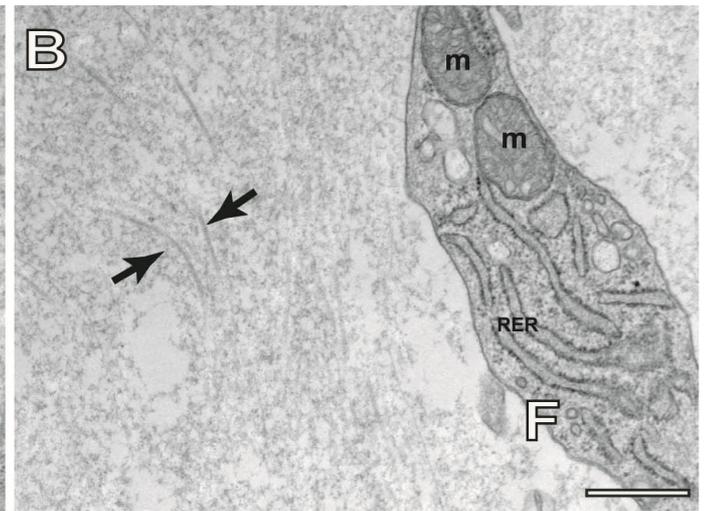
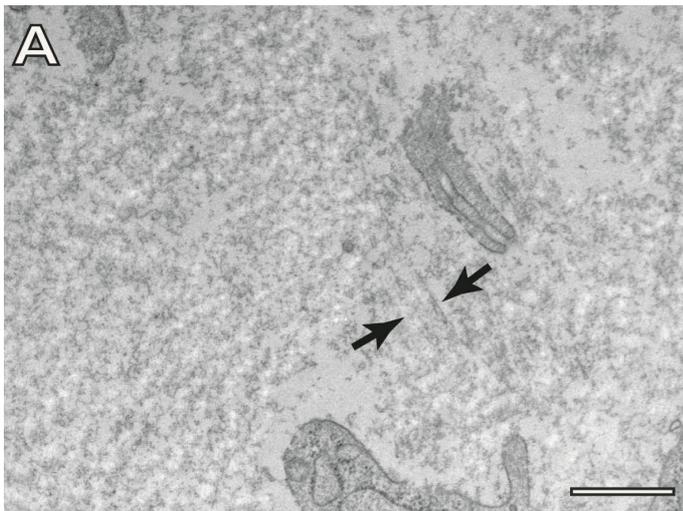
6.4 Avaliação ultraestrutural da região de cicatrização nove dias após indução da lesão

6.4.1 Fibrilas de colágeno

A análise ultraestrutural permitiu observar a organização do colágeno no tecido de granulação, após o 9º dia de reparo (Figura 18).

Foram detectadas algumas diferenças entre os grupos controle e tratados. Observou-se que no grupo controle a matriz mostrou-se frouxa e foi rara a identificação de estruturas fibrilares longitudinais definidas, enquanto que nos demais grupos, fibrilas de colágeno foram mais frequentes e mostraram melhor definição. No grupo tratado com a planta A, observaram-se estruturas fibrilares de colágeno dispersas na matriz aleatoriamente e espaçadas. No grupo tratado com a planta A + plaquetas observou-se matriz mais compacta e fibrilas de colágeno organizadas próximas umas das outras, com tendência a formação de feixes. No tratamento com a planta B, observou-se frequentes estruturas fibrilares de colágeno, mostrando-se orientadas de organização paralela em certas regiões e aleatoriamente em outras. O grupo tratado com a planta B + plaquetas mostrou matriz preenchida com fibrilas de colágeno dispostas paralelas e próximas umas as outras. E no tratamento apenas com plaquetas, observou-se fibrilas de colágeno dispersas e orientadas paralelamente em certas regiões da matriz.

