

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**NATANAEL JUNIOR LOPES SPECHT**

**EFEITOS DA MEMBRANA AMNIÓTICA E GELÉIA DE WHARTON  
DESCELULARIZADAS E DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO  
BIOSSÍNTETIZADAS COM CURCUMINA EM MODELO ANIMAL DE  
FERIDA CRÔNICA**

**CRICIÚMA  
DEZEMBRO 2024**

**NATANAEL JUNIOR LOPES SPECHT**

**EFEITOS DA MEMBRANA AMNIÓTICA E GELÉIA DE WHARTON  
DESCELULARIZADAS E DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO  
BIOSSÍNTETZADAS COM CURCUMINA EM MODELO ANIMAL DE  
FERIDA CRÔNICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade do Extremo Sul  
Catarinense – UNESC para obtenção do título  
de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira

**CRICIÚMA**

**DEZEMBRO 2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S741e Specht, Natanael Junior Lopes.  
Efeitos da membrana amniótica e geleia de Wharton descelularizadas e das nanopartículas de ouro biossintetizadas com curcumina em modelo animal de ferida crônica / Natanael Junior Lopes Specht. - 2024.  
68 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2024.  
Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Membrana amniótica. 2. Geleia de Wharton.  
3. Nanopartículas de ouro. 4. Curcumina. 5.  
Cicatrização de feridas - Tratamento. I. Título.

CDD. 22. ed. 617.1406

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101  
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

## FOLHA DE APROVAÇÃO




UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

---

### ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – N° 456

Com início às 9 (nove) horas do dia 18 (dezoito) de dezembro de 2024 (dois mil e vinte e quatro), realizou-se, na Sala 227/Bloco S, o seminário formal de apresentação dos resultados da Dissertação de Mestrado de **NATANAEL JUNIOR LOPES SPECHT**, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira, e coorientação de Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico, intitulada “EFEITOS DA MEMBRANA AMNIÓTICA E GELÉIA DE WHARTON DESCELULARIZADAS E DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO BISSÍNTETIZADAS COM CURCUMINA EM UM MODELO ANIMAL DE FERIDA CRÔNICA”. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, e Profa. Dra. Andréia Raquel Santos Noites Soares de Pinho (Universidade do Porto - PORTO) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: APROVADO, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 16h (dezesesseis) horas, dos quais eu, Henrique Manenti Felisberto, Secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Profa. Dra. Josiane Budni, Coordenadora do Programa. Criciúma, 18 (dezoito) de dezembro de 2024 (dois mil e vinte e quatro).

  
Profa. Dra. Josiane Budni  
Coordenadora do PPGCS

  
Henrique Manenti Felisberto  
Secretário do PPGCS

## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentado no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha esposa **Ana Letícia Dannenberg Specht**, que sempre esteve ao meu lado e nunca mediu esforços para que este sonho se tornasse realidade.*

*“-A minha pessoa!”*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, por me permitir chegar até aqui, porque sem Ele nada do que foi feito se fez e, dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas;

À minha esposa, Ana Letícia, pelo amor, companheirismo e apoio inabaláveis em todos os momentos desta caminhada.

Aos meus filhos, Mateus e Manuela, por serem minha maior inspiração e motivação diária.

À minha sogra, Ires Elena, pela companhia diária, com sua ajuda e suporte generoso sempre que necessário.

Aos meus pais, Ester Kaktin e Natanael de Moura, pela educação, valores e pelo exemplo de dedicação que sempre me guiaram. Sou profundamente grato a cada um de vocês.

À minha irmã Natieli, que mesmo distante sempre me apoia e incentiva e torcem por mim, assim como eu por ela;

Agradeço imensamente ao professor Paulo Cesar Lock Silveira pela orientação dedicada e pela paciência ao longo desta jornada de mestrado. Sua sabedoria, apoio constante e motivação foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Sou profundamente grato(a) pela oportunidade de aprender sob sua orientação e por todo o conhecimento compartilhado.

Aos colegas do Grupo Proteção e Reparo Tecidual pela parceria, apoio e troca de conhecimentos ao longo deste período. A colaboração e o ambiente acolhedor foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e para o fortalecimento das minhas habilidades científicas. Sou grato(a) por fazer parte de uma equipe tão dedicada e comprometida com a pesquisa e o avanço do conhecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense pela oportunidade de desenvolvimento acadêmico e pelo suporte oferecido ao longo desta jornada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo fomento, essencial para o desenvolvimento científico e tecnológico do nosso país, para a realização deste trabalho e para minha formação acadêmica.

Por fim, mas não menos importante, a todos os familiares e amigos próximos que são parte da minha história e me fizeram ser quem sou hoje;

-Somos o resultado de tudo o que vivemos, das experiências que nos moldaram, das pessoas que nos tocaram e dos desafios que nos transformaram, cada momento, bom ou difícil, constrói quem somos e nos prepara para o que ainda virá."

Natanael Specht

*“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”*

*1 Coríntios 13:2 ACF*

## RESUMO

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano em peso, sua principal função é a de barreira a fim de proteger o interior estéril do corpo do ambiente exterior visando a sobrevivência, além disso, a pele é responsável por atividades metabólicas, catabólicas e de condução de estímulos sensoriais. Ferida é toda e qualquer interrupção da continuidade da pele, seja ela causada por meios físicos, químicos ou biológicos, devido a sua vulnerabilidade a pele adquiriu ao longo do tempo um avançado mecanismo de reparo, denominado cicatrização. Neste contexto a membrana amniótica (MA) e a geléia de Wharton (GW) descelularizadas são materiais ricos componentes matriz extracelular (MEC) incluindo diversos tipos de colágeno, fibrina e fatores de crescimento, fornecendo um “andaime” muito propício para a migração, proliferação e diferenciação celular, processos estes necessários ao desenvolvimento do reparo tecidual, além de serem altamente anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas. As nanopartículas de ouro bio-sintetizadas com curcumina (GNPs) são comprovadamente potentes moléculas anti-inflamatórias e antioxidantes e se somam em sinergia à MA e GW favorecendo e acelerando a cicatrização de feridas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com MA, GW e GNPs isolados e combinados em modelo experimental de ferida crônica em ratos Wistar. Foram utilizados 72 ratos Wistar distribuídos randomicamente em 6 grupos experimentais (n=12): I. Ferida Crônica sem tratamento (FC); II. FC + tratamento com MA (FC + MA); III. FC + tratamento com GW (FC + GW); IV. FC + tratamento com GNPs (FC + GNPs); V. FC + tratamento com MA + GNPs (FC + MA + GNPs); VI. FC + tratamento com GW + GNPs (FC + GW + GNPs). Os animais foram anestesiados com Isoflurano 4% para indução da ferida através de um corte circular de espessura total da pele de 2cm de diâmetro, a cronificação da ferida foi induzida aplicando topicamente por 6 dias iniciando no dia da indução da ferida. Os tratamentos com MA, GW (aplicação única) e GNPs (aplicação diária por 5 dias) foram iniciados no 4º dia após a última aplicação de Resiquimod. No 15º dia após a indução da ferida foi realizada a análise macroscópica e do tamanho da ferida, após, os animais foram eutanasiados e retirados os tecidos (pele/ferida) para as análises histológicas, bioquímicas e moleculares. Os resultados demonstraram que ambos os tratamentos isolados e combinados tiveram diferença significativa para o aumento da contração da ferida em relação ao grupo controle, diminuindo o tempo total de cicatrização, os tratamentos propostos também foram eficazes em diminuir a infiltração de células inflamatórias na ferida, reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL1-β e IL6 TNF-α, e aumentando consideravelmente os níveis das citocinas anti-inflamatórias IL10 e IL4 e do TGF-β. No tocante aos parâmetros oxidativos, nossos resultados demonstram que os tratamentos foram eficazes em reduzir DCF e Nitrito, e todos melhoraram notadamente a atividade do sistema antioxidante SOD e GSH. Na análise da expressão gênica, houve aumento significativo na expressão de COL III nos grupos tratados com GW e GNPs isoladas e no grupo tratado com MA + GNPs, houve aumento também da expressão genica de COL I nos grupos tratados com GNPs e MA + GNPs. Concluímos que os tratamentos com MA, GW e GNPs em ferida crônica são eficazes para controlar e atenuar o processo inflamatório e melhorar as fases proliferativa e de remodelação, favorecendo a formação do tecido de granulação, da MEC e a cicatrização completa e rápida da ferida.

**Palavras-chave:** Membrana amniótica; Geleia de Wharton; Nanopartículas de ouro; Curcumina; Cicatrização de feridas.

## ABSTRACT

The skin is considered the largest organ of the human body by weight, with its primary function being to serve as a barrier that protects the sterile internal environment of the body from the external environment, ensuring survival. Additionally, the skin plays a role in metabolic and catabolic activities and sensory signal conduction. A wound is defined as any disruption in the continuity of the skin, caused by physical, chemical, or biological means. Due to its vulnerability, the skin has developed over time an advanced repair mechanism known as wound healing. In this context, decellularized amniotic membrane (AM) and Wharton's jelly (WJ) are rich in extracellular matrix (ECM) components, including diverse types of collagen, fibrin, and growth factors, providing an ideal scaffold for cell migration, proliferation, and differentiation—processes essential for tissue repair. Furthermore, AM and WJ exhibit strong anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial properties. Biosynthesized gold nanoparticles with curcumin (GNPs) are potent anti-inflammatory and antioxidant molecules that synergize with AM and WJ, promoting and accelerating wound healing. This study aimed to evaluate the effects of treatments with AM, WJ, and GNPs, both individually and combined, in an experimental model of chronic wounds in Wistar rats. A total of 72 Wistar rats were randomly divided into six experimental groups (n=12): I. Chronic Wound without treatment (CW); II. CW + treatment with AM (CW + AM); III. CW + treatment with WJ (CW + WJ); IV. CW + treatment with GNPs (CW + GNPs); V. CW + treatment with AM + GNPs (CW + AM + GNPs); VI. CW + treatment with WJ + GNPs (CW + WJ + GNPs). The animals were anesthetized with 4% Isoflurane, and a full-thickness circular skin wound of 2 cm in diameter was created. Chronicity of the wound was induced by topical application of Resiquimod for six days, starting on the day the wound was created. Treatments with AM and WJ (single application) and GNPs (daily application for five days) were initiated on the fourth day after the last Resiquimod application. On the 15th day after wound creation, macroscopic analysis and wound size measurements were performed, followed by euthanasia of the animals and collection of tissues (skin/wound) for histological, biochemical, and molecular analyses. The results demonstrated that all treatments, both individual and combined, significantly increased wound contraction compared to the control group, reducing total healing time. The proposed treatments also effectively decreased inflammatory cell infiltration in the wound, reducing levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ , while significantly increasing levels of anti-inflammatory cytokines such as IL-10, IL-4, and TGF- $\beta$ . Regarding oxidative parameters, the treatments effectively reduced DCF and nitrite levels and significantly enhanced the activity of the antioxidant system, including SOD and GSH. Gene expression analysis showed a significant increase in COL III expression in groups treated with WJ and GNPs individually and in the group treated with AM + GNPs, as well as an increase in COL I expression in groups treated with GNPs and AM + GNPs. We conclude that treatments with AM, WJ, and GNPs in chronic wounds are effective in controlling and attenuating the inflammatory process, improving the proliferative and remodeling phases, and promoting granulation tissue formation, ECM deposition, and faster, complete wound healing.

**Keywords:** Amniotic membrane; Wharton's jelly; Gold nanoparticles; Curcumin; Wound healing.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1:** Os estágios do reparo de feridas e seus principais componentes celulares. O reparo de feridas começa com a hemostasia, onde um tampão plaquetário previne a perda de sangue e uma matriz de fibrina preliminar é formada. A inflamação então ocorre para remover detritos e prevenir a infecção, começando com o influxo de neutrófilos, que é promovido pela liberação de histamina dos mastócitos. Os monócitos chegam mais tarde e se diferenciam em macrófagos teciduais para limpar os detritos celulares e neutrófilos restantes. Durante a fase proliferativa, os queratinócitos migram para fechar a lacuna da ferida, os vasos sanguíneos se reformam por meio da angiogênese e os fibroblastos substituem o coágulo de fibrina inicial por tecido de granulação. Macrófagos e células T reguladoras (Tregs) também são vitais para este estágio de cicatrização. Finalmente, a matriz depositada é remodelada ainda mais pelos fibroblastos, os vasos sanguíneos regridem e os miofibroblastos causam a contração geral da ferida. Fonte: WILKINSON; HARDMAN, 2020. ....21

**Figura 2:** Localização anatômica dos tecidos perinatais. Placenta; cordão umbilical [corte aumentado da membrana amniótica: fluido amniótico; camada epitelial; membrana basal; camada compacta; camada fibroblástica; camada esponjosa; camada reticular; membrana pseudo-basal; camada trofoblástica; decídua materna; miométrio]. Fonte: Adaptado de SAWVELL *et al.*, 2022.....24

**Figura 3:** A estrutura do cordão umbilical humano com um diagrama tridimensional explodido. O diagrama foi feito traçando diretamente os contornos das várias características na seção histológica e, em seguida, deslocando-as ao longo do eixo longitudinal inclinado. Barra de escala = 5 mm. Fonte: Adaptado de DAVIES; WALKER; KEATING, 2017.....25

**Figura 4:** A Mecanismo de ação da curcumina na redução da inflamação, anabolismo e apoptose. Ao inibir o fator de transcrição pró-inflamatório (NF- $\kappa$ B) e ativar o PPAR- $\gamma$ , a curcumina auxilia no anabolismo e na apoptose, na supressão de citocinas pró-inflamatórias, bem como na expressão e liberação de TNF- $\alpha$ . Abreviações: TLR, Receptores tipo Toll; TNFR, Receptor do fator de necrose tumoral; ROS, Espécies reativas de oxigênio; TRADD, Proteína associada ao domínio de morte do receptor do fator de necrose tumoral tipo 1; CYLD, Desubiquitinase de lisina 63 CYLD; cIAP1/2, Inibidor celular de proteína de apoptose 1/2; TRAF2/5, Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral 2/5; RIPK1, Quinase de serina/treonina interativa com receptor 1; LUBAC, Complexo de montagem de cadeia linear de ubiquitina; SPATA2, Proteína associada à espermatogênese 2; NEMO, Modulador essencial de NF- $\kappa$ B; TAB2/3, Proteína de ligação da quinase ativada por TGF-beta 1 (MAP3K7) 2; TAK1, Quinase ativada pelo fator de crescimento transformador  $\beta$ ; IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\gamma$ , Quinase inibitória kappa B alfa, beta e gama; I $\kappa$ B, Inibidor do fator nuclear kappa B; PPAR- $\gamma$ , Receptor gama ativado por proliferador de peroxissomos; P13K, Fosfoinositídeo 3-quinases; Akt, Proteína transformante da cepa Ak; ERK, Quinase regulada por sinal extracelular; JNK, Quinase N-terminal de Jun; Bax, Proteína associada a Bcl-2 X; AP-1, Proteína ativada 1; MMP-9, Metaloproteinase da matriz 9; COX-2, Ciclooxygenase 2; IL-6 e 1 $\beta$ , Interleucina 6 e 1 beta; TNF- $\alpha$ , Fator de necrose

tumoral alfa; MCP-1, Proteína quimiotática de monócitos 1. Fonte: FULORIA *et al.*, 2022. ....30

**Figura 5:** Linha do tempo experimental. Fonte: Do Autor, 2024. ....36

**Figura 6:** Efeitos do tratamento com MA, GW e GNPs sobre a área de contração da ferida em cm<sup>2</sup> no 15º dia após a indução da ferida. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*p<0,05 v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls). ....44

**Figura 7:** Efeitos do tratamento com MA, GW e GNPs sobre o influxo de células inflamatórias; A) imagens representativas dos cortes histológicos; B) quantificação do infiltrado inflamatório em nº de células/campo, no 15º dia após a indução da ferida. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*\*p<0,01 v.s Grupo FC; \*\*\*p<0,001 v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls)...45

**Figura 8:** Efeitos do tratamento com MA, GW e GNPs sobre a porcentagem da área de colágeno; A) imagens representativas dos cortes histológicos; B) porcentagem da área de colágeno, no 15º dia após a indução da ferida. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*\*p<0,01 v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).....46

**Figura 9:** Efeitos do tratamento com MA, GW E GNPs sobre parâmetros da expressão genica de COL III, COL I e NRF2 no 15º dia após a indução da ferida. (A) Conteúdo de mRNA de COL III; (B) Conteúdo de mRNA de COL I; (C) Conteúdo de mRNA de NRF2. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*p<0,05 v.s Grupo FC; \*\*p<0,01 v.s Grupo FC; \*\*\*p<0,001 v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls). ....47

**Figura 10:** Efeitos do tratamento com MA, GW e GNPs sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL6 em pg/mg de proteína no 15º dia após a indução da ferida. (A) Níveis de TNF- $\alpha$ ; (B) Níveis de IL1- $\beta$ ; (C) Níveis de IL6. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*p<0,05 v.s Grupo FC; \*\*p<0,01 v.s Grupo FC; \*\*\*p<0,001 v.s Grupo FC; \*\*\*\*p<0,0001 v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).....48

**Figura 11:** Efeitos do tratamento com MA, GW e GNPs sobre os níveis das citocinas anti-inflamatórias IL10, IL4 e TGF- $\beta$  em pg/mg de proteína no 15º dia após a indução da ferida. (A) Níveis de IL10; (B) Níveis de IL4; (C) Níveis de TGF- $\beta$ . Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*\*p<0,01 v.s Grupo FC; \*\*\*p<0,001 v.s Grupo FC; \*\*\*\*p<0,0001 v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).....49

**Figura 12:** Efeitos do tratamento com MA, GW e GNPs sobre os níveis dos oxidantes DCF em UFluorescência/mg de proteína e Nitrito em  $\mu$ M/mg de proteína no 15º dia após a indução da ferida. (A) Níveis de DCF; (B) Níveis de Nitrito. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*p<0,05 v.s Grupo FC; \*\*p<0,01 v.s Grupo FC; \*\*\*p<0,001 v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).....50

