Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Ricardo José de Mendonça

*Caracterização biológica de uma fração
angiogênica do látex natural da seringueira
Hevea brasiliensis*

Dissertação apresentada ao Departamento de
Bioquímica e Imunologia da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Coutinho-Netto

Ribeirão Preto - SP
-2004-

Ricardo José de Mendonça

*Caracterização biológica de uma fração
angiogênica do látex natural da seringueira
Hevea brasiliensis*

DEDALUS - Acervo - FMRP

11200029066

5442

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Coutinho-Netto

Ribeirão Preto - SP
-2004-

20/4/04

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Capa: "The anatomy of the man: the cardiovascular system" de Leonardo da Vinci

FICHA CATALOGRÁFICA

MENDONÇA, Ricardo José de

Caracterização biológica de uma fração angiogênica do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. / Ricardo José de Mendonça; orientador Joaquim Coutinho-Netto. - Ribeirão Preto, 2004.

85 fl.: 30 cm.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Bioquímica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. *Hevea brasiliensis*; 2. Látex; 3. Angiogênese;
4. Permeabilidade Vascular; 5. Purificação de proteínas.

RICARDO JOSÉ DE MENDONÇA

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE UMA FRAÇÃO ANGIOGÊNICA DO
LÁTEX NATURAL DA SERINGUEIRA *HEVEA BRASILIENSIS***

Dissertação apresentada ao Departamento de
Bioquímica e Imunologia da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica.

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. Joaquim Coutinho-Netto
FMRP/USP

Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade
HCFMRP/USP

Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues
FMRP/USP

**À Deus,
pela luz que continua a iluminar-me.**

**Ao meu saudoso pai, Beneval José de Mendonça,
pelo que me ensinou e por tudo o que me ofereceu.
Minha mãe, Iracema Maria de Mendonça e
meus irmãos: Ronaldo e Andréia, Rosilene, Rosaine, Rosângela e Rosemeire,
pelo constante apoio e amor que continuam a me oferecer.**

**Aos meus sobrinhos: Laisla, Luis Otávio,
Maria Luíza e Maria Tereza, que nos trouxeram
a alegria e a inocência dos pequeninos.**

**Ao meu filho João Pedro, que ainda não nasceu,
mas já me preenche de ótimas expectativas
e já faz parte deste capítulo da minha história,**

Dedico este trabalho.

"Não preciso me drogar para ser um gênio; Não preciso ser um gênio para ser humano; Mas preciso do seu sorriso para ser feliz."

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Joaquim Coutinho-Netto,
por confiar e acreditar na minha capacidade, neste trabalho. Pela amizade, respeito e ensinamentos, a mim oferecidos.

À minha família,
pelo amor, confiança e apoio incondicionais.

À eterna Escola de Farmácia de Ouro Preto,
onde tudo começou.

Aos meus grandes amigos de Ouro Preto (Bozo, Foca, Dalua e à Fê),
que sempre me incentivaram nesta nova empreitada.

Aos meus co-orientadores não oficiais, Rene e Ruithier,
pelo companherismo, amizade, ensinamentos e principalmente, pelas horas e horas de alegrias que passamos..

À Andréa e Vanessa,
pela amizade, auxílio constante e pela troca de experiências.

À minha única, e mais querida, colega de entrada na pós: Amanda Bavieira,
a mardita, minha eterna dupla... pela amizade, apoio e pelos seminários apresentados juntos.

Aos amigos da pós ("degradação"), em especial, Rodrigo, Carlos, Gy, Laura, Olavo, aos metabolotrópicos e amigos da farmacologia e fisiologia;
pela grande amizade e consideração.

Ao Prof. Dr. Eduardo B. Oliveira,
por ter demonstrado interesse em ensinar; simples, mas que muitos se mostram incapazes, e por se mostrar determinado no objetivo de conseguir-me uma bolsa.

Ao Prof. Dr. João Kajiwara,
por muito me auxiliar no processamento e análise das imagens no meu trabalho.

Aos Prof.(s) Dr.(s) José R. Giglio, José E. S. Roselino, Bernardo Mantovani, Antônio Rossi, Itamar Vulgman, Renato Migliorini, Isis C. Kettelhut, Wilson R. N. Lodi, Vanderlei Rodrigues, Carlos J. Laure e Fernando L. de Lucca,

pela convivência, pelas dicas, pelos ensinamentos, além do empréstimo de aparelhos e reagentes.

À Vera L. Epifânio, Sílvia H. Epifânio e Lúcia H. S.,

pela assistência técnica, pela amizade e pelas alegrias e tristezas compartilhadas no laboratório.

Aos grandes amigos Beto e Odete,

que muito me auxiliaram, principalmente nas eletroforeses, durante todo o meu trabalho.

Ao Michel Farchi,

pela ajuda na aquisição das imagens histológicas.

À Izilda e Vani, do laboratório de histologia,

pela ajuda no preparo do material para estudo histológico.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia (FMRP-USP),

pelas gentilezas e companheirismo.

À Têia, Ivone e Lúcia,

pela ajuda durante estes dois anos e pela amizade.

À toda a galera com quem convivi na casa 12, em especial aos "zés": zé cururu (Gláucio), zé mono(Fabrício), zé pbmessias (Eric), zé taxidriver (Antônio), zé mor (Eduardo), zé poliglota (Álvaro), zé Matias (Matheus) e zé ricardão (Ricardo) (êta nome comum!!),

pela amizade, pelas brincadeiras e pelas horas e horas de discussões enriquecedoras que tivemos juntos.

Às "mulhegadas" da casa 12: Vi, Deise, Patrícia, Ju, e às gurias Márcia, Luciane e Ana,

pela companhia e "aromas" femininos, sempre bem vindos.

Aos amigos da casa 13,

pela amizade e bom convívio.

*À beleza da mulher ribeirão pretana, e aos amigos conquistados nesta cidade,
por me estimularem a permanecer e gostar desta cidade.*

*Aos funcionários da piscina: Avelino, João, Sr. Antônio e Sra. Antônia, e a todos os
funcionários do CEFER,
pela amizade e pelo respeito.*

*Aos funcionários do Biotério Central e funcionários da Oficina de Precisão e Eletrônica,
por tornarem possível, o impossível.*

*À CAPES,
pelo apoio financeiro.*

*Às Universidades públicas, gratuitas e de qualidade: UFOP e USP,
por enriquecerem minha formação.*

*Em especial à Lu,
pelo carinho, amizade e por conseguir me suportar nas horas difíceis, e
principalmente pelo presente que está por vir: João Pedro.*

*À todos que contribuíram para este trabalho e que por ventura eu tenha me esquecido de
agradecer, o meu eterno:*

Muito Obrigado.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	iii
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	Viii
I. INTRODUÇÃO	2
I.1- Cicatrização	2
I.1.1- Fase inflamatória	3
I.1.2- Fase proliferativa	5
I.1.2.1- Permeabilidade vascular	6
I.1.2.2- Angiogênese	6
I.1.2.3- Fatores de crescimento	8
I.1.2.4- Matriz extracelular	18
I.1.3- Fase de remodelagem	19
II. OBJETIVOS	24
III. MATERIAIS E MÉTODOS	26
III.1- Extração do látex	26
III.2- Obtenção do soro	28
III.3- Preparação do sal bicarbonato de amônio	28
III.4- Cromatografia em DEAE-celulose	29
III.5- Cromatografia em CM-celulose	29
III.6- Eletroforese em gel de poliacrilamida	30
III.7- Coloração do gel pela prata	31
III.8- Estudo do aumento da permeabilidade vascular	31
III.9- Dosagem do corante (curva padrão)	33
III.10- Estudo da atividade angiogênica na MCA	34

III.11- Histologia da MCA	37
IV. RESULTADOS	39
IV.1- Cromatografia em DEAE-celulose	39
IV.2- Cromatografia em CM-celulose	40
IV.3- Estudo do aumento da permeabilidade vascular	41
1. Caracterização do material extraído do látex (soro)	41
2. Estudo da atividade dos picos I, II e III obtidos a partir DEAE-celulose	43
3. Estudo da atividade dos picos CM-I.1, CM-I.2 e CM-I.3 obtidos a partir da CM-celulose	45
IV.4- Estudo da atividade angiogênica na MCA	46
1. Atividade do soro e dos picos I, II e III obtidos a partir da DEAE-celulose	46
2. Histologia das MCAs resultantes da estimulação angiogênica pelos picos I, II e III, soro e controle	50
IV.5- Análise eletroforética em gel de poliacrilamida do soro e picos I, II e III	53
IV.6- Análise eletroforética em SDS-PAGE do pico I (DEAE- celulose) e dos picos CM-I.1, CM-I.2 e CM-I.3 (CM-celulose)	54
V. DISCUSSÃO	57
VI. CONCLUSÕES	67
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ABREVIATURAS:

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ – Microgramas/microlitros

$\mu\text{g}/\text{mL}$ – Microgramas/mililitros

Ang – Angiopoetina

cm – centímetros

CM-celulose – Carboximetil celulose

DEAE-celulose – Dietilaminoetil celulose

EGF – Fator de crescimento epitelial

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

FGFR – Receptor de FGF

Flk – Quinase fetal do fígado

Flt – Tirosina quinase semelhante à *fms*

HB-EGF – Fator de crescimento epitelial ligado à heparina

HCl – Ácido clorídrico

HE – Hematoxilina-eosina

i.v. – Intravenoso

IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina

IL-1 – Interleucina 1

KDa – Kilodaltons

Kg – Kilogramas

M – Molar

mA – Miliampere

MCA – Membrana cório-alantóidea

min. – Minutos

mL – Mililitros

mL/h – Mililitros/hora

mM – Milimolar

Na₂S₂O₄ . 5 H₂O – Tiosulfato de sódio pentahidratado

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

nm – Nanômetros

°C – Graus centígrados

p/v – Peso/volume

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PLGF – Fator de crescimento placentário

RGB – Red green blue

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

rpm – Rotações por minuto

seg. – Segundos

TGF-β - Fator de crescimento transformante β

TGF-α - Fator de crescimento transformante α

TGF-βR – Receptor de TGF-β

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

USP – Universidade de São Paulo

V – Volts

v/v – Volume/volume

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

VEGFR – Receptor de VEGF

VPF – Fator de permeabilidade vascular

RESUMO:

O aumento da permeabilidade vascular e a angiogênese são importantes etapas do processo de cicatrização, crescimento de tumores e na revascularização de tecidos submetidos à isquemia. O aumento da permeabilidade vascular permite que diversas macromoléculas, como fibrinogênio e fatores de crescimento, alcancem o tecido lesado, enquanto a angiogênese amplia o suprimento de nutrientes e a remoção de resíduos metabólicos do tecido. Vários trabalhos têm sugerido que o látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* possui atividade angiogênica. Iniciou-se, assim, esforços no sentido de purificar o(s) componente(s) ativo(s) presente(s) neste material e caracterizá-lo(s), afim de comprovar seus efeitos no processo de cicatrização. O soro extraído do látex foi submetido a tratamentos desnaturantes (fervura e proteólise) e analisado quanto à sua capacidade de aumentar a permeabilidade vascular, o que indicou a natureza protéica do material ativo. Ensaio angiogênico em membranas cório-alantóideas (MCAs) de embriões de galinha (*Gallus domesticus*) mostraram que o soro estimula a angiogênese. Em uma primeira etapa, a purificação do soro em coluna de DEAE-celulose, gerou três frações que foram dialisadas e liofilizadas. O pico I mostrou-se a fração mais ativa em aumentar a permeabilidade vascular, e na indução de angiogênese. Estudos histológicos mostraram que MCAs, tratadas com soro ou pico I, são mais espessas do que o controle, indicando, principalmente, uma maior deposição da matriz extracelular. Em uma segunda etapa de purificação em coluna de CM-celulose foram obtidas três novas frações, a partir do pico I. Porém, na análise de atividade destas, não foi possível concluir sobre qual das frações, foi a mais ativa. Em conjunto, estes resultados suportam a aceleração do processo cicatricial observado em estudos clínicos realizados com biomembrana de látex natural.

ABSTRACT:

The increase in vascular permeability and angiogenesis are crucial events to wound repair, tumoral growth and revascularization of tissues submitted to ischemia. An increased vascular permeability allows that a variety of cytokins and growth factors reach the damaged tissue. Nevertheless, the angiogenesis supply tissues with a wide variety of nutrients and also is important to metabolites clearance. It has been suggested that the latex from *Hevea brasiliensis* posses angiogenic activity. Than, the purpose of this work was to purify and characterization of active compound, in order to demonstrate its angiogenic activity and its effects on vascular permeability. The crude latex was submitted to purification on a DEAE-cellulose column and eluted with stepwise gradient of $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{NaCl}$ buffer. Three fractions were obtained and submitted to dialysis and liophilization. The effects of these fractions on the vascular permeability were analyzed according Miles method. The angiogenic activity was analyzed using the chorioallantoic membranes from *Gallus domesticus* eggs. The fraction one (pico I) has the most evident angiogenic effect and is the most effective in enhancing vascular permeability. Moreover, the crude latex and fractions were boiled and treated with proteases in order to analyze their chemical characteristics. These samples lost part of their effects on vascular permeability, indicating a proteic nature of the active(s) compound(s). Also in this work, we have improve the purification status of fraction one using a CM-cellulose column, employing a stepwise gradient of NH_4HCO_3 buffer. These results are according with the enhancement of the wound healing observed in clinical trials carried out with biomembrane of natural latex.

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO:

O objetivo principal do tratamento de feridas é o fechamento rápido da lesão combinado à formação de uma cicatriz funcional e esteticamente satisfatória. Para tanto, é indispensável uma maior compreensão do processo biológico envolvido na cicatrização de feridas e regeneração tecidual (SINGER & CLARK, 1999).

Neste sentido, muito se tem estudado a respeito do complexo processo de reparo de feridas, onde estão envolvidas células, sinais químicos e matriz extracelular, que em conjunto, conduzem à cicatrização.

I.1- Cicatrização:

Com o rompimento da integridade tecidual nos animais vertebrados, logo se inicia o processo de reparo, que compreende uma seqüência de eventos moleculares que objetivam restaurar o tecido injuriado. Após o nascimento, o organismo falha em seu objetivo final de neoformar o tecido lesado, ocorrendo então, o reparo com a formação de uma cicatriz. Apenas durante a fase fetal, o reparo de lesões se dá sem a formação de cicatriz, ocorrendo uma verdadeira restauração do tecido, por um processo de neoformação tecidual (McCALLION & FERGUSON, 1996).

O processo de cicatrização tem sido convenientemente dividido em três fases que se sobrepõem de forma contínua e temporal: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelagem (MADRI *et.al.*, 1996).

I.1.1- Fase Inflamatória:

Após a ocorrência do ferimento, inicia-se o extravasamento sangüíneo que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. A coagulação sangüínea e agregação plaquetária geram um tampão, rico em fibrina, que além de restabelecer a hemostasia e formar uma barreira contra a invasão de microorganismos, organizando uma matriz provisória necessária para a migração celular e que servirá como um reservatório de fatores de crescimento, requeridos durante as próximas fases do processo de cicatrização (WERNER & GROSE, 2003).

As plaquetas, essenciais à formação deste tampão hemostático, também secretam múltiplos mediadores, incluindo fatores de crescimento liberados na área injuriada. Além disso, as plaquetas também ativam a cascata da coagulação, onde a trombina induz a degranulação plaquetária liberando fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante- β (TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento transformante- α (TGF- α), além de glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospondina, que são importantes constituintes da matriz extracelular provisória (ARNOLD & WEST, 1991). De fato, a cascata de coagulação e fatores de crescimento liberados pelas plaquetas, em conjunto com a ativação da cascata do complemento e ativação de células parênquimatosas pela lesão, produzem numerosos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos, os quais, juntos, auxiliam no recrutamento das células inflamatórias ao local da ferida (MADRI *et.al.*, 1996).

Em adição às funções de fagocitose de bactérias, fragmentos celulares e corpos estranhos, estas células inflamatórias produzem fatores de crescimento que

-INTRODUÇÃO-

preparam a ferida para a fase proliferativa, quando fibroblastos e células endoteliais serão, ainda, recrutados.

Apesar da concomitância das fases da cicatrização, parece ocorrer a seguinte seqüência de eventos: saída de plasma com componentes solúveis e constituintes celulares, plaquetas seguidas por neutrófilos e monócitos (CLARK, 1996). Subseqüentemente, muitos neutrófilos aderem-se ao endotélio e migram para a região da ferida. Porém, a depleção dessas células no sangue, não mostrou afetar o processo de reparo na ausência de infecção (SIMPSON & ROSS, 1972).

Os monócitos do sangue periférico, tanto inicialmente, quanto durante todo o transcorrer do processo cicatricial, continuam a infiltrar-se no local da ferida em resposta a agentes quimiotáticos para monócitos, como o PDGF, por exemplo. No tecido, os monócitos são ativados e transformam-se em macrófagos que são, provavelmente, as principais células envolvidas no controle do processo de reparo (SINGER & CLARK, 1999; ARNOLD & WEST, 1991).

A ativação dos macrófagos tem implicações fundamentais nos vários aspectos da cicatrização de feridas, como na fagocitose dos restos celulares, na síntese da matriz extracelular e na liberação de citocinas que estimulam o aumento da permeabilidade vascular, a angiogênese e também a epitelização. A liberação dos fatores provenientes das plaquetas é o principal estímulo para a ativação dos macrófagos, enquanto a fagocitose dos componentes celulares, como fibronectina ou colágeno, também contribuem para esta ativação (BEEZHOLD & PERSONIUS, 1992).

O macrófago ativado é a maior célula efetora no processo de reparo tecidual, degradando e removendo componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno, elastina e proteoglicanas. Além deste papel na fagocitose dos

-INTRODUÇÃO-

fragmentos celulares, os macrófagos também secretam fatores quimiotáticos que atraem outras células inflamatórias ao local da ferida e produzem prostaglandinas, que funcionam como potentes vasodilatadores e afetam a permeabilidade dos microvasos (SINGER & CLARK, 1999; ARNOLD & WEST, 1991).

Os macrófagos também produzem vários fatores de crescimento, tais como o PDGF, o TGF- β , o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que se destacam como as principais citocinas necessárias para estimular a formação do tecido de granulação. Desta maneira, os macrófagos medeiam da fase inicial da resposta inflamatória à fase precoce do reparo, no processo de cicatrização da ferida (SINGER & CLARK, 1999).

I.1.2- Fase Proliferativa:

A fase de proliferação epitelial, no caso da pele, inicia-se por estimulação mitogênica e quimiotática do TGF- α e EGF. Tão importante quanto a epitelização, nesta fase do processo de reparo, é a formação do chamado tecido de granulação, nome dado principalmente, pela característica granular devida à presença dos novos capilares neoformados (FRADE, 2003).

Porém, antes de descrever a angiogênese, torna-se necessário salientar que o aumento da permeabilidade microvascular é o primeiro estágio deste processo, apresentando-se como etapa importante, que permite, através do extravasamento de proteínas, citocinas e elementos celulares, a formação de uma matriz extracelular provisória necessária à migração e proliferação das células endoteliais (DVORAK *et.al.*, 1999).

-INTRODUÇÃO-

I.1.2.1- Permeabilidade vascular:

A produção de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes é acompanhada, na maioria das vezes, por um aumento da permeabilidade vascular (DVORAK *et.al.*, 1999; BATES & HARPER, 2003). Na angiogênese patológica, o aumento da permeabilidade vascular à água e macromoléculas apresenta importante função no processo, sendo responsável direto pela formação do edema. Este aumento da permeabilidade capilar parece ter um menor efeito durante a angiogênese fisiológica, porém, causa danos consideráveis em determinadas patologias como no edema cerebral, por exemplo (VAQUERO *et.al.*, 2000).

O VEGF-A, por exemplo, foi originalmente descrito pela sua capacidade de aumentar a permeabilidade dos microvasos à macromoléculas circulantes, incluindo fibrinogênio e outras proteínas da coagulação. Desta forma, o sistema de coagulação é rapidamente ativado, o que resulta na deposição extravascular de fibrina favorecendo, tanto o processo cicatricial, como o desenvolvimento tumoral (DVORAK, 2002).

Os mecanismos básicos da regulação da permeabilidade vascular, principalmente causada pelos fatores de crescimento não foram, ainda, completamente elucidados. A função destes fatores de crescimento e o mecanismo pelo qual exercem seu efeito, são objetos de estudos de grande interesse, e seus caminhos metabólicos estão sendo, correntemente, elucidados.

I.1.2.2- Angiogênese:

A angiogênese é uma etapa fundamental do processo de cicatrização, pela qual novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes (FOLKMAN & SHING, 1992). Os neovasos participam da formação do tecido de

-INTRODUÇÃO-

granulação provisório e supre de nutrientes e de oxigênio o tecido em crescimento (LI *et.al.*, 2003). De uma forma diferencial, a vasculogênese refere-se aos primeiros estágios do desenvolvimento vascular, durante o qual, as células precursoras do endotélio vascular, sofrem diferenciação, expansão e coalescência para formar a rede de túbulos primitivos do organismo (RISAU, 1997).

Em um organismo adulto, em condições normais, com exceção do ciclo capilar e ciclo reprodutivo das fêmeas (no útero, com a formação do endométrio; e ovários, na formação do corpo lúteo), a vasculatura se mantém quiescente, porém apresenta a capacidade de iniciar a angiogênese, principalmente durante a cicatrização (LI *et.al.*, 2003).

Assim, a angiogênese, além de ser fundamental no sistema reprodutor e no desenvolvimento do organismo, participa também do processo de cicatrização. Em condições normais, a angiogênese é finamente regulada, ativada por curtos períodos (dias) e então, completamente inibida. Entretanto, muitas patologias são consequência do descontrole desta regulação, como ocorre, por exemplo, na artrite, onde novos capilares sangüíneos invadem a articulação e destroem a cartilagem. No *diabetes mellitus*, novos capilares presentes na retina, invadem o vítreo, sangram e podem causar cegueira. O crescimento de tumores e metástases são patologias dependentes de angiogênese (FOLKMAN, 1991). A maioria dos tumores mantém um estímulo constante ao crescimento de novos capilares de forma a permitir o seu próprio crescimento, além de fornecer uma comunicação que permite às células tumorais invadirem a corrente sangüínea e causarem metástase em locais distantes do tumor primitivo. (FOLKMAN & SHING, 1992).

A angiogênese, em resposta à lesão tecidual, é um processo dinâmico, finamente regulado por sinais presentes, tanto no soro, quanto na matriz extracelular

-INTRODUÇÃO-

local (RISAU, 1997). Durante o processo cicatricial, a formação de novos vasos sangüíneos torna-se necessária para a formação do novo tecido de granulação, onde as células dos vasos sangüíneos chegam a corresponder a aproximadamente 60% do tecido de reparo (ARNOLD & WEST, 1991). A angiogênese ocorre na matriz extracelular do leito da ferida com a migração e estimulação mitogênica da células endoteliais.

A indução da angiogênese foi inicialmente atribuída ao FGF ácido ou básico. Subseqüentemente, muitas outras moléculas foram identificadas como angiogênicas, incluindo o VEGF, TGF- β , angiogenina, angiotropina, angiopoetina-1 e trombospondina (FOLKMAN & D'AMORE, 1996). Baixa tensão de oxigênio (DETMAR *et.al.*, 1997) e elevados níveis de ácido láctico e aminas bioativas (REMENSNYDER & MAJNO, 1968) também podem estimular a angiogênese. Muitas das moléculas mencionadas acima são proteínas e parecem induzir a angiogênese de forma indireta, estimulando a produção de FGF básico e VEGF por macrófagos e células endoteliais.

I.1.2.3- Fatores de Crescimento:

A identificação, caracterização e purificação do VEGF em 1989 contribuíram significativamente para o entendimento da regulação da permeabilidade vascular e fluxo sangüíneo na angiogênese (FERRARA & HENZEL, 1989; BATES *et.al.*, 1999). O resultado do desenvolvimento de novos vasos sangüíneos no tecido corresponde ao aumento do suprimento de nutrientes e maior eficiência na remoção de resíduos. Neste sentido, os fatores de crescimento vascular possuem três principais mecanismos de ação: 1) Podem aumentar a permeabilidade dos vasos à água, pequenos solutos e macromoléculas (LEVICK, 1991; MICHEL, 1984); 2) Podem

-INTRODUÇÃO-

reduzir a distância das células teciduais em relação ao vaso sangüíneo mais próximo, pela estimulação da angiogênese; 3) e podem também, aumentar o fluxo sangüíneo ao tecido agindo como potentes vasodilatadores (BATES & HARPER, 2003).

O VEGF, principal fator angiogênico, exerce sua atividade biológica predominantemente através de receptores transmembrânicos com atividade tirosina quinase presente nas células endoteliais, e participa como um mediador chave da angiogênese. A família de proteínas VEGF, atualmente inclui VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e o fator de crescimento placentário (PLGF) (WERNER & GROSE, 2003). O VEGF-A é uma glicoproteína homodimérica, cujas subunidades se mantêm unidas por duas pontes dissulfeto, é sintetizada a partir de *splicing* alternativo de um RNAm, sob a forma de sete isoformas que contêm de 121 a 206 aminoácidos (FERRARA, 2001; BATES & HARPER, 2003; LI *et.al.*, 2003). Dentre estas, destacam-se os VEGF121, VEGF165, VEGF189 e VEGF206 como isoformas predominantes (TISCHER *et.al.*, 1991; JINGJING *et.al.*, 1999). Estas diferentes isoformas apresentam atividades biológicas similares, mas diferem em suas propriedades de ligação à heparina e matriz extracelular (PARK *et.al.*, 1993). As isoformas menores (121 a 165 aminoácidos) são secretadas na forma solúvel, enquanto as maiores possuem domínios transmembrânicos, ficando inicialmente associadas às células, de onde são liberadas e ativadas por proteólise. O VEGF121 é uma proteína ácida, enquanto as demais, possuem ponto isoelétrico básico (Figura 1).

-INTRODUÇÃO-

FIGURA 1: “*Splicing*” alternativo do RNAm do VEGF. Os domínios funcionais são também mostrados. “*Splicing*” diferencial, resulta em diferentes isoformas com diferentes propriedades. “*Splicing*” pode ser específico para determinados tecidos, por exemplo, o VEGF 183 somente é encontrado na íris. A isoforma VEGF165b produzida por “*splicing*” alternativo é demonstrada, com a possibilidade de existência das isoformas VEGF121b, VEGF189b e VEGF145b (não mostrado). Retirado de BATES & HARPER, 2003.

O VEGF também é conhecido como VPF (fator de permeabilidade vascular) devido a sua potente ação no aumento da vasopermeabilidade, o que permite o extravasamento de proteínas, como o fibrinogênio e a fibronectina, essenciais para a formação da matriz extracelular provisória (DVORAK, 1999; KECK et.al., 1989), de forma a aumentar a condutividade hidráulica (BATES et.al., 1997) e fenestração (ESSER et.al., 1998). O VEGF age também, como um potente mitógeno para células

-INTRODUÇÃO-

das células endoteliais e germinação de novos vasos sanguíneos através da regulação de diversos receptores de integrinas endoteliais (SENGER *et.al.*, 1996). Além disso, o VEGF também age como um fator de sobrevivência para células endoteliais através da indução da expressão da Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica (GERBER *et.al.*, 1998).

Estas famílias de VEGF exercem suas funções biológicas por interações diferenciais a três receptores transmembrânicos que apresentam atividade de tirosina quinase já identificados: receptor de VEGF-1 (VEGFR-1) [tirosina quinase semelhante à fms (Flt-1)], VEGFR-2 [quinase fetal do fígado (Flk-1)] e VEGFR-3 (Flt-4). De forma similar ao VEGF, a ativação da expressão gênica destes receptores é acionada principalmente pela hipóxia (WALTENBERGER *et.al.*, 1996). VEGFR-1 e VEGFR-2 são restritos ao endotélio vascular, enquanto o VEGFR-3 juntamente com seus ligantes preferenciais, VEGF-C e VEGF-D parecem estar envolvidos no crescimento do endotélio linfático (GALE & YANCOPOULOS, 1999; KUKK *et.al.*, 1996).

Muitos diferentes tipos celulares, incluindo fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e queratinócitos, são capazes de produzir VEGF (BERSE *et.al.*, 1992), sendo os dois últimos, os principais tipos celulares responsáveis pela produção deste fator de crescimento durante a cicatrização (BROWN *et.al.*, 1992; FRANK *et.al.*, 1995). A adição de anticorpos anti-VEGF inibe fortemente a formação do tecido de granulação na ferida (HOWDIESHELL *et.al.*, 2001) indicando uma importante função do VEGF na angiogênese que ocorre durante a fase proliferativa. Baixa tensão de oxigênio, como ocorre no tecido durante a lesão, constitui-se no maior indutor da produção deste fator de crescimento (DETMAR *et.al.*, 1997). Esta indução pode ser em parte, também mediada pelo TGF- β .

-INTRODUÇÃO-

As angiopoetinas (Ang-1 à Ang-4) têm sido apresentadas como fatores de crescimento específicos para células endoteliais, agindo como associados importantes do VEGF. Elas ligam-se a receptores transmembrânicos tipo tirosina quinase, chamados Tie2 e restritos às células endoteliais. Porém, enquanto as Ang-1 e Ang-4 foram identificadas como ativadores destes receptores, Ang-2 e Ang-3 parecem bloquear a sua atividade na maioria das circunstâncias estudadas (WERNER & GROSE, 2003).