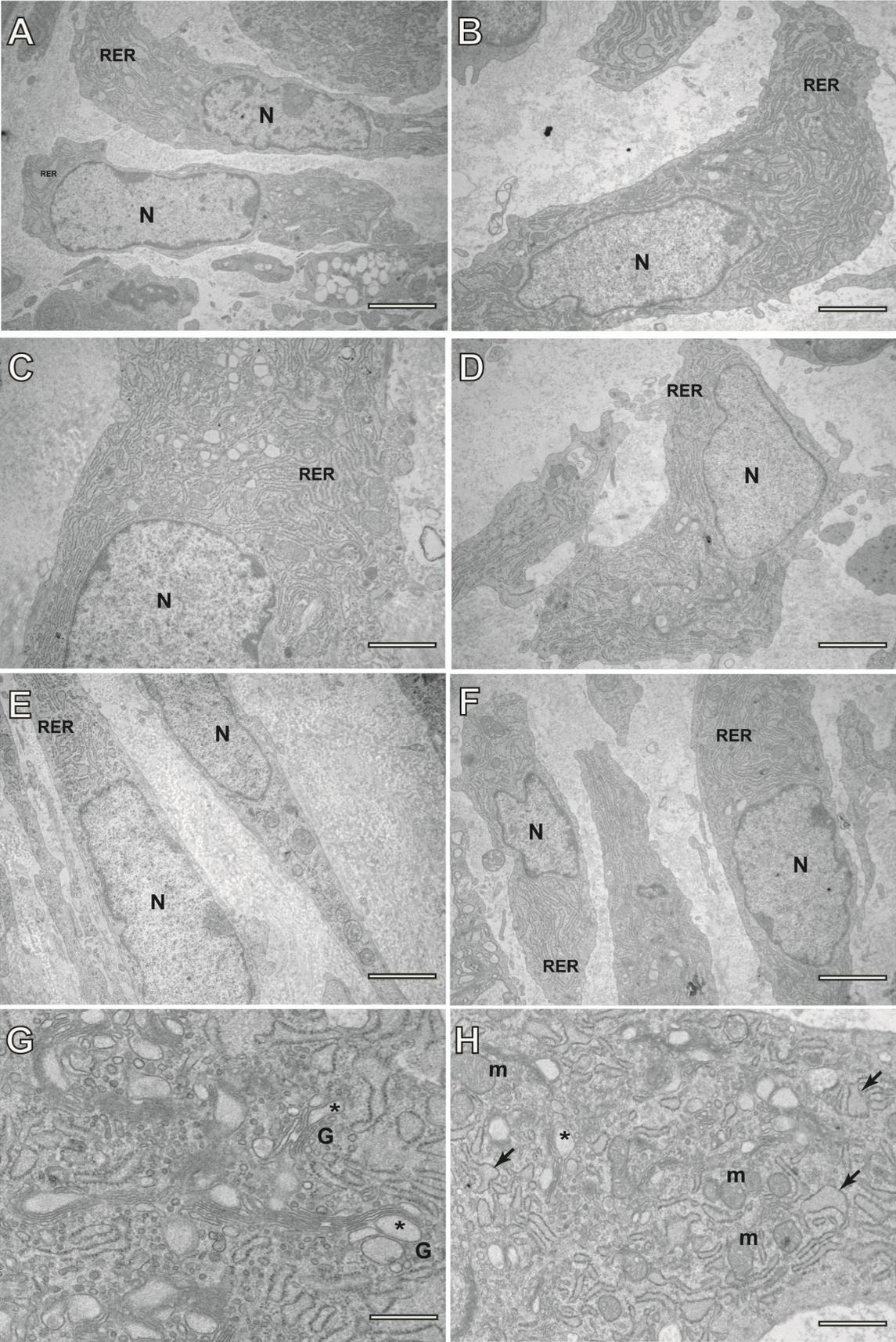
Figura 18: Eletromicrografias da região de tecido de granulação de lesões de pele de camundongo Swiss, nove dias após a indução da lesão evidenciando fibrilas de colágeno. As setas indicam estruturas de fibrilas de colágeno. A letra “F” e a seta branca indicam parte de fibroblastos presentes na matriz – m=mitocôndria; RER=retículo endoplasmático rugoso. A) Grupo controle; B) grupo tratado com a planta A; C) grupo tratado com a planta A associada a plaquetas; D) grupo tratado com a planta B; E) grupo tratado com a planta B associada a plaquetas; F) grupo tratado somente com plaquetas. Barra = 1 μ m



6.4.2 Fibroblastos

Fibroblastos dos grupos experimentais mostraram sinais de ativação, como núcleo eucromático e organelas de síntese ativadas, embora não tenhamos quantificado através de análises morfométricas e/ou quantitativas. A maioria dos fibroblastos de todos os grupos tratados, comparados com os do grupo controle mostraram-se mais desenvolvidos em tamanho, apresentando organelas como complexos de Golgi e retículos endoplasmáticos rugosos em maior extensão. Eletromicrografias representativas de fibroblastos dos diferentes grupos (Figura 19 A à F). Um outro resultado obtido através da microscopia eletrônica foi a detecção da presença de regiões dilatadas do complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso, situação verificada comum a todos os grupos (Figura 19, G e H).

Figura 19: Eletromicrografias da região de tecido de granulação de lesões de pele de camundongo Swiss, 9 dias após a indução da lesão evidenciando fibroblastos. A) Grupo controle; B) grupo tratado com a planta A; C) grupo tratado com a planta A associada a plaquetas; D) grupo tratado com a planta B; E) grupo tratado com a planta B associada a plaquetas; F) grupo tratado com plaquetas. RER: retículo endoplasmático rugoso; N: núcleo; G: complexos de Golgi; asteriscos: regiões dilatadas do Golgi; setas pretas: regiões dilatadas do retículo endoplasmático rugoso; m: mitocôndria. (A-F) Barra = 500nm. (G) Barra = 250nm. (H) Barra = 500nm.



6.4.3 Miofibroblastos

A análise ultraestrutural confirmou a presença de miofibroblastos, de acordo com os resultados observados através da imunohistoquímica. Características como célula bastante alongada, apresentando proeminente retículo endoplasmático rugoso e miofilamentos dispostos longitudinalmente e periféricos a membrana, foram observadas em algumas células no tecido de granulação. Outra característica ultraestrutural que pode ser observada nos miofibroblastos é a presença de fibronexus, estruturas que consistem de junções nas áreas da superfície celular de convergência de miofilamentos intracelulares e filamentos extracelulares de fibronectina. Estruturas semelhantes a descrição para fibronexus foram observadas a MET (Figura 20).