**Figura 13:** Efeitos do tratamento com MA, GW e GNPs sobre os níveis de dano oxidativo e de antioxidantes no 15º dia após a indução da ferida. (A) Níveis de Carbonil em mmol/mg proteína; (B) Níveis de Conteúdo de Sulfidril em mmol TNB/mg proteína; (C) Níveis de SOD em U/mg proteína; (D) Níveis de GSH em U Fluorescência/mg proteína. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*p<0,05 v.s Grupo FC; \*\*p<0,01 v.s Grupo FC; \*\*\*p<0,001 v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).....52

**Figura 14:** Efeitos das nanopartículas de ouro na ferida de pele. As AuNPs promovem efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes e interagem com diferentes moléculas, que reduzem sinergicamente o estresse oxidativo. A entrada de AuNPs no ambiente celular inibe as citocinas pró-inflamatórias livres, e as interações com CYS-179 de IKK-B e subsequente inibição da via NF-kB e da amplificação da resposta inflamatória, impactando na regulação do estresse oxidativo. Fonte: Adaptado de PINHO *et al.*, 2022. ....57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- COL I Colágeno tipo 1
- COL III Colágeno tipo 3
- COX-2 Ciclo-Oxigenase 2
- DAMPs Padrões Moleculares Associados a Danos
- DCF Diclorofluoresceína
- DNA Ácido Desoxirribonucleico
- EGF Fator de Crescimento Epidérmico
- EUA Estados Unidos da América
- FC Ferida Crônica
- FGF Fator de Crescimento de Fibroblastos
- GAGs Glicosaminoglicanos
- GNPs Nanopartículas de Ouro
- GSH Glutationa Reduzida
- GW Geléia de Wharton
- HA Ácido Hialurônico
- ICAM-1 Molécula de Adesão Celular Intercelular 1
- IFN- $\gamma$  Interferon Gama
- IGF Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
- IGF-1 Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1
- IKK- $\beta$  Inibidor de Kappa Beta Quinase
- IL-1 Interleucina-1
- IL-10 Interleucina 10

IL-16 Interleucina 16

IL-1RA Antagonista do Receptor de Interleucina 1

IL1- $\beta$  Interleucina 1 beta

IL-4 Interleucina 4

IL6 Interleucina 6

IL-6R Receptor de Interleucina 6

iNOS Óxido Nítrico Sintase Induzível

LOX Lipoxigenase

LPS Lipopolissacarídeo

MA Membrana Amniótica

MCSF Fator de Crescimento Derivado de Macrófagos

MEC Matriz Extracelular

mRNA Ácido Ribonucleico Mensageiro

NF- $\kappa$ B Fator Nuclear Kappa Beta

NO Óxido Nítrico

NRF2 Fator Eritróide Nuclear 2 Relacionado ao Fator 2

PAMPs Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

PDGF Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PKC Proteína Quinase C

RANTES Quimiocina Reguladora de Neutrófilos e Eosinófilos

RNA Ácido Ribonucleico

ROS Espécies Reativas de Oxigênio

SOD Superóxido Dismutase

TGF- $\alpha$  Fator de Crescimento Transformador Alfa

TGF- $\beta$  Fator de Crescimento Transformador Beta

TIMP-1 Inibidor de Metaloproteinases de Matriz 1

TIMP-2 Inibidor de Metaloproteinases de Matriz 2

TNF- $\alpha$  Fator de Necrose Tumoral alfa

VEGF Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
1.1	FERIDAS	19
1.2	CICATRIZAÇÃO	20
1.3	MEMBRANA AMNIÓTICA (MA)	23
1.4	GELÉIA DE WHARTON (GW)	25
1.5	NANOPARTÍCULAS DE OURO BIOSSÍNTETIZADAS COM CURCUMINA (GNPs)	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS DO TRABALHO</b>	<b>32</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	33
3.2	MENBRANA AMNIÓTICA	33
3.3	GELEIA DE WHARTON	33
3.4	NANOPARTÍCULAS DE OURO BIOSSINTETIZADAS COM CURCUMINA	34
3.5	ANIMAIS	35
3.6	FERIDA	35
3.7	TRATAMENTO	37
3.8	EUTANÁSIA	38
3.9	ANÁLISE DO TAMANHO DAS FERIDAS	38
3.10	ANÁLISE HISTOLÓGICA	38
3.11	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO	39
3.12	RT-PCR	40
3.13	ENSAIOS BIOQUÍMICOS	40
3.13.1	Marcadores de dano oxidativo	41
3.13.1.1	Conteúdo de Sulfidril	41
3.13.1.2	Carbonilação de Proteínas (Carbonil)	41
3.13.2	Defesas antioxidantes	41
3.13.2.1	Superóxido Dismutase (SOD)	41
3.13.2.2	Glutathione (GSH)	42
3.13.3	Quantificação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio	42
3.13.3.1	Indicador da Formação de Óxido Nítrico (NO) (Nitrito)	42
3.13.3.2	Diclorofluoresceína – DCFH-DA (DCF)	42
3.14	PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE DE DADOS	43
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>

4.1	ANÁLISE DA CONTRAÇÃO DA FERIDA .....	44
4.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	44
4.3	ANÁLISE DE RT-PCR .....	46
4.4	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO .....	47
3.13.1	Citocinas Pró-Inflamatórias .....	47
3.13.2	Citocinas Anti-Inflamatórias .....	48
4.5	PARÂMETROS OXIDATIVOS .....	49
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>68</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 FERIDAS

Feridas sejam elas cirúrgicas, traumáticas ou patológicas comprometem a integridade da pele que é um órgão protetor que garante a homeostase interna estéril do organismo frente ao contato com o ambiente externo repleto de riscos potenciais, representando cerca de 15% do peso total do corpo adulto, sua principal função é de barreira entre o organismo e o ambiente atuando na proteção contra agentes físicos, químicos e biológicos, a pele também é responsável pela retenção de água e, desempenha funções metabólicas, excretoras, imunológicas e participa das transmissões sensoriais que carregam estímulos ao sistema nervoso central (KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011).

As feridas podem ser identificadas e classificadas com relação a sua duração como agudas e crônicas a depender de seu tempo de cicatrização, e com relação a sua etiologia como cirúrgicas, traumáticas, vasculares, por pressão ou oncológicas, porém, tem-se usado uma nomenclatura específica para feridas que apresentam grande perda de tecido e aquelas que não cicatrizam espontaneamente após 3 meses, sendo chamadas de feridas complexas que podem ser agudas ou crônicas e demandam tratamentos intensivos e muitas vezes não chegam a cicatrização (FERREIRA *et al.*, 2006; VIANA DE SOUSA *et al.*, 2020).

As feridas que não cicatrizam impactam negativamente a qualidade de vida de cerca de 2,5% da população dos Estados Unidos da América - EUA, os portadores de feridas crônicas além de lidarem com a dor constante, sofrem de baixa autoestima, depressão, dificuldade para atividades sociais e laborais, sendo esta, uma condição altamente incapacitante, além disso as projeções de custos para o tratamento de todos os tipos de feridas de pacientes usuários do Medicare foi estimado de forma conservadora em cerca de 32 bilhões de dólares no ano de 2014 com maior parte destes custos gerados em ambientes ambulatoriais (CARTER *et al.*, 2023; NUSSBAUM *et al.*, 2018).

Também nos EUA identificou-se que em 2014 os usuários do serviço Medicare com pelo menos uma ferida eram 8,2 milhões e em cinco anos passou para 10,5

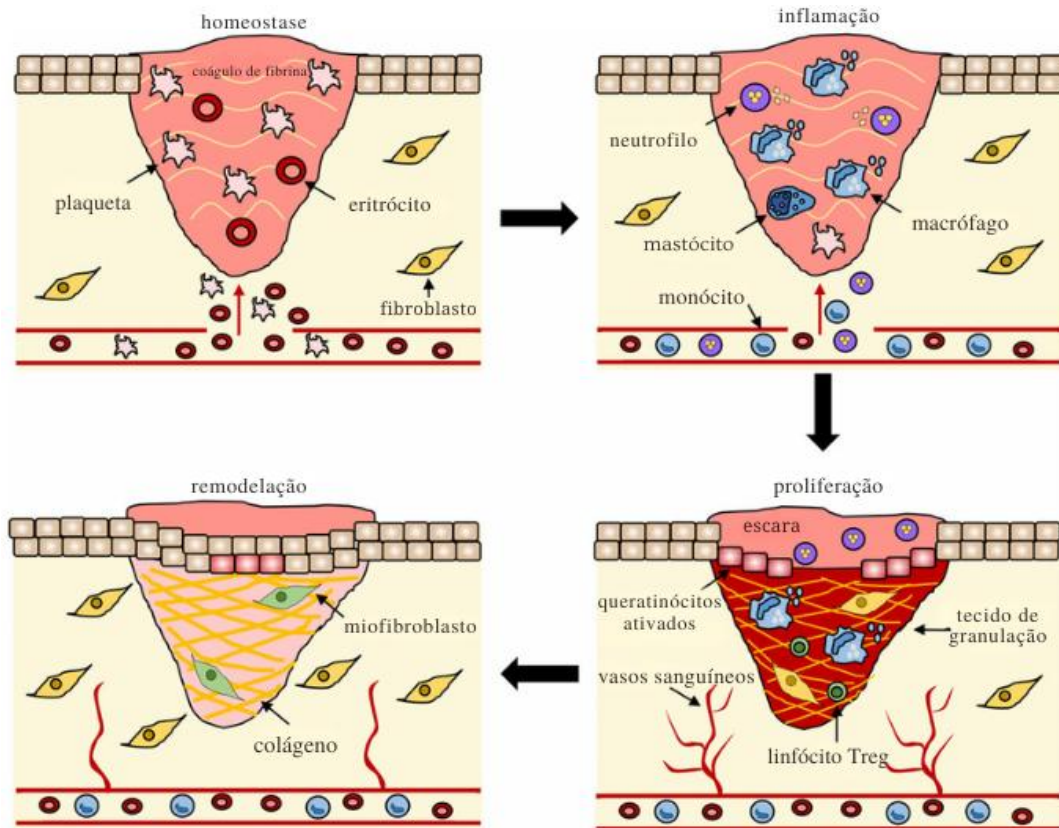
milhões, em 2019, um aumento de 13% atingindo uma prevalência de 16,4% entre todos os usuários do serviço, sendo que destes, os idosos com mais de 65 anos foram os que demonstraram maior aumento de uso por feridas, o estudo também demonstrou que houve aumento na prevalência de feridas arteriais e distúrbios de pele e redução em feridas traumáticas (CARTER *et al.*, 2023).

Nussbaum e colaboradores concluíram que as estimativas totais de gastos do Medicare nos EUA no ano de 2014 para todos os tipos de feridas foram de US\$ 28,1 bilhões, podendo chegar a US\$ 96,8 bilhões se incluídas as feridas como diagnóstico secundário, sendo que as estimativas mais caras foram para feridas cirúrgicas podendo chegar a até US\$ 38,3 bilhões, seguidas por úlceras de pé diabético com custos de até US\$ 18,7 bilhões, as estimativas de custo mais altas em relação ao local de serviço foram para pacientes ambulatoriais hospitalares de US\$ 35,8 bilhões, seguidas por pacientes internados de até US\$ 24,3 bilhões (NUSSBAUM *et al.*, 2018).

O tratamento de feridas representa grandes custos, ainda mais aquelas de difícil cicatrização, estudos têm demonstrado que estes custos se reduzem significativamente com o uso de coberturas avançadas, quando comparadas às tradicionalmente utilizadas, essa redução pode chegar a aproximadamente 7 vezes o custo total do tratamento, diminuindo inclusive o tempo de tratamento e melhorando o processo de cicatrização da ferida (NOGUEIRA CORTEZ *et al.*, 2020).

## 1.2 CICATRIZAÇÃO

Neste contexto, fisiologicamente a cicatrização abrange um processo complexo de sinalização celular e atuação de fatores intrínsecos e extrínsecos, comumente é dividida em fases bem definidas conforme a Figura 1, que são a hemostática e inflamatória – iniciando imediatamente após a ferida e podendo durar de 4 até 6 dias, envolvendo a coagulação e recrutamento de células de defesa para o sítio da ferida – a seguir se inicia a fase proliferativa – de 4 até 14 dias, envolvendo a epitelização, angiogênese e formação de matriz provisória – por fim têm-se a fase de maturação e remodelação – de 8 dias a 1 ano, envolvendo a substituição da matriz provisória por uma definitiva, com a proliferação de miofibroblastos que contraem a ferida e geram a cicatriz – (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).



**Figura 1:** Os estágios do reparo de feridas e seus principais componentes celulares. O reparo de feridas começa com a hemostasia, onde um tampão plaquetário previne a perda de sangue e uma matriz de fibrina preliminar é formada. A inflamação então ocorre para remover detritos e prevenir a infecção, começando com o influxo de neutrófilos, que é promovido pela liberação de histamina dos mastócitos. Os monócitos chegam mais tarde e se diferenciam em macrófagos teciduais para limpar os detritos celulares e neutrófilos restantes. Durante a fase proliferativa, os queratinócitos migram para fechar a lacuna da ferida, os vasos sanguíneos se reformam por meio da angiogênese e os fibroblastos substituem o coágulo de fibrina inicial por tecido de granulação. Macrófagos e células T reguladoras (Tregs) também são vitais para este estágio de cicatrização. Finalmente, a matriz depositada é remodelada ainda mais pelos fibroblastos, os vasos sanguíneos regridem e os miofibroblastos causam a contração geral da ferida. Fonte: WILKINSON; HARDMAN, 2020.

Segundo Landén e colaboradores, imediatamente após a lesão se inicia a cicatrização, marcada por atividades que envolvem um grande aparato celular e molecular, primeiro ocorre a hemostasia onde a agregação plaquetária através de glicoproteínas adesivas acontece juntamente com sinalização plaquetária secretando fatores de crescimento com o EGF, TGF- $\alpha$  e  $\beta$ , IGF, IL-1 e PDGF que ativam outras vias de cascatas de coagulação e estimulam a secreção de quimiocinas promovendo o recrutamento de células imunes residentes e circulantes iniciando concomitantemente à hemostasia a inflamação (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016).

Na inflamação os neutrófilos são inicialmente estimulados por DAMPs a recrutarem ainda mais células e produzirem uma barreira provisória evitando a infecção caso haja PAMPs eles secretam grânulos tóxicos a fim de neutralizar os

patógenos, gerando grandes gradientes de ROS que então estimulam a fagocitose principalmente nos monócitos recrutados ao sítio da lesão que se diferenciam em macrófagos M1, cuja principal função é fagocitar e secretar ainda mais citocinas pró-inflamatórias, exacerbando a atividade inflamatória local, juntamente há a formação da matriz provisória no leito da ferida através da atividade de fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais (SORG; SORG, 2023).

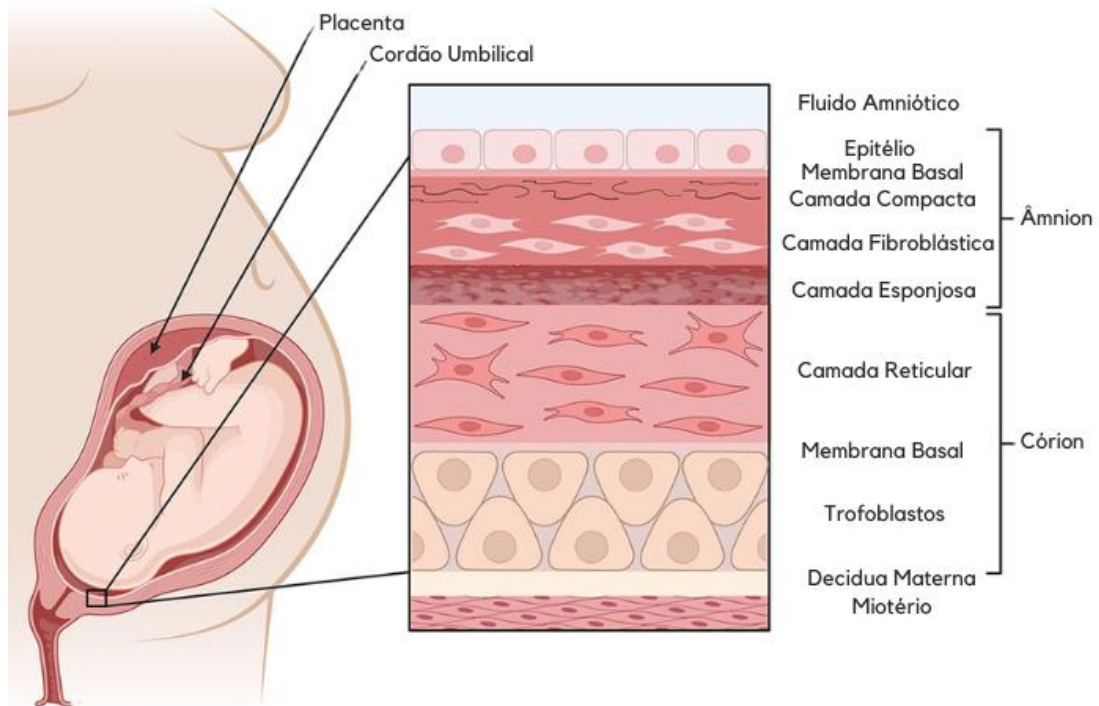
Ao findar o estímulo prejudicial – substrato para fagocitose – monócitos começam a se diferenciar em macrófagos M2, cuja principal função é secretar citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento, marcando o início da atividade de proliferação, onde as células – fibroblastos, granulócitos e macrófagos M2 – vão atuar na reepitelização, restauração da rede vascular e formação de granulação, agora a matriz provisória é substituída e há grande produção e deposição de fibrina, colágeno III, ácido hialurônico, glicosaminoglicanos e fibronectina, que estruturam um “andaime” preenchendo a ferida e viabilizando a migração, crescimento e diferenciação de células de reparo, recuperando parcialmente a função da pele. Por fim a remodelação se inicia após o final da formação do tecido de granulação, nela fibroblastos estimulados por TGF- $\beta$  se diferenciam em miofibroblastos e promovem a contração da ferida, nesta fase o colágeno III imaturo produzido inicialmente é substituído pelo colágeno I maduro, mais resistente à tração, dependendo do grau da lesão, folículos pilosos e glândulas nem sempre são recuperadas, mas aqui a cicatrização está completa (LANDÉN; LI; STÅHLE, 2016).

