



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**AÇÃO DO  $\beta$ -CARIOFILENO SOBRE A VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE  
FIBROBLASTOS**

**MARIANA MENDOZA DE LIMA**

Foz do Iguaçu  
2019



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**AÇÃO DO  $\beta$ -CARIOFILENO SOBRE A VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE  
FIBROBLASTOS**

**MARIANA MENDOZA DE LIMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Arthur da Silveira Prudente

Foz do Iguaçu  
2019

MARIANA MENDOZA DE LIMA

**AÇÃO DO B-CARIOFILENO A SOBRE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE  
FIBROBLASTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof.Dr. Arthur da Silveira Prudente  
UNILA

---

Prof. Dr. Francisney Pinto do Nascimento  
UNILA

---

Profa. Dra. Sanely Lourenço da Costa Caliman  
UNILA

Foz do Iguaçu, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Mariana Mendoza de Lima

Curso: Biotecnologia

		Tipo de Documento
<input checked="" type="checkbox"/> graduação	<input type="checkbox"/> artigo	
<input type="checkbox"/> especialização	<input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso	
<input type="checkbox"/> mestrado	<input type="checkbox"/> monografia	
<input type="checkbox"/> doutorado	<input type="checkbox"/> dissertação	
	<input type="checkbox"/> tese	
	<input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais	
	<input type="checkbox"/> _____	

Título do trabalho acadêmico: Ação do  $\beta$ -cariofileno sobre a viabilidade e proliferação de fibroblastos

Nome do orientador(a): Prof. Dr. Arthur da Silveira Prudente

Data da Defesa: 12/12/2019

### Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Responsável

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e Maria, por me dar força e coragem para que assim eu conseguisse vencer todas as barreiras da minha vida.

Em segundo lugar, aos meus pais Graciela Mendoza Bazán e Mario Antum de Lima a todo apoio, compreensão e reconhecimento. Sem eles, nada disso seria possível.

Ao meu professor orientador, Arthur da Silveira Prudente não só por aceitar me orientar neste trabalho, mas também por cada ensinamento e incentivo à pesquisa.

Ao meu grupo de Jovens Juasc, por me confortar em momentos de angústia.

Ao meu namorado Fernando por acreditar em mim.

Aos meus animais de estimação, por me trazer felicidade e descontração.

Aos colegas de curso que compartilharam diversos momentos e sentimentos durante esses 5 anos de graduação.

Agradeço a cada professor que passou pela minha vida, por todo conhecimento que compartilharam e toda dedicação para ensinar nós alunos.

Agradeço ao governo que sancionou a lei da criação da Unila.

Agradeço a própria Unila, por ter me proporcionado todo estudo, sem a mesma não seria possível ter o título de graduação.

E por fim, agradeço a Capes e ao CNPq por ter financiado minha atual pesquisa.

*Lute pela universidade pública, ela muda vidas, assim  
como a minha. **Autor desconhecido***

Mendoza de Lima, Mariana. **AÇÃO DO  $\beta$ -CARIOFILENO SOBRE A VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2019.

## RESUMO

A pele é um órgão extremamente importante, com inúmeras funções biológicas e uma delas é nos proteger. Quando ocorre injúria neste tecido, a pele sofre vários processos biológicos, entre eles destaca-se o processo de inflamação, a proliferação e a reepitelização, no qual possuem como finalidade a cicatrização. Este trabalho de conclusão de curso, consiste em fazer uma breve pesquisa do potencial do agonista  $\beta$ -cariofileno, em ativar o receptor canabinóide 2 e assim melhorar o processo de cicatrização de feridas. A pesquisa será baseada em testes realizados *in vitro* em células fibroblásticas retiradas de pulmão de rato, de linhagem MRC-5. Durante os testes foi utilizado um método simples de MTT para avaliar a viabilidade e a proliferação das células MRC-5 quando em contato com diferentes tempos e concentrações do composto  $\beta$ -cariofileno. Observou-se que o agonista  $\beta$ -cariofileno possui a característica de reduzir o processo inflamatório, induzir a proliferação de fibroblasto, podendo melhorar o processo de reepitelização.

**Palavras-chave:** Cicatrização,  $\beta$ -cariofileno, receptor canabinóide 2, viabilidade, proliferação.

Mendoza de Lima, Mariana. **ACCIÓN DE  $\beta$ -CARIOFILENO ACERCA DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS.** 2019. Documento de conclusión del curso (Biotecnología) - Universidad Federal de Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2019.

## **RESUMEN**

La piel es un órgano extremadamente importante con numerosas funciones biológicas y una de ellas es protegernos. Cuando se produce una lesión en este tejido, la piel sufre varios procesos biológicos, entre ellos el proceso de inflamación, proliferación y reepitelización, en el cual su propósito es curar. Este trabajo de curso consiste en una breve investigación del potencial del agonista de  $\beta$ -cariofileno, activando el receptor 2 de cannabinoides y mejorando así el proceso de curación de heridas. La investigación se basará en pruebas in vitro en la cepa MRC-5 de células fibroblásticas de pulmón de ratón. Se usó un método MTT simple durante las pruebas para evaluar la viabilidad y la proliferación de las células MRC-5 cuando están en contacto con diferentes tiempos y concentraciones del compuesto de  $\beta$ -cariofileno. Se observó que el agonista de  $\beta$ -cariofileno tiene la característica de reducir el proceso inflamatorio, inducir la proliferación de fibroblastos y puede mejorar el proceso de reepitelización.

**Palabras clave:** Curación,  $\beta$ -cariofileno, receptor cannabinoide 2, viabilidad, proliferación.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 HIPÓTESE.....</b>	<b>18</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>4 METODOLOGIA DA PESQUISA .....</b>	<b>20</b>
4.1 CULTURA CELULAR.....	20
4.2 GRUPO DE TRATAMENTO.....	20
4.3 ENSAIO DE MTT .....	20
4.4 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	20
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	21
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
6.1 VIABILIDADE CELULAR .....	22
6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA .....	24
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>8 CONCLUSÕES .....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