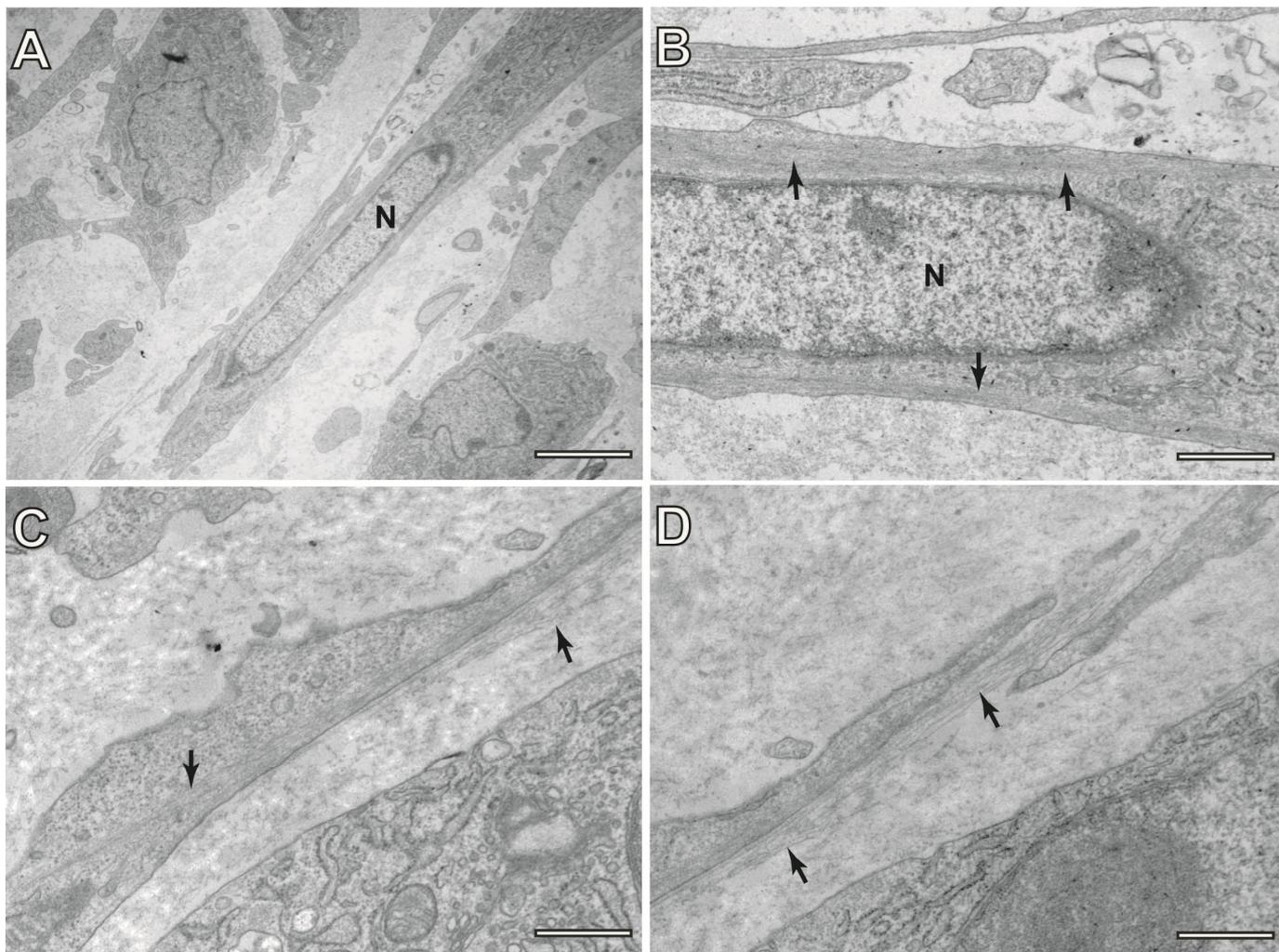


Figura 20: Eletromicrografias de miofibroblasto presentes na região de tecido de granulação de lesões de pele de camundongo Swiss, nove dias após a indução da lesão. A) visão panorâmica do miofibroblasto com característica morfologia de célula alongada. B) citoplasma do miofibroblasto, com miofilamentos dispostos ao longo e paralelamente a membrana celular (setas pretas). Nas eletromicrografias C e D são observados os fibronexus. As setas indicam os miofilamentos (citoplasma) estabelecendo conexão com a matriz extracelular. A) Barra = 2,5 μ m; B) Barra = 500nm.

7. Discussão

Ao longo de anos, muitos estudos têm sido realizados no sentido de investigar novos tratamentos que resultem em melhores processos de cicatrização de lesões de pele. Extratos vegetais tem mostrado sua efetividade em tratamentos de lesões, principalmente por apresentarem efeitos antiinflamatórios (MARTINS et al., 2006; COELHO et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2010). Além disso, estudos também tem demonstrado o efeito de plaquetas em processos de reparo (PIETRAMAGGIORI et al., 2006, 2008; GIUGGIOLI et al., 2011).

Durante o reparo, ocorre a formação de um tecido de granulação que é composto principalmente de fibroblastos, células inflamatórias, fibras colágenas e vasos sanguíneos. Todos estes fatores atuam de forma coordenada e agregada para o desenvolvimento da cicatrização (REINKE & SORG, 2012). Desta forma, diversos parâmetros como aspectos macroscópicos da lesão, descrições histológicas e imunohistoquímica dos componentes teciduais, características ultraestruturais e bioquímicas são utilizados para avaliar o processo de reparo submetido a diferentes tratamentos.

No presente trabalho, foram utilizados alguns dos parâmetros citados para analisar a ação de duas espécies de plantas e de plaquetas sobre a cicatrização de lesão de pele, que em linhas gerais envolvem as fases hemostasia, inflamatória, proliferativa e de remodelação tecidual.