Quando o processo de cicatrização não segue seu curso natural, o que pode ocorrer por diversos fatores, geralmente ocorre uma desregulação na fase inflamatória, levando a exacerbação e continuidade da mesma, o que dificulta ou até mesmo impede a progressão para as demais fases do processo, a fase inflamatória importantíssima no início da lesão para eliminação de patógenos e limpeza de restos celulares e de matriz extracelular danificada, quando descontrolada, acaba dificultando a deposição de uma nova matriz e impedindo que as células necessárias ao reparo da ferida se proliferem, além disso, a produção desenfreada de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio cria um ciclo vicioso e não permite o avanço do processo de cicatrização, caracterizando a cronificação da ferida (DARBY; WELLER, 2017).

A utilização de curativos/coberturas é o tratamento mais comumente utilizado para feridas, uma vez que proporciona proteção ao local da lesão. O desenvolvimento de curativos modernos, visando melhorar características que proporcionem uma melhor cicatrização tem sido alvo de diversas pesquisas, os mais utilizados são curativos a base de hidrogéis, hidrocoloides, alginatos, espumas e filmes, sendo testados *in vitro* e *in vivo*, estes curativos têm demonstrado excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, fornecendo à ferida temperatura mais estável, mais humidade e melhorando a oxigenação estimulando a cicatrização e diminuindo a dor, no entanto, a limitação encontrada ainda é o complicado processo de produção que interfere diretamente no custo e a falta de garantia da qualidade para materiais biológicos (NGUYEN *et al.*, 2023).

### 1.3 MEMBRANA AMNIÓTICA (MA)

No desenvolvimento de novas coberturas para feridas temos a membrana amniótica (MA) que é a camada mais interna da placenta, e envolve todo o feto, sendo responsável por sua proteção física retendo o líquido amniótico que amortece impactos, fornece nutrientes, controla a temperatura, e proporciona um espaço para movimentação fetal e é uma importante barreira contra infecções, sendo composta por duas macro estruturas demonstradas na Figura 2, sendo elas: o âmnio que é a camada mais interna estando em contato direto com o líquido amniótico sendo constituído basicamente pelo epitélio, a camada basal, a camada compacta, a camada de fibroblastos e a camada esponjosa, e o córion que é a camada mais externa em contato direto com o endométrio uterino materno, sendo este formado pela camada celular/reticular, a membrana pseudo-basal e a camada trofoblástica (WETZELL *et al.*, 2024).



**Figura 2:** Localização anatômica dos tecidos perinatais. Placenta; cordão umbilical [corte aumentado da membrana amniótica: fluido amniótico; camada epitelial; membrana basal; camada compacta; camada fibroblástica; camada esponjosa; camada reticular; membrana pseudo-basal; camada trofoblástica; decídua materna; miométrio]. Fonte: Adaptado de SAWVELL *et al.*, 2022.

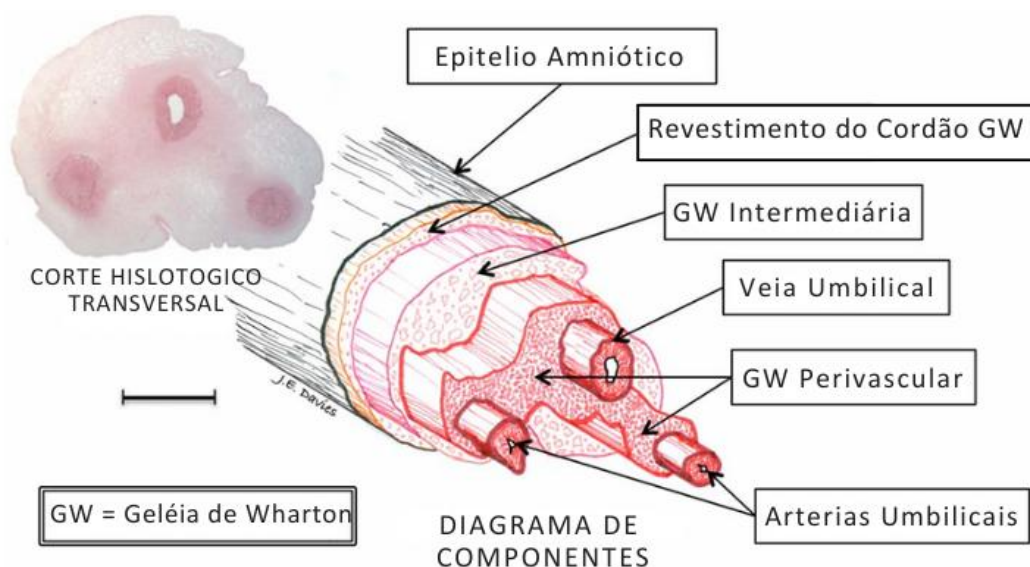
Rica em componentes de matriz extra celular (MEC) a MA possui muitas propriedades que a tornam excelente para a proliferação celular, entre as moléculas que a compõe destacamos, colágenos tipo I e IV (COL I e IV), fibronectina, laminina, proteoglicanos de sulfato de heparano, ácido hialurônico (HA) e glicoproteínas, que juntos fornecem suporte mecânico para resistência à tração, são favoráveis a fixação e motilidade celular e capturam fatores de crescimento como TGF- $\alpha$ , VEGF, IGF-1, dentre outros, todas estas propriedades garantem a manutenção da MA, sua integridade e resistência, inclusive a capacidade de se expandir durante o crescimento do feto (LEI *et al.*, 2017).

Milan e colaboradores investigaram o tratamento com MA descelularizada em modelo experimental de feridas por queimadura em camundongos, concluindo que a MA foi eficaz no reparo total da ferida 15 dias após o tratamento, atenuando a inflamação, reduzindo o infiltrado inflamatório, o que acreditaram ser por conta do efeito antimicrobiano e imunomodulador da MA e, controlando o processo de cicatrização, melhorando a reepitelização, a formação de granulação e a angiogênese em comparação ao grupo controle. Posteriormente aplicaram a MA descelularizada em feridas por queimaduras em humanos, onde observaram uma melhora significativa

na cicatrização em relação ao grupo controle, com redução da área da ferida no grupo tratado, e não houve nenhuma reação imunológica ou alérgica no local de aplicação indicando uma ótima aceitação do tratamento e uma interação entre a pele e o curativo de MA melhorando a cicatrização (MILAN *et al.*, 2020).

#### 1.4 GELÉIA DE WHARTON (GW)

Neste mesmo sentido na pesquisa de coberturas mais eficientes o cordão umbilical que sempre foi tratado como resíduo de serviços de saúde é uma estrutura que conecta a placenta ao feto, à termo ele pode medir cerca de 60cm com uma circunferência de até 2cm, ele contém uma artéria e duas veias umbilicais que fornecem oxigenação e nutrientes ao feto em desenvolvimento, os vasos são cercados por um tecido conjuntivo mucoide firme denominado geléia de Wharton (GW) que é revestido por uma única camada epitelial amniótica ao longo de todo seu comprimento conforme detalhado na Figura 3. Descrita por Thomas Wharton em 1656, a GW tem a função principal de proteger os vasos envolvidos por ela, evitando torções e conferindo elasticidade ao cordão umbilical, garantindo o fluxo sanguíneo mãe-feto e vice-versa (DAVIES; WALKER; KEATING, 2017).



**Figura 3:** A estrutura do cordão umbilical humano com um diagrama tridimensional explodido. O diagrama foi feito traçando diretamente os contornos das várias características na seção histológica e, em seguida, deslocando-as ao longo do eixo longitudinal inclinado. Barra de escala = 5 mm. Fonte: Adaptado de DAVIES; WALKER; KEATING, 2017.

Devido ao fato de o cordão umbilical ser a conexão exclusiva e vital entre a mãe e o feto, a propriedade mecânica deste tecido é extremamente importante, sendo que a consistência que confere resistência e impede o dobramento e oclusão dos vasos se deve à matriz extracelular (MEC) da GW que possui uma composição tecidual única de fibras de tecido conjuntivo juntamente com proteínas solúveis. Dentre os componentes da MEC da GW destacam-se os colágenos tipo I, III, IV, V, VI, VII, que juntos compreendem cerca de 50% do tecido seco desengordurado, os glicosaminoglicanos (GAGs), sendo que o ácido hialurônico (HA) compreende 70% deles e é o mais abundante, em menor quantidade os GAGs sulfatados como queratina, heparana, dermatana, condroitina-4 e sulfato de condroitina-6 e diversos fatores de crescimento como fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento de insulina-1 (IGF-1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento transformador alfa (TGF- $\alpha$ ), desempenhando um papel importante na proliferação, diferenciação celular e síntese e remodelação da MEC, além de diversas citocinas e receptores como (IL-16, RANTES, ICAM-1, IL-6R, IFN- $\gamma$ , MCSF, IL-1RA, TIMP-1 e 2,) entre outros (CAN; KARAHUSEYINOGLU, 2007; FAYON *et al.*, 2022; GUPTA *et al.*, 2020).

Segundo Gupta e colaboradores a GW reúne componentes essenciais à aplicação na medicina regenerativa, sua MEC rica em fatores de crescimento, citocinas, ácido hialurônico e colágeno, além disso, observaram que há um balanço importante entre citocinas e receptores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios o que promove uma sequência adequada de sinais inflamatórios seguida por sinais anti-inflamatórios que são essenciais ao processo de cicatrização adequada (GUPTA *et al.*, 2020).

Em um estudo experimental com camundongos murinos com osteócitos marcados com fluorescência, utilizando um modelo experimental de lesão craniana, demonstrou que os animais tratados com GW descélularizada tiveram uma maior migração de osteócitos das regiões ósseas vizinhas para o local da lesão em comparação com os do grupo controle (lesão sem tratamento), evidenciando a atuação da GW como uma matriz de suporte quimioatraente e biocompatível (JADALANNAGARI *et al.*, 2017).

## 1.5 NANOPARTÍCULAS DE OURO BISSÍNTETIZADAS COM CURCUMINA (GNPs)

Dentro deste mesmo panorama a nanotecnologia em constante avanço busca através da combinação entre ciência e engenharia, desenvolver materiais em escala de 1-100nm que possuam propriedades físico-químicas, ópticas e biológicas aplicáveis à saúde humana, utilizando por exemplo metais, polímeros, polissacarídeos e compostos bioativos derivados de plantas dentre outros, podendo ser combinados com fármacos e sendo utilizados atualmente no tratamento de diversas patologias como infecções por patógenos (bactérias e vírus), em tratamentos de câncer, hemofilia, acidente vascular encefálico, distúrbios sanguíneos, etc., se destacando como uma das abordagens mais promissoras para inovação em novos materiais para saúde humana (SINGH *et al.*, 2022).

A utilização de materiais em escala nanométrica tem diversas vantagens, dentre elas destacam-se a enorme área de superfície em relação a sua massa, sendo este aumento de superfície progressivo conforme se diminui o tamanho das nanopartículas, propriedades químicas e físicas que se modulam conforme o tamanho e o formato das nanopartículas, possibilidade de produção de estruturas como tubos, hastes, filmes, aglomerados de átomos, materiais nanoporosos, maior reatividade dos produtos obtidos, em aplicações na saúde maior biocompatibilidade e interatividade com o organismo em relação aos materiais em maior escala molecular (EMAMI MOGHADDAM; GHADAM; RAHIMZADEH, 2022; YAZDANIAN *et al.*, 2022; PATNAIK; THALLURI; SWAIN, 2023).

Materiais nanoparticulados podem ser produzidos, à grosso modo, tanto a partir da quebra de material a granel em pedaços cada vez menores (Top-Down), sendo esta, a técnica mais utilizada em larga escala pois possibilita a produção de grandes volumes de nanopartículas em curto espaço de tempo, quanto a partir da conjugação de átomos e moléculas menores até a formação das nanopartículas (Bottom-Up), com a vantagem de se produzirem nanopartículas com propriedades cristalográficas mais definidas e uma área superficial específica mais alta (ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018; KARUNAKARAN *et al.*, 2023).

Nesse cenário os métodos industriais tradicionalmente utilizados são químicos e físicos, onde necessariamente se empregam processos produtivos por meio de sol-gel, condensação atômica, corrosão química, pulverização catódica, prólise por spray, prólise a laser, altas temperaturas, pressão e grande demanda energética, métodos estes que apresentam grandes desvantagens devido as alterações morfológicas das nanopartículas obtidas que podem ocorrer através da variação de razões químicas e de reação, a alta toxicidade intrínseca dos meios de produção, dificuldades em termos de biocompatibilidade, bioacumulação, rebrota, reutilização e reciclagem, além dos riscos potenciais dos resíduos tóxicos ao meio ambiente e os altos custos de produção (KARUNAKARAN *et al.*, 2023; MAYNARD, 2012; NAJAH-MISSAOUI; ARNOLD; CUMMINGS, 2020).

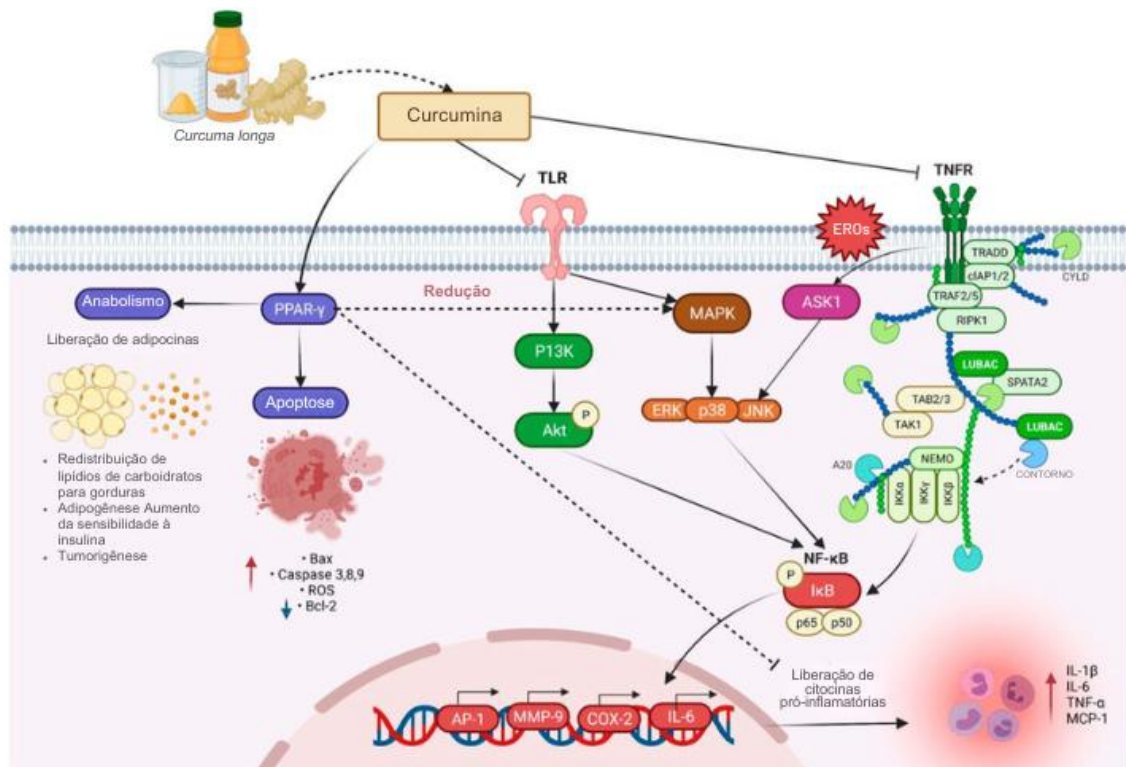
Neste contexto surgiram os processos de biossíntese ou síntese verde de nanopartículas onde o emprego de soluções extraídas de plantas são utilizadas para redução e estabilização das nanopartículas, processo este que tem como grandes vantagens a baixa ou nenhuma toxicidade conferida pelo processo de produção ao material nanoparticulado, o que confere as nanopartículas melhor biocompatibilidade, a possibilidade de produção em larga escala, a obtenção de nanopartículas com tamanho e morfologia bem definidos, a inexistência de risco ambiental uma vez que os resíduos de produção são atóxicos e biodegradáveis, além do baixo custo, todas estas vantagens tornam a biossíntese de nanopartículas mais promissora à aplicação na saúde, agricultura, indústria alimentícia e farmacêutica (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013; ELIZABETH *et al.*, 2022; THIRUPATHI *et al.*, 2023) .

Os processos de síntese convencionais de nanopartículas de ouro através de agentes químicos partindo da redução química do cloreto de ouro com borohidreto de sódio ou citrato de sódio, aumentam a toxicidade dos produtos obtidos devido a presença de resíduos e ainda geram grande quantidade de resíduos para descarte que são prejudiciais ao meio ambiente, além de consumirem grande quantidade de energia, tornando-se um processo muito oneroso, nesse sentido, a biossíntese com extratos vegetais para a redução e estabilização das nanopartículas de ouro tem sido muito promissora reduzindo custos de produção além de obter-se nanopartículas atóxicas, e ainda contar com a possibilidade de sinergia dos efeitos farmacológicos intrínsecos do extrato utilizado (CAI *et al.*, 2022; JHA *et al.*, 2024).

As GNPs podem atuar no reparo tecidual como agente anti-inflamatório, bloqueando a ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e associando-se ao componente Cys-179 da I-kappa- $\beta$ -quinase (IKK- $\beta$ ), deste modo, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, além disso são capazes de ligarem-se à IL-1 extracelular neutralizando sua ação em seu receptor e contribuindo ainda mais para atenuação de cascatas pró-inflamatórias reduzindo desta forma a produção de espécies reativas de oxigênio e promovendo o controle do processo inflamatório tão necessário ao reparo (MENDES *et al.*, 2022).