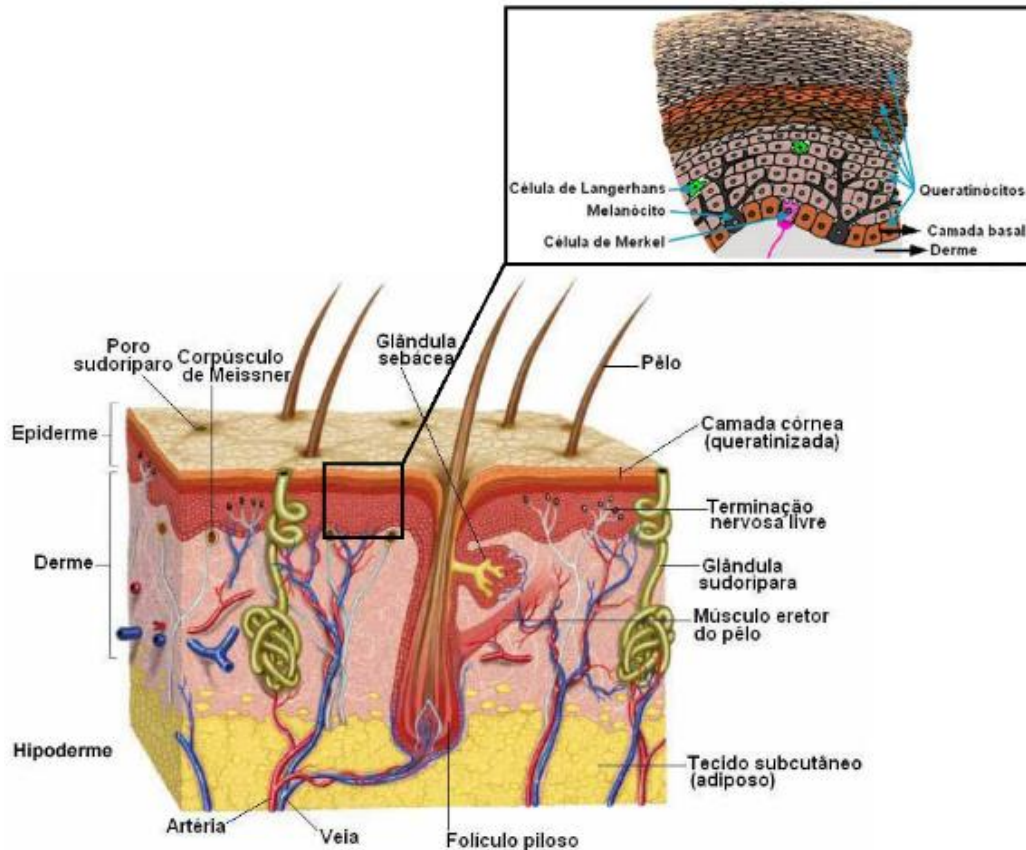
A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo responsável por revestimento, pela proteção, regulação da temperatura, sensibilidade e ainda pelo controle de perda de água. (Robbins, 1975). Ela representa 15% do peso corpóreo sendo composta essencialmente, de três grandes camadas: uma camada superior – a epiderme; uma camada intermediária – a derme; e uma camada profunda, a hipoderme ou tecido celular subcutâneo (Sampaio et al., 2000). Assim, pode-se observar a representação das três camadas na figura 1.

A camada superior da pele é a epiderme, sendo constituída por um epitélio estratificado pavimentoso cuja espessura apresenta variações topográficas ao longo do organismo (Candi et al., 2005; Sampaio et al., 2000). A epiderme não possui vascularização e é constituída por alguns tipos celulares, que possuem diferentes origens embrionárias. Aproximadamente 80-85% da epiderme é constituída de queratinócitos, 10-13 % de melanócitos, 4% de células de Langerhans e 1% de células de Mercke. Sua principal função é conferir resistência e impermeabilidade (Freinkel e Woodley, 2001; Koster e Roop, 2004; Rosa et al., 2014).

A derme é subdividida na porção papilar e a porção reticular, ambas são formadas por fibras colágenas, fibras elásticas e matriz extracelular, que são produzidas por fibroblastos, possuem vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e órgãos sensoriais, tem como função conferir elasticidade e resistência (Da Costa et al., 2009; Rosa et al., 2014). Na sua constituição há o envolvimento de polissacarídeos (hialuronidatos e condroitinsulfatos), substância fundamental (glicoproteínas, proteoglicanas e glicosaminoglicanas), material fibrilar (fibras colágenas, fibras elásticas e fibras reticulares), receptores sensoriais (ex.: corpúsculos de Meissner, corpúsculos de Pacini), células dérmicas (fibroblastos), vasos sanguíneos e linfáticos (Proksch et al., 2008).

Os fibroblastos são as principais células que compõem a derme, estes sintetizam diferentes macromoléculas que entram na constituição da matriz celular, como por exemplo, o colágeno e a elastina. Durante um processo inflamatório ocorre o aumento da proliferação e da atividade de fibroblastos devido à ação de alguns mediadores pró-inflamatórios como a interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Debenedictis et al., 2001; Freinkel e Woodley, 2001; Haake et al., 2001; Nestle et al., 2009).

A última camada da pele é a hipoderme, que possui adipócitos que confere amortecimento, proteção mecânica, térmica e define formas ao corpo (Rosa et al., 2014).



**Figura 1:** Esquema representativo das camadas da pele, suas células e anexos (Adaptado de Freinkel e Woodley, 2001).

A pele é a primeira barreira exposta ao meio externo e está constantemente sujeita a lesões e invasão de patógenos que podem gerar diversas desordens inflamatórias. Nesse contexto, a pele é muito mais do que simplesmente uma barreira física passiva entre o meio externo e interno, mas também uma extensão do sistema imunológico (Williams e Kupper, 1996). Portanto, a pele possui um papel importante na manutenção e desenvolvimento da defesa contra invasores e/ou lesões, desencadeando um processo inflamatório que é produzido e mantido pela interação de vários tipos celulares residentes como: terminações nervosas, queratinócitos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais e macrófagos (Bhagwat et al., 1999; Buckle e Hedgecock, 1997; Puignero e Queralt, 1997). Tanto estas células que compõe a epiderme, como outras células também residem e/ou migram em resposta aos mais variados estímulos nas quais incluem: os linfócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, sendo essas células elementos da resposta de defesa inata ou adquirida e se encontram em maiores quantidades em processos inflamatórios agudos e crônicos (Nickoloff e Nestle, 2004; Perera et al., 2012).

A imunidade pode ser dividida em: imunidade inata e imunidade adquirida. A

imunidade inata ou natural é conhecida por sua rapidez na resposta, e a mesma é composta por: barreiras (pele, superfície da mucosa e microbiota), componentes celulares (fagócitos, células dendríticas, células NK), componentes moleculares (citocinas, quimiocinas e as proteínas do complemento e de fase aguda). O reconhecimento de invasores se faz logo após a passagem da barreira epitelial assim que o agente infeccioso alcança o tecido subjacente. Em seguida, mecanismo efetores são responsáveis por reconhecer e matar os agentes infecciosos através da fagocitose. Posteriormente, na fase inflamatória ocorrem o recrutamento celular e produção de mediadores para o aumento do fluxo sanguíneo produzidos por células residentes no local. Já na resposta adquirida ou adaptativa, ocorre mais tardiamente e como principais características tem-se a especificidade e a memória. Suas principais células são os linfócitos e as células apresentadoras de antígenos (APCs), que são extremamente importantes na identificação dos antígenos (Cruvinel et al, 2010). Os principais mecanismos da resposta imune adquirida são: resposta imune celular (antígenos exógenos e endógenos), resposta imune humoral, ação dos anticorpos, imunização, imunização passiva (natural ou artificial) e imunização ativa (natural ou artificial) (Abbas et al, 2008).

A alteração na integridade da pele, membrana, mucosa ou nos tecidos e órgãos é denominada ferida, classificada de acordo com a etiologia ou ato: meios (mecânicos, térmicos, químicos, traumáticos, cirúrgicos e radiogênicos), patologias subjacentes (diabetes mellitus, insuficiência vascular crônica, imunológicas e dermatológicas), grau de contaminação (contaminadas e não contaminadas), profundidade das lesões (superficial ou profunda), tempo de existência e processo de cicatrização (agudas ou crônicas) (Roerhrs, 2016)

Quando é causada uma lesão na pele, ocorre o rompimento dos vasos sanguíneo e a perda de comunicação entre as células adjacentes, formando assim uma ferida, e algumas partes que constituem o tecido são perdidos, logo é necessário a reconstituição desse tecido que sofreu injúria (Da Costa et al.,2009). Nessa etapa a cicatrização é quem vai fazer o reparo do tecido, que envolve a regeneração de células especializadas que substituirão o tecido lesado por um novo, e por fim, ocorrerão diversos processos biológicos como a finalidade de reparação tecidual, como: inflamação, proliferação e remodelação (Lins et al, 2010).