Imediatamente após a lesão, a pele entra em estágio de hemostasia, cuja reação procura evitar a perda de sangue e fluido tissular. Segue-se a fase inflamatória, importante para o seguimento do processo de reparo (EMING et al., 2007). Nesse sentido, o presente estudo foi iniciado com a análise dos mastócitos, células conhecidas por sua característica resposta à processos inflamatórios, e que mostraram reatividade frente aos tratamentos aqui propostos. Os mastócitos são células intimamente envolvidas com o processo de cicatrização, pois sintetizam e liberam mediadores inflamatórios que levam à vasodilatação e recrutamento de outras células como os leucócitos e macrófagos, além de secretar mediadores capazes de ativar fibroblastos, favorecendo assim a renovação da matriz extracelular (STONE et al., 2010; NG, 2010; FOLEY et al., 2011). Os resultados da avaliação dos mastócitos

mostraram que estas células apareceram em maior número no grupo tratado somente com plaquetas quando comparado ao grupo controle e com os demais grupos tratados com plantas e plantas associadas às plaquetas. As plaquetas utilizadas no experimento são de origem humana, e o elevado número de mastócitos presentes no grupo tratado somente com plaquetas, sugere que possa ter ocorrido uma reação inflamatória alérgica (METZ et al., 2007; GALLI & TSAI, 2010). O acúmulo de mastócitos pode estar associado também à inflamação crônica (METZ et al., 2007; THEOHARIDES et al., 2010) que pode eventualmente levar a um atraso no processo de reparo (EMING et al., 2007; BRAN et al.; 2009).

As plantas utilizadas neste experimento são conhecidas por seus efeitos antiinflamatórios, graças à presença de flavonóides, que representam um dos principais grupos de substâncias com atividades farmacológicas. Assim, pode-se sugerir que as plantas exerceram esse efeito quando foram associadas às plaquetas, visto que o número de mastócitos nos grupos tratados com planta A + plaquetas e planta B + plaquetas diminuiu comparado ao tratamento somente com plaquetas. Embora tenha sido detectado um número maior de mastócitos no grupo tratado com a planta A em relação ao controle, este aumento não foi tão marcante quanto àquele tratado apenas com plaquetas. Baseado no efeito demonstrado neste estudo, as plantas A e B podem ser um recurso no controle da inflamação.

Considerando a formação da nova matriz, avaliamos a deposição de fibras reticulares e colágenas na região de cicatrização através de imagens das lâminas A análise morfométrica de imagens utilizando *softwares* tem sido atualmente empregada (RUSSO et al., 2009; TORISEVA et al., 2012; ELDARDIRI et al., 2012; CALVI et al., 2012). Tal fato deve-se a maior confiabilidade deste tipo de análise para certas variáveis, já que o programa analisa todas as imagens seguindo um mesmo padrão, eliminando qualquer subjetividade. Além disso, tais *softwares* permitem análise automática de mais de um parâmetro, e em menos tempo (ANDREA et al., 2008). As análises morfométricas realizadas à microscopia de luz nove dias após o início dos tratamentos mostraram que o grupo tratado com a planta A e o grupo tratado com a planta B apresentaram deposição de fibras reticulares significativamente

menor quando comparados ao controle e demais tratamentos. Analisando as fibras colágenas em geral, pela coloração com Gomori, a morfometria demonstrou que aos nove dias todos os grupos tratados apresentaram deposição de colágeno significativamente maior em comparação com ao grupo controle, não havendo diferença entre os tratamentos. As fibras reticulares correspondem ao colágeno do tipo III, que é o primeiro a ser depositado para a formação do tecido de granulação. Com o desenvolvimento do reparo, o colágeno do tipo III é então substituído pelo colágeno do tipo I, característica que torna o tecido mais resistente (DELAVARY et al., 2011; REINKE & SORG, 2012). Desta forma, se a deposição de colágeno foi maior e uniforme para todos os grupos enquanto que a deposição de fibras reticulares foi menor para os grupos tratados com a planta A e planta B, infere-se que a substituição dos tipos de colágeno já iniciou nestes dois grupos, ao contrário dos demais. Sugere-se, portanto, uma maior eficiência na substituição da fibra reticular pelo colágeno, graças à aplicação do tratamento com as plantas. Além disso, os resultados indicam que as plaquetas podem ser o fator responsável por retardar o processo de substituição do colágeno, visto que o atraso se deu, tanto no tratamento somente com plaquetas, quanto naqueles que as plaquetas foram associadas às plantas.

Levando-se em conta o período de análise, nove e 21 dias, registrou-se que a deposição de fibras reticulares diminuiu significativamente para todos os grupos, indicando que a substituição ocorreu para todos os tratamentos e controle neste intervalo de tempo. Comparando os grupos no dia 21, não houve diferença significativa para fibra reticular. A análise do fator tempo para a deposição de colágeno em geral, demonstrou que houve aumento significativo para todos os grupos entre nove e 21 dias, com exceção do grupo tratado com a planta B + plaquetas. Analisando apenas o dia 21, o tratamento com a planta A foi o que significativamente apresentou maior deposição de colágeno. O colágeno confere força e integridade à matriz, sendo de fundamental importância no reparo, além de agir como suporte para o desenvolvimento da angiogênese e migração de células inflamatórias, fibroblastos e queratinócitos (LANDSMAN et al., 2009; YEH et al., 2010). O aumento da síntese de colágeno

está relacionado com a eficácia da cicatrização da ferida em diversos estudos experimentais (JUDITH et al., 2010; DE MELO et al., 2011; CHEN et al., 2012).