Ni e colaboradores demonstraram e cultura de células de macrófagos RAW 264.7, com e sem estimulação por LPS de E. Coli para simular uma condição inflamatória aguda que as GNPs na condição sem estimulação por LPS foram capazes de elevar os níveis de mRNA de macrófagos do fenótipo M1, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e iNOS como também facilitaram a expressão de fatores relacionados ao fenótipo M2, como TGF- $\beta$ , IL-10 e Arg-1. Já no ambiente celular estimulado por LPS onde a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e iNOS é extremamente alta, as GNPs demonstraram um potente efeito inibitório, reduzindo os níveis destes marcadores pró-inflamatórias, além de aumentar ainda mais a expressão dos marcadores anti-inflamatórios TGF- $\beta$ , IL-10 e Arg-1, além disso, observaram que na também na presença do LPS que aumenta significativamente os macrófagos M1, as GNPs foram capazes de polarizar os macrófagos para o fenótipo M2 modulando a resposta inflamatória (NI *et al.*, 2019).

Derivada da cúrcuma (Cúrcuma Longa L., rizomas) a curcumina é um composto fenólico pleiotrópico de cor amarela, é a substância presente em maior quantidade na planta e devido a isso responsável pela maior parte de suas atividades farmacológicas, entre elas destacam-se sua alta atividade anti-inflamatória conforme mecanismos descritos na Figura 4, atividade antioxidante, anticancerígena, antiangiogênica, antidiabética e antimicrobiana, devido a esses efeitos promove a cicatrização pois além de modular processos importantes como a inflamação e dano oxidativo ainda previne infecções (SALAMA *et al.*, 2024).



**Figura 4:** A Mecanismo de ação da curcumina na redução da inflamação, anabolismo e apoptose. Ao inibir o fator de transcrição pró-inflamatório (NF- $\kappa$ B) e ativar o PPAR- $\gamma$ , a curcumina auxilia no anabolismo e na apoptose, na supressão de citocinas pró-inflamatórias, bem como na expressão e liberação de TNF- $\alpha$ . Abreviações: TLR, Receptores tipo Toll; TNFR, Receptor do fator de necrose tumoral; ROS, Espécies reativas de oxigênio; TRADD, Proteína associada ao domínio de morte do receptor do fator de necrose tumoral tipo 1; CYLD, Desubiquitinase de lisina 63 CYLD; cIAP1/2, Inibidor celular de proteína de apoptose 1/2; TRAF2/5, Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral 2/5; RIPK1, Quinase de serina/treonina interativa com receptor 1; LUBAC, Complexo de montagem de cadeia linear de ubiquitina; SPATA2, Proteína associada à espermatogênese 2; NEMO, Modulador essencial de NF- $\kappa$ B; TAB2/3, Proteína de ligação da quinase ativada por TGF- $\beta$  1 (MAP3K7) 2; TAK1, Quinase ativada pelo fator de crescimento transformador  $\beta$ ; IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\gamma$ , Quinase inibitória kappa B alfa, beta e gama; I $\kappa$ B, Inibidor do fator nuclear kappa B; PPAR- $\gamma$ , Receptor gama ativado por proliferador de peroxissomos; P13K, Fosfoinositídeo 3-quinases; Akt, Proteína transformante da cepa Ak; ERK, Quinase regulada por sinal extracelular; JNK, Quinase N-terminal de Jun; Bax, Proteína associada a Bcl-2 X; AP-1, Proteína ativada 1; MMP-9, Metaloproteinase da matriz 9; COX-2, Ciclooxygenase 2; IL-6 e 1 $\beta$ , Interleucina 6 e 1 beta; TNF- $\alpha$ , Fator de necrose tumoral alfa; MCP-1, Proteína quimiotática de monócitos 1. Fonte: FULORIA *et al.*, 2022.

Nesta conjuntura, Kumawat e colaboradores avaliaram a síntese verde de nanopartículas de ouro com curcumina (Cur-GNPs) na redução de processos inflamatórios, onde concluíram que as Cur-GNPs, foram capazes de eliminar radicais livres atuando como potentes antioxidantes de modo concentração-dependente, onde as concentrações mais altas produziram melhor efeito antioxidante, na avaliação de toxicidade utilizando macrófagos de camundongos, observaram que as diferentes concentrações de Cur-GNPs apresentaram efeito positivo na viabilidade e proliferação celular confirmando sua biocompatibilidade e baixa toxicidade, na avaliação dos efeitos na inflamação induzida por LPS, observaram uma significativa redução na

expressão dos genes de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , levando a expressão destes genes à níveis normais em macrófagos (KUMAWAT *et al.*, 2022).

Corroborando com estes dados, Salehi e colaboradores analisaram os efeitos da curcumina em monócitos e macrófagos humanos *in vitro* expostos à LPS, onde observaram que a curcumina foi capaz de inibir a produção de IL-8, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  pelos monócitos-1 (MCP-1) sugerindo que este efeito poderia ocorrer através de inibição de diferentes vias como a da proteína kinase C (PKC), estes efeitos podem também estar associados à sua estrutura molecular pois possui grupamentos fenil e metoxi na posição orto, o que tem grande capacidade de inibir o NF- $\kappa$  $\beta$ , impedindo a cascata de sinalização, além de inibir COX-2, LOX e iNOS que são importantes mediadores inflamatórios (SALEHI *et al.*, 2019).

Sob essa ótica a nanotecnologia aplicada utilizando plantas e seus derivados, tem recentemente proporcionado novas possibilidades para a produção de nanopartículas e se destaca como uma técnica ambientalmente segura, prática, rápida e estável. A utilização da água como solvente redutor na síntese de nanopartículas traz várias vantagens, como biocompatibilidade, escalabilidade e uso medicinal. Dessa forma, nanopartículas derivadas de plantas podem suprir a demanda crescente por essas partículas, com aplicações tanto na biomedicina quanto no meio ambiente, pois são produzidas a partir de componentes vegetais acessíveis e não são tóxicas (CHOPRA *et al.*, 2022).

Considerando a relevância do tema, o presente estudo foi desenvolvido com os seguintes objetivos de investigar os efeitos do tratamento com membrana amniótica e geléia de Wharton descelularizadas, bem como com nanopartículas de ouro biossintetizadas com curcumina, em um modelo experimental de ferida crônica em ratos Wistar.

## 2 OBJETIVOS DO TRABALHO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito do tratamento com MA descelularizada, GW descelularizada e GNPs bio-sintetizadas com curcumina, isoladas e combinadas em modelo experimental de ferida crônica em ratos Wistar.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a área de contração da ferida;
- Realizar análise histológica do influxo de células inflamatórias em amostras de tecido da ferida;
- Realizar análise histológica da porcentagem da área de colágeno em amostras de tecido da ferida;
- Verificar a expressão gênica de mRNA de colágeno imaturo (COL III), de mRNA de colágeno maduro (COL I) e de mRNA de Fator eritróide nuclear 2 (NRF2) em amostras de tecido da ferida;
- Quantificar níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL6 em amostras de tecido da ferida;
- Quantificar níveis de citocinas anti-inflamatórias IL4 e IL10 e TGF- $\beta$ , em amostras de tecido da ferida;
- Determinar a produção de oxidantes (DCF e Nitrito), a atividade do sistema de defesa antioxidante (SOD e GSH) e os danos oxidativos (carbonil e sulfidril) em amostras de tecido da ferida;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi submetido a Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, tendo todos os procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7), sendo aprovado sob o número do protocolo 82/2022 no dia 23 de maio de 2023. (Anexo A).

#### 3.2 MENBRANA AMNIÓTICA

As membranas amnióticas foram obtidas em parceria com a PUC-PR, onde foram processadas e as recebemos prontas para o uso no experimento.

As membranas amnióticas foram obtidas de parturientes (n=2, com 36 a 40 semanas de idade gestacional) que tiveram parto vaginal, depois que cada mãe assinou um termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com o protocolo interno aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR. As membranas coletadas foram processadas no período de 6 a 12 horas após o parto.

A descelularização da membrana amniótica foi realizada com técnica asséptica em uma cabine de segurança biológica classe II BioSAFE (Veco®). Para esse processo, as membranas foram retiradas do meio (PBS) tampão fosfato pH 7.2 (Gibco) e tratadas com solução de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 0,01% e SD (desoxicolato de sódio) a 0,01% por 24 horas a 37°C, com auxílio de agitador mecânico (Mesa agitadora 109M, Nova Ética Ltda.). Depois foram conservadas em PBS a 4° C. De acordo com a metodologia descrita por Hopper *et al.* (2003).

#### 3.3 GELEIA DE WHARTON

Os cordões umbilicais foram obtidos em parceria com a PUC-PR, onde foram processados e os recebemos prontos para o uso no experimento.

Os cordões umbilicais foram obtidos de parturientes (n=2, com 36 a 40 semanas de idade gestacional) que tiveram parto vaginal, depois que cada mãe

assinou um termo de Consentimento Livre e Esclarecido de doação, de acordo com o protocolo interno aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR. Os cordões umbilicais foram processados no período de 6 a 12 horas após o parto. O processo de descelularização ocorreu na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) de acordo com a metodologia descrita por Hopper *et al.* (2003) e Francisco *et al.* (2016).

### 3.4 NANOPARTÍCULAS DE OURO BIOCINTETIZADAS COM CURCUMINA

As GNPs foram obtidas pela redução com uma solução estoque de extrato de *Cúrcuma Longa* L. conhecida popularmente como açafrão da terra. Uma solução estoque do extrato de *Cúrcuma Longa* foi preparada em Etanol absoluto. Solução estoque de ácido cloroáurico (HAuCl<sub>4</sub> 1mM), foi preparada em água Milli Q. Na sequência, uma solução pré-definida de extrato foi adicionado em água Mili Q e mantida sob agitação e aquecimento até atingir a temperatura de 90°C. Hidróxido de sódio (NaOH) (0.1M) foi usado para ajustar o pH entre 10 e 11. Na sequência, uma solução 1mM de HAuCl<sub>4</sub> foi adicionada gota a gota sob agitação simultânea. A reação foi mantida sob agitação até atingir a temperatura ambiente e posterior formação das GNPs.

As solução de GNPs foi caracterizada por espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis), em um modelo SpectraMax Plus. As nanopartículas foram medidas na região do visível (390–700nm). O tamanho e morfologia das nanopartículas foram realizados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) usando um JEM-1011 (100kV). Uma gota da solução das nanopartículas foi adicionada a uma grade de cobre (300mesh) coberta com uma fina camada de carbono. A secagem foi realizada em temperatura ambiente (24h) e posteriormente as imagens foram obtidas. O tamanho hidrodinâmico e a carga superficial em pH 7,4 (25°C) foram investigados através de medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta, usando um Zetasizer Nano ZS. As soluções de nanopartículas foram colocadas em uma célula capilar dobrada. Todas as análises foram realizadas em triplicata, para obtenção da média e desvio padrão (DP). A estabilidade das soluções foi avaliada por espectroscopia UV-Vis e Zetasizer.

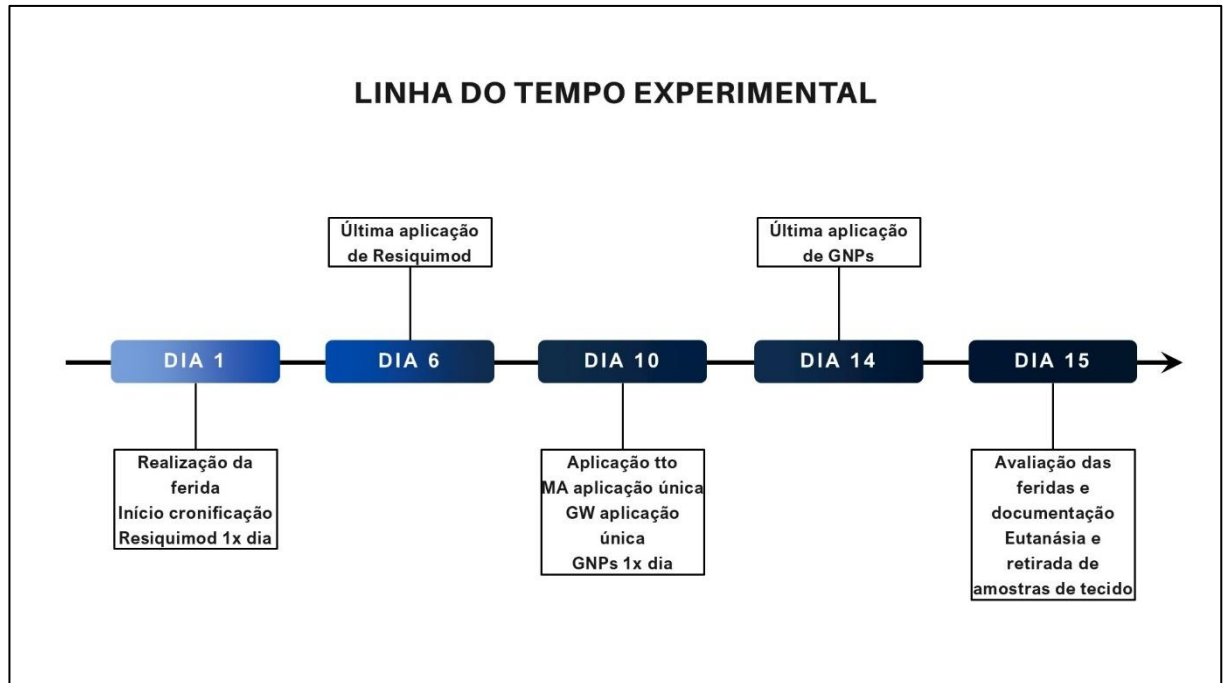
### 3.5 ANIMAIS

Foram utilizados 72 ratos Wistar – *Rattus norvegicus albinus*, machos, adultos, pesando entre 250 e 300 g, com 60 dias, provenientes da colônia de reprodução do Biotério da UNESC. Os animais foram alocados em 6 grupos de 12 ratos por gaiola moradia, com acesso à ração e água potável ad libitum, mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e em temperatura de  $20\pm 1$  °C. Os animais foram distribuídos randomicamente em 6 grupos experimentais com “n” de 12 animais por grupo para análises histológicas, bioquímicas e moleculares da seguinte forma:

- Grupo 1- Ferida Crônica (FC) (n=12);
- Grupo 2- Ferida Crônica + Membrana Amniótica (FC + MA) (n=12);
- Grupo 3- Ferida Crônica + Geléia de Wharton (FC + GW) (n=12);
- Grupo 4- Ferida Crônica + Nanopartículas de ouro biossintetizadas com curcumina (FC + GNPs) (n=12);
- Grupo 5- Ferida Crônica + Membrana Amniótica + Nanopartículas de ouro biossintetizadas com curcumina (FC + MA + GNPs) (n=12);
- Grupo 6- Ferida Crônica + Geléia de Wharton + Nanopartículas de ouro biossintetizadas com curcumina (FC + GW + GNPs) (n=12);

### 3.6 FERIDA

O desenvolvimento experimental ao longo do tempo se deu conforme a figura 5 a seguir, onde são demonstradas as principais atividades sendo elas: realização da ferida, início do protocolo de cronificação com Resiquimod (aplicação diária por 6 dias), três dias de intervalo entre a última aplicação de Resiquimod e o início da aplicação dos tratamentos no 10º dia de experimento (uma única aplicação de MA e GW, e aplicação diária por 5 dias de GNPs), no dia seguinte à última aplicação de GNPs, 15º dia, avaliação da ferida, documentação e eutanásia dos animais.



**Figura 5:** Linha do tempo experimental. Fonte: Do Autor, 2024.

No primeiro dia de experimento os animais foram randomicamente separados nos grupos e todos tiveram uma área de aproximadamente 3cm<sup>2</sup> do dorso tricotomizada para que no dia seguinte fosse induzida a ferida e iniciado o protocolo de cronificação da ferida.

O modelo de ferida epitelial foi induzido como descrito por Corrêa et al. (2022). Os animais foram anestesiados com Isoflurano 4%. No terço superior da região medial-dorsal, entre a linha infrascapular e a cauda dorsal a pele de cada animal foi tricotomizada, limpa e desinfetada com álcool 70% e realizada a demarcação do local da excisão de pele com um molde circular de 2 cm de diâmetro, após demarcada a espessura total da pele foi removida através de incisão cirúrgica (CORRÊA *et al.*, 2022).

O modelo de cronificação da ferida epitelial foi induzido como descrito por Holzer-Geissler (2022). O modelo utiliza o Resiquimod como indutor de ferida crônica, sendo esse um membro das imidazoquinolinaminas, e agonista dos receptores TLR 7 e 8 que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como interferon, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e outras (HOLZER-GEISSLER *et al.*, 2022).

O Resiquimod R848 (tlrl-r848) foi dissolvido em água estéril sem endotoxinas para gerar uma solução estoque de 5 mL de Resiquimod (15,9mM). A solução de

trabalho de Resiquimod consistiu em 593  $\mu$ L de água deionizada, 7,5  $\mu$ L de Tween 80 (9005656), 750  $\mu$ L de propilenoglicol (82280) e 135  $\mu$ L da solução estoque de Resiquimod R848 (1,4mM). A solução de trabalho foi preparada em um tubo de 3mL e aplicada em todas as feridas.

Todos os animais receberam a aplicação de 100  $\mu$ L da solução de trabalho de Resiquimod R848 1,4mM topicamente no local da ferida por 6 dias iniciando no dia seguinte à tricotomia (indução da ferida). No 4º dia após a última aplicação de Resiquimod, iniciou-se o tratamento dos animais.

### 3.7 TRATAMENTO

Todos os animais foram anestesiados com Isoflurano 4% na forma inalatória para assegurar a imobilização e aplicação correta dos tratamentos.

Após a cronificação da ferida, nos animais do grupo I (controle) as feridas foram cobertas por curativo transparente e adesivo (Tegaderm®), e a cicatrização se deu por segunda intenção. Já nos animais dos Grupos II, III, IV, V e VI as feridas foram cobertas conforme descrição a seguir:

Nos animais do grupo II, o leito da ferida foi totalmente coberto pela MA em quantidade suficiente para cobrir completamente a ferida.

Nos animais do grupo III, o leito da ferida foi totalmente coberto pela GW em quantidade suficiente para cobrir completamente a ferida.

Nos animais do grupo IV, o leito da ferida foi totalmente coberto pela GNPs em quantidade suficiente para cobrir completamente a ferida.

Nos animais do grupo V, o leito da ferida foi totalmente coberto pela MA + GNPs em quantidade suficiente para cobrir completamente a ferida.