Apesar de ambos, Ang e VEGF apresentarem funções distintas e essenciais ao processo cicatricial, elas possuem um efeito aditivo na angiogênese. A Ang-1, por exemplo, está envolvida nas interações normais entre as células endoteliais e seu suporte subjacente, os pericitos, auxiliando na manutenção da estabilidade vascular (SURI *et.al.*, 1996). Além disso, foi demonstrado que Ang-1 protege as células endoteliais da apoptose (PAPAPETROPOULOS *et.al.*, 2000) e induz a migração e germinação, levando à formação estrutural tubular do vaso (HAYES *et.al.*, 1999). A superexpressão destes fatores de crescimento na pele, mostra que VEGF induz a formação de vasos sangüíneos imaturos apresentando hiperpermeabilidade (THURSTON *et.al.*, 1999), enquanto Ang-1 leva a formação de vasos sangüíneos maduros, não apresentando hiperpermeabilidade (SURI *et.al.*, 1998). Enquanto a Ang-1 é expressa constitutivamente em adultos, Ang-2 é altamente produzida em locais de angiogênese ativa (MAISON-PIERRE *et.al.*, 1997), sugerindo uma provável função na desestabilização dos vasos pré-existentes, o que leva a um estado de maior plasticidade.

A família dos FGFs compreendem 22 membros de estrutura homóloga, apresentando-se como pequenos polipeptídeos com um núcleo central contendo 140 aminoácidos. FGF1 (FGF ácido) e FGF2 (FGF básico) estão preferencialmente

-INTRODUÇÃO-

implicados no processo da angiogênese (FOLKMAN e SHING, 1992; ORNITZ & ITOH, 2001). Estes compostos apresentam-se como polipeptídeos com cerca de 18 KDa, de cadeia simples e não glicosilados. Eles transmitem seus sinais através de 4 receptores de FGF de alta afinidade, proteínas quinases transmembrânicos (FGFR-1 ao FGFR-4), os quais ligam à FGFs distintos com diferentes afinidades. Uma das características do FGF1 e FGF2 é que eles interagem fortemente com moléculas semelhantes a proteoglicanas, como o sulfato de heparana, presentes na matriz extracelular (FOLKMAN *et.al.*, 1988), o que estabiliza os FGFs frente a desnaturação térmica e proteolítica, além de limitar sua difusibilidade (WERNER & GROSE, 2003). Desta forma, estas moléculas atuam como um reservatório para fatores pró-angiogênicos. Porém, nem o uso de peptídeo sinal clássico para a secreção, nem o mecanismo de liberação destes fatores de crescimento foram, ainda, determinados.

A maioria dos membros da família FGF possui um amplo espectro mitogênico. Eles estimulam a proliferação de várias células de origem mesodérmica, ectodérmica e também, endodérmica. Em adição aos seus efeitos mitogênicos, os FGFs regulam a migração e diferenciação de suas células alvos, apresentando também a função citoprotetora, o que aumenta a sobrevivência das células sobre condições adversas (WERNER & GROSE, 2003; WERNER, 1998; ORNITZ & ITOH, 2001).

FGF1 e FGF2 são sintetizados por uma variedade de tipos celulares envolvidos na angiogênese e cicatrização, incluindo células inflamatórias (BAIRD *et.al.*, 1985), células endoteliais (SCHWEIGERER *et.al.*, 1987) e fibroblastos da derme (KANDEL *et.al.*, 1991). Eles agem sobre as células endoteliais de forma parácrina, liberados a partir da matriz extracelular, ou de forma autócrina, quando liberados pelas próprias células endoteliais (SCHWEIGERER *et.al.*, 1987),

-INTRODUÇÃO-

promovendo a proliferação e diferenciação celular (KANDA *et.al.*, 1996). Durante a formação do tecido de granulação, FGF2 promove a migração celular através de receptores de superfície para integrinas, os quais medeiam a ligação das células endoteliais à matriz extracelular (SEPP *et.al.*, 1994).

O TGF- β é um dos mais importantes mediadores da cicatrização devido aos seus efeitos multipotentes. Apresenta-se como o principal modulador da angiogênese durante a cicatrização, por regular a proliferação celular, migração, formação do tubo capilar e deposição da matriz extracelular. Três isoformas do TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) são expressas em mamíferos, possuindo uma sequência de aminoácidos com alta homologia. São sintetizadas como precursores, usualmente sendo secretadas como uma proteína complexa ligada ao TGF- β , da qual é removida extracelularmente via clivagem proteolítica (ROBERTS, 1998). Todas as três isoformas ligam-se aos mesmos receptores: receptor de TGF- β I (TGF- β RI), receptor de TGF- β II (TGF- β RII) e receptor de TGF- β III (TGF- β RIII), disparando uma resposta similar quando ensaiados em culturas celulares diversas. Os receptores TGF- β RI e TGF- β RII, apresentam atividade de serinas-treoninas quinases, enquanto o último, TGF- β RIII, parece ser um receptor não sinalizante (ROBERTS, 1998).

As isoformas do TGF- β possuem sua expressão regulada de forma distinta em diferentes tipos celulares, e em vários estágios do desenvolvimento celular, o que parece sugerir funções biológicas distintas (KINGSLEY, 1994). O TGF- β 3, mas não o TGF- β 1, protege as células da apoptose induzida (LI *et.al.*, 1999). *In vitro*, estes fatores de crescimento apresentam-se como estimuladores da mitose de fibroblastos, mas por outro lado, inibem a proliferação de muitas outras células, incluindo queratinócitos. Além disso, os TGF- β s são potentes estimuladores da

-INTRODUÇÃO-

expressão de proteínas da matriz extracelular e de integrinas (MASSAGUÉ, 1990; MASSAGUÉ, 1998).

Imediatamente após a ocorrência da lesão, grandes quantidades de TGF- β 1 são liberadas pelas plaquetas (ASSOIAN *et.al.*,1983) afim de agirem como quimioatrativos para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos. Estes tipos celulares também servem para aumentar o nível de TGF- β 1 dentro da ferida. Assim como as formas ativas, também são secretadas as formas latentes que, por sua vez, são seqüestradas dentro da matriz, de onde são liberadas no decorrer do processo pela ação de enzimas proteolíticas. Esta combinação de liberação celular e liberação a partir de um estoque temporário na matriz da ferida, abastece de TGF- β , todo o processo de reparo (ROBERTS & SPORN, 1996). Outra função importante dos TGF- β s é a estimulação da reepitelização e formação do tecido de granulação. Apesar deste fator de crescimento inibir a proliferação dos queratinócitos, eles induzem a expressão de integrinas necessárias à migração destas células que cruzam a matriz provisória da lesão, rica em fibronectina (GAILIT *et.al.*, 1994; ZAMBRUNO *et.al.*, 1995).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I e IGF-II) são potentes estimuladores da mitose e sobrevivência de vários tipos celulares, exercendo sua função de forma autócrina, parácrina ou mesmo endócrina. Suas ações são mediadas pelo receptor tipo I de IGF, que apresenta atividade tirosina quinase de forma semelhante ao receptor de insulina (WERNER & GROSE, 2003). Diversos estudos têm demonstrado um efeito benéfico da utilização de IGF exógeno durante a cicatrização, particularmente, quando combinado a outros fatores de crescimento (LYNCH *et.al.*, 1989).

-INTRODUÇÃO-

Na pele normal, somente poucas células da derme e epiderme expressam o IGF-I. Porém, cerca de 1 a 3 dias após a lesão, todas as células epidérmicas, além de macrófagos e outras células inflamatórias tornam-se positivas em estudos de expressão deste fator de crescimento, por técnicas de imunohistoquímica (JENNISCHE *et.al.*, 1987). Porém, um dado ainda mais interessante a ser salientado, é a redução dos níveis de IGF-I no fluído cicatricial, em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, chegando a níveis de redução da ordem de até 42% (BITAR & LABBAD, 1996) o que pode ajudar a explicar a deficiência no processo de cicatrização apresentados em pacientes diabéticos portadores das úlceras crônicas, principalmente nos membros inferiores (úlceras de pés diabéticos). Por outro lado, o aumento da expressão do IGF-I pode levar a formação de uma cicatriz excessiva, hipertrófica (GHAHARY *et.al.*, 1995).

O EGF compreende uma família de mitógenos contendo diversos membros, incluindo EGF, TGF- α , fator de crescimento epidérmico ligado à heparina (HB-EGF), anfiregulina, epiregulina, betacelulina, neuregulina, e a mais recente descoberta, o "epigen", assim como proteínas codificadas pelo vírus Vaccinia e outros poxivírus (STRACHAN *et.al.*, 2001; TSAHAR *et.al.*, 1998). Todos estes fatores exercem suas funções através da ligação a quatro diferentes receptores de alta afinidade (EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 e HER4/ErbB4). Quando unidos aos seus ligantes, estes receptores formam homo ou heterodímeros (YARDEN, 2001). A superexpressão destes receptores, em particular do HER2 apresenta um papel importante na gênese tumoral. Uma série de experimentos e estudos clínicos, apresentaram um efeito positivo do EGF, TGF- α e HB-EGF no processo de cicatrização de feridas, sugerindo que os fatores de crescimento endógenos também

-INTRODUÇÃO-

estão envolvidos no processo (GREENHALGH, 1996; SCHULTZ *et.al.*, 1987; STEED, 1998).

Quanto às funções, o HB-EGF é mitogênico para fibroblastos e queratinócitos, sugerindo uma importante função na reepitelização e formação do tecido de granulação. Foi demonstrado que ele atua, sinérgicamente, com o IGF-I na estimulação dos queratinócitos *in vitro* (MARIKOVSKY *et.al.*, 1996). O TGF- α é expresso em macrófagos na lesão, além de eosinófilos e queratinócitos epidérmicos localizados no centro da ferida (WERNER & GROSE, 2003).

Por último e não menos importante, encontra-se o PDGF que compreende uma família de proteínas homo ou heterodiméricas, incluindo PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC e PDGF-DD (HELDIN *et.al.*, 2002). Eles exercem suas funções por meio da ligação a três diferentes receptores de atividade tirosina quinase transmembrânicos, os quais são homo ou heterodímeros de cadeias α e β . O PDGF foi o primeiro fator de crescimento a apresentar-se como quimiotático de células inflamatórias, como neutrófilos, monócitos e fibroblastos. Em adição, eles aumentam a proliferação dos fibroblastos e produção da matriz extracelular. Em um último estágio, o PDGF estimula fibroblastos a contraírem as matrizes de colágeno e induzirem o fenótipo miofibroblástico destas células. Por isto, o PDGF foi o primeiro fator de crescimento a ser aprovado para o tratamento de úlceras humanas (NAGAI & EMBIL, 2002; MANDRACCHIA *et.al.*, 2001).

Logo após a injúria, o PDGF é liberado em grandes quantidades a partir da degranulação plaquetária já nos primeiros estágios do processo de cicatrização (ROSS *et.al.*, 1974). Os padrões de expressão de PDGF e seu receptor, sugerem uma ação de forma parácrina, onde os ligantes são predominantemente expressos na epiderme, enquanto os receptores são encontrados na derme e no tecido de

-INTRODUÇÃO-

granulação. A expressão dos PDGFs e de seus receptores também se encontra reduzida nas feridas de difícil cicatrização, como em camundongos diabéticos ou tratados com glicocorticóides (BEER *et.al.*, 2000; BEER *et.al.*, 1997) indicando que a expressão dos PDGFs e seus receptores são essenciais para o reparo normal. Vale ressaltar no entanto que o aumento da produção do PDGF pode estar envolvido na patogênese de cicatrizes hipertróficas e formação de quelóides, como sugerido pelo potente efeito do PDGF sobre a proliferação de fibroblastos e produção da matriz extracelular por estas células (NIESSEN *et.al.*, 2001).

I.1.2.4- Matriz Extracelular:

Para que ocorra a migração das células endoteliais e desenvolvimento de novos capilares de estrutura tubular há uma dependência, não somente das células e citocinas presentes, mas também de uma produção e organização dos componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina, colágeno, vibronectina, tenascina e laminina, tanto no tecido de granulação, quanto na membrana endotelial basal. A matriz extracelular é importante para o crescimento e manutenção normal dos vasos, pois além de agir como uma "plataforma" suporte para a migração celular, também age como um reservatório e modulador da liberação de fatores de crescimento, assim como o FGF2 e o TGF- β (RUOSLAHTI e YAMAGUCHI, 1991).

A proliferação das células endoteliais adjacentes e dentro da ferida, levam a deposição, de forma transitória, de grandes quantidades de fibronectina na parede do vaso (CLARK *et.al.*, 1982). Assim, a angiogênese requer a expressão de receptores para fibronectina pelas células endoteliais (BROOKS *et.al.*, 1994), organizando a fibronectina como um canal de modo a permitir o movimento das

-INTRODUÇÃO-

células endoteliais. Expressão e atividade de proteases também são necessários à angiogênese, principalmente na fase de remodelagem (CLARK, 1996).

I.1.3- Fase de Remodelagem:

Nesta fase do processo de cicatrização, ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal. É uma fase marcada por maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, ocorrendo o depósito de proteoglicanas e colágeno. Em uma fase mais tardia, o tecido de granulação comporta-se como um tecido contrátil responsivo à agonistas que estimulam o músculo liso (GABBIANI *et.al.*, 1972). Ocorre, concomitantemente, uma reorganização da matriz extracelular, que se transforma de uma matriz provisória em uma matriz definitiva, cuja intensidade fenotípica, observada nas cicatrizes, reflete a intensidade dos fenômenos que ocorreram, bem como o grau de equilíbrio ou desequilíbrio entre eles.

Com o decorrer do processo de maturação e remodelagem, a maioria dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias desaparecem do local da ferida por meio de processos de emigração, apoptose ou outros mecanismos de morte celular desconhecidos. Este fato leva a formação de uma cicatriz relativamente acelular. Por outro lado, se persistir a celularidade no local, ocorrerá a formação de cicatrizes hipertróficas e quelóides (ARNOLD & WEST, 1991).

As principais citocinas envolvidas nesta fase são: TNF- α , IL-1, PDGF e TGF- β produzidas pelos fibroblastos, além das produzidas pelas células epiteliais como EGF e TGF- β (KARUKONDA *et.al.*, 2000).

Várias são as doenças que interferem negativamente no processo de reparo tecidual, como diabetes, esclerose sistêmica, anemia, desnutrição e doenças

-INTRODUÇÃO-

crônicas, dentre outras. Muitas também são as condições que tornam este processo de difícil resolução, impedindo ou retardando uma completa restauração dos tecidos. Dentre estas condições podem ser ressaltadas as ressecções extensas da parede abdominal, como aquelas em que a peritoniotomia se faz necessária. Por dificultarem de alguma maneira o reparo tecidual, essas doenças ou condições contribuem potencialmente para um aumento da morbidade e mortalidade (MRUÉ, 2000).

Nas últimas décadas, vários estudos têm sido realizados no sentido de se identificar substâncias capazes de favorecer o processo de reparo. Também a busca de substâncias com atividade angiogênica tem sido intensa, pelo seu grande potencial de aplicação clínica.

Dentre as substâncias que possuem ação direta no processo de reparo destacam-se alguns fatores de crescimento que, quando aplicados topicamente sobre a ferida, demonstram boa capacidade de acelerar o reparo tecidual em experimentos animais (MUSTOE *et.al.*, 1991; PIERCE *et.al.*, 1992; PIERCE *et.al.*, 1994; WANG *et.al.*, 1998). Neste grupo, merece destaque o REGRANEX®, um produto composto por PDGF recombinante humano, que parece interferir diretamente de maneira a favorecer o processo de reparo, apresentando bons resultados na cicatrização de úlceras de pacientes diabéticos (STEED *et.al.*, 1995; PIERCE *et.al.*, 1991; PIERCE *et.al.*, 1992; MEYER-INGOLD, 1993). No entanto, são curativos de alto custo, estando assim, distante da realidade sócio-econômica da maioria da população portadora de úlceras crônicas. Outras substâncias contendo agentes enzimáticos como as pomadas à base de DNase e collagenase atuam promovendo o desbridamento da ferida (HEBDA *et.al.*, 1990) auxiliando desta

-INTRODUÇÃO-

maneira, o curso da restauração tecidual de maneira discreta e indireta. Estas últimas são largamente utilizadas na prática clínica.

Desde 1994 vem sendo pesquisado, com sucesso, o desenvolvimento de um novo material biocompatível, a base de látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* desenvolvido no laboratório de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo/ Brasil.

Nesta pesquisa, uma biomembrana é produzida quimicamente pela indução da polimerização do poliisopreno endógeno na emulsão aquosa láctea por evaporação a baixa temperatura, preservando a conformação terciária das proteínas presentes no látex. Os cuidados especiais tomados na polimerização, fazem com que a biomembrana adquira uma microarquitetura particular, com uma superfície natural, a qual permite aderência celular e estimula os vários tipos celulares, especialmente, os polimorfonucleares envolvidos nos processos de cicatrização de feridas. Esta biomembrana, pode ser produzida na forma laminar (utilizada como curativo) ou em vários formatos, como próteses, preparados a partir de moldes especiais (MRUÉ, 2000).

Mrué (1996) em seus trabalhos, evidenciou que este material é um importante indutor de cicatrização de paredes esofágicas lesadas de cães experimentais, além de produzir um acentuado aumento na vascularização (neoangiogênese); epitelização (epitélio pseudoestratificado); neoformação granular submucosa e fibras musculares neoformadas. A biocompatibilidade da biomembrana de látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* foi demonstrada através de implantes *in vivo* em cães (LACHAT *et.al.*, 1997; MRUÉ, 2001).

-INTRODUÇÃO-

Em estudo piloto que envolveu a aplicação da biomembrana em úlcera venosa crônica foram observados sinais evidentes de estímulo à granulação que puderam ser visualizados no paciente, clínica e histopatologicamente, a partir do 15º dia de tratamento com a biomembrana (FRADE *et.al.*, 2001).

Com estes resultados, ficou evidente a ação do látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* como estimulador do processo de reparo, principalmente, pela atividade indutora de angiogênese apresentada por este material. O princípio ativo presente neste material apresentava-se como de identidade supostamente protéica, devido, principalmente, à perda de atividade quando exposto a altas temperaturas de secagem. Desta forma, tornou-se necessário um estudo bioquímico mais aprofundado, no sentido de se caracterizar e isolar o(s) componente(s) ativo(s) presente(s) no látex.

⊗ Este(s) componente(s) apresenta(m) grande potencial de utilização no tratamento de feridas crônicas, principalmente em pés diabéticos. É necessário destacar ainda, o fato deste material possuir origem natural, constituindo-se de matéria prima nacional e de baixo custo, sem risco de transmissão de patógenos e de grande aplicabilidade clínico-social.

OBJETIVOS

-OBJETIVOS-**II- OBJETIVOS:**

Com o propósito de estudar o material extraído a partir do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* que apresenta atividade angiogênica e indutora do processo de cicatrização, foi proposto:

- Caracterizar a identidade química do(s) componente(s) ativo(s) presente(s) neste material;
- Purificar o componente ativo deste material, utilizando-se de técnicas de separação cromatográficas e eletroforéticas, específicas para purificação de proteínas;
- Avaliar a atividade do material, após cada etapa de purificação, em ensaios *in vivo* que indiquem a indução do aumento da permeabilidade vascular e estimulação da angiogênese;

MATERIAIS E
MÉTODOS

III- MATERIAIS E MÉTODOS:

III.1-Extração do Látex:

O látex natural foi extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*, pelo processo tradicional de incisão em formato de meia espiral, a uma altura de 60 a 90 cm, através do floema da árvore. As células lactíferas, assim expostas, permitem a drenagem de um líquido de aspecto leitoso, que neste estado denomina-se látex natural. Pequenos recipientes contendo amônia foram fixados à extremidade distal da espiral de corte, para a coleta do látex (Figura 2). A adição de amônia ao recipiente de coleta tem como objetivo evitar a autocoagulação do látex. Nesta fase sua constituição química é heterogênea, apresentando os seguintes componentes: *cis*-poliisopreno, carboidratos, lipídeos, fosfolipídios e proteínas, estas últimas representando até 1,7% do total.

A extração do látex foi realizada em árvores de um mesmo seringal, sendo pertencentes, principalmente, aos clones RRhim 600 e GT-1, localizado no município de Guapiaçu, interior de São Paulo. Este material pode ser estocado a 4 °C pelo período de até um mês sem alteração de suas propriedades, assim como de sua atividade.

Durante todo projeto o material foi fornecido pela empresa Globbor, situada no município de Guapiaçu-SP.

-MATERIAIS E MÉTODOS-

FIGURA 2: Coleta do Látex: A- Fotografia de um seringal localizado no interior de São Paulo demonstrando a plantação, de forma organizada, das seringueiras; B- Detalhe da incisão, em meia espiral, na casca da seringueira; C- Correto procedimento de coleta do látex.

-MATERIAIS E MÉTODOS-

III.2- Obtenção do Soro:

O látex natural amoniacal, não centrifugado, foi diluído com ácido acético a 2,2%, na proporção de 1:2 (v/v). A 500 mL de látex adicionou-se, sob agitação branda com bastão de vidro, 1000 mL de ácido acético 2,2%, e deixou em repouso absoluto por 30 minutos, tempo necessário para que a coagulação ocorresse e o processo de retração do coágulo se iniciasse. O soro, de aspecto límpido e amarelado, foi decantado. O restante do soro, foi obtido após o coágulo ser comprimido com bastão de vidro. De 500 mL de látex natural, extraiu-se, através desta metodologia, aproximadamente 1000 mL de soro.

Deste material, retirou-se alíquotas para realização dos testes de atividade biológica (após diálise contra água destilada, liofilização e dosagem de proteínas).

O pH do soro foi elevado para 9,0 com NaOH 5,0 M, determinando-se a quantidade de base utilizada para cálculo aproximado da força iônica final, essencial para reprodutibilidade nos procedimentos cromatográficos.

III.3- Preparação do sal bicarbonato de amônio:

O tampão volátil bicarbonato de amônio foi utilizado como fase móvel nas cromatografias em colunas de DEAE-celulose e CM-celulose .

O bicarbonato de amônio foi preparado segundo SAMPAIO *et al.* (1983). Dois litros de hidróxido de amônio foram adicionados em água destilada (1:1), ambos a temperatura de 4°C. A esta solução, foram adicionados lentamente 12 Kg de gelo seco sob agitação periódica. O pH foi, então, corrigido para 7,8 com hidróxido de amônio. O frasco foi deixado em repouso por aproximadamente 12 horas a 4°C para cristalização do sal. O bicarbonato de amônio assim obtido foi filtrado em funil de placa sinterizada e lavado com álcool etílico destilado. O sal,

-MATERIAIS E MÉTODOS-

espalhado sobre papel de filtro foi deixado em capela ventilada até secagem. Depois de seco, o sal foi armazenado em frascos hermeticamente fechados. Com este procedimento, consegue-se um sal com alto grau de pureza.

III.4- Cromatografia em DEAE-celulose:

Em uma primeira etapa de purificação cromatográfica utilizamos uma coluna de vidro preenchida com matriz DEAE-celulose (5 cm x 50 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01 M (pH 7,8).

O soro, material extraído do látex, foi diluído em água destilada na proporção de 1:1 (v/v), e o pH corrigido para 9,0 com NaOH 5M. O soro diluído foi aplicado à coluna cromatográfica, à temperatura ambiente, e eluído com tampão bicarbonato de amônio 0,01 M em gradiente descontínuo e crescente de NaCl (0 M; 0,15 M; 0,25 M e 1,5 M de NaCl).

O fluxo empregado foi de 7 mL/min e o eluato monitorado a 280 nm em espectrofotômetro Hitachi U-2000. Este comprimento de onda permite a detecção de sistemas de ressonância como os da tirosina e do triptofano. As frações foram coletadas na razão de 30 mL por tubo, com auxílio de um coletor Gilson. O material, de acordo com o perfil cromatográfico, teve seus picos característicos reunidos e submetidos à diálise contra água destilada, liofilizados e armazenados a -20° C para posterior análise de atividade biológica.

III.5- Cromatografia em CM – celulose:

O Pico I obtido a partir da cromatografia em DEAE-celulose e ativo nos ensaios de aumento da permeabilidade vascular e indução angiogênica na membrana cório-alantóideia (MCA), foi utilizado para posterior etapa de purificação

-MATERIAIS E MÉTODOS-

em coluna CM-celulose (2 cm X 50 cm) Preparou-se 10 mL de uma solução do Pico I (10 mg/mL) em tampão volátil de bicarbonato de amônio (0,01 M, pH 7,5). Esta solução foi aplicada em uma coluna de vidro, preenchida com resina CM-32 Whatman carboximetil-celulose, equilibrada previamente em tampão volátil de bicarbonato de amônio 0,01 M, pH 7,5. Após a aplicação total da amostra, a coluna foi lavada com 250 mL do tampão volátil de bicarbonato de amônio (0,01 M, pH 7,5) e a seguir, aumentou-se sucessivamente a concentração do tampão de bicarbonato de amônio na forma *step-wise* (250 mL de cada tampão nas seguintes concentrações 0.01M; 0.05M; 0.15M; 0.25M até o final de 0.5M de bicarbonato de amônio). As frações eluídas em fluxo aproximado de 30 mL/h, foram coletadas na razão de 3 mL por tubo, com auxílio de coletor de frações LKB-Bromma 7000 Ultrorac®, e a absorvância determinada em 280 nm, com auxílio de um espectrofotômetro Hitachi U-2000. As frações obtidas foram reunidas, dialisadas contra água destilada, liofilizadas e armazenadas à -20°, para posterior teste de atividade biológica.

III.6- Eletroforese em gel de poliacrilamida:

Como forma de analisar o processo de purificação realizado pelas cromatografias em DEAE-celulose, foi realizado a análise do material por eletroforese em gel de poliacrilamida PAGE, específico para proteínas ácidas.

Este procedimento foi realizado de acordo com o método de DAVIS (1964). Utilizou-se de um gel de acrilamida 10% (p/v), bisacrilamida 0.8% (p/v), Tris-HCl 480 mM (pH 8,9). A corrida foi realizada sob amperagem constante de 10 mA e voltagem crescente até o limite de 200 V, utilizando-se o tampão Tris-HCl 0,5 mM pH 8,3 e glicina 3,8 mM..

-MATERIAIS E MÉTODOS-

III.7- Coloração do gel pela prata:

Para visualização das proteínas, os géis de poliacrilamida foram corados pela prata segundo o método descrito por BLUM *et.al.* (1987). Após a corrida, o gel foi fixado por 30 min. com uma solução fixadora (metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e formaldeído 37% 0,5µL/mL). Em seguida, o gel foi lavado 3 X, por 10 min. cada lavagem, com etanol 50% v/v e posteriormente, pré-tratado com tiosulfato de sódio 0,08 mM 0,02% (p/v) por 30 seg.. Após 3 lavagens com água deionizada, o gel foi incubado na solução de prata (AgNO_3 0,2% (p/v) e formaldeído 37% 0,75µL/mL) por 10 min. ao abrigo da luz, lavado novamente, com água deionizada, incubado com solução reveladora (Na_2CO_3 6% p/v, formaldeído 37% 0,5µL/mL e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,0004% p/v) até as bandas ficarem bem visíveis e a reação foi parada com solução inativadora (metanol 50% v/v, ácido acético 12% v/v). O gel foi embebido na solução de metanol 50% (v/v) e fotografado com auxílio de um scanner.

III.8- Estudo do aumento da permeabilidade vascular:

A permeabilidade vascular foi determinada de acordo com o método descrito por MILES, 1952; modificado por UDAKA *et.al.*, 1970; WEDMORE e WILLIAMS, 1981 e SENGGER *et.al.*, 1990.

Os animais (coelhos machos de linhagem *Albino*, pesando entre 2,5 e 2,8 kg), fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP, foram previamente anestesiados com Tionembutal (i.v.) (25µg/mL) e posteriormente depilados no dorso, o qual foi dividido em quadrantes, para separar os sítios de reação após injeção dos diferentes materiais a serem analisados: soro, picos cromatográficos e salina (NaCl 0,9%), como controle negativo, de forma subcutânea.

-MATERIAIS E MÉTODOS-

Após aplicação do anestésico, foi injetado também via intravenosa o corante Azul de Evans (15mg/kg), seguido de 5mL de salina (NaCl 0,9% p/v).

Em quadrantes separados foram injetados de forma subcutânea, 0,2; 0,1 e 0,05 mL de salina ou das soluções do material a ser ensaiado. Após 30 minutos das injeções os animais foram sacrificados por guilhotinamento, para remoção da pele do dorso. Esta pele é armazenada à -20°C, por 24 horas de forma a facilitar o corte padronizado, de uma área circular ao redor do local de aplicação de cada amostra, utilizando-se de um *punch* com 2,5 cm de diâmetro. Os cortes removidos foram embebidos em 3 mL de formamida e após um período de 72 h de armazenamento, sob refrigeração (4° C), o sobrenadante foi submetido à leitura espectrofotométrica em 620 nm, com auxílio de um espectrofotômetro Hitachi U-2000. O valor obtido, foi comparado a uma curva padrão do corante obtida a partir do soro do animal, coletado durante o sacrifício, e descrita a seguir.

Figura 3: Estudo da permeabilidade vascular. 1: Aplicação do corante Azul de Evans (i.v.) seguido de salina; 2: Conjuntiva do animal azulada demonstrando a correta aplicação do corante; 3: Aplicação subcutânea do material e salina; 4: Visualização superior do dorso da animal dividido em quadrantes proporcionais.

III.9- Dosagem do corante (curva padrão):

A fim de se construir uma curva padrão para dosagem do corante na corrente sanguínea para cada animal, foram coletadas amostras de sangue, no momento dos sacrifícios. O sangue foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, a fim de se obter o soro.

A curva foi feita adicionando-se exatamente 10, 25, 50 e 100 μL do soro em 3 mL de formamida. Este material foi deixado juntamente com o material extraído da pele do coelho por 72h sob refrigeração (4°C). A absorvância foi determinada em 620 nm em espectrofotômetro Hitachi U-2000.

-MATERIAIS E MÉTODOS-

O gráfico foi construído (curva padrão) pelo programa *Windows Excel 2000* que relaciona volumes conhecidos do corante no soro do animal, com suas respectivas absorvâncias, o que permitiu a determinação do volume de corante extravasado a partir do leito vascular, devido à atividade do material testado.

III.10- Teste de atividade angiogênica na MCA:

O material, previamente liofilizado, obtido a partir das cromatografias em DEAE – celulose (picos I, II e III), CM – celulose (CM-I.1, CM-I.2 e CM-I.3), assim como o soro, foram dissolvidos em água destilada estéril na concentração de 2.5µg/µL, homogeneizados, filtrados e esterilizados em Filtros Millex® 0,22 µm. Esta solução foi armazenada em recipientes estéreis à -20°C, até o momento de sua utilização.

Em um estudo piloto, foram testadas as atividades referentes aos volumes de 1,5 e 3 µL das soluções (2,5 µg/µL) preparadas a partir do soro, pico I, pico II e pico III.

Nas análises seguintes, devido aos resultados apresentados no estudo piloto, foi utilizado somente o volume de 3µL das soluções teste, de forma a se avaliar a atividade angiogênica referente a 7,5 µg do material.

Utilizou-se de papel de filtro Whatmman cortado na forma de discos circulares com 0,5 cm de diâmetro e esterilizados, como veículo na deposição do material de estudo.

Para se estudar a atividade angiogênica apresentada pelo material foi utilizado o teste na MCA de embriões de galinha conforme descrito por WILTING *et.al.* (1991).

-MATERIAIS E MÉTODOS-

Os ovos de galinha (*Gallus domesticus*) linhagem Rhoss, adquiridos junto à Empresa Pena Branca (São Carlos – SP), foram incubados em estufa automática produzida pela Brasmatic Ind. e Com. LTDA, com controle de temperatura (38 °C) e umidade (65%), e deslocados lateralmente a cada 15 minutos, durante os 5 primeiros dias de incubação. Ao final deste prazo, os ovos foram submetidos à abertura circular (1,0 cm de diâmetro) em sua base maior, onde está localizada a câmara de ar, com auxílio de uma micro-retífica marca Dremel (Figura 4).

Após a realização da abertura, utilizando-se de seringa e salina estéreis, depositou-se uma gota de salina (NaCl 0,9% p/v) de forma a auxiliar na retirada da membrana da casca, expondo a MCA já vascularizada. A abertura, então, foi vedada com fita crepe e o ovo novamente incubado, porém, sem agitação periódica e com a base furada voltada para cima.

Ao final do 13º dia de incubação, os discos de papel de filtro, veiculando 3 µL da solução a ser testada, ou água destilada (controle negativo), foram depositados diretamente sobre a membrana de forma cuidadosa e estéril. O ovo voltou a incubação até o 16º dia, quando foram retirados da incubadora. Em seguida, as MCAs foram fixadas em solução de formol (3,7 % v/v) por 5 min. e retiradas do embrião. As MCAs, desta forma, foram fotografadas sobre um fundo branco, em tamanho 640X480 pixels e formato de RGB 24 bites, padronizados, com auxílio de uma câmera CCD-Iris Sony modelo DXC-107 A, adaptada a uma lupa de aumento máximo 10 X (Figura 4) e conectada a um computador equipado com uma placa de aquisição de imagens marca PIXEL VIEW, utilizando-se do software "Pixel View Station v4.29 TV" para captura da imagem.

Figura 4: Estudo da angiogênese na MCA: A: Lupa com a câmara CCD-Iris Sony adaptada, utilizados para captura das imagens das MCAs; B- Ovo perfurado em sua base maior, já contendo o disco de papel de filtro, veículo do material a ser testado; C- Aspecto da MCA no 16º dia de incubação (membrana transparente, vascularizada, que separa o embrião do meio externo).

A imagem digitalizada foi processada pelo programa GIMP 1.2.4 de forma que a saturação, brilho e contraste permitam uma melhor resolução dos vasos sanguíneos. A análise desta imagem foi realizada com auxílio do programa ImageJ versão 1.28u capaz de separar intervalos de níveis de intensidade e desta forma isolar e quantificar os pixels correspondentes aos vasos sanguíneos. A quantidade de pixels selecionados é proporcional ao nível de vascularização do campo de imagem capturada.

Assim, obteve-se um padrão de comparação da atividade angiogênica do soro e do material cromatografado, com o controle negativo, onde foi colocado somente o papel de filtro veiculando 3 μ l de água destilada.

III.11- Histologia da MCA:

As MCAs, após terem sido fixadas em formaldeído 3,7% (v/v), retiradas do ovo e fotografadas contra um fundo branco, seguiram pelo processo de desidratação e inclusão em parafina. Este material foi seccionado em micrótomo Spencer a 6 μ m de espessura. Em seguida, foi corado pela Hematoxilina-Eosina, segundo técnica clássica padronizada.

O material foi observado em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E800 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY), e as imagens adquiridas com o auxílio de uma câmera digital Nikon DXM1200 (Nikon Instruments Inc.), acoplada ao microscópio.

RESULTADOS

IV- RESULTADOS:

IV.1- Cromatografia em DEAE-celulose:

Em uma primeira etapa de purificação do material extraído do látex (soro), foi utilizada cromatografia em resina de DEAE-celulose. Esta resina possui a característica de comportar-se como uma trocadora aniônica, separando os diferentes componentes presentes no material de acordo com suas propriedades elétricas, quanto mais cargas negativas possuírem as moléculas, maior o tempo de eluição, pois maior a concentração salina necessária para a liberação desta molécula da resina. Uma outra característica importante desta resina é sua alta capacidade de processamento de material, isto se dá devido à sua característica física, apresentando cargas positivas que atraem as moléculas carregadas negativamente no pH 9,0 utilizado, enquanto as moléculas neutras e positivas, neste valor de pH, são rapidamente eluídas. Isto permite a utilização de um maior volume de solução, sendo o principal fator limitante, a quantidade total de proteínas presentes nesta solução.

Assim, foi preparada uma solução contendo o soro extraído do látex não centrifugado da seringueira *Hevea brasiliensis*, conforme descrito em materiais e métodos. Esta solução teve a quantidade de proteínas determinada pelo método de LOWRY (1951) modificado por HARTREE (1972), sendo a concentração média destas soluções 0,36 mg/mL o que corresponde a um total de 720 mg de proteína aplicados na coluna.

-RESULTADOS-

Após completa eluição do material e acompanhamento do perfil por leitura espectrofotométrica em 280 nm, obteve-se o seguinte perfil cromatográfico (Figura 5).

Figura 5: Cromatograma em DEAE-celulose. Perfil cromatográfico do soro do látex PH 9,0 em coluna DEAE-celulose (5,0 X 50,0cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01M. A eluição foi realizada em gradiente descontínuo e crescente de NaCl empregando-se um fluxo de 7 ml/min. O eluato foi monitorado em 280 nm. As frações foram designadas de pico I, pico II e pico III, dialisadas contra água destilada, liofilizadas e armazenadas à -20°C para posterior análise de atividade.

IV.2- Cromatografia em CM-celulose:

Em uma segunda etapa de purificação, após a realização dos testes de atividade de aumento da permeabilidade vascular, o pico mais ativo, obtido a partir da cromatografia em DEAE-celulose (pico I), foi submetido à purificação em CM-celulose. Nesta resina, trocadora de cátions, esperava-se que, em um pH menor ($\text{pH}=7,5$), as moléculas carregadas positivamente ficassem retidas na resina, retardando sua eluição. Assim, o material foi preparado conforme descrito no

-RESULTADOS-

capítulo de materiais e métodos, e o seguinte perfil cromatográfico foi obtido (Figura 6).

Figura 6: Cromatograma em CM-celulose. Perfil cromatográfico do pico I da DEAE-celulose, processado em coluna de CM-celulose (2X50cm) equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01M, pH 7,5. A eluição foi realizada em gradiente descontinuo e crescente de NH_4HCO_3 empregando-se um fluxo de 42mL/h. O eluato foi monitorado em 280 nm. As frações, designadas de CM-I.1, CM-I.2 e CM-I.3 foram dialisadas contra água destilada, liofilizadas e armazenadas à -20°C para posterior análise de atividade biológica.

IV.3- Estudo do aumento da permeabilidade vascular:

1. Caracterização do material extraído do látex (soro):

Com o objetivo de caracterizar a composição do material ativo presente no soro, foi preparada uma solução dissolvendo-se 12 mg do soro, previamente liofilizado, em 10 mL de salina (NaCl 0,9% p/v). Esta solução foi homogeneizada até completa dissolução do material e em seguida, submetida a centrifugação (5000 rpm/ 5 min.). Esta solução foi alíquotizada em três grupos que foram submetidos a tratamentos como descrito a seguir:

Grupo I: Soro em solução sem tratamento;

Grupo II: Soro em solução submetido a fervura à 100°C por 1 hora;

Grupo III: Soro em solução tratado com Proteinase K (200 μL à 0.32 mg/mL);

-RESULTADOS-

E grupos controle:

Grupo IV: Salina (NaCl 0,9% p/v);

Grupo V: Salina adicionada de Proteinase K (200 μ L à 0.32mg/mL).

A concentração protéica do material a ser testado, determinada pelo método de LOWRY (1951) modificado por HARTREE (1972), foi de 1.1 mg/mL, sendo testado em três volumes/animal (0.2; 0.1 e 0.05 mL) conforme descrito em materiais e métodos.

O resultado deste estudo, é expresso em microlitros de corante extravasado por miligramas de proteínas, e para a análise estatística realizada foi utilizado ANOVA de uma via pelo método de múltiplas comparações *versus* grupo controle (Método de Dunnett's) sendo apresentado no seguinte gráfico (Figura 7).

O gráfico apresenta a atividade relativa referente a cada grupo, de acordo com a concentração protéica. Observa-se uma maior atividade, tanto no grupo I, quanto nos grupos II e III, em relação aos grupos controles, porém, a atividade relativa, diminui do grupo I (soro sem qualquer tipo de tratamento desnaturante), para os grupos II (soro fervido) e III (soro submetido à atividade proteolítica).

-RESULTADOS-

Figura 7: Estudo da identidade química do(s) componente(s) ativo(s) do soro. As amostras correspondem à: **Grupo I:** Soro em solução sem tratamento; **Grupo II:** Soro em solução submetido a fervura à 100° C por 1 hora,; **Grupo III:** Soro em solução tratado com Proteinase K (200 µL à 0.32mg/mL), e grupos controle: **Grupo IV:** Salina (NaCl 0,9% p/v); **Grupo V:** Salina adicionada de Proteinase K (200 µL à 0.32mg/mL). (* = $p < 0,05$).

2. Estudo da atividade dos picos I, II e III obtidos a partir da DEAE-celulose:

As frações obtidas a partir da primeira etapa de purificação em DEAE-celulose foram dissolvidas na concentração de 20 mg/mL em salina (NaCl 0.9%p/v). Estas soluções tiveram seu conteúdo protéico determinado pelo de método de LOWRY (1951) modificado por HARTREE (1972), e assim formaram-se os seguintes grupos de estudo:

- 1) : Pico I (DEAE) dissolvido em salina (0.54mg proteína/mL solução);
- 2) : Pico II (DEAE) dissolvido em salina (3.53mg proteína/mL solução);
- 3) : Pico III (DEAE) dissolvido em salina (4.17mg de proteína/mL solução);
- 4) : Salina (NaCl 0.9% p/v) – controle negativo.

-RESULTADOS-

O resultado deste estudo, é expresso em microlitros de corante extravasado por miligramas de proteínas, e para a análise estatística realizada foi utilizado ANOVA de uma via pelo método de múltiplas comparações *versus* grupo controle (Método de Dunnett's), apresentado no seguinte gráfico (Figura 8).

O gráfico demonstra a maior atividade relativa apresentada pelo Pico I, quando comparada ao Pico II e Pico III. Estes últimos, também mostram-se capazes de aumentar a permeabilidade vascular, porém de forma não significativa ($p > 0,05$).

Figura 8: Estudo da atividade na permeabilidade vascular das frações obtidas da cromatografia em DEAE-celulose. As amostras correspondem à: 1) Pico I em solução (0.535mg de proteína/mL solução); 2) Pico II em solução (3.53 mg de proteína/mL de solução); 3) Pico III em solução (4.17mg de proteína/mL de solução) e 4) Salina (NaCl 0,9% p/v) (* = $p < 0,05$).

-RESULTADOS-**3. Estudo da atividade dos picos (CM-I.1, CM-I.2 e CM-I.3) obtidos a partir da CM-celulose:**

As frações obtidas a partir da segunda etapa de purificação em CM-celulose (purificação do Pico I – DEAE) foram dissolvidas na concentração de 1mg/mL em salina (NaCl 0.9% p/v). Estas soluções tiveram seu conteúdo protéico determinado pelo método de LOWRY (1951) modificado por HARTREE (1972), e assim formaram-se os seguintes grupos de estudo:

- 1) : CM-I.1 dissolvido em salina (0.58mg proteína/mL solução);
- 2) : CM-I.2 dissolvido em salina (0.55mg proteína/mL solução);
- 3) : CM-I.3 dissolvido em salina (0.53mg proteína/mL solução);
- 4) : Salina (NaCl 0.9% p/v) –Controle Negativo.

O resultado deste estudo, é expresso em microlitros de corante extravasado por miligramas de proteínas, e para a análise estatística realizada foi utilizado ANOVA de uma via pelo método de múltiplas comparações *versus* grupo controle (Método de Dunnett's), sendo apresentado no seguinte gráfico (Figura 10).

O gráfico demonstra a maior atividade relativa apresentada pelas frações CM-I.1, CM-I.2 e CM-I.3 com diferenças não significativas entre elas. Este gráfico não permite identificar qual das frações possui maior atividade, nem concluir sobre a eficiência desta etapa de purificação.

-RESULTADOS-

Figura 9: Estudo da atividade na permeabilidade vascular das frações obtidas da cromatografia em CM-celulose. As amostras correspondem à: 1) CM-I.1 em solução (0.58mg de proteínas/mL de solução); 2) CM-I.2 em solução (0.55mg de proteínas/mL de solução); 3) CM-I.3 em solução (0.53mg de proteínas/mL de solução) e 4) Salina (NaCl 0,9% p/v).

IV.4- Estudo da atividade angiogênica na MCA:

1. Atividade do soro e dos picos I, II e III obtidos a partir da DEAE-celulose:

O material, soro e frações obtidas a partir da cromatografia em DEAE-celulose foram dissolvidos na proporção de 2,5 mg do material (soro e Picos I, II e III), previamente liofilizados, para cada mL de água destilada, segundo descrito em materiais e métodos. Desta forma, 3 μL de cada solução apresentando as seguintes concentrações protéicas: 1) Soro: 0.23 mg/mL; 2) Pico I: 0.07 mg/mL; 3) Pico II: 0.44mg/mL e 4) Pico III: 0.52 mg/mL; foram aplicados, através dos discos de papel, sobre a MCA, assim como o controle negativo (água destilada).

-RESULTADOS-

O resultado é apresentado nas fotografias retiradas da MCA, as quais apresentaram um aumento na vascularização, em comparação ao controle (água destilada), tanto do soro, quanto do Pico I e II obtidos a partir da DEAE-celulose (Figura 10).

As fotografias apresentadas na Figura 10 demonstram os padrões de vascularização das MCAs, obtidos com o ensaio do veículo controle (água destilada), soro e dos picos I, II e III. Observa-se uma maior vascularização referentes ao soro, e picos I e II, quando comparados ao controle. O pico III apresentou um discreto aumento da vascularização em relação ao controle. A fotografia apresentada na Figura 10-F é o resultado do processamento da fotografia (Figura 10-E).

Para se quantificar este aumento, processou-se a imagem através do programa GIMP 1.2.4 de forma que a saturação, brilho e contraste permitam uma melhor visualização dos vasos sanguíneos (Figura 10-F). A análise desta imagem foi realizada com auxílio do programa ImageJ versão 1.28u capaz de separar intervalos de níveis de intensidade e desta forma isolar e quantificar os pixels correspondentes aos vasos sanguíneos. A quantidade de pixels selecionados é proporcional ao nível de vascularização do campo de imagem capturada.

Figura 10: Atividade angiogênica das frações (DEAE-celulose), soro e controle na MCA. A: Controle negativo (Água Destilada); B: Atividade do soro (0,69 μ g de proteína); C: Atividade do pico I (0,21 μ g de proteína); D: Atividade do pico II (1,32 μ g de proteína); E: Atividade do Pico III (1,56 μ g de proteína) e F: Imagem E processada para quantificação dos vasos sanguíneos. Em cada ensaio foi utilizado 3 μ L da solução preparada na concentração de 2,5 mg/mL de cada material em água destilada, veiculada em discos de papel de filtro.

-RESULTADOS-

A quantificação está representada nos seguintes gráficos (Figura 11 e 12) que apresenta o resultado da análise da atividade absoluta seguida pela análise da atividade relativa.

No gráfico apresentado na Figura 11, os resultados são apresentados como a média e a variação da população de dados obtidos. Esta é uma análise absoluta e comparativa da quantidade de vasos sanguíneos apresentada nas MCAs controle e testes, demonstrando uma atividade angiogênica tanto do soro, quanto dos picos I e II. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via, pelo método de múltipla comparações *versus* grupo controle (Método de Dunnett's).

Figura 11: Quantificação absoluta da atividade angiogênica das frações e do soro na MCA. Após processamento e análise das imagens, os vasos sanguíneos são quantificados pela contagem dos pixels. (* = $p < 0,05$).

A quantificação da atividade relativa, levando-se em conta a concentração protéica do material a ser testado na MCA é apresentada no gráfico seguinte (Figura 12). De cada resultado teste, foi subtraído o valor da média do grupo controle. O resultado é expresso em pixels/ μ g de proteínas testadas e demonstra uma maior

-RESULTADOS-

atividade de indução de angiogênese relativa apresentada pelo pico I em relação aos demais, assim como, em relação ao soro. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student.

Figura 12: Quantificação relativa da atividade angiogênica das frações e do soro na MCA. Este resultado leva em conta a concentração de proteínas presente nas amostras testadas (* = $p < 0,05$).

2. Histologia das MCAs resultantes da estimulação angiogênica pelos picos I, II e III, soro e controle:

Com o objetivo de analisar as alterações histológicas apresentadas pelas MCAs submetidas à atividade do material testado: soro, picos I, II e III, e controle negativo (água destilada), a histologia da MCA foi realizada conforme descrita em materiais e métodos.

O material foi observado em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E800 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY), e as imagens foram adquiridas com o auxílio de uma câmera digital Nikon DXM1200 (Nikon Instruments Inc.), acoplada ao microscópio.

-RESULTADOS-

As fotomicrografias das MCAs tratadas com: controle negativo, soro, pico I, pico II e pico III são apresentadas (Figura 13), em 3 aumentos (44, 88 e 254 X) possibilitando uma observação comparativa tanto da espessura, como das alterações morfológicas e celulares apresentadas nas três camadas constitutivas.

Estes resultados demonstram uma maior vascularização obtida nos ensaios do soro e picos I e II enquanto o padrão de vascularização do pico III obtido, foi similar ao do controle. A espessura das MCAs analisadas mostra-se aumentada no soro e no pico I, não alterando nos picos II e III.

O crescimento vascular ocorreu, principalmente, na camada ectodérmica da MCA e em menor quantidade na camada mesenquimal.

-RESULTADOS-

FIGURA 13: Cortes histológicos da MCA corados por HE. A,B e C: Controle negativo (água destilada); D,E e F: Soro (0,69 µg de proteína); G,H e I: Pico I (0,21 µg de proteína); J, L e M: Pico II (1,32 µg de proteína) e N, O e P: Pico III (1,56 µg de proteína). As setas indicam vasos sanguíneos presentes; ec: ectoderma; en: endoderma; ms: mesênquima.

-RESULTADOS-

IV.5- Análise eletroforética em gel de poliacrilamida do soro e picos I, II e III:

O material obtido a partir do látex natural (soro), assim como os picos I, II e III obtidos da purificação em DEAE-celulose foram submetidos a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida na ausência de SDS e 2-mercaptoetanol, conforme descrito em materiais e métodos. Foi obtido o seguinte perfil eletroforético (Figura 14).

Figura 14: Perfil eletroforético do soro, pico I, II e III em PAGE. os materiais foram processados em duas concentrações distintas. O gel foi corado com prata conforme descrito em materiais e métodos.

Para detecção da banda angiogênica, os géis foram confeccionados e processados como descrito. O gel foi cortado ao meio e metade foi corada enquanto a outra metade foi seccionada, com auxílio de um papel milimetrado em pedaços de 0,5/0,5 cm, os quais foram testados diretamente sobre a MCA. Porém este ensaio

-RESULTADOS-

não permitiu concluir sobre qual seria a banda angiogênica visto que o gel apresentou alto grau de toxicidade, matando os embriões.

IV.6- Análise eletroforética em SDS-PAGE do pico I (DEAE-celulose) e dos picos CM-I.1; CM-I.2 e CM-I.3 (CM-celulose):

Como forma de se analisar o peso molecular dos componentes protéicos presentes no Pico I (DEAE-celulose) assim como das frações obtidas da cromatografia em CM-celulose (CM-I.1; CM-I.2 e CM-I.3), este material foi submetido a corrida eletroforética em SDS-PAGE, conforme em materiais e métodos. Utilizando-se dos padrões de peso molecular: Ovoalbumina (44 KDa); Anidrase Carbônica (31 KDa); RNase (13,7 KDa) e Citocromo C (12,38 KDa). Foi obtido o seguinte perfil eletroforético (Figura 15).

Não se pode especificar qual das bandas protéicas é responsável pela atividade angiogênica do material, e por isso nada é possível concluir, a respeito do peso molecular desta proteína.

-RESULTADOS-

Figura 15: Perfil eletroforético em SDS-PAGE do pico I e dos picos CM-I.1, CM-I.2 e CM-I.3.
 Como padrões de peso molecular foram utilizados as seguintes substâncias: Ovalbumina (44 KDa);
 Anidrase Carbônica (31 KDa); Citocromo C (12,38 KDa) e Aprotinina (6,5 KDa).

DISCUSSÃO

-Discussão-

V- DISCUSSÃO:

A compreensão do processo de reparo no organismo é de grande importância na busca de substâncias que possam favorecer a restauração tecidual de maneira rápida e adequada. De todas as fases e eventos observados no processo de reparo tecidual, a angiogênese parece comportar-se como uma variável limitante para a resolução da lesão, sendo, para alguns, considerada condição essencial para este processo (ARNOLD & WEST, 1991).

Com este objetivo, neste trabalho, foi realizado a caracterização bioquímica dos componentes ativos do soro extraído do látex da seringueira *Hevea brasiliensis*, que vêm demonstrando possuir atividades angiogênicas e indutoras da cicatrização, através do uso de membranas manufaturadas no laboratório de neuroquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -USP (FRADE *et al.* , 2001e FRADE, 2003).

Num primeiro instante, foi necessário determinar a natureza química do material ativo extraído do látex natural da seringueira. Estudos preliminares realizados com a biomembrana confeccionada a partir do látex natural, por MRUÉ (2000), demonstraram que esta, perdia a atividade angiogênica quando era aquecida à 110 °C por uma hora e após incubação com a enzima proteinase K, sugerindo que a atividade angiogênica poderia ser mediada por uma proteína. FRADE (2001 e 2003), através de observações clínicas, relatou a perda da atividade deste material, quando o mesmo era exposto à altas temperaturas de secagem (>100° C). Estas observações sugerem uma natureza protéica do componente ativo presente no material. Porém, existia a necessidade de se caracterizar, através de procedimentos adequados, a(s) real(is) identidade(s) química(s) do(s) composto(s) ativo(s) presente(s) no látex.

-Discussão-

Escolheu-se como métodos de estudo da atividade do material o teste de Miles (permeabilidade vascular) e a indução da angiogênese na MCA. Tanto o teste de Miles, quanto o ensaio de indução angiogênica na MCA constituem-se de métodos de baixo custo, de fácil implantação na rotina laboratorial e de grande eficiência na análise, tanto do aumento da permeabilidade vascular, quanto da atividade angiogênica, caracterizando os materiais testados conforme sua ação *in vivo*.

O ensaio da membrana cório-alantóidea em ovos de galinha já vem sendo usado há muito tempo, como um ensaio de atividade angiogênica *in vivo*. Investigações prévias têm demonstrado que muitos materiais, incluindo alguns usados no ensaio de angiogênese, não são biologicamente inertes e possuem, por si próprios, atividade angiogênica. (JAKOB *et.al.* 1978). Por exemplo, fragmentos de casca do ovo ocasionalmente podem produzir uma reação inflamatória, levando a uma resposta angiogênica na MCA (FOLKMAN, 1985). Desta forma, muito cuidado no manejo experimental é necessário de forma a se evitar reações inespecíficas que possam provocar uma resposta "falso positivo".

No ensaio da MCA, a densa rede vascular da membrana respiratória do embrião da galinha é usada como uma região sensível à estímulos angiogênicos e anti-angiogênicos. A MCA consiste de três camadas: a *camada ectodérmica*, mais externa e que exhibe um denso plexo de capilares sanguíneos a partir do 12º dia de desenvolvimento; a *camada mesenquimal*, intermediária, contendo as grandes veias e artérias; e uma *camada endodérmica* mais interna, ausente de vasos sanguíneos (AUSPRUNK *et.al.*, 1974; OLIVO *et.al.*, 1992).

Para este estudo, separou-se, por meio da coagulação da borracha com a redução do pH, o látex natural em duas fases: 1- Polímeros constituídos de poli-

-Discussão-

isoprenóides (borracha) e 2- Fase aquosa contendo todos os componentes hidrossolúveis do látex (proteínas, carotenóides, carboidratos, pigmentos, etc.). Este extrato hidrossolúvel, denominado "soro", passou a ser o objeto de estudo da atividade cicatrizante apresentada no látex, haja visto que nesta fase encontrava-se maior concentração de proteínas.

Desta forma, a caracterização da perda da atividade do material por processos desnaturantes foi realizada através do processamento do soro (fervura e ação de proteases) verificando a sua capacidade de aumentar a permeabilidade vascular pelo teste de Miles. Ao tratar o soro com protease (proteínase K), ou submetê-lo à fervura, dois tratamentos padrões de desnaturamento de proteínas, observou-se uma redução da atividade de aumento da permeabilidade vascular, principalmente, para o material tratado com protease (Figura 7). Apesar do resultado não apresentar uma perda completa da atividade por desnaturação, deve ser ressaltado que o soro, além de proteínas, possui diversas biomoléculas que podem apresentar atividade vasodilatadora direta ou indireta, ou mesmo, capacidade de aumentar a permeabilidade vascular. Assim, uma redução significativa desta atividade como aconteceu entre o grupo I (soro sem tratamento) e os grupos II (soro fervido) e III (soro tratado com protease) poderia estar indicando que uma parte da atividade de aumento da permeabilidade vascular pode ser induzida por proteína(s) presente(s) no material (Figura 7).

Muitas substâncias já foram identificadas como indutores do aumento da permeabilidade vascular e angiogênica, incluindo o VEGF, TGF- β , angiogenina, angiotropina, angiopoetina-1 e trombospondina (DVORAK *et.al.*, 1995; FERRARA, 2001; FOLKMAN & D'AMORE, 1996). A maioria destas substâncias apresenta

-Discussão-

identidade protéica, constituindo-se de polipeptídeos de diversos tamanhos e pesos moleculares.

A identidade protéica do(s) componente(s) ativo(s) no látex pode sugerir uma possível homologia funcional entre esta(s) substância(s) e fatores de crescimento já muito estudados e descritos na literatura científica, como VEGF, TGF- α , FGF dentre outros. Além disso, quando se observa atentamente o processo de coleta do látex, na planta (*Hevea brasiliensis*), ocorrem eventos semelhantes aos que são descritos durante o processo de reparo de lesões. Ou seja, no ato da coleta do látex, há a necessidade de se realizar incisões através do floema da planta, lesionando o tecido vegetal. O látex, extraído desta forma, é composto pelo conteúdo citoplasmático de células laticíferas que formam vasos especializados organizados ao redor do floema (KUSH *et.al.*, 1990). Este fluido, denominado látex natural apresenta a função principal de estancar a perda da seiva, isolando o tecido lesado do ambiente e iniciando o processo de restauração do tecido vegetal lesado.

Para análise sobre esta possível homologia funcional, assim como para um completo estudo sobre o mecanismo de ação pelo qual age(m) esta(s) substância(s) ativa(s), é necessário o processamento deste material por consecutivas etapas de purificação de proteínas, até que se obtenha(m) a(s) molécula(s), em sua(s) forma(s) isolada(s), responsável(is) pela atividade cicatrizante do látex.

Com este objetivo, iniciou-se o processamento cromatográfico do soro, no sentido de se isolar este(s) componente(s), caracterizá-lo(s) biologicamente de acordo com sua(s) atividade(s) e estudar sobre sua(s) possível(is) homologia(s) com outros fatores de crescimento já descritos.

-Discussão-

Em uma primeira etapa de purificação, foram realizadas cromatografias em resina de DEAE-celulose em meio básico (pH 9,0), utilizando-se de tampão volátil (bicarbonato de amônio), na qual obtivemos um perfil cromatográfico apresentando três picos (Figura 5).

Os picos após diálise contra água destilada e liofilização, tiveram suas capacidades de aumentar a permeabilidade vascular e induzir a angiogênese estudados por meio dos ensaios descritos: 1- Teste de Miles, que pela quantificação do corante extravasado para o tecido onde foi aplicado o material teste, permite a identificação de substâncias capazes de aumentar a permeabilidade microvascular (SENGER *et.al.*, 1990; BATES & HARPER, 2003) e 2- Teste da MCA, que quantifica a angiogênese induzida pelo material diretamente na MCA de embriões de galinha (*Galus domesticus*).

Estes ensaios apresentam-se como uma análise individualizada de etapas importantes que compõem o processo cicatricial. No processo de reparo de lesões o aumento da permeabilidade vascular é necessário para permitir que as células de defesa sanguíneas, assim como substâncias produzidas pelas mesmas, alcancem o tecido lesado, onde agirão, seja por estimulação mitogênica, seja modificando o nível de expressão de proteínas ou outras mais. Além disso, a hiperpermeabilidade microvascular possui uma importante função no processo de angiogênese, visto que as proteínas plasmáticas que extravasam, principalmente fibrinogênio e a fibronectina, dão origem à matriz extracelular provisória, necessária à migração das células endoteliais e fibroblastos para a formação do vaso (FERRARA, 1995). A angiogênese por si só, permite um maior fornecimento de oxigênio e nutrientes necessários ao tecido lesado, devido ao alto metabolismo encontrado durante o processo de cicatrização.

-Discussão-

Os picos obtidos a partir da cromatografia em DEAE-celulose, foram testados quanto à suas capacidades de aumentar a permeabilidade vascular e induzir a angiogênese. Pelos gráficos apresentados em resultados (Figura 8, 10, 11 e 12), observamos uma maior atividade apresentada pelo pico I enquanto os picos II e III se mostram inativos.

Os resultados do estudo do aumento da permeabilidade vascular indicaram uma maior atividade apresentada pelo pico I em relação ao pico II e III, e também em relação ao soro. A quantificação da atividade de aumentar a permeabilidade vascular do soro pode ser observada nos dados fornecidos pelo gráfico demonstrado na Figura 7. Enquanto o soro possui uma atividade relativa de aproximadamente $140 \mu\text{L}/\text{mg} \pm 60$, o pico I apresenta uma atividade de aumento da permeabilidade vascular de, aproximadamente $205 \mu\text{L}/\text{mg} \pm 90$. Este dado indica uma eficiência no processo de purificação do(s) componente(s) capaz(es) de aumentar a permeabilidade vascular, presente no soro.

Quanto aos ensaios de quantificação da angiogênese induzida na MCA de embriões de galinha, de forma semelhante, o Pico I se mostrou o mais ativo quando analisado pela sua atividade relativa (Figura 12). Após o tratamento da MCA com o material a ser testado, conforme descrito em materiais e métodos, a imagem desta membrana foi capturada utilizando-se do software "Pixel View Station v4.29 TV" e o processamento e análise dos dados realizados com auxílio do programa GIMP 1.2.4 e do programa ImageJ versão 1.28u. A quantificação dos vasos sanguíneos era expressa em pixels correspondentes à cor dos vasos. Esta quantificação, de forma absoluta, foi significativamente maior no soro, Pico I e Pico II, sendo esta última, a fração que apresentou maior atividade absoluta. Quando estes dados foram transformados em atividade específica, levando-se em conta a concentração

-Discussão-

protéica presente no veículo e subtraindo-se a média da atividade apresentada pelo controle, observamos uma grande atividade por microgramas de proteína, presente no Pico I. Uma atividade específica maior que a encontrada no soro, evidenciando-se, novamente uma maior purificação do(s) material(is) indutor(es) da angiogênese da ordem de três a quatro vezes.

Os materiais dos picos I, II e III foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições não desnaturantes, como forma de se analisar a eficiência do processo de purificação. O perfil eletroforético demonstrou a eficiência cromatográfica na resina DEAE-celulose e a presença, no Pico I, de pelo menos, três proteínas diferentes.

De forma alternativa, o reconhecimento da fração com atividade angiogênica diretamente no gel de eletroforese em poliacrilamida, foi tentado. As bandas foram recortadas e o gel colocado diretamente sobre a MCA. Todavia, este ensaio não se mostrou eficiente, visto que o gel de poliacrilamida apresentou alta toxicidade causando a morte prematura dos embriões.

O ensaio de indução de angiogênese na MCA demonstrou que o material extraído do látex natural, o soro, realmente apresenta atividade angiogênica conforme apresentado nos gráficos (Figuras 11 e 12) e visualizados nas fotografias da MCA (Figura 10).

A Figura 13 apresenta as fotomicrografias obtidas a partir das MCAs analisadas com relação à atividade angiogênica das diferentes frações (pico I, II e III, do soro, assim como do controle negativo). Estas imagens permitem uma análise mais detalhada sobre a ação diferencial destes materiais sobre as camadas constituintes da MCA: ectodérmica, mesenquimal e endodérmica.

-Discussão-

Neste estudo, observou-se um grande aumento no número de vasos, juntamente com um evidente espessamento da camada mesenquimal que compõe a MCA, principalmente nas membranas submetidas ao tratamento com o soro e com o pico I [Figura 13 (D,E,F e G,H,I)]. O aumento do número de vasos é semelhante ao que ocorre quando da aplicação do VEGF₁₆₅ na MCA, diferindo no fato de que o VEGF₁₆₅ não provoca o espessamento mesenquimal, com o aumento do depósito de matriz extracelular na MCA (WILTING *et.al.*, 1992).

O tratamento da MCA com o pico I, induziu a proliferação dos fibroblastos no espaço mesenquimal [Figura 13 (G,H e I)], que contrasta com os resultados obtidos nos ensaios do VEGF₁₆₅. Alguns fatores de crescimento, como o FGF- β e PDGF, apesar de não apresentarem atividade no aumento do número de vasos sanguíneos na MCA, mostram-se capazes de aumentar a espessura da membrana, por estimulação do aumento de deposição da matriz extracelular e/ou indução da proliferação de fibroblastos (WILTING *et.al.*, 1991 e WILTING *et.al.*, 1992).

A indução de numerosos capilares sanguíneos pelo pico I, ocorreu, principalmente, na membrana ectodérmica e no tecido mesenquimal vizinho enquanto os maiores vasos sanguíneos se encerram no estroma mesenquimal [Figura 13 (G, H e I)].

Outra alteração observada nas MCAs submetidas à atividade tanto do soro, quanto do pico I, foi o espessamento da parede endotelial dos grandes vasos sanguíneos [Figura 13 (G, H e I)]. Este processo está intimamente ligado à angiogênese, na formação da estrutura tubular dos novos vasos sanguíneos (FERRARA, 1995).

No segundo processo de purificação, utilizou-se da cromatografia em resina de CM-celulose (pH=7,5) para o processamento do pico I, que apresentou maior

-Discussão-

capacidade de aumentar a permeabilidade vascular e de indução da angiogênese. O objetivo era continuar o isolamento, baseado nas propriedades elétricas apresentada pelas diferentes proteínas em outro valor de pH. Com a realização deste procedimento, obteve-se três novas frações que também foram analisadas pelas suas atividades de aumento da permeabilidade vascular e indução angiogênica.

Nesta etapa de purificação e nas condições utilizadas, não se conseguiu uma boa eficiência de separação no processo, não se obtendo picos cromatográficos completamente separados uns dos outros (Figura 6). Além disso, a maior parte do material aplicado à coluna não apresentou afinidade pela resina, de forma que sua eluição ocorreu no "void".

O resultado das análises de atividade indicou a fração CM-I.2 como a mais ativa na capacidade de aumentar a permeabilidade vascular, porém tanto a fração CM-I.1, quanto a fração CM-I.3 se mostraram ativas em aumentar a permeabilidade vascular (Figura 6). Modificações no processo de purificação serão introduzidos no sentido de se obter o material com maior grau de pureza e atividade.

CONCLUSÕES

-CONCLUSÕES-**VI- CONCLUSÕES:**

Os resultados das análises do material extraído a partir do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* que apresenta atividade angiogênica e indutora do processo de cicatrização de feridas, levam as seguintes conclusões:

- O componente ativo presente no soro obtido a partir do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* constitui-se de uma proteína de peso molecular ainda não determinado;
- A etapa de purificação por cromatografia em DEAE-celulose teve sua eficiência comprovada, separando uma fração que apresenta atividade indutora de angiogênese e capacidade de aumentar a permeabilidade vascular;
- A análise do aumento da permeabilidade vascular pelo teste de Miles demonstrou uma maior atividade apresentada pelo pico I, obtido da cromatografia em DEAE-celulose, assim como pelo soro;
- A análise de indução de angiogênese diretamente na membrana cório-alantóidea demonstrou uma maior atividade apresentada pelo pico I, obtido da cromatografia em DEAE-celulose, assim como pelo soro;

-CONCLUSÕES-

- Os ensaios utilizados para analisar a atividade das frações obtidas de cada etapa de purificação apresentaram-se altamente eficazes no sentido de caracterizar esta atividade, além de mostrarem-se de fácil aplicação.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ARNOLD, F.; WEST, DC. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol. Ther.** 52(3). 407-22, 1991.

ASSOIAN, RK; KOMORIYA, A; MEYERS, CA; MILLER, DM; SPORN, MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. **J. Biol. Chem.** 258, 7155-60. 1983.

AUSPRUNK, DH; KNIGHTON, DR; FOLKMAN, J. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. **Dev. Biol.** 38(2), 237-48. 1974.

BAIRD, A; MORMEDE, P. Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage-derived growth factor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 126, 358-64. 1985.

BATES, DO; CURRY, FE. Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca^{+2} -dependent pathway. **Am. J. Physiol.** 273, 687-94. 1997.

BATES, DO; HARPER, SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factor. **Vascular Pharmacology.** 39, 225-37, 2003.

BATES, DO; LODWICK, D; WILLIAMS, B. Vascular endothelial growth factor and microvascular permeability. **Microcirculation.** 6(2), 83-96. 1999.

BEER, HD; FASSLER, R; WERNER, S. Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair. **Vitam. Horm.** 59, 217-39. 2000.

-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

BEER, HD; LONGAKER, MT; WERNER, S. Reduced expression of PDGF and PDGF receptors during impaired wound healing. **J. Invest. Dermatol.** 109, 132-38. 1997.

BEEZHOLD, DH; PERSONIUS, C. Fibronectin fragments stimulate tumor necrosis factor secretion by human monocytes. **Journal of leukocyte biolog.** 51(1), 59-64. 1992.

BERSE, B; BROWN, LF; VAN DE WATER, L; DVORAK, HF; SENGHER, DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. **Mol. Biol. Cell.** 3, 211-20. 1992.

BITAR, MS; LABBAD, ZN. Transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I in relation to diabetes-induced impairment of wound healing. **J. Surg. Res.** 61(1), 113-9. 1996.

BROOKS, PC; CLARK, RA; CHERESH, DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. **Science.** 264(5158), 569-71. 1994.

BROWN, LF; YEO, KT; BERSE, B; YEO, TK; SENGHER, DR; DVORAK, HF; VAN DE WATER, L. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. **J. Exp. Med.** 176(5), 1375-9. 1992.

CLARK, RA; QUINN, JH; WINN, HJ; LANIGAN, JM; DELLEPELLA, P; COLVIN, RB. Fibronectin is produced by blood vessels in response to injury. **J. Exp. Med.** 156(2), 646-51. 1982.

-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

CLARK, RAF. **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2 ed. N.Y., Plenum Press, 1996.

CONN, G; BAYNE, ML; SODERMAN, DD; KWOK, PW; SULLIVAN, KA; PALISI, TM; HOPE, DA; THOMAS, KA. Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 87, 2628-32. 1990.

DETMAR, M; BROWN, LF; BERSE, B; JACKMAN, RW; ELICKER, BM; DVORAK, HF; CLAFFEY, KP. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. **J. Invest. Dermatol.** 108(3), 263-8. 1997.

DVORAK, HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **J Clin Oncol.** 20(21), 4638-80. 2002.

DVORAK, HF; DETMAR, M; CLAFFEY, KP; NAGY, JA; VAN DE WATER, L; SENGGER, DR. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. **Int. Arch. Allergy Immunol.** 107(1-3), 233-5. 1995.

DVORAK, HF; NAGY, JA; FENG, D; BROWN, LF; DVORAK, AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 237, 97-132. 1999.

ESSER, S; WOLBURG, K; WOLBURG, H; BREIER, G; KURZCHALIA, T; RISAU, W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. **J. Cell. Biol.** 140, 947-59. 1998.

-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** 280(6), C1358-66. 2001.

FERRARA, N. The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. **Breast. Cancer Res. Treat.** 36(2), 127-37. 1995.

FERRARA, N; HENZEL, WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 161(2), 851-8.1989.

FOLKMAN, J. Toward an understanding of angiogenesis: search and discovery. **Perspect. Biol. Med.** 29(1), 10-36.1985.

FOLKMAN, J; D'AMORE, PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? **Cell.** 87, 1153-55, 1996.

FOLKMAN, J; KLAGSBRUN, M; SASSE, J; WADZINSKI, M; INGBER, D; VLODAVSKY, I. A heparin-binding angiogenic protein-basic fibroblast growth factor- is stored within basement membrane. **Am. J. Pathol.** 130, 393-400. 1988.

FOLKMAN, J; SHING, T. Angiogenesis, **J. Biol. Chem.**, 267, 10931-34, 1992.

FOLKMAN, J. In: DE VITA, V; HELLMAN, S; ROSEMBERG, SA. **Biologic Therapy of Cancer**, J.B.Lippincott Co., Philadelphia, 1991.p. 743-53.

FRADE, MAC. **Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico do reparo tecidual na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis***. 2003. 164f. Tese (doutorado em medicina) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

FRADE, MAC; VALVERDE, RV; ASSIS, RVC; COUTINHO-NETTO, J; FOSS, NT. Chronic flebophatic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **Intern. J. Dermatol.** 40, 237-240. 2001.

FRANK, S; HUBNER, G; BREIER, G; LONGAKER, MT; GREENHALGH, DG; WERNER, S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. **J. Biol. Chem.** 270(21), 2607-13. 1995.

GABBIANI, G; HIRSCHL, BJ; RYAN, GB; STATKOV, PR; MAJNO, G. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. **J. Exp. Med.** 135(4), 719-34. 1972.

GAILIT, J; WELCH, MP; CLARK, RA. TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. **J. Invest. Dermatol.** 103(2), 21-7. 1994.

GALE, NW; YANCOPOULOS, GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. **Genes Dev.** 13(9), 1055-66. 1999.

GERBER, HP; MCMURTREY, A; KOWALSKI, J; YAN, M; KEYT, BA; DIXIT, V; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. **J. Biol. Chem.** 273(46), 30336-43. 1998.

-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

GHAHARY, A; SHEN, YJ; NEDELEC, B; SCOTT, PG; TREDGET, EE. Enhanced expression of mRNA for insulin-like growth factor-1 in post-burn hypertrophic scar tissue and its fibrogenic role by dermal fibroblasts. **Mol. Cell Biochem.** 148(1), 25-32. 1995.

GREENHALGH, DG. The role of growth factors in wound healing. **J. Trauma.** 41(1), 159-67. 1996.

HARTREE, EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.** 48(2), 422-7. 1972.

HAYES, AJ; HUANG, WQ; MALLAH, J; YANG, D; LIPPMAN, ME; LI, LY. Angiopoetin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. **Microvasc. Res.** 58, 224-37. 1999.

HEBDA, PA; KLINGBEIL, CK; ABRAHAM, JA; FIDDES, JC. Basic fibroblast growth factor stimulation of epidermal wound healing in pigs. **J. Invest. Dermatol.** 95(6), 626-31. 1990.

HELDIN, CH; ERIKSSON, U; OSTMAN, A. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. **Arch. Biochem. Biophys.** 398(2), 284-90. 2002.

HOWDIESHELL, TR; CALLAWAY, D; WEBB, WL; GAINES, MD; PROCTER, CDJr; SATHYANARAYANA; POLLOCK, JS; BROCK, TL; McNEIL, PL. Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. **J. Surg. Res.** 96, 173-82. 2001.

JAKOB, W; JENTZSCH, KD; MAUERSBERGER, B; HEDER, G. The chick embryo choriallantoic membrane as a bioassay for angiogenesis factors: reactions induced by carrier materials. **Exp. Pathol.** 15(5), 241-9. 1978.

-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

JENNISCHE, E; SKOTTNER, A; HANSSON, HA. Dynamic changes in insulin-like growth factor I immunoreactivity correlate to repair events in rat ear after freeze-thaw injury. **Exp. Mol. Pathol.** 47(2), 193-201. 1987.

JINGJING, L; XUE, Y; AGARWAL, N; ROQUE, RS. Human Muller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 40, 752-59. 1999.

KANDA, S; LANDGREN, E; LJUNGSTROM, M; CLAEISSON-WELSH, L. Fibroblast growth factor receptor 1 induced differentiation of endothelial cell line established from tsA58 large T transgenic mice. **Cell Growth Differ.** 7, 383-95. 1996.

KANDEL, J; BOSSY-WETZEL, E; RADVANYI, F; KLAGSBRUN, M; FOLKMAN, J; HANAHAN, D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. **Cell.** 66, 1095-104. 1991.

KARUKONDA, SR; FLYNN, TC; BOH, EE; MCBURNEY, EI; RUSSO, GG; MILLIKAN, LE. The effects of drugs on wound healing: part 1. **Int. J. Dermatol.** 39(4), 250-7. 2000.

KECK, PJ; HAUSER, SD; KRIVI, G; SANZO, K; WARREN, T; FEDER, J; CONNOLLY, DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. **Science.** 246, 1309-13. 1989.

KINGSLEY, DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. **Genes Dev.** 8, 133-46. 1994.

-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

KUKK, E; LYMBOUSSAKI, A; TAIRA, S; KAIPAINEN, A; JELTSCH, M; JOUKOV, V; ALITALO, K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. **Development**. 122(12), 3829-37. 1996.

KUSH, A.; GOYVAERTS, E; CHYE, M; CHUA, N. Laticifer-specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 87, 1787-90. 1990.

LACHAT, JJ; MRUÉ, F; THOMAZINI, JA; COUTINHO-NETTO, J. Morphological and biochemical studies of the biocompatibility of membrane manufactured from latex of *Hevea brasiliensis*. **Acta Microscópica**. 6, sup.758. 1997.

LEVICK, JR. Capillary filtration-absorption balance reconsidered in light of dynamic extravascular factors. **Exp. Physiol**. 76(6), 825-57. 1991.

LI, J; FOITZIK, K; CALAUTTI, E; BADEN, H; DOETSCHMAN, T; DOTTO, GP. TGF-beta3, but not TGF-beta1, protects keratinocytes against 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced cell death in vitro and in vivo. **J. Biol. Chem**. 274, 4213-19. 1999.

LI, J; ZHANG, YP; KIRSNER, RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microsc. Res. Tech**. 60(1). 107-14. 2003.

LOWRY, OH; ROSEBROUGH, NJ; FARR, AL; RANDALL, RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**. 193(1), 265-75. 1951.

LYNCH, SE; COLVIN, RB; ANTONIADES, HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. **J. Clin. Invest**. 84(2), 640-6. 1989.

MADRI, JM; SANKAR, S; ROMANIC, AM. Angiogenesis. In: CLARK, RAF. **The molecular and cellular biology of wound repair**, 2 ed. N.Y., Plenum Press, 1996. 355-71.

-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

MAISON-PIERRE, PC; SURI, C; JONES, PF; BARTUNKOVA, S; WIEGAND, SJ; RADZIEJEWSKI, C; COMPTON, D; McCLAIN, J; ALDRICH, TH; PAPADOPOULOS, N; DALY, TJ; DAVIS, S; SATO, TN; YANCOPOULOS, GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. **Science**. 277, 55-60. 1997.

MANDRACCHIA, VJ; SANDERS, SM; FRERICH, JA. The use of becaplermin (rhPDGF-BB) gel for chronic nonhealing ulcers. A retrospective analysis. **Clin. Podiatr. Med. Surg.** 18(1), 189-209. 2001.

MARIKOVSKY, M; VOGT, P; ERIKSSON, E; RUBIN, JS; TAYLOR, WG; JOACHIM, S; KLAGSBRUN, M. Wound fluid-derived heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) is synergistic with insulin-like growth factor-I for Balb/MK keratinocyte proliferation. **J. Invest. Dermatol.** 106(4), 616-21. 1996.

MASSAGUÉ, J. TGF-beta signal transduction. **Annu. Rev. Biochem.** 67, 753-91. 1998.

MASSAGUÉ, J. The transforming growth factor-beta family. **Annu. Rev. Cell Biol.** 6, 597-641. 1990.

MCCALLION, RL; FERGUSON, MWJ. Fetal wound healing and the development of antiscarring therapies for adult wound healing. In: CLARK, RAF. **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2 ed. N.Y., Plenum Press, 1996. p. 561-90.

MEYER-INGOLD, W. Wound therapy: growth factors as agents to promote healing. **Trends Biotechnol.** 11(9), 387-92. 1993.

MICHEL, D. The biophysiology of the cardiovascular system and its therapeutic implications. **Internist. Berlim**, 25(8), 478-84. 1984.

-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

MILES, A.A, MILES, E.M. Vascular reactions to histamine, histamine- liberator, and leukotoxine in the skin of guinea pigs. **J. Physiol.** 118, 228-57. 1952.

MRUÉ, F. **Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães.** 2000. 111f. Tese (Doutorado em medicina) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

MRUÉ, F. **Substituição do esôfago cervical por prótese bio sintética de látex - Estudo experimental em cães.** 1996. 114f. Dissertação (Mestrado em medicina) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

MRUÉ, F; COUTINHO-NETTO, J; CENEVIVA, R; LACHAT, JJ; THOMAZINI, JA; TOMBELINI, H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials Research.** Aceito para publicação em 2004.

MUSTOE, TA; PIERCE, GF; MORISHIMA, C; DEUEL TF. Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model. **J. Clin. Invest.** 87(2), 694-703. 1991.

NAGAI, MK; EMBIL, JM. Becaplermin: recombinant platelet derived growth factor, a new treatment for healing diabetic foot ulcers. **Expert. Opin. Biol. Ther.** 2(2), 211-8. 2002.

NIESSEN, FB; ANDRIESSEN, MP; SCHALKWIJK, J; VISSER, L; TIMENS, W. Keratinocyte-derived growth factors play a role in the formation of hypertrophic scars. **J. Pathol.** 194(2), 207-16. 2001.

-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

OLIVO, M; BHARDWAJ, R; SCHULZE-OSTHOFF, K; SORG, C; JACOB, HJ; FLAMME, I. A comparative study on the effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), human angiogenic factor (h-AF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. **Anat. Rec.** 234(1), 105-15.1992.

ORNITZ, DM; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol.** 2(3), REVIEWS3005, 1-12. 2001.

PAPAPETROPOULOS, A; FULTON, D; MAHBOUBI, K; KALB, RG; O'CONNOR, DS; LI, F; ALTIERI, DC; SESSA, WC. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. **J. Biol. Chem.** 275, 9102-05. 2000.

PARK, JE; KELLER, GA; FERRARA, N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of the extracellular matrix-bound VEGF. **Mol. Biol. Cell.** 4, 1317-26. 1993.

PIERCE, GF; TARPLEY, JE; ALLMAN, RM; GOODE, PS; SERDAR, CM; MORRIS, B; MUSTOE, TA; VANDE BERG, J. Tissue repair processes in healing chronic pressure ulcers treated with recombinant platelet-derived growth factor BB. **Am. J. Pathol.** 145(6), 1399-410. 1994.

PIERCE, GF; TARPLEY, JE; YANAGIHARA, D; MUSTOE, TA; FOX, GM; THOMASON, A. Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. **Am. J. Pathol.** 140(6), 1375-88. 1992.

REMENSNYDER, JP; MAJNO, G. Oxygen gradients in healing wounds. **Am. J. Pathol.** 52, 301-23, 1968.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature.** 386, 671-74, 1997.

-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

ROBERTS, AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. **Miner. Electrolyte Metab.** 24(2-3), 111-9. 1998.

ROBERTS, AB; SPORN, MB. Transforming growth factor- β . In: CLARK, RAF. **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2 ed. N.Y., Plenum Press, 1996. p. 275-308.

ROSS, R; GLOMSET, J; KARIYA, B; HARKER, L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 71, 1207-10. 1974.

RUOSLAHTI, E; YAMAGUCHI, Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. **Cell.** 64(5), 867-9. 1991.

SAMPAIO, SV; LAURE, CJ; GIGLIO, JR. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon.** 21(2), 265-77. 1983.

SCHULTZ, GS; WHITE, M; MITCHELL, R; BROWN, G; LYNCH, J; TWARDZIK, DR; TODARO, GJ. Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor-alpha and vaccinia growth factor. **Science.** 235(4786), 350-2. 1987.

SCHWEIGERER, L; NEUFELD, G; FRIEDMAN, J; ABRAHAM, JA; FIDDES, JC; GOSPODAROWICZ, D. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. **Nature.** 325, 257-59. 1987.

-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

SENGER, DR; LEDBETTER, SR; CLAFFEY, KP; PAPADOPOULOS-SERGIOU, A; PERUZZI, CA; DETMAR, M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α v β 3 integrin, osteopontin, and thrombin. **Am. J. Pathol.** 149, 293-305. 1996.

SEPP, NT; LI, LJ; LEE, KH; BROWN, EJ; CAUGHMAN, SW; LAWLEY, TJ; SWERLICK, RA. Basic fibroblast growth factor increases expression of the α v β 3 integrin complex on human microvascular endothelial cells. **J. Invest. Dermatol.** 103, 295-99. 1994.

SIMPSON, DM; ROSS, R. The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. **J Clin Invest.** 51(8), 2009-23. 1972.

SINGER, AJ; CLARK, RA. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med.** 341(10), 738-46, 1999.

STEED, DL. Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. **Clin. Plast. Surg.** 25(3), 397-405. 1998.

STEED, DL; RICOTTA, JJ; PRENDERGAST, JJ; KAPLAN, RJ; WEBSTER, MW; MCGILL, JB; SCHWARTZ, SL. Promotion and acceleration of diabetic ulcer healing by arginine-glycine-aspartic acid (RGD) peptide matrix. RGD Study Group. **Diabetes Care.** 18(1), 39-46. 1995.

STRACHAN, L; MURISON, JG; PRESTIDGE, RL; SLEEMAN, MA; WATSON, JD; KUMBLE, KD. Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily. **J. Biol. Chem.** 276(21), 18265-71. 2001.

-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

SURI, C; JONES, PF; PATAN, S; BARTUNKOVA, S; MAISONPIERRE, PC; DAVIS, S; SATO, TN; YANCOPOULOS, GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. **Cell**, 87, 1171-80. 1996.

SURI, C; MCCLAIN, J; THURSTON, G; MCDONALD, DM; ZHOU, H; OLDMIXON, EH; SATO, TN; YANCOPOULOS, GD. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. **Science**. 282, 468-71. 1998

THURSTON, G; SURİ, C; SMITH, K; MCCLAIN, J; SATO, TN; YANCOPOULOS, GD; MCDONALD, DM. Leakage resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. **Science**. 282, 2511-14. 1999.

TISCHER, E; MITCHELL, R; HARTMAN, T; SILVA, M; GOSPODAROWICZ, D; FIDDES, JC; ABRAHAM, JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. **J.. Biol. Chem.** 266, 11947-54. 1991.

TSAHAR, E; MOYER, JD; WATERMAN, H; BARBACCI, EG; BAO, J; LAVKOWITZ, G; SHELLY, M; STRANO, S; PINKAS-KRAMARSKI, R; PIERCE, JH; ANDREWS, GC; YARDEN, Y. Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network. **EMBO J.** 15, 5948-63. 1998.

UDAKA, K; TAKEUCHI, Y; MOVAT, HZ. Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 133(4), 1384-7. 1970.

VAQUERO, J; ZURITA, M; MORALES, C; CINCU, R; OYA, S. Expression of vascular permeability factor in glioblastoma specimens: correlation with tumor vascular endothelial surface and peritumoral edema. **J. Neurooncol.** 49(1). 49-55. 2000.

-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

WALTENBERGER, J; MAYR, U; PENTZ, S; HOMBACH, V. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hipoxia. **Circulation**, 94, 1647-54. 1996.

WANG, X; POLO, M; KO, F; ROBSON, MC. Endogenous TGF- β 1 gene protein changes during human partial thickness wound healing. **Wounds**. 3, 76-82. 1998.

WEDMORE, CV; WILLIAMS, TJ. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. **Nature**. 289(5799), 646-50. 1981.

SENGER, DR; CONNOLLY, DT; VAN DE WATER, L; FEDER, J; DVORAK, HF. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. **Cancer Res**. 50(6), 1774-8. 1990.

WERNER, S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. **Cytokine Growth Factor Rev**. 9(2), 153-65. 1998.

WERNER, S; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev**. 83(3), 835-70. 2003.

WILTING, J; CHRIST, B; BOKELOH, M. A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors. Studies on the effects of carriers, PBS, angiogenin, and bFGF. **Anat. Embryol**. 183(3), Berlin, 259-71. 1991.

WILTING, J; CHRIST, B; WEICH, HA. The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of VEGF₁₆₅ and PDGF-BB. **Anat. Embryol**. 186(3), 251-7. 1992.

YARDEN, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. **Eur. J. Cancer**. 37 S3-8. 2001.

-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-

ZAMBRUNO, G; MARCHISIO, PC; MARCONI, A; VASCHIERI, C; MELCHIORI, A; GIANNETTI, A; DE LUCA, M. Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. **J. Cell Biol.** 129(3), 853-65. 1995.