De forma geral todos os tratamentos apresentaram melhor deposição de colágeno comparado ao controle, sendo eficazes no processo de cicatrização. Porém, é relevante destacar a planta A e B por proporcionarem eficiente substituição dos tipos de colágeno já aos nove dias, e em especial a planta A, que demonstrou maior eficiência na deposição de colágeno geral aos 21 dias.

Avaliando os resultados obtidos da análise de mastócitos e da formação de colágeno no entendimento do processo de cicatrização, infere-se que apesar da reação inflamatória observada pelo elevado acúmulo de mastócitos no grupo tratado com plaquetas ter coincidido com o atraso do fechamento em relação aos demais grupos, este fato não interferiu na deposição de colágeno. Uma possível explicação é que moléculas como citocinas e fatores de crescimento das plaquetas, promoveram efeitos sobre as células que sintetizam matriz, de forma que a reação inflamatória não interferisse na deposição das fibras. Já o pequeno aumento de mastócitos no grupo tratado com a planta A, além de não ter interferido no fechamento da lesão, também não interferiu na síntese de colágeno, visto que este tratamento levou a uma maior deposição de colágeno com o tempo. Pode-se então sugerir que a modulação nos mastócitos pela planta A eventualmente contribuiu com uma síntese mais eficiente de colágeno. Estudos com mastócitos humanos têm mostrado sua capacidade em promover a proliferação dos fibroblastos (GARBUZENKO et al., 2002; TRAUTMANN et al., 2000). Sabe-se que animais deficientes em mastócitos apresentam atraso no processo de cicatrização, além de apresentarem permeabilidade vascular e recrutamento de neutrófilos reduzidos (WELLER et al., 2006; YOUNAN et al., 2011). Entretanto, mesmo que os mastócitos estejam agindo neste sentido, vale lembrar que diversos outros fatores não abordados no presente estudo, podem também estar relacionados com os resultados encontrados para o tratamento com a planta A.

Seguindo o desenvolvimento do reparo tecidual, durante a fase proliferativa ocorre a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, dentre alguns outros eventos. Miofibroblastos são células com características distintas à microscopia eletrônica de transmissão pela presença de microfilamentos de

actina dispostos longitudinalmente e periféricos a membrana celular e pela presença de junções de fibronexus, como observado no presente trabalho e corroborado por diversos estudos (EYDEN, 2001; ITO et al., 2011; SANDBO & DULIN, 2011). Funcionalmente, os miofibroblastos são células fundamentais para a contração da lesão, além de contribuírem também com a deposição de matriz extracelular (HINZ, 2007; REINKE & SORG, 2012). No entanto, verifica-se que os miofibroblastos estão muitas vezes associados à desfavorável formação de fibrose e excesso de cicatriz, visto que em muitos destes casos foi observado que estas células persistem no local da lesão quando deveriam sofrer apoptose (THANNICKAL., 2012 ; MICALLEF et al., 2012). Analisando os resultados dos reparos teciduais neste trabalho, observa-se que há uma redução no número de miofibroblastos nos cinco grupos tratados quando comparados ao grupo controle, sugerindo a eficiência do uso das plantas e de plaquetas na reconstituição da lesão no intuito de evitar a formação de fibrose.

Características ultraestruturais de fibroblastos típicos foram observadas nos grupos controle e tratados, ou seja, núcleo predominantemente eucromático e a presença de organelas como complexo de Golgi, Retículo Endoplasmático rugoso (RER) e mitocôndrias conforme relatos de KALLURI & ZEISBERG (2006). No entanto, foram observadas diferenças nos grupos de animais tratados, tais como o aparente aumento na dimensão dos fibroblastos e RER com extensas cisternas ocupando quase todo o citoplasma, quando comparados ao grupo controle. Estas características são particulares de células com alta atividade metabólica e podem também estar relacionadas à maior deposição de colágeno observada nos grupos tratados.

Alterações na morfologia do Golgi e do RER caracterizadas por significativas dilatações de suas cisternas foram observadas em células ativas e também em células com sinais de apoptose, propriedade vista em todos os grupos. Dentre as várias funções do RER e do complexo de Golgi, listam-se respectivamente a produção de proteínas e suas modificações pós traducionais antes de serem secretadas. Fibroblastos presentes no tecido de granulação estão em plena atividade, com elevada síntese de proteínas para deposição da nova matriz que está se formando. Porém, no decorrer do processo de reparo, ocorre um controle de celularidade quando muitas células sofrem apoptose,

inclusive fibroblastos. Desta forma, como a característica dilatação dos complexos de Golgi e RER foi observada tanto em fibroblastos saudáveis como em células com sinais de apoptose, sugere-se que ela pode estar relacionada a alta atividade secretória dos fibroblastos como também com características de apoptose. Alguns estudos corroboram os resultados aqui demonstrados. A ocorrência de hipertrofia e a dilatação do Golgi em células tumorais foi associada à excessiva produção de material secretório característicos dessas células (NAKAICHI et al., 1997). Também foi observado que fibroblastos com aumento da atividade metabólica apresentaram dilatação de RER (HUSSEIN et al., 2005). Características de dilatação de RER e Golgi também foram demonstradas em células secretoras de animais tratados com substâncias, como álcool e drogas farmacêuticas (TIRAPELLI et al., 2000; DIAZ et al., 2000; YABE et al., 2004). A detecção de dilatação das cisternas de RER também já foi demonstrada em morte celular lipotóxica (BORRADAILE et al., 2006).