Nos animais do grupo V, o leito da ferida foi totalmente coberto pela GW + GNPs em quantidade suficiente para cobrir completamente a ferida.

As coberturas com MA e GW foram aplicados uma única vez no primeiro dia de tratamento, já as GNPs foram aplicadas por 5 dias, nas associações de tratamento a MA e GW foram aplicadas primeiramente e sobre elas as GNPs, diariamente após a

aplicação todas as feridas foram cobertas com curativo adesivo transparente (Tegaderm®) a fim de manter os tratamentos aplicados no local da ferida, durante o período do experimento os animais foram observados diariamente a fim de detectar alterações locais na ferida e sistêmicas decorrentes do experimento, após 15 dias da indução da ferida epitelial e tratamento os animais foram eutanasiados.

### 3.8 EUTANÁSIA

Após o final do período do tratamento, os animais foram anestesiados com Isoflurano 4% e mortos por decapitação em guilhotina, no 15º dia após a indução da ferida. Em seguida, a pele/ferida de quatro animais de cada grupo foi retirada com margem de segurança de 0,5 cm para análise histopatológica e os oito restantes foram para análises bioquímicas e moleculares.

### 3.9 ANÁLISE DO TAMANHO DAS FERIDAS

O método fotográfico é uma alternativa precisa para medir a área da ferida, sendo uma técnica apropriada para feridas limpas, contaminadas ou não. Imagens digitais das feridas foram feitas na resolução: 3264 x 2448 pixels e analisadas pelo software IMAGEJ® 1.51. As imagens das lesões foram obtidas no dia X após o tratamento, para verificação visual da evolução do processo de cicatrização e mensuração do tamanho delas (área, comprimento e largura) calculando a variação das áreas das feridas neste período em cm<sup>2</sup>. Essas mensurações foram feitas pelo mesmo pesquisador, sendo realizadas 5 mensurações de cada ferida e utilizado o valor médio para as análises estatísticas.

### 3.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras de tecido epitelial do 15º dia após a ferida foram embebidas em solução de paraformaldeído (PFA) a 10% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). As

amostras retiradas foram fixadas por 24 horas na mesma solução (PFA 23 10%), e posteriormente incluídas em parafina após desidratação e clareamento, e seccionadas em cortes de 5µm de espessura. Quantificações histológicas da infiltração de leucócitos e deposição de colágeno ocorreram com hematoxilina-eosina e tricrômico de Gomori, respectivamente. As lâminas foram lidas em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA), com aumento de 200x, e foram capturados quatro campos oculares por corte (4 animais / grupo). As imagens foram gravadas com o auxílio da câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, NY, EUA) e analisadas no software NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA), considerando a coloração nuclear de células inflamatórias (H&E). Os dados foram expressos como densidade óptica (OD).

### 3.11 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

Para dosagem das citocinas foi utilizado o método ELISA de captura através do Kit Unconted TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL4, IL10, TGF- $\beta$  (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific ELISA). A dosagem foi realizada conforme as instruções da bula. Para isso, foi utilizada uma placa de ELISA, na qual serão adicionados 100µL/poço de anticorpo de captura diluído em tampão Coating Buffer (1:250), a placa foi incubada overnight a 4°C. No dia seguinte, retiramos toda a solução dos poços e realizamos três processos de lavagens com 250µL/poço de tampão de lavagem. O bloqueio da placa foi feito com 200µL/poço de diluente ELISA/ELISPOT (1X) e a incubação ocorreu por uma hora à temperatura ambiente. Passado o período de incubação, toda a solução foi retirada e realizamos dois processos de lavagens com 250µL/poço de tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100µL/poço das amostras (sobrenadante celular) e incubadas overnight a 4°C, para sensibilidade máxima. No dia seguinte, toda a solução foi retirada e cinco processos de lavagens com 250µL/poço de tampão de lavagem foram realizados. Feito isso, foram adicionados 100µL/poço de anticorpo de detecção diluído em ELISA/ELISPOT (1:250) em todos os poços e incubados à temperatura ambiente durante uma hora. Passado o período de incubação, toda a solução foi retirada e cinco processos de lavagens com 250µL/poço de tampão de lavagem foram realizados. Em seguida, foram adicionados 100µL/poço de Streptavidin-HRP e incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após esse

período, toda a solução foi retirada e cinco processos de lavagens com 250µL/poço de tampão de lavagem foram realizados. Adicionamos 100µL/poço de Solução TMB 23 (tetrametilbenzidina) (1X) e incubamos em temperatura ambiente por quinze minutos. Por fim, foram adicionados 100µL/poço de solução de parada. Em seguida, a placa foi analisada em um leitor de placas por absorbância, no comprimento de onda de 450nm. Todas as análises foram realizadas em duplicadas visto que a amostra utilizada foi o homogeneizado da pele retirada. Na mesma placa, foi realizado uma curva de concentração, com a amostra padrão do kit. A realização da curva de calibração, garante a qualidade do teste que está sendo realizado e possibilita que sejam realizados os cálculos para dosagens em pg/mL das citocinas.

### 3.12 RT-PCR

A análise de expressão gênica de NRF2, colágeno tipo 1 (COL I) e colágeno tipo 3 (COL III) foram realizadas através de PCR – Real Time. O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Life Technologies) e seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. O RNA obtido foi solubilizado em 30 µl de água Milli-Q tratada com DEPC 0,1% (Sigma), agrupado em um único tubo e armazenado a -20°C. O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria em absorbância a 260nm e 280nm. A relação entre as absorbâncias 260/280nm foi utilizada para estimar a contaminação por proteínas. Foram considerados de boa qualidade os RNAs cuja relação 260/280 nm estiverem entre 1,8 e 2,0. Logo após, o DNA complementar foi sintetizado através da transcriptase reversa M-MLV, que promove uma fita de DNA complementar a partir de RNA de fita simples. A parte final inclui a PCR em tempo real, por meio do sistema do corante SYBR Green, que possui ligação altamente específica ao DNA dupla-fita, para detectar o produto da PCR conforme ele se acumula durante os ciclos da reação (BUSTIN, 2002).

### 3.13 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

### **3.13.1 Marcadores de dano oxidativo**

#### *3.13.1.1 Conteúdo de Sulfidril*

Para determinar grupamentos tióis totais na amostra foi utilizado o reagente de cor (DTNB), que reduziu os grupos tióis gerados, formando um derivado amarelo (TNB), mensurado espectrofotometricamente em um aparelho SpectraMax à 412nm (AKSENOV; MARKESBERY, 2001).

#### *3.13.1.2 Carbonilação de Proteínas (Carbonil)*

A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370nm como previamente descrito por Levine et al. (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. 32 (LEVINE *et al.*, 1990).

### **3.13.2 Defesas antioxidantes**

#### *3.13.2.1 Superóxido Dismutase (SOD)*

A atividade da SOD foi avaliada através de uma inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister e Calabrese (1987). As amostras de homogenato de tecido epitelial foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15ul foram retiradas da mesma, a qual 5ml de catalase (0,0024mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175-185mL (0,75g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5ul adrenalina (60mM em água destilada +15ml/ml de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180s em intervalos de 10s e medido em leitor de ELISA a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por

miligrama de proteína (U/MG de proteína). Conteúdo de Proteínas O teor de proteína a partir do homogenato de tecido epitelial foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry (1951). O reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico (Folin fenol) foi adicionado a fim de obter sua interação com o conteúdo proteico; com absorvância lida a 750nm em espectrofotômetro (BANNISTER; CALABRESE, 1987).

### 3.13.2.2 *Glutathione (GSH)*

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurado no homogenato de tecido epitelial após precipitação de proteína com 1mL de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800mM, pH 7,4 e 500 µM DTNB. A absorvância foi lida a 412nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutathione reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras (HISSIN; HILF, 1976).

## 3.13.3 **Quantificação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio**

### 3.13.3.1 *Indicador da Formação de Óxido Nítrico (NO) (Nitrito)*

A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1 % sulfanilamida e 0,1 % de N1 (naphthylethylenodiamina)) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorvância foi medida a 540nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>). Os resultados foram calculados em µmol Nitrito/mg proteína (CHAE *et al.*, 2004).

### 3.13.3.2 *Diclorofluoresceína – DCFH-DA (DCF)*

A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) a partir da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) por ROS de acordo com o método descrito anteriormente por Dong (2010), com algumas modificações.

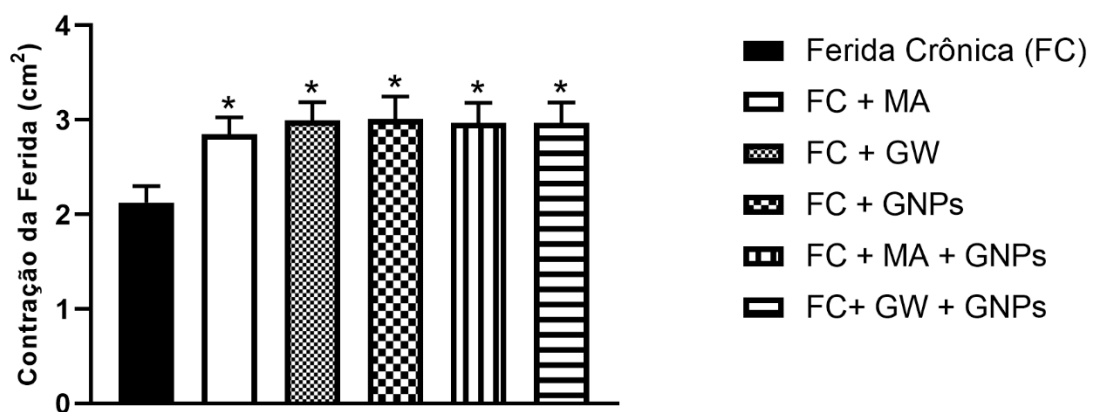
### 3.14 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Newman-Keuls. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de  $p < 0,05$ . Foi utilizado o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 17.0 como pacote estatístico.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DA CONTRAÇÃO DA FERIDA

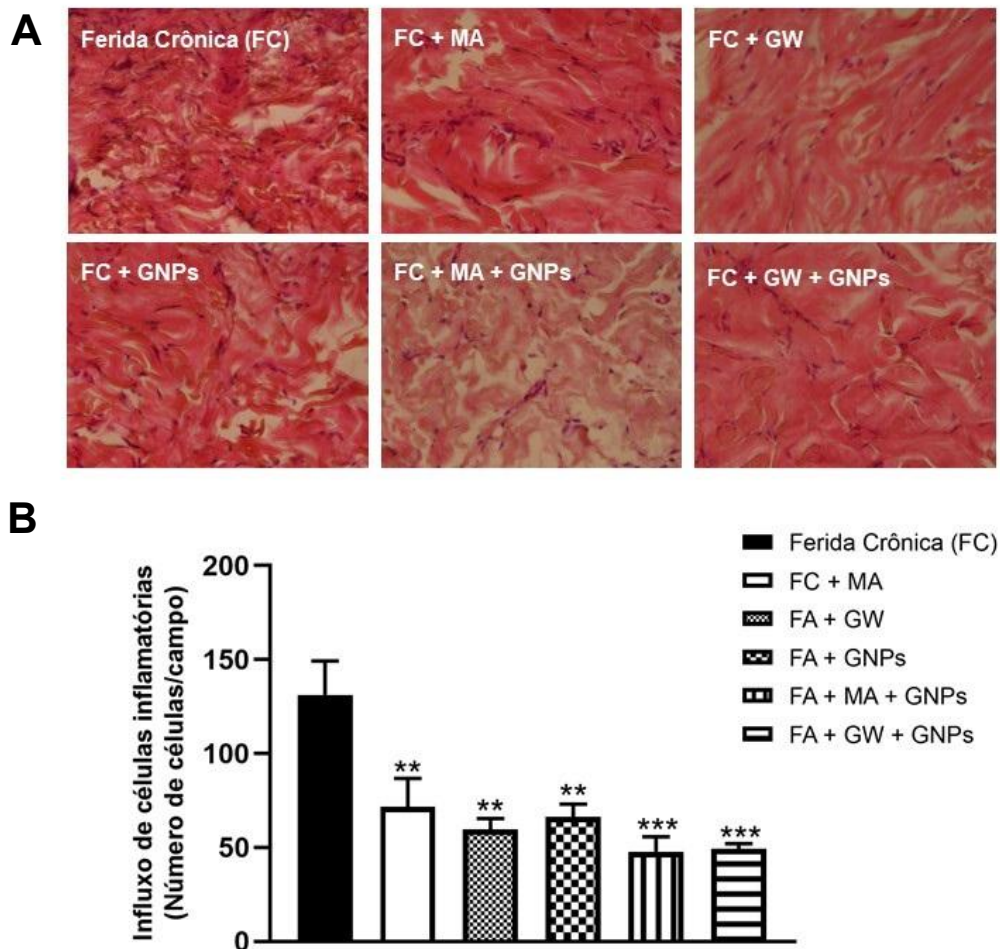
A figura 6 apresenta a contração da ferida em cm<sup>2</sup> no 15º dia após a indução da ferida. Foi verificado que todos os grupos com tratamento apresentaram diferença significativa em relação ao grupo Ferida Crônica (FC) sem tratamento, com  $p < 0,05$  em todos os grupos.



**Figura 6:** Efeitos do tratamento com MA, GW e GNP sobre a área de contração da ferida em cm<sup>2</sup> no 15º dia após a indução da ferida. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

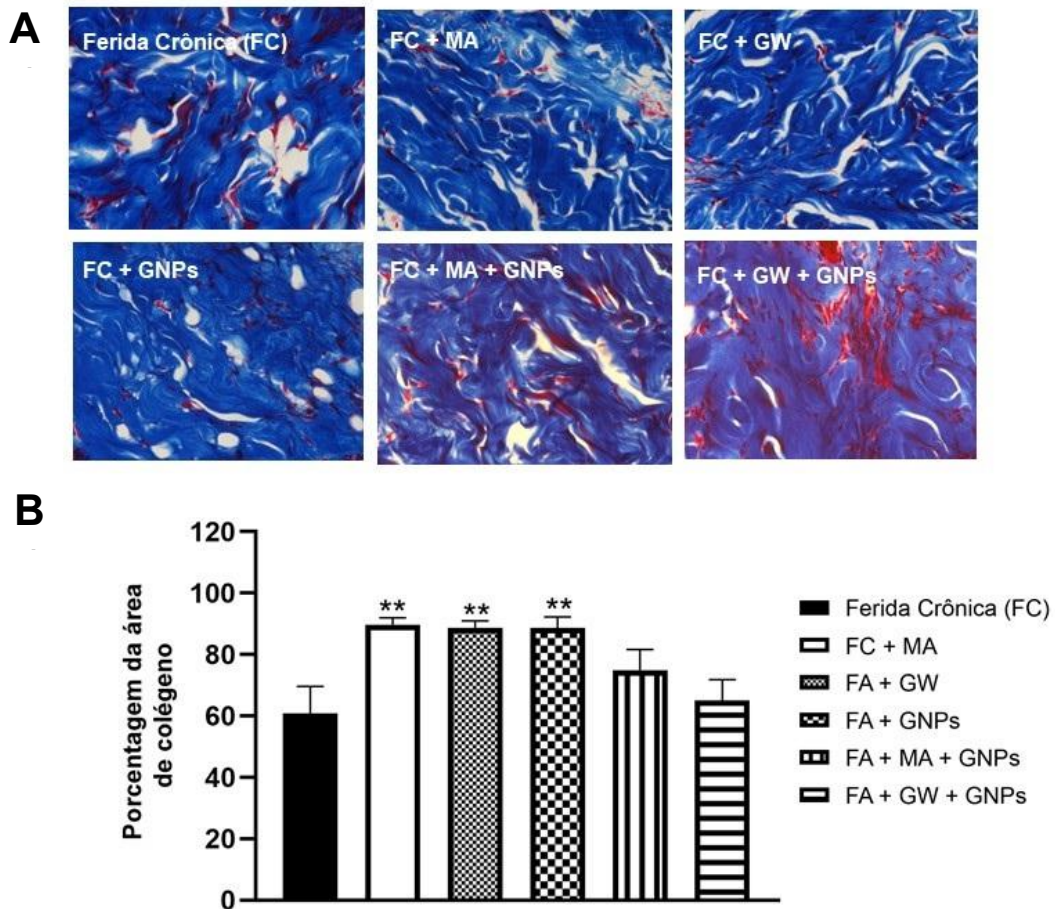
### 4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A figura 7 apresenta a análise histológica do infiltrado de células inflamatórias na ferida no 15º dia após a indução da ferida. Na figura 7A observam-se as imagens representativas dos cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina. Na figura 7B observa-se a quantificação do influxo das células inflamatórias através de contagem do número de células inflamatórias por campo, onde todos os grupos tratados apresentaram diminuição do influxo de células inflamatórias com diferença significativa ( $p < 0,01$ ), sobretudo os grupos com terapias combinadas (FC + MA + GNP e FC + GW + GNP) onde a diferença foi ainda maior ( $p < 0,001$ ), em relação ao grupo FC sem tratamento.



**Figura 7:** Efeitos do tratamento com MA, GW e GNPs sobre o influxo de células inflamatórias; A) imagens representativas dos cortes histológicos; B) quantificação do infiltrado inflamatório em nº de células/campo, no 15º dia após a indução da ferida. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*\* $p < 0,01$  v.s Grupo FC; \*\*\* $p < 0,001$  v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

A figura 8 apresenta a análise histológica da porcentagem de colágeno da ferida no 15º dias após a indução da ferida. Na figura 8A observam-se as imagens representativas do cortes histológicos corados com tricrômico de Gomori para visualização da deposição de colágeno. Na figura 8B observa-se a quantificação da porcentagem da área de colágeno, onde apenas os grupos com terapias isoladas (FC + MA; FC + GW e FC + GNPs) apresentaram aumento na deposição de colágeno no local da ferida com diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo FC sem tratamento.