A primeira fase do processo de cicatrização é a fase inflamatória. No primeiro instante após a lesão, ocorre o influxo sanguíneo contendo plaquetas, que auxiliam no processo

para que possa cessar o sangramento, para assim permitir a hemostase. As plaquetas são responsáveis pela secreção de citocinas tanto dos tecidos locais quanto dos vasos sanguíneos, para que assim seja atraído neutrófilos e macrófagos para a região lesada (Jones et al.,2019). Assim, pode-se dividir a fase inflamatória em duas etapas que possuem mecanismos diferentes, são eles: mecanismos vasculares e celulares (Maria De Fátima et al, 2008).

Os mecanismos vasculares, incluem a formação de um coágulo de fibrina e a própria coagulação, processo este realizado com participação de plaquetas. Quando ocorre a lesão, a matriz extracelular (MEC) é exposta e este é responsável por ativar o colágeno fibrilar e a fibronectina. Após a ativação, ocorre a ação de mediadores vasoativos, de proteínas de adesão e ativação de diversas enzimas. Na intenção de interromper o sangramento, ocorre a ativação da rede de coagulação, através da ativação em tecidos lesados do fator XII e fator tecidual. As células plaquetárias por sua vez são responsáveis por secretar inúmeros fatores de crescimento com a intenção de restabelecer o tecido e assim conferir a cicatrização (Balbino et al, 2005).

A próxima etapa são os mecanismos celulares, onde se tem a presença de leucócitos, neutrófilos, monócitos e macrófagos, essas células são responsáveis por secretar citocinas, fatores de crescimento e ainda limpar os detritos e restos celulares presentes na lesão (Molinaro et al, 2009)

Na proliferação ocorre a deposição de matriz extracelular pelos fibroblastos e migração de queratinócitos, diferenciação do neo-epitélio e reestruturação da membrana basal, nesta fase os mecanismos celulares vão predominar e assim será criada uma nova barreira, chamada reepitelização, havendo a formação de novos vasos e remodelação da derme (Catarino, 2015).

Na fase de reepitelização, a migração de queratinócitos é uma etapa importante. Dessa forma, ocorre mudanças nas estruturas dos queratinócitos, como: alongamento da célula, perda do contato célula-célula e célula-matriz, com posterior formação de filamentos de actina. Logo, alguns fatores colaboram para esta migração, como; os receptores de integrinas, as metaloproteínases (MMPs) e MEC provisória formada por fibrina, fibronectina e colágeno tipo V (Laureano e Rodrigues, 2011).

Após a migração celular, acontece a reestruturação da membrana basal, onde ocorre a ligação das células ao substrato subjacente e a diferenciação do neo-epitélio, que têm o intuito de estabilizar a derme na sua antiga forma e faz com que os queratinócitos voltem a ter adesão (Peterle, 2017).

Para permitir que o fluxo sanguíneo volte a fluir normalmente, é preciso o crescimento de novos vasos (fase da angiogênese). No entanto se tem a ativação e proliferação das células endoteliais, formação da estrutura tubular do vaso e reconstrução da membrana basal. Os novos vasos formados, serão responsáveis por sintetizar o tecido de granulação através de nutrientes e células inflamatórias que serão recrutadas. Fatores de crescimento vão atuar nesta fase, como por exemplo VEGF. Estes irão influenciar de forma direta na migração de células endoteliais, interferindo na expressão de integrinas e de forma indireta na manutenção da integridade das células endoteliais (De Mendonça e Coutinho-Netto, 2009)

É na fase de reepitelização que se tem a síntese de colágeno e outras proteínas que constituem a MEC. Os fibroblastos migram e proliferam na região de coágulo de fibrina que foi formado assim que ocorreu a ferida. Imediatamente, ocorrem alterações nestes fibroblastos que por sua vez ajudarão na síntese de proteínas, e na contração da ferida por sua morfologia de miofibroblasto (Laureano e Rodrigues, 2011).

Para finalizar o processo de cicatrização tem-se a fase de remodelação, que consiste na produção e deposição de novos elementos da MEC para uma nova pele saudável. Assim, o tecido é cicatrizado e então são restabelecidas as funções da pele (Isaac, 2010).

Bramante e colaboradores (2010), em estudo realizado através de um corte em peles de camundongo, observaram ao sétimo dia uma camada de coloração eosinofílica espessa, com restos celulares e tecido de granulação na região do conjuntivo, conclui-se que ao sétimo dia há um avanço do processo de reparação tecidual. Já ao décimo quarto dia após a incisão, é possível observar um revestimento de epitélio do tipo estratificado pavimentoso, com camada queratinizada. Ao mesmo tempo que, no tecido conjuntivo subjacente notava-se a presença de tecido de granulação já em fase de maturação e a partir destes resultados, concluíram que o tecido já está totalmente reparado (BRAMANTE et al.,2010). Portanto, considera-se o tempo de cicatrização completa, em média de 14 dias.

Atualmente, existem diversos métodos para tratar lesões cutâneas. Dentre eles, os métodos biofísicos estão sendo alvos de estudos. Um deles é o campo eletromagnético pulsado, e quando feitos testes *in vivo* e *in vitro*, observa-se que este método atua na proliferação celular, na produção de miofibroblastos e deposição de fibras colágenas tipo 1 e diversos outros parâmetros relacionados a cicatrização, como por exemplo: vascularização, alinhamento de fibrilas e colágeno, tensão e espessura da ferida. Os resultados, portanto, superam os métodos do grupo controle (Kwan et al, 2019).

Outra alternativa é o ultra-som, quando avaliado sua eficiência, como por exemplo

cicatrização de feridas em ratos, os parâmetros como a migração de fibroblastos e tecido de granulação, que é a via pelo qual este método interfere, os resultados são positivos. Observa-se a migração, proliferação de fibroblastos e a densidade vascular. Os resultados nem sempre são mais eficientes, uma vez que não se vê diferença entre o tamanho das feridas nos grupos tratados com terapia padrão. Portanto, mesmo com alguns resultados positivos, a utilização do mesmo não supera os métodos padrão, sendo, portanto, insatisfatório como método para cicatrização de feridas (Kwan et al, 2019).

Existe ainda, a radiação infravermelha, que foi testada *in vivo* e *in vitro*. Os resultados dos testes em animais foram satisfatórios, uma vez que houve uma rápida cicatrização, pois, este método age estimulando a produção de colágeno, influenciando no aumento da migração celular, da viabilidade tecidual, aumentando a vascularização e ainda atuando na redução da inflamação. Apesar de alguns dos aspectos utilizando métodos biofísicos serem positivos, tais métodos não podem substituir tratamentos padrão já existentes, pois sua eficiência é menor ou igual àquelas já utilizadas (Kwan et al, 2019)

As células tronco são atuais alvos de pesquisa, uma vez que possuem o potencial de se diferenciar em diversos tipos de células e tecidos, e tem uma alta capacidade de auto-renovação. Por esse motivo são tão estudadas para terapia. Para células-tronco estaminais existem diversos tratamentos desenvolvidos ao que se refere a lesão dérmica. Entre eles destaca-se: géis, sprays, esponjas, câmaras de silicone, hidrogel adesivo e um adesivo extracelular. Acredita-se que as células-tronco agem reduzindo a inflamação e ainda estimulam a produção de MEC, o que de fato é um resultado positivo. Em contrapartida, acredita-se também que células-tronco mesenquimais agem aumentando a inflamação e estimulando as citocinas que conseqüentemente promovem a granulação (Jones et al. 2019).

Quando citados métodos *in vitro*, tem-se a utilização de papaína para tratamento de feridas. A papaína atua diretamente na degradação de componentes da matriz extracelular em cultura de fibroblastos humanos. Após uma exposição das MMPs (metaloproteinases) a diferentes concentrações da papaína, as células expostas a papaína obtiveram crescimento celular favorável sem prejudicar o tecido. Isso ocorre por que as MMPs fazem parte da cicatrização de feridas, e a papaína é capaz de fazer o controle dessas proteinases. Uma vez que essas MMPs não são reguladas, estas por sua vez degradam ou acumulam elementos que pertencem a MEC, e a cicatrização é prejudicada. (Costa, 2016)

O sistema endocanabinóide tem despertado curiosidade nos últimos tempos, devido

a suas diversas aplicações em doenças. Sendo um novo alvo terapêutico para doenças de pele. Esse sistema, portanto, está distribuído por todo organismo, atuando em vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, participando da manutenção da homeostasia da pele (Maccarrone et al., 2015).

Este sistema é composto por dois receptores, sendo eles  $CB_1$  e  $CB_2$ , por dois endocanabinóides, anandamida (N-araquidonoil etanolamina; AEA) e 2-araquidonoil glicerol (2-AG) e as enzimas responsáveis pela síntese e degradação dos endocanabinóides. Os receptores canabinóides são ligados a proteína  $G_{i/o}$  que consequentemente impede a ação da adenilato ciclase, e assim ativam a atividade da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Horinouchi, 2012).

O sistema endocanabinóide atua na homeostasia da pele, interferindo no crescimento, na diferenciação e até na sobrevivência das células, bem como em respostas imunes e inflamatórias. Portanto, muitas doenças de pele podem estar ligadas a alteração deste sistema, como por exemplo: fibrose exuberante, cicatrização anormal e até esclerose sistêmica (De Paiva, 2019).

O  $CB_2$  é um receptor canabinóide que está ligado a respostas imunes do organismo (Francischetti et al., 2006). Sendo assim está presente em diversas células, mas principalmente em células periféricas e imunes, sendo elas: linfócitos, células NK, monócitos, macrófagos, fibroblastos e queratinócitos. Logo o receptor  $CB_2$  está envolvido em diversas patologias referentes a essas células. Os endocanabinóides são produzidos a partir de seus precursores lipídicos de membrana quando necessário, sendo assim podem ser induzidos a produção por estímulos patológicos ou fisiológicos. Logo, o receptor  $CB_2$  pode ser ativado “sob demanda”, ou seja, a medida que seja necessário (Wang et al, 2016).

Um estudo de Wang e colaboradores (2016) feito com agonista do receptor  $CB_2$ , teve como objetivo comprovar que a ativação deste receptor, pode causar uma melhora da cicatrização de feridas cutâneas e uma diminuição da inflamação e da fibrogênese. Para tal comprovação, foi feita uma incisão em pele de camundongos, e tratado com agonista do receptor  $CB_2$  altamente seletivo GP1a (1- (2,4-diclorofenil) -6 metil-N-piperidin-1-il-4H-indeno [1,2-c ] pirazol-3carboxamida). Observou-se que ocorreu uma diminuição de neutrófilo e de macrófagos na inflamação. A quantidade de fibroblastos, miofibroblastos e fibrócitos também foram reduzidos, e consequentemente a expressão proteica do pró-colágeno também sofreu regulação negativa. Houve redução da fibrogêneses, e uma melhora na reepitelização. Esses resultados, sugerem que a hipótese de ativação de  $CB_2$



realmente pode interferir na cicatrização da pele (Wang et al, 2016).

O  $\beta$ -cariofileno é um sesquiterpeno natural, que são grupos de metabólitos secundários presentes em uma diversidade de famílias de plantas, e uma dessas plantas é a *Cannabis Sativa L.* (Ferreira, 2014). O  $\beta$ -cariofileno é um canabinóide anti-inflamatório, que possui o potencial de se ligar e atuar como agonista no receptor CB<sub>2</sub> e dessa forma ativá-lo. O  $\beta$ -cariofileno tem o potencial de inibir as vias de sinalização que promovem a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a resposta imunitária TH1, sendo assim o mesmo inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias e atua na diminuição da inflamação (Oliveira, 2018).

Deste modo, esta pesquisa visa estudar se  $\beta$ -cariofileno tem o potencial de acelerar o processo de cicatrização de feridas cutâneas, uma vez que existem muitas pessoas que sofrem com isso. Um dos fatores que interferem na cicatrização é a alta inflamação na fase inflamatória, o que acarreta na cicatrização tardia da pele e pode até levar a inflamação crônica (Pristo 2012). Portanto a fim de evitar essas ocorrências, se faz necessário a atual pesquisa.

## 2 HIPÓTESE

$\beta$ -cariofileno atua na cicatrização da pele ativando o receptor canabinoide, diminuindo a inflamação e influenciando na ativação proliferativa de fibroblastos, e assim melhorando o processo de cicatrização.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se a ativação de receptores canabinóides por  $\beta$ -cariofileno tem influência sobre a cicatrização de pele *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a ativação de receptores canabinóides por  $\beta$ -cariofileno atua no processo de cicatrização *in vitro*;
- Achar a concentração  $ic_{50}$  de  $\beta$ -cariofileno para viabilidade celular;
- Avaliar a segurança *in vitro* do  $\beta$ -cariofileno.

## 4 METODOLOGIA DA PESQUISA

### 4.1 CULTURA CELULAR

A linhagem de fibroblasto de rato (MRC-5) foi cultivada em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina (10.000 U/100 mg / ml) a 37° C, com 5% de CO<sub>2</sub> em uma atmosfera umidificada. Os fibroblastos quando atingiram a confluência foram subcultivados na proporção de 1:4, no entanto quando cultivados *in vitro* são capazes de recuperar a capacidade proliferativa sem mostrar sinais de diferenciação. Portanto, os fibroblastos cultivados podem servir como um modelo experimental útil para o presente estudo.

### 4.2 GRUPO DE TRATAMENTO

Agonista  $\beta$ -cariofileno (0,01mM, 0,03 mM, 0,1 mM, 0,3 mM, 1,0 mM, 3,0mM)

### 4.3 ENSAIO DE MTT

A fim de avaliar um possível efeito citotóxico do  $\beta$ -Cariofileno em linhagem de fibroblasto de pulmão de rato da linhagem MRC-5 (GFP) à metodologia de redução do sal de tetrazólio foi utilizada. O ensaio mede a redução de amarelo de 3-(4, 5 -dimetil-tiazol-2-il) -2, 5-difenil tetrazólio (MTT), através da succinato desidrogenase mitocondrial em células vivas. As células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de  $7 \times 10^3$  células/poço. Após 24 horas o meio de cultivo suplementado foi substituído por meio incompleto com diferentes concentrações do  $\beta$ -Cariofileno (0,01 – 3,0 mM) e incubado por 24 horas. Ao final deste período o meio foi substituído por uma solução de MTT (0,5 mg/mL) em meio incompleto e placa foi incubada em uma atmosfera umidificada e controlada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C por 4 horas. A solução de MTT foi removida e os cristais de formazan formados foram dissociados em etanol PA e a absorbância foi verificada em leitor de placa (Bio-Tek Ultra Microplatereader EL808) em comprimentos de onda de 495 e 630 nm, e a diferença entre as duas leituras de absorbância foi expresso em porcentagem da viabilidade celular (Pachauri et al., 2013).

### 4.4 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Com o intuito de verificar a participação do  $\beta$ -Cariofileno em processos de proliferação celular de fibroblastos, células MRC-5 ( $7 \times 10^3$  células/poço) foram semeadas

em placas de 96 poços e em uma atmosfera umidificada, 37°C e uma tensão de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas o meio foi substituído por 200 µL de meio contendo diferentes concentrações do β-Cariofileno (0,01 – 3,0 mM). A placa foi incubada em condições padrão e a cada 48 horas o meio foi substituído por um novo meio contendo as mesmas concentrações anteriores do extrato. Ao final de 96 horas a proliferação foi avaliada através do ensaio de MTT de acordo com o item 4.3 (Prudente, 2013).

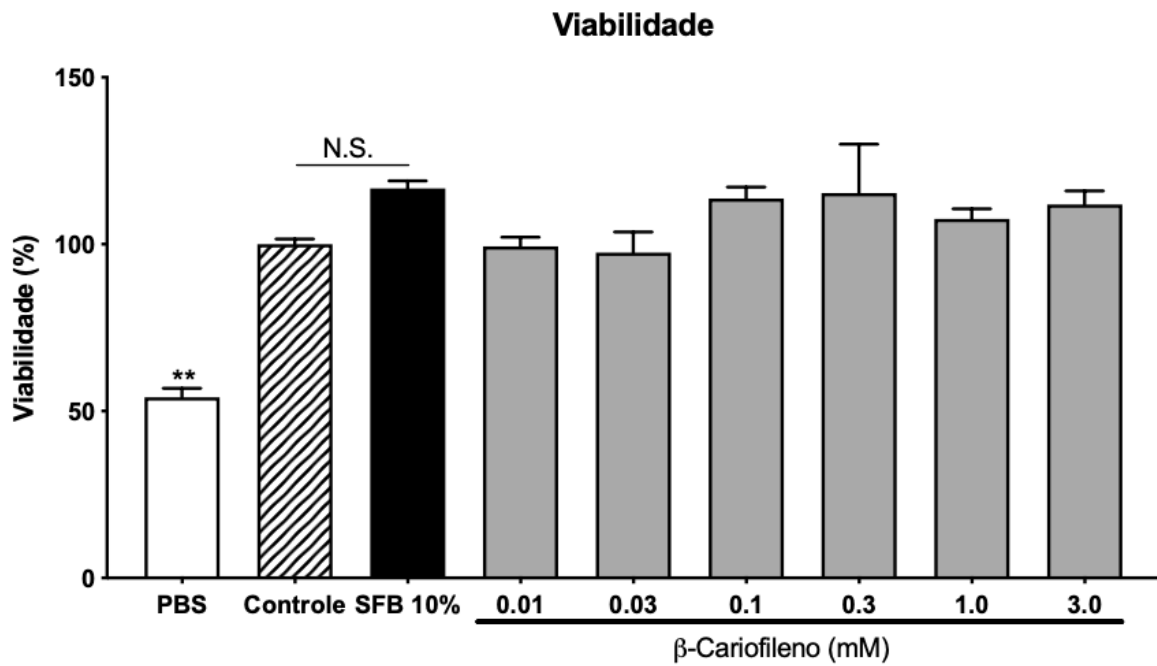
#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), exceto para os valores das EC<sub>50</sub> (Concentração eficaz para obter 50% da resposta dos grupos tratados em relação ao grupo controle), que foram representados como a média geométrica acompanhada de seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Os dados foram avaliados pelo teste de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de Newman-Keuls ou de duas vias seguida do teste *post-hoc* Bonferroni. Valores de P menores do que 0,05 (P < 0,05) serão considerados como indicativos de significância. Os cálculos serão realizados utilizando o Software estatístico GraphPad Prism version 8.0, San Diego Califórnia, EUA.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 VIABILIDADE CELULAR

Como primeira avaliação do  $\beta$ -Cariofileno sobre os fibroblastos (MRC-5) foi realizado o ensaio de viabilidade pela metodologia do MTT. Verificamos que a presença do  $\beta$ -Cariofileno nas concentrações testadas não foi capaz de interferir na viabilidade das células (Figura 2), quando comparado as células sem tratamento, as quais foram consideradas com viabilidade de 100% (Controle). Afim de validar o método utilizado nesta pesquisa, as células foram incubadas em meio completo (SFB 10%) e mesmo assim a viabilidade não alterou frente ao grupo controle. As células foram mantidas em tampão fosfato (PBS) e após 24 horas observou-se uma redução significativa frente ao grupo controle, resultado esse já esperado.

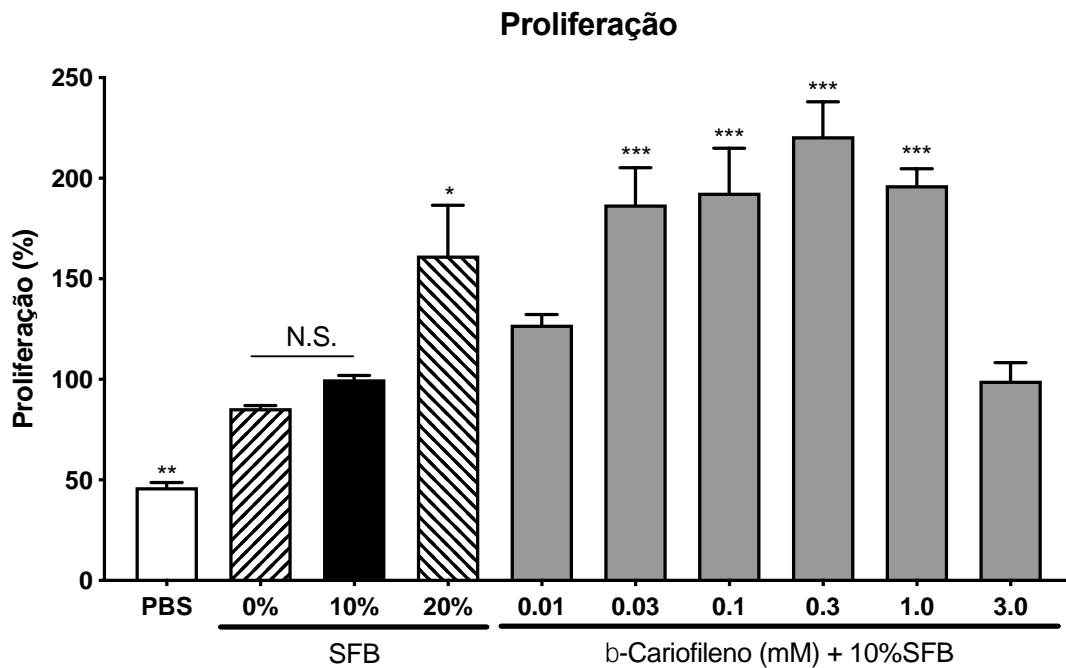


**Figura 2:** Avaliação da viabilidade celular através do MTT. Foi avaliada 24 horas após a exposição do  $\beta$ -Cariofileno em diferentes concentrações (0,01 – 3,0 mM) comparadas com as células que não foram expostas a nenhum dos tratamentos (Controle). O asterisco denota o nível de significância, quando comparado com o grupo controle, onde \*\*  $p < 0,01$ .

## 6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA

Para avaliar a atividade proliferativa dos fibroblastos na presença do  $\beta$ -Cariofileno (0,01 – 3,0 mM),  $7 \times 10^3$  células/poço foram plaqueadas e mantidas em meio completo com diferentes concentrações de SFB em estufa. Ao final de 96 horas as células foram submetidas ao protocolo de viabilidade celular pelo método de MTT. As células mantidas somente em meio foram consideradas com 100% de viabilidade denominadas de Controle. Os demais grupos receberam diferentes concentrações do  $\beta$ -Cariofileno (0,01 – 3,0 mM) diluídos em meio de cultivo completo, o qual foi substituído por meio novo contendo as mesmas concentrações a cada 48 horas. Observou-se um aumento significativo da proliferação celular nas concentrações de 0,03; 0,1; 0,3 e 1,0 mM em 86,93%; 92,79%; 120,93% e 96,56% respectivamente (Figura 3), com um valor de  $p \leq 0,001$  para a ANOVA, com um  $F(9, 29) = 20,12$ . No tratamento de meio sem o SFB (0%) não apresentou diferenças significativas com o grupo controle (10%) o qual teve uma proliferação normal. Já o grupo onde foi aumentada a concentração do SFB (20%) observa-se um considerado aumento na proliferação em aproximadamente de 61,47%.





**Figura 3:** Avaliação do efeito do  $\beta$ -Cariofileno sobre a proliferação celular. Foi avaliado 96 horas após a exposição ao  $\beta$ -Cariofileno, sendo efetuado o mesmo tratamento a cada 48 horas, em diferentes concentrações (0,01 – 3,0 mM) comparadas com as células que receberam somente meio contendo Soro Fetal Bovino (SFB 10%). Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle, onde \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 7 DISCUSSÃO

O  $\beta$ -cariofileno possui características lipofílica e por este motivo possui facilidade em penetrar nas células, este por sua vez possui inúmeros efeitos biológicos e farmacológicos (Ferreira, 2014). Segundo Oliveira (2008), há estudos que comprovam que o  $\beta$ -cariofileno tem o potencial de atuar nos receptores CB<sub>2</sub>, promovendo a redução da inflamação e conseqüentemente a redução de algumas citocinas, como por exemplo: IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ . O método MTT avalia a citotoxicidade causada às células que foram expostas a um determinado composto, sendo ele, neste caso o  $\beta$ -cariofileno e também avalia a proliferação dessa célula quando em contato com esse mesmo composto. O ensaio por sua vez, avalia a atividade mitocondrial através da formação de formazam, que acontece na mitocôndria que se dá através da redução da proteína succinato desidrogenase, sendo assim, apenas aquelas mitocôndrias viáveis são capazes de realizar a reação de coloração azul (Ferreira, 2014). Os objetivos deste atual trabalho é comprovar a viabilidade e a proliferação de fibroblastos MRC-5, através do método MTT quando submetidos a diferentes concentrações do tratamento de interesse ( $\beta$ -cariofileno).

Em nossa pesquisa de viabilidade, utilizou-se o PBS como controle negativo, pois com este tratamento foi possível observar um aumento significativo no número de células inviáveis, e como controle positivo fez-se o uso de SFB 10%, pois com o mesmo, é possível ter certeza que as células estavam viáveis. Os fibroblastos que foram submetidos a diferentes concentrações de  $\beta$ -cariofileno (0,01 mM, 0,03 mM, 0,1 mM, 0,3 mM, 1,0 mM, 3,0 mM), não demonstraram alteração na viabilidade celular. Sendo assim, o  $\beta$ -cariofileno pode ter um efeito protetor sobre os fibroblastos, não demonstrando citotoxicidade e sim segurança para o uso do tratamento. Tal avaliação não diz respeito sobre a eficácia do tratamento.

Este experimento traz relevância quando comparado ao trabalho de Ferreira (2014), que comprovou que o  $\beta$ -cariofileno possui um efeito protetor, reduzindo a morte celular no modelo celular em doenças degenerativas (em específico em células feocromocitoma), atuando na redução da ativação da caspase-3 que está ligada à morte celular apoptótica.

Tendo em vista que os canabinóides estão sendo muito pesquisados ultimamente, muito se questiona em relação a concentração do seu uso, ou seja, a concentração ótima para se obter o melhor resultado. Cada dose depende do fim que se deseja utilizá-lo. De

maneira geral, os canabinóide possuem um perfil diferenciado e também previsível quando se trata de avaliar a dose-resposta. Tem-se o que se chama de “relação dose-resposta em U”.

Guimarães e colaboradores (1990) realizou um teste com o CBD (canabidiol), que é um canabinóide clássico, para diminuir a ansiedade em ratos. Observou-se o efeito em U invertido, onde quanto mais alto o número de “entradas” em um braço aberto de um labirinto em cruz elevado, menos ansioso se encontra o rato em estudo. Dessa forma, o efeito máximo foi causado por 5 mg/kg, onde os valores abaixo ou acima dessa faixa não mostraram resultados melhores, ou seja, a melhor dose-resposta demonstrou-se em uma faixa mais intermediária (5mg/kg), enquanto que as doses 2,5 mg/kg, 10,0 mg/kg, 20,0 mg/kg não se obteve respostas significativas.

Um estudo mais recente realizado em seres humanos, também sobre o efeito na ansiedade através do uso do CBD, prova que esse efeito em U invertido também está presente nos humanos. Logo é possível observar a resposta em U invertido, onde a melhor dose-resposta se obtém com 300 mg e não em doses superiores ou inferiores. Foi possível encontrar a melhor concentração com a melhor resposta, onde 100 mg e 900 mg não obtiveram bons resultados (Zuardi et al, 2017).

Esse perfil de resposta é uma característica observada nos canabinóides de maneira geral, e no presente estudo, se observa o mesmo perfil de resposta, observada no trabalho de Guimarães e colaboradores (1990). O que ocorre no experimento é que as concentrações menores causam um efeito menor (menos proliferativo), e gradativamente aumenta o efeito em decorrência ao aumento da concentração do agonista. Na concentração intermediária (0,3 mM) é onde atinge o melhor efeito.

Os resultados deste trabalho em fibroblasto de ratos, e diversos outros estudos demonstram que o sistema canabinóide têm o potencial de controlar a resposta celular através da atuação em seus receptores, causando um efeito de dose-resposta em U invertido. O que explica a redução de proliferação em contato com o  $\beta$ -cariofileno em determinadas concentrações.

Nas concentrações do teste (1,0mM; 3,0mM), ocorre a queda do efeito, ou seja, uma redução da proliferação e isso pode se dar por alguns fatores, entre eles destaca-se a dessensibilização do receptor, ou seja, quando dada uma determinada concentração, o organismo se adapta e assim reduz o efeito à medida que a dose aumenta. Portanto a mesma quantidade de receptor existente nas células faz um efeito menor, justamente porque o sistema canabinóide tem o potencial de realizar esse controle, assim o sistema

canabinóide pode desacoplar o sistema de transdução de sinal ou ainda internalizar o receptor, causando assim o efeito em U invertido onde mesmo que o canabinóide se ligue ao receptor não se obtém a resposta esperada do efeito dose-resposta com platô que é mais comum observado na farmacologia. No uso de canabinóide destaca-se um efeito máximo causado a célula quando atinge uma determinada concentração, e o motivo pode se dar por diversos mecanismos (Zuardi, 2017; Guimarães 1990; Gallily, 2015).

Em uma revisão bibliográfica feita por Bih e colaboradores (2015), mostra que em doenças neurológicas o mecanismo pelo qual um canabinóide (CBD) pode atuar são vários, podendo alcançar 65 potenciais mecanismos de ação, sendo eles: enzimas (49%), transportadores (20%), canais iônicos clássicos (15%) e receptores (15%).

Como citado anteriormente, as enzimas constituem 49% do mecanismo pelo qual um canabinóide (CBD) atua, sendo um número bem maior que os receptores. Segundo Bih e colaboradores (2015), o CBD pode atuar inibindo o transportador de membrana da anandamida, conseqüentemente inibindo a captação do endocanabinóide anandamida. Essa inibição pode estar ligada a uma faixa dependente da concentração do CBD, aumentando assim seu nível endógeno. Além disso a anandamida possui efeitos anti-inflamatórios, que pode ser melhorado através da facilitação da transmissão da anandamida, exercidos através do CBD (Bih et al, 2015). Nada impede que de forma semelhante possa atuar o  $\beta$ -cariofileno.

É possível observar que ativação do sistema canabinóide com o agonista  $\beta$ -cariofileno influencia na fase de proliferação. Como já comprovado por várias literaturas, o beta-cariofileno tem o potencial de reduzir a inflamação e acredita-se com o atual estudo, que o mesmo tem o potencial de atuar também induzindo a proliferação de fibroblasto e assim melhorando de forma significativa a cicatrização, pois atua em duas fases principais da cicatrização de pele, sendo elas: inflamação e proliferação.

Como já descrito no presente trabalho, o receptor canabinóide 2 está envolvido nos principais processos biológicos das fases de cicatrização de feridas, sendo eles: inflamação, fibrogênese e crescimento epidérmico e como conseqüência é possível regulá-lo.

No trabalho de Wang e colaboradores, verificou-se a redução de inflamação quando utilizado um agonista (GP1a) do receptor CB<sub>2</sub>, principalmente através da diminuição dos neutrófilos e macrófagos em feridas de ratos. Porém, constatou-se também, que houve diminuição dos fibroblastos, e essa divergência de resultados do atual estudo com o do Wang e colaboradores, pode estar envolvido tanto pela diferença de agonista utilizado e

dessa forma mecanismos de ativação diferentes que causam efeitos diferentes. Quanto pelo fato da redução do processo inflamatório uma vez que, os neutrófilos foram minimamente reduzidos enquanto que os macrófagos foram reduzidos pela metade, sendo eles os principais reparadores das feridas, tendo a ação de fagocitar tecidos mortos, patógenos e estando envolvido em citocinas e fatores de crescimento importantes para a cicatrização, sendo esses fatores: TGF- $\beta$ 1 e VEGF. Desse modo, evidencia-se que a fase mais importante que orquestra todo processo de cicatrização, é a fase de inflamação. Portanto, é evidente que a ativação do receptor CB<sub>2</sub> tem o potencial de regular a inflamação, porém mais estudos devem ser feitos indicando qual a melhor concentração do agonista para obter melhor resposta de cicatrização (Wang, 2016).

A ativação do receptor CB<sub>2</sub> também foi capaz de promover a reepitelização em determinadas concentrações do agonista do estudo de Wang, onde o mesmo foi capaz de induzir a proliferação e migração de queratinócitos. Esse acontecimento se deve ao fato que o agonista foi capaz de regular a expressão de proteínas de adesão como involucrina e E-caderina, alterando sua morfologia, através da ativação do receptor CB<sub>2</sub>. A problemática dessa fase de reepitelização é justamente a sobrevivência dessas células que dependem dessas proteínas e uma vez que elas são reguladas erroneamente, esse processo pode induzir as células a morte, e esse efeito é causado pelo aumento da expressão de caspase 3 (Wang, 2016). Como citado acima, o beta-cariofileno possui um efeito protetor e este pode atuar reduzindo a ativação das caspase 3, melhorando significativamente o processo de migração e proliferação de queratinócitos.

## 8 CONCLUSÕES

Considera-se, portanto, que o  $\beta$ -cariofileno não é capaz de causar danos às células, tendo um potencial de induzir a proliferação celular. O experimento, contudo, mostrou um efeito biológico em U invertido, que é característico dos canabinóides e isso pode acontecer devido a diferentes receptores, alvos e até mesmo em relação a concentração do tratamento, esses fatores de forma conjunta controla esse efeito sob as células.

Esses achados sobre a curva em U invertido enfatizam a importância de encontrar a melhor faixa de dose do potencial efeito terapêutico do  $\beta$ -cariofileno, podendo assim obter o melhor efeito dose-resposta para o tratamento. Esse efeito traz pontos positivos, pois este pode modular de forma que a necessidade biológica seja atendida, e a cicatrização de modo geral não seja prejudicada.

Por fim, compreende-se que o  $\beta$ -cariofileno está envolvido na ativação do sistema canabinóide, tendo um efeito proliferativo e anti-inflamatório podendo melhorar de forma significativa as fases de inflamação, proliferação e reepitelização, destacando-se assim como um possível efeito cicatrizante.

## REFERÊNCIAS

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pober, J. S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

Balbino, Carlos Aberto; Pereira, Leonardo Madeira; CURI, Rui. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

Bhagwat, S.S., Manning, A.M., Hoekstra, M.F., Lewis, A., 1999. Gene-regulating protein kinases as important anti-inflammatory targets. *Drug Discov Today* 4, 472-479.

Bih, Clementino Ibeas et al. Molecular targets of cannabidiol in neurological disorders. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 699-730, 2015.

Bramante, Clovis Monteiro et al. **Análise Microscópica de Incisões realizadas em Ratos, por meio do Bisturi, Termocautério e Laser de Er: YAG**. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, v. 51, n. 2, p. 77-81, 2010.

Buckle, D.R., Hedgecock, C.J.R., 1997. Drug targets in inflammation and immunomodulation. *Drug Discovery Today* 2, 325-332.

Candi, E., Schmidt, R., Melino, G., 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 328-340.

Catarino, Carolina Motter. **Desenvolvimento de epiderme equivalente sobre membrana do tipo transwell e membrana biopolimérica**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2015.

Costa, Karina Brito da. Principais dosagens de papaína utilizadas em tratamentos de

feridas em fibroblastos humanos *in vitro* e suas consequências nas MMPS E TIMPS. 2016.

Cruvinel, Wilson de Melo et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010

Da Costa Glinardello, Maria Madalena et al. LESÃO EPITELIAL E CICATRIZAÇÃO DE NATUREZA HIPERTRÓFICA E QUELÓIDE. **Corpus et Scientia**, v. 5, n. 2, 2009.

Debenedictis, C., Joubeh, S., Zhang, G., Barria, M., Ghohestani, R.F., 2001. Immune functions of the skin. *Clin Dermatol* 19, 573-585.

De Mendonça, Ricardo José; Coutinho-neto, Joaquim. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol**, v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.

DE PAIVA, Anita Gomes Alves. O sistema endocanabinóide: recetores canabinóides e fibrose da pele. 2019.

Ferreira, Danilo Avelar Sampaio. **Avaliação do efeito protetor do  $\beta$ -cariofileno em modelos celulares de doenças neurodegenerativas**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Francischetti, Emilio Antonio; Abreu, Virginia Genelhu de; Virginia, G. **O sistema endocanabinóide: nova perspectiva no controle de fatores de risco cardiometabólico**. *Arq. Bras. Cardiol*, v. 87, p. 548-558, 2006.

Freinkel, R.K., Woodley, D., 2001. The biology of the skin. Parthenon Pub. Group, New York.



Gallily, Ruth et al. Superando a resposta à dose em forma de sino do canabidiol usando extrato de cannabis enriquecido em canabidiol. **Pharmacology & Pharmacy** , v. 6, n. 02, p. 75, 2015

Guimarães, Francisco Silveira et al. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, v. 100, n. 4, p. 558-559, 1990.

Haake, A., Scott, G.A., Holbrook, K.A., 2001. Structure and function of the skin: Overview of the epidermis and dermis. *The Biology of the Skin*.

Horinouchi, Cintia. **EM BUSCA DE UM NOVO ALVO TERAPÊUTICO PARA PSORÍASE: PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE EM UM MODELO ANIMAL DE PSORÍASE INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE IMIQUIMODE**. Curitiba: UFPR, 2012.

Isaac, Cesar et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3-4, p. 125-131, 2010.

Jones, Ruth Ellen et al. **Wound healing and fibrosis: current stem cell therapies**. *Transfusion*, v. 59, n. S1, p. 884-892, 2019.

Koster, M.I., Roop, D.R., 2004. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. *Eur J Cell Biol* 83, 625-629.

Kwan, Rachel Lai-Chu et al. **Efficacy of Biophysical Energies on Healing of Diabetic Skin Wounds in Cell Studies and Animal Experimental Models: A Systematic Review**. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 2, p. 368, 2019.

Laureano, André; Rodrigues, Ana Maria. Cicatrização de feridas. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**, p. 355-367, 2011.

Lins, R. D. A. U. et al. **Biostimulation effects of low-power laser in the repair process.** An Bras Dermatol., v. 85, n. 6, p. 849-855, 2010.

Maccarrone, M., Bab, I., Biro, T., Cabral, G.A., Dey, S.K., Di Marzo, V., Konje, J.C., Kunos, G., Mechoulam, R., Pacher, P., Sharkey, K.A., Zimmer, A., 2015. **Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC.** Trends Pharmacol. Sci. 36, 277–296.

Maria De Fátima, G. S. et al. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 41, n. 3, p. 259-264, 2008.

Molinaro, Etelcia Moraes et al. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, v. 4. 2009.

Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.Z., Nickoloff, B.J., 2009b. Skin immune sentinels in health and disease. Nature reviews. Immunology 9, 679-691.

Norris, A., 2004. Targeting mast cells. Expert Opin Investig Drugs 13, 739-741. ONU, 1997. Statement of Ind. Comm. for Population & Quality of Life. ONU.

Nickoloff, B.J., Nestle, F.O., 2004. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. J Clin Invest 113, 1664-1675.

Oliveira, Inês Pires de. **Potencial terapêutico dos Agonistas CB1 e CB2 na Doença Inflamatória Intestinal.** 2018. Dissertação de Mestrado.

Pachauri, Vidhu et al. MiADMSA protects arsenic-induced oxidative stress in human keratinocyte 'HaCaT' cells. **Biological trace element research**, v. 153, n. 1-3, p. 396-402, 2013.

Perera, G.K., Di Meglio, P., Nestle, F.O., 2012. Psoriasis. Annual review of pathology 7, 385-422.

Peterle, Jonathan Parisotto. **Estudo da atividade cicatrizante de hidrogel contendo beta-cariofileno nanoemulsionado**. 2017.

Pristo, Ilanna. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 267-271, 2012.

Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.M., 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17, 1063-1072.

Prudente, Arthur S. et al. Pre-clinical anti-inflammatory aspects of a cuisine and medicinal millennial herb: *Malva sylvestris* L. **Food and chemical toxicology**, v. 58, p. 324-331, 2013.

Puignero, V., Queralt, J., 1997. Effect of topically applied cyclooxygenase-2-selective inhibitors on arachidonic acid- and tetradecanoylphorbol acetate-induced dermal inflammation in the mouse. *Inflammation* 21, 431-442.

Robbins, S. L. Pele. In: ROBBINS, S. L (ed). **PATOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL**. Rio de Janeiro: Interamericana Ltda, 1975. cap 30, p 1241 – 1242

Roerhrs, Hellen. Efetividade do ácido hialurônico para a cicatrização de feridas crônicas: revisão sistemática. 2016.

Rosa, Mário Fabrício Fleury; Rosa, Suélia de Siqueira Rodrigues Fleury; Souza, Êmilly Késsy Ferreira de. Sistema complexo bio inspirado: modelagem matemática da pele humana via Bond Graph. 2014.

Sampaio, A.L., Rae, G.A., Henriques, M.M., 2000. Role of endothelins on lymphocyte accumulation in allergic pleurisy. *J Leukoc Biol* 67, 189-195.

Wang, Lin-Lin et al. **Pharmacological activation of cannabinoid 2 receptor attenuates inflammation, fibrogenesis, and promotes re-epithelialization during skin wound healing**. *European journal of pharmacology*, v. 786, p. 128-136, 2016.

Wang, Y.W., Ren, J.H., Xia, K., Wang, S.H., Yin, T.F., Xie, D.H., Li, L.H., 2012. Effect of mitomycin on normal dermal fibroblast and HaCat cell: an *in vitro* study. *J Zhejiang Univ Sci B* 13, 997-1005.

Williams, I.R., Kupper, T.S., 1996. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci* 58, 1485-1507

Zuardi, Antonio W. et al. Inverted U-shaped dose-response curve of the anxiolytic effect of cannabidiol during public speaking in real life. ***Frontiers in pharmacology***, v. 8, p. 259, 2017.