Quanto às fibrilas de colágeno, suas características típicas foram mais claramente observadas à microscopia eletrônica de transmissão nos grupos tratados quando comparados ao controle, que mostrou pobre arquitetura de colágeno.

Diante dos resultados apresentados, sugere-se que os tratamentos com a planta A, planta A + plaquetas, planta B, planta B + plaquetas e somente plaquetas, foram efetivos na renovação da matriz extracelular durante o processo de reparo tecidual. Estes dados são representados pelo controle do número de mastócitos, pela indução de biossíntese mais eficiente de fibras colágenas e pela efetividade no controle da diferenciação e ação funcional dos miofibroblastos. Estes resultados podem estar relacionados com os efeitos dos componentes moleculares presentes nos extratos das plantas utilizadas tanto quanto pela ação de moléculas biologicamente ativas liberadas pelas plaquetas no local da lesão.

Assim, os tratamentos aqui testados caracterizaram-se como promotores de síntese de matriz com qualidade, ao mesmo tempo em que apresentaram propriedade anti-fibrótica. Esta dupla propriedade demonstrada pelos tratamentos leva a sugerir-los no tratamento de lesões.

8 Conclusões

Os resultados do presente trabalho mostraram que o tratamento com plaquetas aumentou o influxo de mastócitos, numa ação inflamatória reativa natural. No entanto, a associação com as plantas modulou o recrutamento de mastócitos, e não só controlou a inflamação, como também ativou os fibroblastos no processo de síntese de proteínas para a renovação da matriz extracelular. Os tratamentos com as plantas A e B, associados ou não as plaquetas foram, de um modo geral, mais eficazes na deposição de colágeno, quando comparado ao grupo controle, favorecendo o processo de cicatrização. Em especial, as plantas A e B proporcionaram eficiente substituição dos tipos de colágeno aos nove dias, sendo que a planta A demonstrou maior eficiência na deposição de colágeno aos 21 dias. Este dado é comprovado pela ultraestrutura de fibroblastos, cujas características morfológicas mostraram condições favoráveis como o sugestivo aumento nas dimensões de organelas como o retículo endoplasmático rugoso com extensas cisternas ocupando quase todo o citoplasma, o complexo de Golgi bem desenvolvido, além de núcleo eucromático e diversas mitocôndrias, quando comparados ao grupo controle. Cabe-nos salientar as significativas dilatações das cisternas do Golgi e do RER observadas em todos os grupos.. Estas características são particulares de células com alta atividade metabólica e podem também estar relacionadas à maior deposição de colágeno observada nos grupos tratados. Confirmando a atividade sintética, foram detectadas fibrilas colágenas em arranjo típico, depositados próximos dos fibroblastos.

Cabe ressaltar que nossos resultados mostraram que os tratamentos induziram a uma incipiente diminuição no número de miofibroblastos no tecido de granulação, propriedade interessante para o controle da fibrose. Portanto, os tratamentos aqui testados, dentre os quais pode-se destacar a planta A, podem ser indicados para tratamentos de lesões, uma vez que os resultados mostraram ter havido a síntese de matriz extracelular e apresentarem propriedade anti-fibrótica.

9 Referências Bibliográficas

ANDREA, C. E.; BLEGGI-TORRES, L. F.; ALVES, M. T. S. et al. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. *J Bras Patol Med Lab.* 2008. 44(n.1):51-57.

ARTUC, M. et al. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing - active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol.* 1999. 8:1-16.

ARTUC, M.; STECKELINGS, U.M.; HENZ B.M. Mast cell-fibroblast interactions: human mast cells as source and inducers of fibroblast and epithelial growth factors. *J Invest Dermatol.* 2002. 118:391-5.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras de Cie Farmac.* 2005. 41(n.1): 27-51.

BHATTACHARJEE, P. K. et al. Sweat gland carcinoma - a case report. *J Indian Med Assoc.* 2010. 108:871- 872.

BORRADAILE, N. M. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J. Lipid Res.* 2006. 47: 2726–2737.

BRAN, G. M. et al. Keloids: Current concepts of pathogenesis (Review). *International Journal Of Molecular Medicine.* 2009. 24:283-293.

BUCALA, R. Fibrocytes and fibrosis. *Q J Med.* 2012. 05:505–508.

CALVI, E. N. C. et al. An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2012. 27(10):681-686.

CHEN, W. C. et al. Wound repair and anti-inflammatory potential of *Lonicera japonica* in excision wound-induced rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2012. 12:226.

CHIARINI-GARCIA, H.; PEREIRA, F. M. A comparative study of lymph node mast cell populations in five marsupial species. *Tissue & Cell.* 1999. 31(3) 318–326.

CHIARINI-GARCIA, H.; SANTOS, A. A. D.; MACHADO, C. R. S. Mast cell types and cell-to-cell interactions in lymph nodes of the opossum *Didelphis albiventris*. *Anat Embryol.* 2000. 201:197–206.