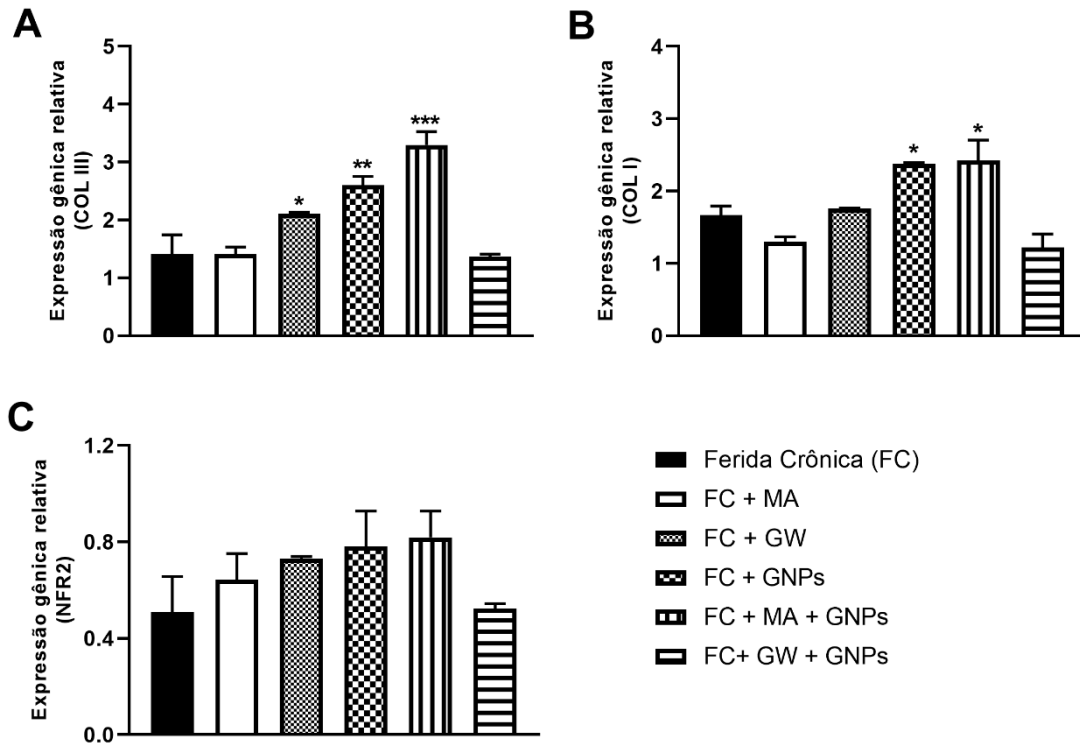
**Figura 8:** Efeitos do tratamento com MA, GW e GNPs sobre a porcentagem da área de colágeno; A) imagens representativas dos cortes histológicos; B) porcentagem da área de colágeno, no 15º dia após a indução da ferida. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*\* $p < 0,01$  v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

#### 4.3 ANÁLISE DE RT-PCR

A figura 9 apresenta a análise da expressão gênica dos marcadores COL III; COL I e NRF2 no 15º dia após a indução da ferida. Quando analisado o conteúdo de mRNA de COL III (figura 9A) os grupos FC + GW, FC + GNPs e FC + MA + GNPs apresentaram aumento na expressão de COL III, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ) respectivamente em relação ao grupo FC sem tratamento.

Na análise do conteúdo de mRNA de COL I (figura 9B) apenas os grupos FC + GNPs e FC + MA + GNPs apresentaram aumento na expressão de COL I, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo FC sem tratamento. Na análise

da expressão de NRF2 (figura 9C) nenhum grupo demonstrou diferença significativa em relação ao grupo FC.



**Figura 9:** Efeitos do tratamento com MA, GW E GNPs sobre parâmetros da expressão genica de COL III, COL I e NRF2 no 15º dia após a indução da ferida. (A) Conteúdo de mRNA de COL III; (B) Conteúdo de mRNA de COL I; (C) Conteúdo de mRNA de NRF2. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo FC; \*\* $p < 0,01$  v.s Grupo FC; \*\*\* $p < 0,001$  v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

#### 4.4 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

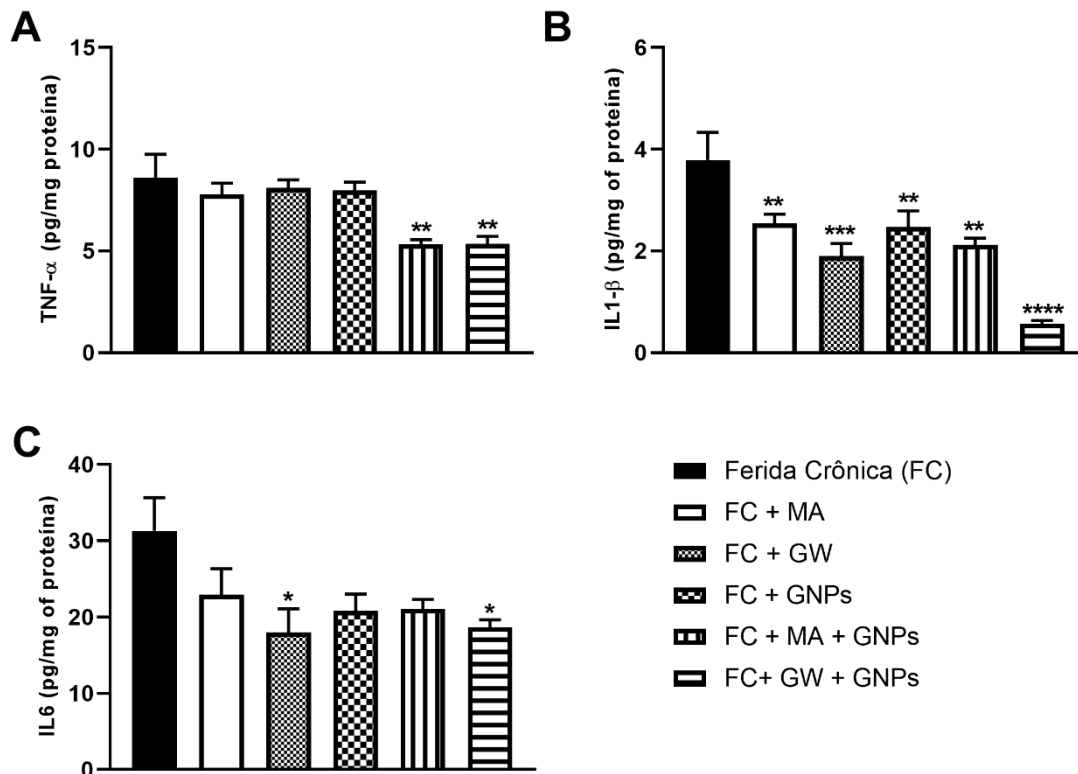
##### 3.13.1 Citocinas Pró-Inflamatórias

A figura 10 apresenta a análise dos níveis proteicos das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL6 no 15º dia após a indução da ferida. Na avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$  (figura 10A) somente os grupos com tratamentos combinados (FC + MA + GNPs e FC + GW + GNPs) apresentaram redução nos níveis com diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo FC sem tratamento.

Já na avaliação dos níveis de IL1- $\beta$  (figura 10B) todos os grupos tratados apresentaram redução com diferença significativa ( $p < 0,01$ ), sendo que os grupos FC

+ GW e FC + GW + GNPs a diferença foi ainda maior ( $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ ) respectivamente, em relação ao grupo FC sem tratamento.

Da mesma forma na avaliação dos níveis de IL6 (figura 10C) somente os grupos FC + GW e FC + GW + GNPs apresentaram redução com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo FC sem tratamento.



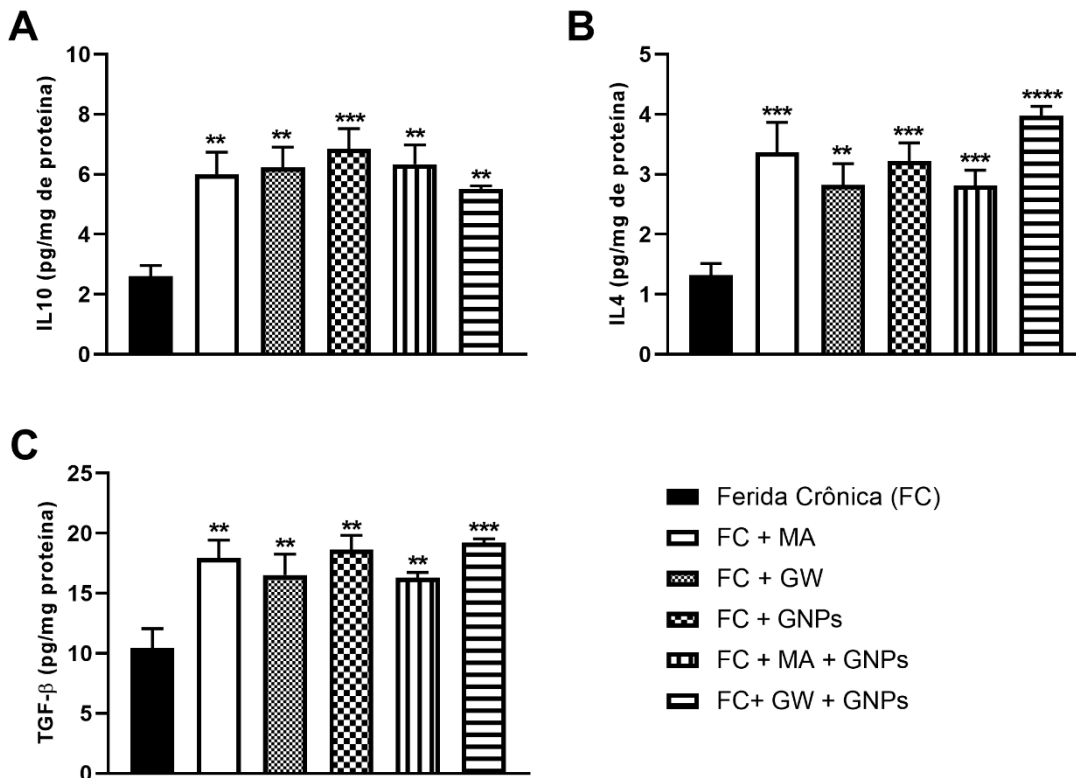
**Figura 10:** Efeitos do tratamento com MA, GW e GNPs sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL6 em pg/mg de proteína no 15º dia após a indução da ferida. (A) Níveis de TNF- $\alpha$ ; (B) Níveis de IL1- $\beta$ ; (C) Níveis de IL6. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo FC; \*\* $p < 0,01$  v.s Grupo FC; \*\*\* $p < 0,001$  v.s Grupo FC; \*\*\*\* $p < 0,0001$  v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

### 3.13.2 Citocinas Anti-Inflamatórias

A figura 11 apresenta a análise dos níveis proteicos das citocinas anti-inflamatórias IL10, IL4 e TGF- $\beta$  no 15º dia após a indução da ferida. Na avaliação dos níveis de IL10 (figura 11A) todos os grupos tratados apresentaram aumento com diferença significativa ( $p < 0,01$ ), sobretudo o grupo FC + GNPs que apresentou diferença ainda maior ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo FC sem tratamento.

Já na avaliação dos níveis de IL4 (figura 11B) todos os grupos tratados apresentaram aumento nos níveis com diferença significativa, sendo o grupo FC + GW ( $p < 0,01$ ), os grupos FC + MA, FA + GNPs e FC + MA + GNPs ( $p < 0,001$ ) e o grupo FC + GW + GNPs significância ainda maior ( $p < 0,0001$ ) em relação ao grupo FC sem tratamento.

Da mesma forma na avaliação dos níveis de TGF- $\beta$  (figura 11C) todos os grupos tratados apresentaram aumento nos níveis com diferença significativa ( $p < 0,01$ ), sendo que o grupo FC + GW + GNPs apresentou diferença ainda maior ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo FC sem tratamento.



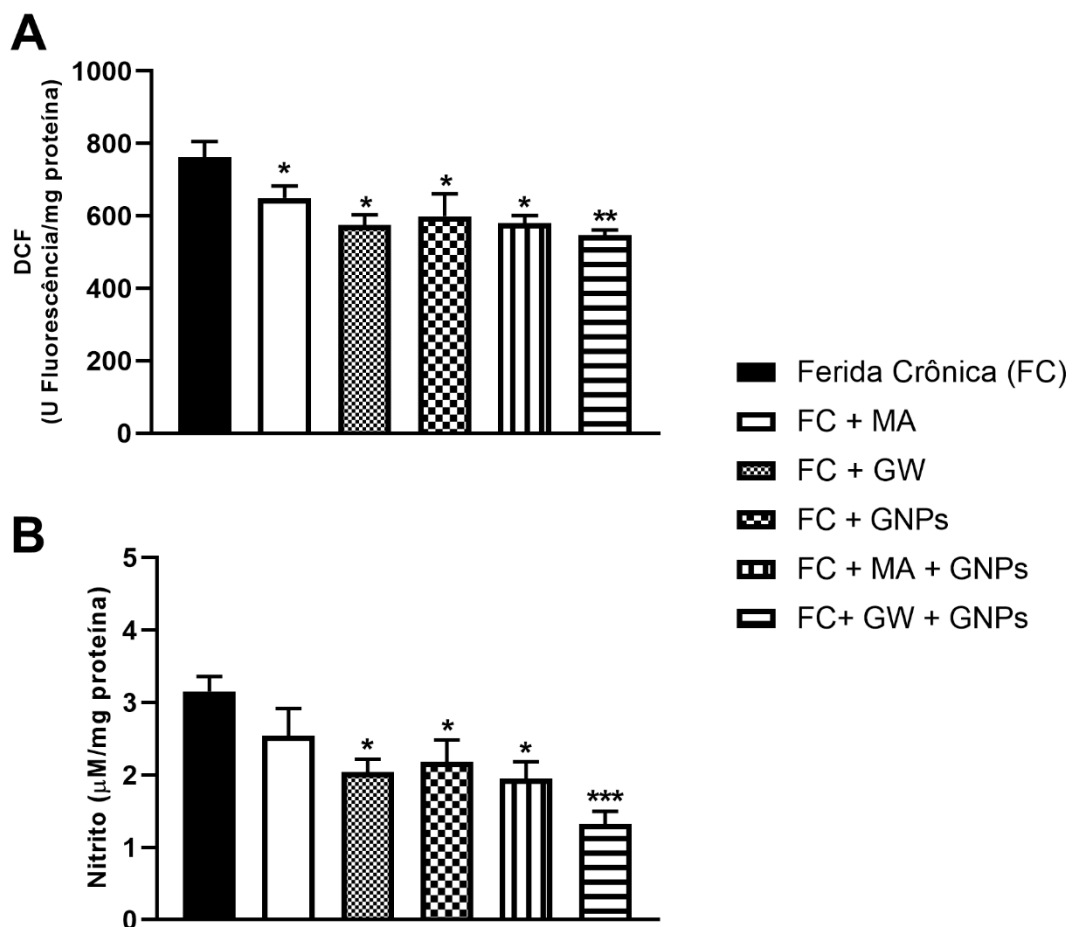
**Figura 11:** Efeitos do tratamento com MA, GW e GNPs sobre os níveis das citocinas anti-inflamatórias IL10, IL4 e TGF- $\beta$  em pg/mg de proteína no 15º dia após a indução da ferida. (A) Níveis de IL10; (B) Níveis de IL4; (C) Níveis de TGF- $\beta$ . Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \*\* $p < 0,01$  v.s Grupo FC; \*\*\* $p < 0,001$  v.s Grupo FC; \*\*\*\* $p < 0,0001$  v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

#### 4.5 PARÂMETROS OXIDATIVOS

A figura 12 apresenta a análise dos níveis de oxidantes DCF e Nitrito no 15º dia após a indução da ferida. Na análise dos níveis de DCF (figura 12A) todos os grupos

apresentaram redução com diferença significativa ( $p < 0,05$ ), sendo que o grupo FC + GW + GNPs apresentou significância ainda maior ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo FC sem tratamento.

Na análise dos níveis de Nitrito (figura 12B), os grupos FC + GW, FC + GNPs e FC + MA + GNPs apresentaram redução com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e o grupo de terapia combinada FC + GW + GNPs apresentou significância ainda maior ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo FC sem tratamento.

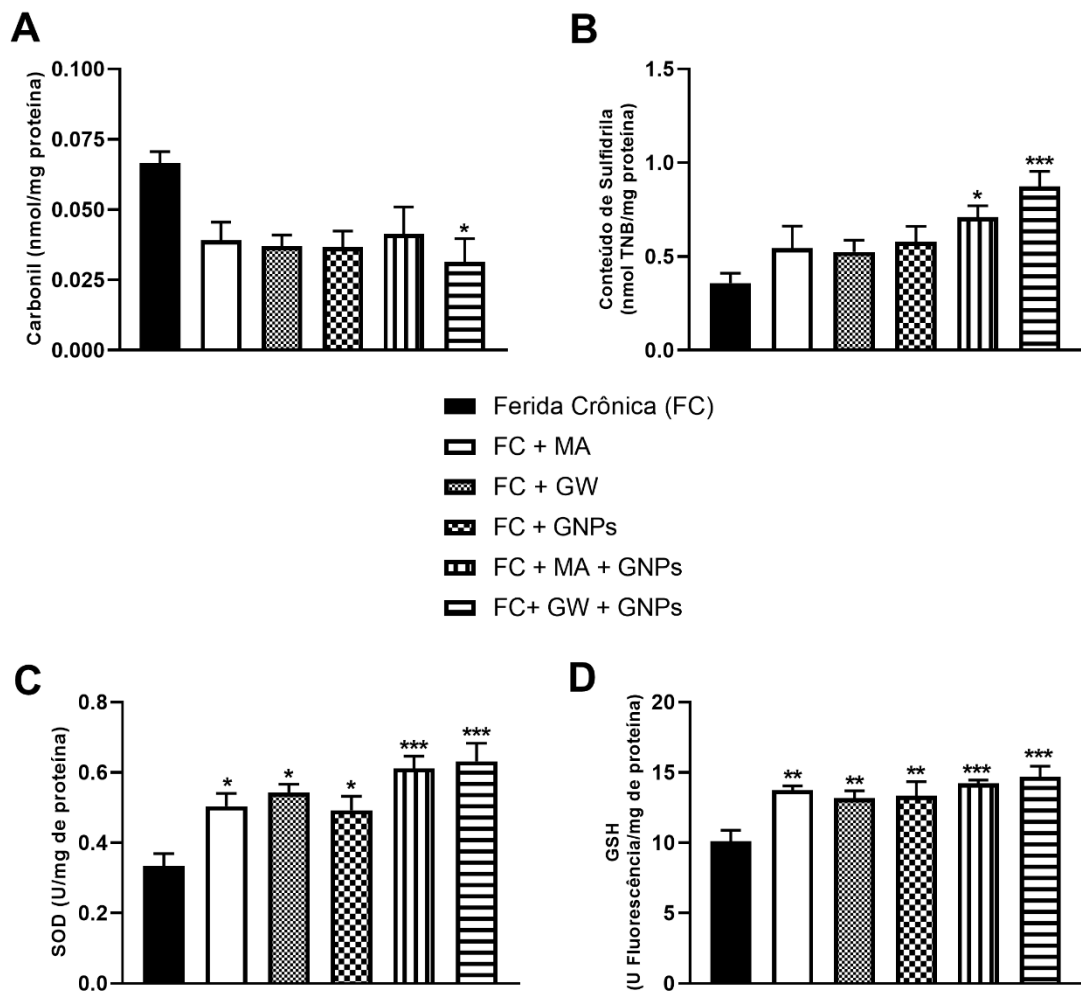


**Figura 12:** Efeitos do tratamento com MA, GW e GNPs sobre os níveis dos oxidantes DCF em UFluorescência/mg de proteína e Nitrito em µM/mg de proteína no 15º dia após a indução da ferida. (A) Níveis de DCF; (B) Níveis de Nitrito. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo FC; \*\* $p < 0,01$  v.s Grupo FC; \*\*\* $p < 0,001$  v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

A figura 13 apresenta a análise de dano oxidativo e dos sistemas antioxidantes no 15º dia após a indução da ferida. Na análise do dano oxidativo através do nível de Carbonil (figura 13A) somente o grupo FC + GW + GNPs apresentou diferença

significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo FC sem tratamento. Na análise do nível do Conteúdo de Sulfidrina (figura 13B), apenas os grupos com terapias combinadas (FC + MA + GNPs e FC + GW + GNPs) apresentaram aumento com diferenças significativas ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) em relação ao grupo FC sem tratamento.

Já nos parâmetros antioxidantes, na análise dos níveis de SOD (figura 13C) todos os grupos tratados apresentaram aumento nos níveis, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) sendo que os grupos com terapias combinadas (FC + MA + GNPs e FC + GW + GNPs) apresentaram significância ainda maior ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo FC sem tratamento. Do mesmo modo na análise dos níveis de GSH (figura 13D) todos os grupos apresentaram aumento nos níveis com diferença significativa ( $p < 0,01$ ) e os grupos com terapias combinadas (FC + MA + GNPs e FC + GW + GNPs) apresentaram significância ainda maior ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo FC sem tratamento.



**Figura 13:** Efeitos do tratamento com MA, GW e GNPs sobre os níveis de dano oxidativo e de antioxidantes no 15º dia após a indução da ferida. (A) Níveis de Carbonil em mmol/mg proteína; (B) Níveis de Conteúdo de Sulfidril em mmol TNB/mg proteína; (C) Níveis de SOD em U/mg proteína; (D) Níveis de GSH em U Fluorescência/mg proteína. Os dados são apresentados em média +EPM, no qual: \* $p < 0,05$  v.s Grupo FC; \*\* $p < 0,01$  v.s Grupo FC; \*\*\* $p < 0,001$  v.s Grupo FC; (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Newman-Keuls).

## 5 DISCUSSÃO

Feridas que não cicatrizam representam um problema de saúde pública cada vez mais urgente, tanto do ponto de vista econômico quanto social. Esse tipo de ferida é especialmente prevalente em pacientes com comorbidades, como por exemplo diabetes e distúrbios vasculares, que dificultam os processos naturais de reparo e cicatrização. Nessas condições, células imunes, como neutrófilos e macrófagos, secretam em excesso citocinas pró-inflamatórias, criando um microambiente altamente proteolítico que degrada componentes da matriz provisória e fatores de crescimento essenciais para o início do reparo tecidual. Esse ambiente leva à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, intensificando os danos celulares e na matriz extracelular, o que perpetua um ciclo vicioso inflamatório que impede a cicatrização (LANDÉN; LI; STÅHLE, 2016).

Frente a esses desafios, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da aplicação de membrana amniótica (MA) e geléia de Wharton (GW) descelularizadas, além de nanopartículas de ouro bio-sintetizadas com curcumina (GNPs), na cicatrização de feridas cutâneas crônicas em ratos Wistar. Avaliou-se também o impacto desses tratamentos na contração da ferida, inflamação, parâmetros oxidativos e características histológicas da região lesionada.

Diante disso nos resultados obtidos podemos observar que todos os grupos tratados (MA, GW, GNPs, MA + GNPs e GW + GNPs) tiveram uma maior contração da ferida quando relacionados ao grupo FC que não recebeu tratamento, Campelo e colaboradores e Davoodi e colaboradores demonstraram em seus estudos sobre o efeito da aplicação de membrana amniótica na cicatrização de feridas cutâneas em ratos, que a MA acelerou o processo de cicatrização e fechamento da ferida favorecendo o avanço da fase inflamatória para a fase proliferativa e de remodelação e concluíram que a taxa de fechamento das feridas foi significativamente aumentada em relação ao grupo controle (CAMPELO *et al.*, 2018; DAVOODI *et al.*, 2022).

Outro estudo publicado por Lu e colaboradores investigando o papel da Geléia de Wharton (GW) descelularizada na cicatrização de feridas concluiu que em 5 semanas após a aplicação a GW foi capaz de aumentar a contração da ferida em relação ao grupo controle e sem o aumento inicial da ferida como observado no grupo controle (LU *et al.*, 2023).

Thirupathi e colaboradores observaram também que as nanopartículas de ouro produziram um aumento na área de colágeno e nos níveis de TGF- $\beta$ , possivelmente mecanismo pelo qual aumentaram consideravelmente a taxa de contração da ferida em relação ao grupo controle, demonstrando assim o potencial das GNPs em auxiliar a contração da ferida (THIRUPATHI *et al.*, 2023).

Estes estudos corroboram com nossos resultados demonstrando que tanto os tratamentos isolados quanto combinados são eficazes, acreditamos que a MA e a GW atuam fornecendo ao leito da ferida um ambiente rico em colágeno, hialuronato, fibronectina e laminina entre outras moléculas servindo de “andaime”, do mesmo modo que as GNPs estimulam a produção de colágeno e a secreção de TGF- $\beta$  influenciando a migração, diferenciação e proliferação das células de reparo, como miofibroblastos responsáveis pela contração da ferida, aumentando significativamente a taxa de contração da ferida em relação ao grupo não tratado.

Para um processo de reparo tecidual adequado o envolvimento ordenado e controlado de células inflamatórias é fundamental, iniciando a resposta ao dano ou presença de patógenos, após o controle dos estímulos danosos é necessária a diferenciação de células inflamatórias para fenótipos anti-inflamatórios e reparadores, por fim com o alcance da homeostase essas células deixam o local da ferida ou sofrem apoptose (EMING; WYNN; MARTIN, 2017).

No tocante a análise histológica, a modulação proporcionada pela MA, GW e GNPs fornecendo o aumento de substratos da MEC e fatores de crescimento provavelmente está relacionada a considerável redução do recrutamento e influxo de células inflamatórias para o local da ferida que nossos resultados demonstraram, neste contexto, Takejima e colaboradores, demonstraram em um estudo utilizando MA descelularizada para tratar feridas cutâneas em ratos, que a MA foi capaz de minimizar o processo inflamatório e acelerar a cicatrização devido ao seu potencial anti-inflamatório (TAKEJIMA *et al.*, 2022).

Em consonância com nossos achados Dubus e colaboradores, publicaram estudo onde concluíram que a GW descelularizada, *in vitro*, foi capaz de promover a polarização de macrófagos indiferenciados M0 para o fenótipo anti-inflamatório M2, reduzindo assim o processo inflamatório, sugerindo que esse balanço positivo para o fenótipo M2 poderia ser atribuído à liberação de moléculas derivadas da matriz da GW

como colágeno I, colágeno III, colágeno VI, colágeno XII, fibronectina e glicosaminoglicanos (DUBUS *et al.*, 2022).

No tocante as GNPs, Casagrande e colaboradores em estudo dos efeitos de GNPs bio-sintetizadas com curcumina em modelo de inflamação pulmonar induzido por LPS, demonstraram que as GNPs foram eficazes em reduzir significativamente a interação de leucócitos com o endotélio vascular, através da redução da expressão de moléculas de adesão, diminuindo o infiltrado destas células, corroborando com nossos achados, onde as associações de MA + GNPs e GW + GNPs apresentaram efeito sinérgico, sendo ainda mais eficientes em reduzir o infiltrado de células inflamatórias no local da lesão (CASAGRANDE *et al.*, 2023).

O colágeno fibrilar é abundante na pele e essencial para a formação da matriz extracelular proporcionando um andaime favorável a migração proliferação e reparo tecidual, há uma modulação variável no tipos, concentração e organização do colágeno durante a cicatrização, que vão influenciar tanto a atividade inflamatória quanto, em níveis adequados, viabilizam a finalização do processo e conferem resistência mecânica à cicatriz (GARDEAZABAL; IZETA, 2024).

Deste modo, ao analisarmos o a porcentagem da área de colágeno, observou-se que os grupos tratados com MA, GW e GNPs isoladamente tiveram um aumento significativo em relação ao grupo controle, dados estes que sustentam os resultados encontrados por Corrêa e colaboradores que evidenciaram um aumento significativo na compactação de fibras de colágeno em ratos com ferida cutânea tratados com MA descelularizada em relação ao grupo controle (CORRÊA *et al.*, 2022).

Segundo Beiki e colaboradores a GW é um tecido rico em colágeno, sobretudo o tipo I, representando maior parte das proteínas da matriz, desta forma é um perfeito candidato para reconstrução de tecidos a base de colágeno como a pele, cartilagens e ossos, em seu estudo com ferida de espessura total em camundongos, observaram que os camundongos tratados com GW tiveram um desenvolvimento da cicatrização sem exsudato ou crosta, devido a absorção promovida pela GW, a ferida se contraiu mais rapidamente e o aspecto final da cicatriz no grupo tratado foi melhor sendo que o grupo controle apresentava uma cicatriz mais esticada e disforme, histologicamente no 18º dia após a indução da ferida a reepitelização já estava completa porém no grupo tratado com GW foi observado um tecido dérmico bem desenvolvido com fibras

colágenas bem organizadas e vasos sanguíneos presentes na hipoderme, enquanto que o grupo controle estava com reepitelização parcial, com poucos fios de colágeno frouxos e finos e com presença de hiperproliferação capilar com células inflamatórias, demonstrando que a inflamação persistia (BEIKI; ZEYNALI; SEYEDJAFARI, 2017).

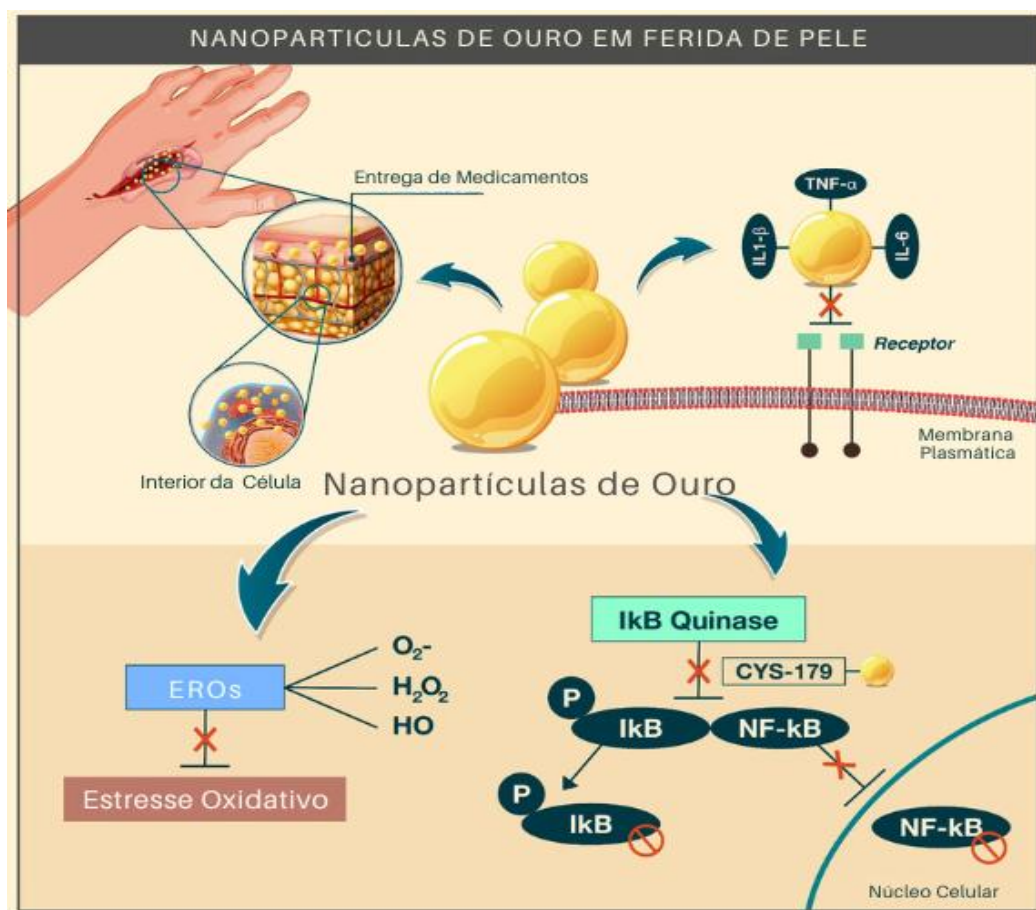
Conforme citado anteriormente as GNPs também demonstram potencial para aumentar a deposição de colágeno na ferida conforme evidenciado por Thirupathi e colaboradores e reforçado por estudos posteriores como de Salama e colaboradores no tratamento tópico com GNPs com curcumina em feridas em ratos diabéticos, onde também se verificou o aumento da deposição de colágeno da ferida (THIRUPATHI *et al.*, 2023; SALAMA *et al.*, 2024).

Muito provavelmente este efeito da MA, GW e GNPs sobre o aumento da porcentagem de colágeno está relacionado à estimulação induzida por TGF- $\beta$  sobre os fibroblastos a fim de aumentarem a produção de colágeno viabilizando a formação do tecido de granulação e posteriormente do novo tecido cicatricial.

A inflamação é crucial ao processo de reparo uma vez que garante a limpeza de restos celulares, toxinas e patógenos que podem estar presentes local da ferida, devendo ser controlada e efetiva no preparo do local para as próximas fases da cicatrização, a infiltração de leucócitos para o sítio da ferida se dá por meio de sinalização das plaquetas presentes no coágulo e células adjacentes que secretam TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, quando no local da ferida estes leucócitos tendem a potencializar ainda mais a secreção destes mediadores inflamatórios até a finalização do estímulo nocivo (agente mecânico, toxinas ou patógenos) (RAZIYEVA *et al.*, 2021).

Ao analisamos os níveis de citocinas pró-inflamatórias em nosso estudo, observamos que houve uma diminuição significativa de TNF- $\alpha$  nos dois grupos tratados com terapias combinadas MA + GNPs e GW + GNPs, e de IL-1 $\beta$  em todos os grupos tratados com ênfase nos dois grupos com GW (GW e GW + GNPs) onde a redução foi ainda mais acentuada em relação ao grupo controle. Estes dados corroboram com a literatura onde, Nasiry e colaboradores demonstraram que a MA descelularizada foi capaz de diminuir a expressão gênica de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no grupo tratado em relação ao controle em um modelo experimental de rato diabético (NASIRY *et al.*, 2023).

Dos Santos Haupenthal e colaboradores ao observarem os efeitos das nanopartículas de ouro de 20nm (AuNPs) em modelo experimental de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS em roedores, onde concluíram que as AuNPs foram capazes de diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias incluindo IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, assim sendo, sugeriram que o mecanismo pela qual alcançaram este resultado foi através da inibição da via inflamatória NF- $\kappa$ B, ligando-se ao componente Cys-179 consequentemente impedindo a fosforilação da subunidade IKK- $\beta$ , impossibilitando a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo, reduzindo a produção das citocinas pró-inflamatórias, além de as AuNPs ligarem-se às citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 livres impedindo sua interação com o receptor, corroborando com dados de estudos posteriores conforme demonstrado na Figura 14 (DOS SANTOS HAUPENTHAL *et al.*, 2020; PINHO *et al.*, 2022)



**Figura 14:** Efeitos das nanopartículas de ouro na ferida de pele. As AuNPs promovem efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes e interagem com diferentes moléculas, que reduzem sinergicamente o estresse oxidativo. A entrada de AuNPs no ambiente celular inibe as citocinas pró-inflamatórias livres, e as interações com CYS-179 de IKK-B e subsequente inibição da via NF- $\kappa$ B e da amplificação da resposta inflamatória, impactando na regulação do estresse oxidativo. Fonte: Adaptado de PINHO *et al.*, 2022.

Por outro lado, após controle do estímulo nocivo, Macrófagos começam a diferenciar-se no fenótipo M2 reparador, secretando fatores de crescimento e citocinas anti-inflamatórias (TGF- $\beta$ , IL-10 e IL4), que vão estimular a proliferação de fibroblastos a angiogênese e a produção de MEC, além de fagocitarem neutrófilos, patógenos e restos celulares a fim de evitar mais danos no local da ferida, esta diferenciação de macrófagos M1 para M2 é um ponto crucial da cessação da inflamação e avanço do reparo tecidual (SORG *et al.*, 2017).