COELHO, J. M. et al. Effects of silver sulfadiazine, ipe roxo (*Tabebuia avellanedae*) extract and barbatimao (*Stryphnodendron adstringens*) extract on cutaneous wound healing in rats. *Rev Col Bras Cir.* 2010. 37:45-51.

CONWAY, E.M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular Research.* 2001. 49:507 –521.

DE LAVARY, B. M. et al. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011. 216:753-62.

DE MELO, C.M.L. et al. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. *Int J Pharma*. 2011. 408:113–119.

DE OLIVEIRA, M.L.M. et al. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. seeds. *J Ethnopharm*. 2010. 129:214–219.

DINATO, S.L.M. et al. Caso para diagnóstico. Úlcera de Marjolin. *An Bras Dermatol*. 2011. 86(3):601-610.

DIAZ, E. G. et al. Benznidazole-induced Ultrastructural and biochemical alterations in rat colon. *Acta Pharmacol Sin*. 2000. 21(11):961-966.

ELDARDIRI, M. et al. Wound contraction is significantly reduced by the use of microcarriers to deliver keratinocytes and fibroblasts in an in vivo pig model of wound repair and regeneration. *Tissue Engineering: Part A*. 2012. 18(n.5-6): 587-597.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *J Inv Dermatol*. 2007. 127:514–525.

ESCANDON, J. et al. High mortality in patients with chronic wounds. *Wound Rep Reg*. 2011. 19:526–528.

EYDEN, B. The myofibroblast in health and disease. 2008. *Rev Esp Patol*. 41(n.1):3-10.

FANG, R. C.; GALIANO, R. D. A review of becaplermin gel in the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Biologics: Targets & Therapy*. 2008. 2(1):1–12.

FOLEY, T. T. et al. Rat Mast Cells Enhance Fibroblast Proliferation and Fibroblast-Populated Collagen Lattice Contraction through Gap Junctional Intercellular Communications. *Plast. Reconstr. Surg. Journal*. 2011. 127:1478-1486.

GALLI, S. J.; TSAI, M. Mast cells in allergy and infection: Versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *Eur. J. Immunol*. 2010. 40: 1843–1851.

GANTWERKER, E. A.; HOM D. B. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. *Facial Plast Surg Clin N Am*. 2011. 19:441–453.

GARBUZENKO, E. et al. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. *Clin Exp Allergy*. 2002. 32:237-46.

GIUGGIOLI, D. et al. Platelet gel in the treatment of severe scleroderma skin ulcers. *Rheumatol Int.* 2011.

GRUBER, B. L. et al. Human mast cells activate fibroblasts: Tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis. *J Immunol.* 1997. 158:2310-2317.

GURTNER, G.C. et al. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008. 453:314-321.

HALOVA, I.; DRABEROVA, L.; DRABER, P. Mast cell chemotaxis - chemoattractants and signaling pathways. *Frontiers in Immunology | Molecular Innate Immunity.* 2012. 3:1-19.

HARRISON-BALESTRA, C. et al. Recombinant human platelet-derived growth factor for refractory nondiabetic ulcers: a retrospective series. *Dermatol Surg.* 2002. 28:755-9.

HINZ, B. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *Journal of Investigative Dermatology.* 2007. 127:526–537.

HUSSEIN, M. R. et al. Ultrastructural evaluation of the radioprotective effects of melatonin against X-ray-induced skin damage in Albino rats. *Int. J. Exp. Path.* 2005. 86:45–55.

ITO, A. et al. Myofibroblastic differentiation in atypical fibroxanthomas occurring on sun-exposed skin and in a burn scar: an ultrastructural and immunohistochemical study. *J Cutan Pathol.* 2011. 38:670–676.

JAIN, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine.* 2003. 9(n.6):685-693.

JUDITH, R. et al. Application of a PDGF-containing novel gel for cutaneous wound healing. *Life Sciences.* 2010. 87:1–8.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews – Cancer.* 2006. 6:392-401.

KONDO, T.; Y. ISHIDA. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci Int.* 2010. 203:93-8.

LANDSMAN, A.; TAFT, D.; RIEMER, K. The Role of Collagen Bioscaffolds, Foamed Collagen, and Living Skin Equivalents in Wound Healing. *Clin Podiat Med Surg.* 2009. 26(4):525–533.

LEE, K. B. et al. Topical Embryonic Stem Cells Enhance Wound Healing in Diabetic Rats. *J Orthop Res.* 2011. 1554-1562.

LUO, S. et al. Abnormal Balance between Proliferation and Apoptotic Cell Death in Fibroblasts Derived from Keloid Lesions. *Plast. Reconstr. Surg.* 2001. 107(n.1):87-96

LI, J. et al. Collagen triple helix repeat containing-1 inhibits transforming growth factor-b1-induced collagen type I expression in keloids. *British Association of Dermatologists.* 2011. 164:1030–1036.

MAAS-SZABOWSKI, N. et al. Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation. *J Invest Dermatol.* 2001. 116:816-20.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova.* 2002. 25(3).

MANDELBAUM S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM M. H. S. *An Bras Dermatol.* 2003. 78(4):393-410.

MARTINS, N. L. Healing process in cutaneous surgical wounds in rats under the influence of *Orbignya phalerata* aqueous extract. *Acta Cir Bras.* 2006. 21(Suppl 3):66-75.

MAZZUCCO, L. et al. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. *Transfusion.* 2004. 44:1013-8.

MERCER, P. F.; CHAMBERS, R. C. Coagulation and coagulation signalling in fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. 1-10.

MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Cellular aspects of wound healing. *An Bras Dermatol.* 2009. 84:257-262.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast Cells. *Physiol. Rev.* 1997. 77(n.4):1033-1079.

METZ, M. et al. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunological Reviews.* 2007. 217:304–328.

MICALLEF, L. et al. The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. *Fibrogenesis & Tissue Repair.* 2012. 5(Suppl 1):S5.

MONROE, D. M.; HOFFMAN, M. The clotting system – a major player in wound healing. *Haemophilia.* 2012. 18(Suppl. 5):11–16.

NAKAICHI, M. et al. Morphological change in tumor endothelial cells induced by natural-type human tumor necrosis factor. *J. Vet. Med. Sci.* 1997. 59(7):605-608.

NG, M. F. Y. The role of mast cells in wound healing. *Int Wound J.* 2010. 7:55–61.

- NISHIKORI, Y. et al. Skin mast cell promotion of matrix remodeling in burn wound healing in mice: relevance of chymase. *Arch Dermatol Res.* 1998. 290:553-60.
- NOLI, C.; MIOLO, A. The mast cell in wound healing. *Vet Dermatol.* 2001. 12:303-13.
- NURDEN, A. T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2011. 105 Suppl 1:S13-33.
- PALADINO, S. F. Úlceras de membros inferiores na anemia falciforme. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2007. 29(3):288-290.
- PIETRAMAGGIORI, G. et al. Freeze-dried platelet-rich plasma shows beneficial healing properties in chronic wounds. *Wound Rep Reg.* 2006. 14:573–580.
- PIETRAMAGGIORI, G. et al. Healing modulation induced by freeze-dried platelet-rich plasma and micronized allogenic dermis in a diabetic wound model. *Wound Rep Reg.* 2008. 16:218–225.
- REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res* 2012. 49:35–43.
- RUSSO, R. C. et al. Role of the chemokine receptor cxcr2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009. 40:410–421.
- SANDBO, N.; DULIN, N. Actin cytoskeleton in myofibroblast differentiation: Ultrastructure defining form and driving function. *Translational Research.* 2011. 158(n.4):181-196.
- SASAKI, A. B. S. et al. Mast Cells: An Unexpected Finding in the Modulation of Cutaneous Wound Repair by Charged Beads. *Plast. Reconstr. Surg.* 2003. 111: 1446-1453.
- SCEVOLA, S. et al. Allogenic platelet gel in the treatment of pressure sores: a pilot study. *Int Wound J.* 2010. 7:184-90.
- SILVA SANTOS, N. R. et al. Effects of laser photobiomodulation on cutaneous Wounds treated with mitomycin c: a histomorphometric and histological study in a rodent model. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2010. 28(n.1):81–90.
- SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999. 341:738-46.
- STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010. S73-S80.

SUM, R. et al. Wound-healing properties of trehalose-stabilized freeze-dried outdated platelets. *Transfusion*. 2007. 47:672-9.

THANNICKAL, V. J. Mechanisms of pulmonary fibrosis: role of activated myofibroblasts and NADPH oxidase. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2012. 5(Suppl 1):S23.

THEOHARIDES, T.C. et al. Mast cells and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011.

TIRAPELLI, L. F.; TAMEGA, O. J.; PETRONI, S. Ultrastructural alterations of choroid plexuses of lateral ventricles of rats (*Rattus Norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. *Arq Neuropsiquiatr*. 2000. 58(1): 25-31.

TOMASEK, J.J. et al. Myofibroblasts And Mechano-Regulation Of Connective Tissue Remodelling. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*. 2002. 3:349-363.

TORISEVA, M. et al. MMP-13 regulates growth of wound granulation tissue And modulates gene expression signatures involved in inflammation, proteolysis, and cell viability. 2012. *PLoS ONE*. 7(8):e42596.

TRAUTMANN, A. et al. Mast cell involvement in normal human skin wound healing: expression of monocyte chemoattractant protein-1 is correlated with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo. *J Pathol*. 2000. 190:100-6.

WELLER, K. et al. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *The FASEB Journal*. 2006. 20: E1628-E1635.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004. 27:1047-53.

WOLBERG, A. S. Determinants of fibrin formation, structure, and function. *Curr Opin Hematol*. 2012. 19:349–356.

YABE, K. et al. Early Pathophysiologic Feature of Arthropathy in Juvenile Dogs Induced by Ofloxacin, a Quinolone Antimicrobial Agent. *Vet Pathol*. 2004. 41:673–681.

YANG, Y. et al. Promotion of skin regeneration in diabetic rats by electrospun core-sheath fibers loaded with basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*. 2011. 32:4243-4254.

YEH, J. T. et al. Impaired skin wound healing in lumican-null mice. *British Assoc Dermatol*. 2010. 163:1174–1180.

YOUNAN, G. J. et al. Mast Cells Are Required in the Proliferation and Remodeling Phases of Microdeformational Wound Therapy. *Plast. Reconstr. Surg. Journal*. 2011. 128(n.6):649e-658e.

ZEISBERG, M., STRUTZ, F.; MULLER, G. A. Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. 2000. *J. Nephrol.* 13 (Suppl.), S111–S120.

ZOOG, S.J. et al. Antagonists of CD117 (cKit) signaling inhibit mast cell accumulation in healing skin wounds. *Cytometry A.* 2009. 75:189-98.