Levando em consideração os níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 e do fator de crescimento TGF- $\beta$ , em nossos resultados todos os grupos demonstraram diferença significativa no aumento destes marcadores de forma muito acentuada, indo de encontro aos estudos que indicam que a MA, GW e as GNPs desempenham um papel anti-inflamatório importante, regulando a secreção de mediadores e a atividade celular, como já vimos anteriormente favorecendo o fenótipo M2 de macrófagos e modulando a resposta inflamatória e o avanço do processo de cicatrização para a fase proliferativa (SORG *et al.*, 2017; NASIRY *et al.*, 2023; CASAGRANDE *et al.*, 2023; TAKEJIMA *et al.*, 2022).

Concernente à essa regulação do processo inflamatório, no tocante aos parâmetros oxidativos, nossos achados indicaram que todos os grupos tratados tiveram uma redução significativa nos níveis de DCF, e todos os grupos exceto o MA tiveram redução significativa nos níveis de Nitrito, o que denota a diminuição das espécies reativas e oxigênio e nitrogênio na ferida, corroborando com dados obtidos por Lockington e colaboradores que demonstraram haver captação de ROS pela MA de forma significativa, enquanto que Gupta e colaboradores, demonstraram que a GW descelularizada é rica em citocinas anti-inflamatórias além de antagonistas de receptores como IL-1RA que se liga competitivamente nos receptores de IL-1 bloqueando sua atividade, esta regulação negativa da inflamação diminui a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na ferida (LOCKINGTON *et al.*, 2014; GUPTA *et al.*, 2020).

Ao avaliarmos os níveis de Carbonil, somente o grupo GW + GNPs obteve diferença significativa em relação ao grupo controle, na análise do Conteúdo de Sulfidril, os dois grupos com tratamentos combinados MA + GNPs e GW + GNPs tiveram diferença significativa em relação ao grupo controle. O estresse oxidativo é decorrente do desbalanço entre espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e o sistema

antioxidante, nesse contexto, corroborando com nossos dados, Kumawat e colaboradores demonstraram *in vitro* que as nanopartículas de ouro bio-sintetizadas com curcumina (Cur-GNPs) exibem forte atividade antioxidante, destacando sua natureza intrínseca de mimetização da enzima peroxidase (GPx) em ensaio ATBS utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de compostos, demonstraram que essa atividade por parte das Cur-GNPs ocorre por uma função “scavenging” (catando/captando) radicais livres de modo concentração-dependente, ou seja em maiores concentrações o efeito antioxidante foi ainda melhor (KUMAWAT *et al.*, 2022).

A atuação do sistema antioxidante no processo de cicatrização é fundamental uma vez que uma ferida é um ambiente necessariamente suscetível ao aumento de espécies reativas de oxigênio, que são vitais ao processo inflamatório, porém o equilíbrio entre os níveis de ROS e sistema antioxidante é necessário, sem o qual uma superprodução de ROS poderia aumentar ainda mais o dano celular e tecidual no local da ferida e retardar ou impedir a cicatrização (DENG *et al.*, 2021).

Ao avaliarmos o sistema antioxidante, observamos um aumento significativo nos níveis da SOD e GSH em todos os grupos tratados em relação ao grupo controle, e, notadamente acentuado nos grupos com tratamentos combinados MA + GNPs e GW + GNPs, demonstrando um efeito antioxidante sinérgico dos compostos ainda melhor com as GNPs que possuem alto poder redutor. A capacidade antioxidante da MA foi comprovada por Lockington e seus colaboradores que evidenciaram sua capacidade de eliminar radicais livres, sendo que este efeito já havia sido demonstrado no líquido amniótico por Burlingame e colaboradores, que ainda concluíram que há um aumento na atividade antioxidante com o avanço da idade gestacional (LOCKINGTON *et al.*, 2014; BURLINGAME *et al.*, 2003).

O aumento da atividade dos sistemas antioxidantes pode estar relacionado à liberação no local da ferida de citocinas inflamatórias, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 que ativam as vias NF- $\kappa$ B e MAPK, promovendo a transcrição de genes antioxidantes dentre eles os de expressão de SOD e GSH, atuando na regulação do balanço oxidativo, tornando o microambiente da ferida favorável ao reparo tecidual.

Diante do exposto, este estudo serve de base e novos estudos são necessários para melhor evidenciar alguns mecanismos ainda pouco esclarecidos com relação as atividades anti-inflamatória, antioxidante e cicatrizante da membrana amniótica e

geléia de Wharton descelularizadas e das nanopartículas de ouro biossintetizadas com curcumina, e suas aplicações em diferentes tecidos e modelos experimentais.

## 6 CONCLUSÃO

Concluimos através dos achados deste estudo que tanto as terapias com membrana amniótica e geléia de Wharton descelularizadas e nanopartículas de ouro bio-síntetizadas com curcumina isoladas quanto combinadas apresentam um significativo potencial terapêutico para o tratamento de feridas crônicas, contribuindo de maneira relevante para a aceleração e a qualidade do processo de cicatrização, atenuando a inflamação, reduzindo o recrutamento de leucócitos e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, possivelmente favorecendo a diferenciação de macrófagos para o fenótipo M2, aumentando a secreção de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento e diferenciação de células, atuando também na diminuição do estresse oxidativo na ferida, promovendo a produção de colágeno e componentes da MEC essenciais para o reparo completo da ferida.

Esses resultados não apenas reforçam a viabilidade desses materiais como opções inovadoras no manejo de feridas, mas também abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de novos materiais biocompatíveis e novas abordagens terapêuticas mais eficazes e acessíveis, direcionados à recuperação rápida e completa de lesões de pele, sobretudo daquelas de difícil manejo e cicatrização.

## REFERÊNCIAS

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience letters**, v. 302, n. 2–3, p. 141–145, 2001.

BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods of biochemical analysis**, v. 32, p. 279–312, 1987.

BEIKI, B.; ZEYNALI, B.; SEYEDJAFARI, E. Fabrication of a three dimensional spongy scaffold using human Wharton's jelly derived extra cellular matrix for wound healing. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 78, p. 627–638, 2017.

BENATTI JUSTINO, A. et al. Curcumin-functionalized gold nanoparticles attenuate AAPH-induced acute cardiotoxicity via reduction of lipid peroxidation and modulation of antioxidant parameters in a chicken embryo model. **International journal of pharmaceutics**, v. 646, n. 123486, p. 123486, 2023.

BROUGHTON, G., 2nd; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 117, n. 7 Suppl, p. 1e-S-32e-S, 2006.

BURLINGAME, J. M. et al. Total antioxidant capacity and reactive oxygen species in amniotic fluid. **Obstetrics and gynecology**, v. 101, n. 4, p. 756–761, 2003.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of molecular endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 23–39, 2002.

CAI, F. et al. Green synthesis of gold nanoparticles for immune response regulation: Mechanisms, applications, and perspectives. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 110, n. 2, p. 424–442, 2022.

CAMPELO, M. B. D. et al. Effects of the application of the amniotic membrane in the healing process of skin wounds in rats. **Acta cirurgica brasileira**, v. 33, n. 2, p. 144–155, 2018.

CAN, A.; KARAHUSEYINOGLU, S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 25, n. 11, p. 2886–2895, 2007.

CARTER, M. J. et al. Chronic wound prevalence and the associated cost of treatment in Medicare beneficiaries: changes between 2014 and 2019. **Journal of medical economics**, v. 26, n. 1, p. 894–901, 2023.

CASAGRANDE, L. DE R. et al. Green synthesis of gold nanoparticles modulates lipopolysaccharide-induced lung inflammation in Wistar rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 132, n. 6, p. 473–485, 2023.

CHAE, S. Y. et al. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. **Biomaterials**, v. 25, n. 5, p. 843–850, 2004.

CHOPRA, H. et al. Green metallic nanoparticles: Biosynthesis to applications. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 10, p. 874742, 2022.

CORRÊA, M. E. A. B. et al. Effects of the application of decellularized amniotic membrane solubilized with hyaluronic acid on wound healing. **Annals of biomedical engineering**, v. 50, n. 12, p. 1895–1910, 2022.

DARBY, I. A.; WELLER, C. D. Aspirin treatment for chronic wounds: Potential beneficial and inhibitory effects. **Wound repair and regeneration**, v. 25, n. 1, p. 7–12, 2017.

DAVIES, J. E.; WALKER, J. T.; KEATING, A. Concise review: Wharton's jelly: The rich, but enigmatic, source of mesenchymal stromal cells. **Stem cells translational medicine**, v. 6, n. 7, p. 1620–1630, 2017.

DAVOODI, S. et al. Decellularized human amniotic membrane engraftment in combination with adipose-derived stem cells transplantation, synergistically improved diabetic wound healing. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 21, n. 12, p. 6939–6950, 2022.

DENG, L. et al. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic wound healing. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2021, n. 1, p. 8852759, 2021.

DOS SANTOS HAUPENTHAL, D. P. et al. Effects of treatment with gold nanoparticles in a model of acute pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 108, n. 1, p. 103–115, 2020.

DUBUS, M. et al. Antibacterial and immunomodulatory properties of acellular Wharton's jelly matrix. **Biomedicines**, v. 10, n. 2, p. 227, 2022.

ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. **Talanta**, v. 184, p. 537–556, 2018.

ELIZABETH, M. K. et al. Synthesis of Phyto based metal nanoparticles: A green approach. **Journal of pharmaceutical research international**, p. 20–32, 2022.

EMAMI MOGHADDAM, S. A.; GHADAM, P.; RAHIMZADEH, F. Biosynthesis of cadmium sulfide nanoparticles using aqueous extract of *Lactobacillus acidophilus* along with its improvement by response surface methodology. **Journal of cleaner production**, v. 356, n. 131848, p. 131848, 2022.

EMING, S. A.; WYNN, T. A.; MARTIN, P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. **Science (New York, N.Y.)**, v. 356, n. 6342, p. 1026–1030, 2017.

FAYON, A. et al. Characterization of an innovative biomaterial derived from human Wharton's jelly as a new promising coating for tissue engineering applications. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 10, p. 884069, 2022.

FERREIRA, M. C. et al. Complex wounds. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 61, n. 6, p. 571–578, 2006.

FRANCISCO, J. C. et al. Decellularized amniotic membrane scaffold as a pericardial substitute: An in vivo study. **Transplantation proceedings**, v. 48, n. 8, p. 2845–2849, 2016.

FULORIA, S. et al. A comprehensive review on the therapeutic potential of *Curcuma longa* Linn. In relation to its major active constituent curcumin. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, p. 820806, 2022.

GARDEAZABAL, L.; IZETA, A. Elastin and collagen fibers in cutaneous wound healing. **Experimental dermatology**, v. 33, n. 3, p. e15052, 2024.

GUPTA, A. et al. Umbilical cord-derived Wharton's jelly for regenerative medicine applications. **Journal of orthopedic surgery and research**, v. 15, n. 1, p. 49, 2020.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 214–226, 1976.

HOLZER-GEISSLER, J. C. J. et al. The impact of prolonged inflammation on wound healing. **Biomedicines**, v. 10, n. 4, p. 856, 2022.

HOPPER, R. A.; WOODHOUSE, K.; SEMPLE, J. L. Acellularization of human placenta with preservation of the basement membrane: a potential matrix for tissue engineering: A potential matrix for tissue engineering. **Annals of plastic surgery**, v. 51, n. 6, p. 598–602, 2003.

JADALANNAGARI, S. et al. Decellularized Wharton's Jelly from human umbilical cord as a novel 3D scaffolding material for tissue engineering applications. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0172098, 2017.

JHA, C. B. et al. Synthesis and evaluation of curcumin reduced and capped gold nanoparticles as a green diagnostic probe with therapeutic potential. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 241, n. 114050, p. 114050, 2024.

KARUNAKARAN, G. et al. Biosynthesis of nanoparticles from various biological sources and its biomedical applications. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 11, 2023.

KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK, M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and physiology of the skin. **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, v. 3, n. 4, p. 203–213, 2011.

KUMAWAT, M. et al. Surface engineered peroxidase-mimicking gold nanoparticles to subside cell inflammation. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 38, n. 5, p. 1877–1887, 2022.

LANDÉN, N. X.; LI, D.; STÄHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 73, n. 20, p. 3861–3885, 2016.

LEI, J. et al. Identification of extracellular matrix components and biological factors in micronized dehydrated human amnion/chorion membrane. **Advances in wound care**, v. 6, n. 2, p. 43–53, 2017.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 464–478, 1990.

LOCKINGTON, D. et al. Antioxidant properties of amniotic membrane: novel observations from a pilot study. **Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie**, v. 49, n. 5, p. 426–430, 2014.

LU, J.-H. et al. A novel dressing composed of adipose stem cells and decellularized Wharton's jelly facilitated wound healing and relieved lymphedema by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis in a rat model. **Journal of functional biomaterials**, v. 14, n. 2, 2023.

MAYNARD, R. L. Nanotechnology and nano-toxicology. **Emerging health threats journal**, v. 5, n. 1, p. 17508, 2012.

MENDES, C. et al. Microcurrent and gold nanoparticles combined with hyaluronic acid accelerates wound healing. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 11, p. 2257, 2022.

MILAN, P. B. et al. Decellularized human amniotic membrane: From animal models to clinical trials. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 171, p. 11–19, 2020.

MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 2, p. 346–356, 2013.

NAJAH-MISSAOUI, W.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Safe nanoparticles: Are we there yet? **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 1, p. 385, 2020.

NASIRY, D. et al. Accelerated wound healing using three-dimensional amniotic membrane scaffold in combination with adipose-derived stem cells in a diabetic rat model. **Tissue & cell**, v. 82, n. 102098, p. 102098, 2023.

NGUYEN, H. M. et al. Biomedical materials for wound dressing: recent advances and applications. **RSC advances**, v. 13, n. 8, p. 5509–5528, 2023.

NI, C. et al. Gold nanoparticles modulate the crosstalk between macrophages and periodontal ligament cells for periodontitis treatment. **Biomaterials**, v. 206, p. 115–132, 2019.

NOGUEIRA CORTEZ, D. et al. Costs of treating skin lesions in Primary Health Care. **ESTIMA, Brazilian Journal of Enterostomal Therapy**, 2020.

NUSSBAUM, S. R. et al. An economic evaluation of the impact, cost, and Medicare policy implications of chronic nonhealing wounds. **Value in health: the journal of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research**, v. 21, n. 1, p. 27–32, 2018.

PATTNAIK, S.; THALLURI, C.; SWAIN, K. Rise of gold nanoparticles as carriers of therapeutic agents. **Acta chimica slovenica**, v. 70, n. 4, p. 467–478, 2023.

PINHO, R. A. et al. Gold nanoparticle-based therapy for muscle inflammation and oxidative stress. **Journal of inflammation research**, v. 15, p. 3219–3234, 2022.

RAZIYEVA, K. et al. Immunology of acute and chronic wound healing. **Biomolecules**, v. 11, n. 5, p. 700, 2021.

SALAMA, A. et al. Curcumin-loaded gold nanoparticles with enhanced antibacterial efficacy and wound healing properties in diabetic rats. **International journal of pharmaceuticals**, v. 666, n. 124761, p. 124761, 2024.

SALEHI, B. et al. Plant-derived bioactives in oral mucosal lesions: A key emphasis to curcumin, lycopene, chamomile, Aloe vera, green tea and coffee properties. **Biomolecules**, v. 9, n. 3, p. 106, 2019.

SAWVELL, E. et al. Perinatal tissue-derived allografts and stromal cells for the treatment of knee osteoarthritis: A review of preclinical and clinical evidence. **Cartilage**, v. 13, n. 4, p. 184–199, 2022.

SINGH, M. et al. Silver nanoparticles and its mechanistic insight for chronic wound healing: Review on recent progress. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 17, p. 5587, 2022.

SORG, H. et al. Skin wound healing: An update on the current knowledge and concepts. **European surgical research**, v. 58, n. 1–2, p. 81–94, 2017.

SORG, H.; SORG, C. G. G. Skin wound healing: Of players, patterns, and processes. **European surgical research**, v. 64, n. 2, p. 141–157, 2023.

TAKEJIMA, A. L. et al. Role of mononuclear stem cells and decellularized amniotic membrane in the treatment of skin wounds in rats. **Tissue barriers**, v. 10, n. 2, p. 1982364, 2022.

THIRUPATHI, A. et al. Green synthesis of gold nanoparticles with Curcumin or Açai in the tissue repair of palatal wounds. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 8, 2023.

VIANA DE SOUSA, M. B. et al. Assistência de enfermagem no cuidado de feridas na atenção primária em saúde: revisão integrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 48, p. e3303, 2020.

WETZELL, B. et al. Characterization of a full-thickness decellularized and lyophilized human placental membrane for clinical applications. **International wound journal**, v. 21, n. 5, p. e14888, 2024.

WILKINSON, H. N.; HARDMAN, M. J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. **Open biology**, v. 10, n. 9, p. 200223, 2020.

YAZDANIAN, M. et al. The potential application of green-synthesized metal nanoparticles in dentistry: A comprehensive review. **Bioinorganic chemistry and applications**, v. 2022, n. 1, p. 2311910, 2022.

## ANEXO A



Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **23/05/2023**.

<b>Título do projeto</b>	Comparação entre os efeitos da geleia de Wharton descelularizada, a membrana amniótica descelularizada e a nanopartícula de ouro reduzida com Croton lechieri na cicatrização de feridas crônicas
<b>Project title</b>	Comparison between the effects of decellularized Wharton jelly, decellularized amniotic membrane and Croton lechieri reduced gold nanoparticle on chronic wound healing
<b>Número do protocolo Protocol number</b>	82/2022
<b>Pesquisador principal Principal Investigator</b>	Paulo Cesar Lock Silveira
<b>Pesquisadores Researchers</b>	Maria Eduarda Anastácio Borges Corrêa, Laura de Roch Casagrande, Gustavo de Bem Silveira, Carolini Mendes, João Vitor Silvano Bittencourt, Ligia Milanez Venturini, Igor Ramos Lima, Gabrielli Martins, Camila da Costa, Lucas de Oliveira Pacagnan e Alice Machado Clemencia.
<b>Finalidade</b>	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	01/03/2023 a 01/02/2024
<b>Espécie/linhagem/raça</b>	Rato heterogênico/ Wistar
<b>Idade/Peso</b>	60 dias / 250-300 g
<b>Número de animais</b>	Masculino 72
<b>Procedência</b>	Biotério Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma-SC, 23 de maio de 2023

*Josiane Budni*  
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA