UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARCEL NANI LEITE

**Eficácia do soro do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* na
cicatrização de escoriações cutâneas em ratos**

Ribeirão Preto

2016

MARCEL NANI LEITE

Eficácia do soro do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização de escoriações cutâneas em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica.

Área de Concentração: Clínica Médica –
Investigação Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

Ribeirão Preto

2016

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

Catálogo na publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FICHA CATALOGRÁFICA

Leite, Marcel Nani

Eficácia do soro do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização de escoriações cutâneas em ratos. Ribeirão Preto, 2016.

76 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Clínica Médica: Investigação Biomédica.

Orientador: Frade, Marco Andrey Cipriani

1. Cicatrização
2. Escoriação
3. *Hevea brasiliensis*
4. Modelos animais
5. Eficácia
6. Segurança

FOLHA DE APROVAÇÃO

LEITE, Marcel Nani

Eficácia do soro do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização de escoriações cutâneas em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica.

Área de Concentração: Clínica Médica -
Investigação Biomédica.

Aprovado em ____ / ____ / ____

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Primeiramente à *Deus* pelo amor que tem por mim, pela força, coragem, fé e saúde para concluir este trabalho. *“Tudo é do Pai, toda honra e toda glória”*.

Dedico também aos meus queridos pais, *José* e *Maria Lúcia*, por todo amor doado, pela confiança e pela força neste momento tão importante, que mesmo de longe estavam sempre comigo.

Dedico à minha irmã *Giselle*, por todo amor, carinho e incentivo durante estes anos de trabalho.

E em especial e principalmente a meu irmão *Saulo*, que me ajudou a ingressar neste meio científico, por toda força para continuar e não desistir, sou eternamente grato por tudo que fez e que faz por mim.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço em especial ao meu querido orientador *Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade*, primeiramente por acreditar em mim, por todos os ensinamentos, discussões, aulas e principalmente pelas broncas, o aprendizado foi bem maior. O meu muito obrigado pela confiança depositada, carinho, zelo, paciência, pelo incentivo nos momentos de desânimo e acima de tudo pela amizade. Te admiro muito, continue sendo este excelente professor, médico, pesquisador e o mais importante HUMANO, pensando sempre no próximo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo à *Jesus Cristo* pelo dom da *Vida*. Agradeço por esta oportunidade, pela força em todos os momentos difíceis desta caminhada e ao *Espírito Santo* por me iluminar a cada passo dado. “*Tudo posso naquele que me fortalece*”.

Ao meu pai, *José*, por todo amor, carinho e confiança depositada em mim, e à minha mãe, *Maria Lúcia* pelo infinito amor, confiança, orações, conversas e extremo apoio nos momentos bons e principalmente difíceis.

A minha querida irmã *Giselle* por todo apoio, amor e amizade durante todo o trabalho. Que Deus te abençoe sempre.

Ao meu irmão *Saulo* que sem palavras por tudo que fez por mim. O meu muito obrigado pela força, carinho, paciência, discussões, dedicação e principalmente pela amizade. Que Deus te abençoe sempre.

Aos grandes amigos do grupo de Cicatrização e Hanseníase da Dermatologia da FMRP que fiz durante esta jornada. Em especial ao *Dr. Thiago, Guilherme, Dr. Márcio, Natália, Francielle e Patrícia* pela amizade, companheirismo, ajuda nos experimentos, ensinamentos, paciência, discussões científicas, pelos finais de semana e feriados dedicados à ciência e com certeza pelas risadas e momentos de alegria.

“É camelandando que se aprende, vamo que vamo”.

A querida técnica do Laboratório de **Cicatrização e Hanseníase** da FMRP, Maria Aparecida, *Cici*, com toda amizade, conversas e carinho. Pelo zelo e organização do laboratório, ensinamentos e disposição a nos ajudar nos experimentos.

À secretária *Cris*, da divisão de **Dermatologia** da FMRP pela disposição em ajudar.

À técnica *Paula Payão* do Laboratório de **Nutrição** da FMRP por toda ajuda nas leituras de ELISA e ensinamentos.

Ao técnico e grande amigo *Renato* do Laboratório de **Neurologia Aplicada e Experimental** da FMRP-USP por toda assistência e ajuda nas leituras de placas do método *Scratch Assay*.

Aos funcionários do biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP, *Adalberto, Maurício e Roni* pelo cuidado com os animais e grande ajuda nos experimentos.

À todos os meus *amigos e familiares*, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e que por ventura não tenham sido mencionado, muito obrigado!

RESUMO

LEITE, M.N. **Eficácia do soro do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização de escoriações cutâneas em ratos.** 2016. 76f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Quando as escoriações ocorrem é esperada uma cicatrização sem complicações, utilizando produtos para prevenção de infecções e que proporcionam ambiente que otimiza rápida cicatrização com cicatrizes mínimas. Tratamentos com antissépticos tópicos e produtos cicatrizantes são os mais utilizados. Vários relatos demonstram que o soro do látex (SLX) da seringueira *Hevea brasiliensis* tem propriedades cicatrizantes para úlceras cutâneas. O objetivo deste trabalho foi avaliar citotoxicidade e potencial proliferativo do SLX em ensaios *in vitro* e sua eficácia em escoriações cutâneas no dorso de ratos. A citotoxicidade do SLX (10%, 1% e 0,1%) foi avaliada em culturas de fibroblastos 3T3 pela determinação da viabilidade celular. A proliferação/migração celular com queratinócitos humanos foi avaliada pelo método *scratch assay* nas concentrações (1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0001% e 0,00001%). Para a atividade cicatrizante utilizou-se 72 ratos Wistar submetidos à escoriação no dorso por dermoabrasão, e 3 grupos foram estabelecidos: soro fisiológico (SF), antisséptico (AS-Merthiolate®) e soro do látex (SLX-Regederm®), aplicado diariamente por 10 dias. As lesões foram fotografadas e avaliadas por análise de imagem nos dias 2, 7 e 10 pós-lesão e calculados os índices de cicatrização das escoriações (ICE) para medir reepitelização. Nos dias 2, 7 e 10 foram sacrificados 8 animais de cada grupo e coletadas amostras para dosagem bioquímica da mieloperoxidase (MPO) e no 10º dia uma parte das biópsias foram separadas para análise histológica da epiderme e crosta. O SLX não apresentou toxicidade aos fibroblastos nas concentrações menores ou iguais à 1%, sendo inviável na concentração de 10%. Pelo *scratch assay* o SLX apresentou atividade proliferativa sobre queratinócitos humanos principalmente na concentração de 0,01% (89%). O SLX promoveu melhor reepitelização no modelo de escoriação, principalmente no 7º dia, diferente dos demais grupos que tinham atraso na reepitelização. Além disso, quanto às diferenças de espessura da crosta e da epiderme, o grupo SLX promoveu um aumento no número de camadas epidérmicas e menor espessura das crostas. Os grupos SLX e AS apresentaram aumento da enzima MPO no 2º dia, porém com redução significativa a partir do 7º dia, diminuindo assim a inflamação e acelerando consequentemente a reepitelização. Os resultados evidenciaram que a aplicação do soro do látex é segura pela não toxicidade e comprova sua eficácia perante a outros produtos, pela propriedade proliferativa para queratinócitos e pela aceleração da cicatrização em modelos de exulcerações cutâneas.

Palavras-chave: Cicatrização. Escoriação. *Hevea brasiliensis*. Modelos animais. Eficácia. Segurança

ABSTRACT

LEITE, M. N **Efficacy of natural rubber latex serum from *Hevea brasiliensis* in skin abrasion healing in rats.** 2016. 76 p. Master Dissertation – Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

When abrasions occur is expected to heal without complications, using products to prevent infections and provide environment that optimizes rapid healing with minimal scarring. Treatments with topical antiseptics and healing products are the most used. Several reports show that the latex serum (LXS) from *Hevea brasiliensis* has healing properties for skin ulcers. The objective was to evaluate the cytotoxic and proliferative potential of LXS *in vitro* assays and their efficacy to heal skin abrasions on the back of rats. LXS cytotoxicity (10, 1 and 0.1%) was evaluated in 3T3 fibroblast cultures by cell viability. The cell proliferation/migration in human keratinocytes was evaluated by the scratch assay method using 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001% and 0.00001% concentrations. For healing activity, 72 Wistar rats were underwent to dermoabrasion on the back and 3 groups were established: saline (S), antiseptic (AS-Merthiolate®) and rubber latex serum (LXS-Regederm®). The different products were applied daily for 10 days. The lesions were photographed and evaluated by image analysis on days 2, 7 and 10 post-injury and the abrasion healing rate (AHR) were calculated for evaluation of the re-epithelialization. On days 2, 7 and 10, 8 animals from each group were sacrificed, and samples were taken for biochemical determination of myeloperoxidase (MPO) After that, on day 10, a part of the biopsies was separated for histological analysis of the epidermis and crust. The LXS showed no toxicity to fibroblasts at concentrations less than or equal 1%, being impractical at a concentration of 10%. By the scratch assay, the LXS showed proliferative activity on human keratinocytes, particularly at a concentration of 0.01% (89%). The LXS produced better re-epithelialization in the excoriation model, especially on the 7th day, unlike other groups, in which the re-epithelialization was delayed. Furthermore, it showed significant differences regarding the amount of epidermis and crust. The Regederm group presented an increase in the number of epidermal layers and thinner thickness of their crusts. The LXS and AS groups showed an increase of MPO enzyme on the 2nd day, however, with a significant decrease from the 7th day, thus reducing inflammation and consequently accelerating re-epithelialization. The results showed that the application of the rubber latex serum is safe due its non-toxicity and prove its efficacy comparing to other products, because of its proliferative property for keratinocytes and acceleration of healing in cutaneous exulceration models.

Keywords: Healing. Abrasions. *Hevea brasiliensis*. Animal models. Efficacy. Safety

LISTA DE SIGLAS

BLN	Biomembrana de látex natural
CETEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ePTFE	Politetrafluoretileno
F1	Fração proteica do látex
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GAGs	Glicosaminoglicanas
GAS	Grupo antisséptico
GSF	Grupo soro fisiológico
GSLX	Grupo soro do látex
HARP	Peptídeo regulador de afinidade da heparina
HE	Hematoxilina e eosina
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
ICE	Índice de cicatrização das escoriações
ICU	Índice de cicatrização das úlceras
IFN	Interferon
IL₁	Interleucina 1
ILGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
iNOS	NO sintase induzida
MEC	Matriz extracelular
MPO	Mieloperoxidase
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
NK	Natural killer

NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato-salino
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PFA	Paraformaldeído
ROS	Espécies reativas derivadas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
SLX	Soro do látex
TGFα	Fator transformador de crescimento alfa
TGFβ	Fator transformador de crescimento beta
TMB	3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidine
TNF-α	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	<i>Morfofisiologia da pele</i>	15
1.2	<i>Úlceras cutâneas</i>	16
1.2.1	<i>Úlceras cutâneas agudas e crônicas</i>	16
1.3	<i>Cicatrização</i>	18
1.4	<i>Tratamento de úlceras</i>	23
1.5	<i>Estudos do látex da seringueira Hevea brasiliensis</i>	24
2	OBJETIVOS	29
2.1	<i>Objetivo geral</i>	29
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	<i>Extração do látex natura da seringueira Hevea brasiliensis</i>	31
3.2	<i>Avaliação da citotoxicidade e migração/proliferação do soro do látex em cultura de fibroblastos NIH-3T3 e queratinócitos humanos</i>	32
3.2.1	<i>Fonte de fibroblastos e queratinócitos humanos</i>	32
3.2.2	<i>Cultura celular</i>	32
3.2.3	<i>Avaliação da viabilidade celular</i>	33
3.2.4	<i>Avaliação da migração/proliferação celular</i>	34
3.3	<i>Animais</i>	38
3.4	<i>Padronização dos grupos</i>	38
3.5	<i>Procedimento cirúrgico: padronização da confecção de escoriações cutâneas dorsais</i>	39
3.6	<i>Avaliação clínica dos animais</i>	40
3.7	<i>Eutanásia e dias de seguimento das avaliações</i>	40
3.8	<i>Captura e análise das imagens</i>	40

3.9	<i>Coleta do material para estudo</i>	44
3.10	<i>Estudo histopatológico – mensuração da epiderme e da crosta</i>	44
3.11	<i>Dosagem de mieloperoxidase (MPO)</i>	45
3.12	<i>Análise dos resultados</i>	46
4	Resultados	48
4.1	<i>Avaliação da viabilidade celular</i>	48
4.2	<i>Avaliação da migração/proliferação celular – Scratch Assay</i>	49
4.3	<i>Avaliação clínica dos animais</i>	51
4.4	<i>Evolução do processo de reepitelização</i>	51
4.5	<i>Avaliação histopatológica</i>	52
4.6	<i>Avaliação bioquímica: Dosagem de mieloperoxidase (MPO)</i>	54
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXOS	75

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Morfofisiologia da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano podendo atingir 10% da massa corporal total e juntamente com os seus apêndices (pelos, e glândulas sudoríparas e sebáceas) constitui um órgão responsável por importantes funções, primeiramente como defesa contra infecções de microorganismos e toxinas do meio externo, barreira mecanicamente flexível, é essencial nos mecanismos homeostáticos, manutenção do equilíbrio hídrico, termo-regulação, absorção, resposta imunológica, detecção sensorial, cicatrização entre outras (CLARK et al, 2007; GÁL et al., 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; KENDALL; NICOLAOU, 2013).

É composta por duas camadas distintas: a epiderme que é de origem ectodérmica onde encontra-se queratinócitos e a derme de origem mesodérmica localizada abaixo da epiderme formada por fibroblastos e matriz extracelular (MEC) onde encontram-se os apêndices (pelos e glândulas) e estruturas como vasos sanguíneos e fibras nervosas. Ainda abaixo da derme situa a hipoderme, origem mesodérmica, embora não faça parte da pele, tem a função de atuar como suporte e união dos tecidos e órgãos adjacentes (EHRENREICH; RUSZCZAK, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; KENDALL; NICOLAOU, 2013).

A epiderme é camada mais externa da pele composta de um epitélio multiestratificado, isto é, formado por várias camadas (estratos) de células justapostas e a lamina basal, de origem mesodérmica, que constitui a estrutura que separa a derme da epiderme. Tem função de proteção externa, barreira contra entrada de água e microorganismos, não contém vasos sanguíneos, recebe nutrientes por difusão a partir dos vasos existentes na derme. É composta principalmente por queratinócitos, além de terminações nervosas (células de Merkel), de melanócitos e

células do sistema imune tais como células de Langerhans e dos linfócitos T (EDWARDS, 2005; KENDALL; NICOLAOU, 2013; MCLAFFERTY; HENDRY; ALISTAIR, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A derme, camada abaixo da epiderme, é a parte mais espessa da pele composta por colágeno, fibras elásticas e glicosaminoglicanas (GAGs) produzidos por fibroblastos termais, vasos sanguíneos, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, terminações nervosas e células do sistema imunológico como células dendríticas, células B, natural killer (NK), neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e mastócitos. A hipoderme ou tecido adiposo, camada mais interna, é formada principalmente de vasos sanguíneos e tecido adiposo (EDWARDS, 2005; KENDALL; NICOLAOU, 2013; MCLAFFERTY; HENDRY; ALISTAIR, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

1.2 Úlceras cutâneas

1.2.1 Úlceras cutâneas agudas e crônicas

Úlceras cutâneas são definidas como rompimento celular da continuidade anatômica da pele e de sua funcionalidade, podendo envolver epiderme e/ou derme. Pode ocorrer uma lesão simples na integridade do tecido como, epiderme e derme assim como alcançar regiões mais profundas, músculos e ossos (HENG, 2011; KOKANE, 2009; SCHMIDT et al., 2009).

As úlceras são classificadas em relação a fatores como: tempo de fechamento (aguda ou crônica), etiologia (venosas, arteriais, neuropáticas, diabéticas, dentre outras) e pela profundidade. Quanto à profundidade, quando a perda tecidual atinge epiderme e pontos superficiais da derme (grau 1), denominamos como erosão ou exulceração; quando acomete derme superficial e profunda denominamos úlceras de

grau 2, subcutâneo úlceras de grau 3 e quando atinge músculo e outros tecidos, de grau 4 (BRYANT; NIX, 2012).

As perdas teciduais agudas definidas como exulcerações podem surgir após procedimentos dermatológicos cirúrgicos como a dermoabrasão e *peelings* químicos, ou causadas por traumatismo, atingindo essencialmente epiderme e raros pontos da derme superior. Neste caso, a reparação acontece apenas por meio da reepitelização reparo tecidual ordenado, seguido do processo de restauração anatômica e funcional da pele, resultando em uma cicatriz praticamente imperceptível. O tempo de cicatrização pode variar entre 5 a 10 dias, podendo chegar até 30 dias (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009) e na maioria dos casos não há presença de contaminações e complicações para o paciente (LAZARUS et al., 1994; ROBSON; STEED; FRANZ, 2001; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

As úlceras crônicas ou de espessura total, como por exemplo, úlceras venosas, arteriais, diabéticas cicatrizam de forma desordenada e com atraso no reparo, podendo vários fatores alterar o processo normal de cicatrização, como idade, infecções, desnutrição, doenças cardiovasculares, fumo, *diabetes mellitus*, entre outras (BARANOSKI; AYELLO, 2004; BROUGHTON; JANIS, 2006; BRYANT, 2000; CHILDRESS; STECHMILLER, 2002; SINNO, PRAKASH, 2013). São aquelas que a cicatrização não ocorre em um tempo esperado de até 6 semanas ou de 8 a 12 semanas sem qualquer sinal de cicatrização (RONDÁN-MARÍM et al., 2009; WHITNEY, 2005) e necessitam, além da reepitelização, da formação um tecido de granulação para restaurar o tecido perdido e a cicatriz formada torna-se perceptível e muitas vezes pronunciada (FAZIO; ZITELLI; GOSLEN, 2000; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Na fase inflamatória das úlceras agudas, ocorre um equilíbrio entre citocinas pró e antiinflamatórias fazendo com que o processo inflamatório seja limitado, diferente das úlceras crônicas onde há um processo inflamatório persistente.

(BARANOSKI; AYELLO, 2004; BEHM et al., 2012; CHILDRESS; STECHMILLER, 2002; MENKE et al., 2007).

Nas últimas décadas, inúmeros avanços científicos trouxeram mudanças significantes sobre o processo cicatricial, influenciando assim nas abordagens atualmente aceitas nos tratamentos de úlceras (SHAI; MAIBACH, 2005).

Recursos naturais e sintéticos têm sido alvos na busca de novos produtos que estimulam o processo de cicatrização e dezenas destes de curativos contendo diferentes substâncias estão disponíveis comercialmente, desde vaselina a fatores de crescimento geneticamente modificados (BROUGHTON II; JANIS; ATTINGER, 2006).

1.3 Cicatrização

A cicatrização de úlceras cutâneas é um processo biológico complexo onde ocorrem eventos de maneira coordenada e sequencial envolvendo interações de vários tipos celulares, componentes da matriz, proteases e citocinas (SINNO; PRAKASH, 2013). As úlceras agudas como as cirúrgicas e traumáticas cicatrizam normalmente durante esses eventos de modo organizado e rápido (BRYANT, 2000).

A cicatrização ocorre por primeira intenção, minimizando o volume de tecido conjuntivo depositado, gerando mínima formação de cicatriz e restaurando a barreira epitelial contra infecções (BRYANT, 2000; CHILDRESS; STECHMILLER, 2002; BARANOSKI; AYELLO, 2004). São lesões simples da camada superficial da pele ou mucosas, apresentando solução de continuidade do tecido, sem perda ou destruição do mesmo, com sangramento discreto, mas costumam ser extremamente dolorosas. Não representam risco à vítima quando isoladas. Geralmente são causadas por instrumento cortante ou contundente (CARDOSO, 2003).

O processo dinâmico da cicatrização de feridas envolve cinco fases sequenciais, distintas didaticamente: lesão, coagulação, inflamação, formação tecidual

e remodelagem tecidual. Cada fase é composta por elementos celulares e extracelulares específicos, como citocinas e fatores de crescimento, que agem como substâncias sinalizadoras, supressoras e estimuladoras (ARNOLD; WEST, 1991; BROUGHTON; JANIS, 2006; EMING et al., 2007; LEE et al., 2012).

Imediatamente após a lesão, o processo de reparo inicia-se com uma interação dinâmica envolvendo citocinas liberadas por células lesadas como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fatores de transformação do crescimento beta e alfa (TGF β e TGF α), elementos celulares, matriz extracelular (MEC) e células parenquimatosas (BARANOSKI; AYELLO, 2004; BEANNES et al., 2003).

Na fase de coagulação, o coágulo de fibrina no local da injúria ativa a cascata da coagulação onde a trombina induz a degranulação das plaquetas liberando PDGF, TGF β , fator de crescimento epidérmico (EGF), e TGF α , além de glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospondina, importantes constituintes da matriz extracelular provisional. Além disso, o coágulo de fibrina formado age como uma matriz de colonização de células inflamatórias atraídas por quimiotaxia por meio da ação do PDGF e TGF α , principalmente neutrófilos (BARANOSKI; AYELLO, 2004; BEANNES et al., 2003; LEE et al., 2012; LI et al., 2007).

A fase inflamatória, que ocorre de 1 a 5 dias após a injúria, os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a chegarem ao local da lesão, liberam enzimas proteolíticas mieloperoxidase (MPO) para digestão de restos celulares como bactérias e outros elementos estranhos, por meio da fagocitose, produção de superóxido ou peróxido de hidrogênio (espécies reativas derivadas do oxigênio – ROS) e óxido nítrico (NO) (DOUGHTY; SPARKS-DeFRIESE, 2012; FIERRO, BARJA-FIDALGO et al., 1996; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009). Os monócitos aderidos à matriz chegam à lesão e transformam-se em macrófagos continuando o desbridamento tecidual mediante fagocitose e neutrófilos senescentes (BARANOSKI; AYELLO, 2004; BEANNES et al., 2003; LI et al., 2007; SINNO; PRAKASH, 2013). As citocinas desta fase são derivadas principalmente do macrófago como PDGF, TGF β , fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento semelhante à

insulina (ILGF-1), $TGF\alpha$, interleucinas 1 (IL_1), EGF e fator de necrose tumoral ($TNF\alpha$) além das derivadas dos neutrófilos ($TGF\beta$) e dos linfócitos [$TGF\beta$, interferon (IFN) e IL_2] (ARNOLD; WEST, 1991; EMING et al., 2007; SINNO; PRAKASH, 2013).

A fase de formação tecidual ocorre do 3º ao 12º dia com a função de restabelecer a integridade da epiderme e da derme. A proliferação epitelial inicia-se por estimulação mitogênica e quimiotática do $TGF\alpha$ e EGF. A granulação tecidual, uma importante etapa com aparência granular gerada pelos capilares neoformados, forma-se mediante ação de fatores de crescimento específicos que são secretados por células parenquimatosas lesadas e macrófagos. Os macrófagos, os fibroblastos e os vasos sanguíneos são importantes agentes que atuam de maneira interdependente no interior da ferida durante este processo. Os macrófagos são uma fonte contínua de fatores de crescimento que estimulam a fibroplasia e a angiogênese. Os fibroblastos atuam na construção da nova matriz extracelular que dará suporte para a chegada de células de reparo e, por fim, os vasos sanguíneos neoformados transportam oxigênio e nutrientes para o metabolismo celular, que nesta fase é intenso. Assim, o processo de granulação tecidual ocorre como consequência dos mecanismos de fibroplasia e angiogênese (BEHM et al., 2012; LI et al., 2007; KARUKONDA et al., 2000).

A fibroplasia traduz-se pela proliferação de fibroblastos e sua migração para o interior da ferida por estímulo de fatores de crescimento como PDGF, fator básico de crescimento de fibroblasto (FGF) e $TGF\beta$. À semelhança das células epiteliais, os fibroblastos migram para a ferida valendo-se de alterações morfológicas que possibilitam a expansão de segmentos da membrana celular ao acaso, chamados lamelipódios, que são análogos dos pseudópodos das células epiteliais em migração (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1990; CHAN, 1992). Uma vez no interior da ferida, os fibroblastos interagem com os elementos da MEC, sintetizando e depositando colágeno, remodelando-a. Os fibroblastos assumem uma nova função que é a de sintetizar proteínas (BROUGHTON; JANIS, 2006; LI et al., 2007; STADELMANN et al., 1998). Gradualmente estas células mudam seu fenótipo migratório para um fenótipo

profibrótico, que começa pela dispersão do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi pelo citoplasma até apresentarem abundante retículo endoplasmático rugoso e Golgi repleto de novas proteínas representadas pelas fibras de colágeno. A produção de grande quantidade de colágeno nesta fase pode ser explicada pela evidente expressão de TGF β . Por volta do décimo dia após o início do processo de reparo os fibroblastos sofrem alterações morfológicas desencadeadas por mecanismos sinalizadores ainda não elucidados e que os levam ao fenômeno de apoptose (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1990). Há uma contração cicatricial mediada por miofibroblastos estimulada por 5-hidroxitriptofano, prostaglandina F $_{1\alpha}$, angiotensina, vasopressina, bradicinina, epinefrina ou norepinefrina e, também, por participação do TGF β (KARUKONDA et al., 2000).

Em relação à angiogênese, trata-se de um fenômeno que envolve uma série de mecanismos complexos dependentes da MEC local, bem como de alterações fenotípicas e fatores mitogênicos estimuladores de células endoteliais, que são elementos protagonistas deste processo. Vários fatores de crescimento e citocinas parecem estar envolvidos com a angiogênese como FGF (α e β), EGF, TGF α , PDGF, TGF β , VEGF, fator de crescimento de células endoteliais derivados de plaquetas (PDEGF) e peptídeo regulador de afinidade da heparina (HARP) dentre outros (ARNOLD; WEST, 1991; BARANOSKI; AYELLO, 2004).

A reepitelização é o processo de restauração da epiderme por meio da proliferação e migração de queratinócitos da epiderme adjacente que se inicia logo após o momento da lesão migrando no sentido das bordas para o centro. Além disso, estão envolvidos processos como a diferenciação do novo epitélio em epiderme estratificada e a restauração da membrana basal que conecta a epiderme com a derme subjacente (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Vários elementos estão ligados à migração dos queratinócitos como citocinas inflamatórias, receptores de integrina, matriz extracelular e metaloproteinases da matriz (MMP's). TNF- α e IL-1 β regulam o gene de expressão do fator de crescimento de queratinócitos (KGF) em fibroblastos que por outro lado

sintetizam e secretam KGF-1, KGF-2 e IL-6 que estimulam os queratinócitos adjacentes para migrarem para a lesão, proliferarem e se diferenciarem para formar a nova epiderme (BROUGHTON; JANIS, 2006; WERNER et al., 2007). Os queratinócitos utilizam seus receptores de integrina para interagir com a matriz provisional rica em fibronectina, fibrina e colágeno tipo V. Esses receptores interagem com as moléculas de colágeno neoformado na lesão regulando a direção da migração dos queratinócitos. Os queratinócitos que estão migrando, produzem MMP's como a MMP-9 que especificamente degrada colágeno tipo IV e lamininas na membrana basal permitindo que células saiam da membrana e migrem para a lesão. Quando a migração cessa, os queratinócitos entram no substrato adjacente, reconstituem a membrana basal e retomam o processo terminal de diferenciação para gerar a epiderme estratificada (PARKS, 1999; LI et al., 2007).

A migração dos queratinócitos e a contração da úlcera resultam na reepitelização da área lesada que de suma importância para estabelecer o suporte necessário para restaurar o tecido lesado (STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

Na fase de remodelagem tecidual há uma tentativa de retorno à estrutura tecidual normal. Há um equilíbrio entre formação de colágeno novo e degradação de colágeno velho por meio da ação das collagenases. Os macrófagos começam a desaparecer junto à redução da angiogênese e da proliferação de fibroblastos. Ocorre uma remodelagem da matriz extracelular pelas metaloproteinases que incluem collagenases intersticiais, collagenase tipo IV e gelatinases. As principais citocinas envolvidas nesta fase são $TNF\alpha$, IL_1 , PDGF, $TGF\beta$ produzidas pelos fibroblastos além das produzidas pelas células epiteliais como EGF e $TGF\beta$ (BARANOSKI; AYELLO, 2004; KARUKONDA et al., 2000; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

1.4 Tratamento de úlceras

O objetivo principal de um tratamento tópico ideal para úlcera consiste em restaurar o ambiente fisiológico da lesão, mantendo umidade adequada, o controle da temperatura, regulação de potencial hidrogênio (pH) e controle de microrganismos. Uma vez estas condições ajustadas irão assim colaborar para reparação e restauração tecidual (ROLSTAD; BRYANT; NIX, 2012).

São inúmeras opções no mercado para o tratamento de úlceras cutâneas. Os curativos úmidos, como, hidrocolóides, hidrogéis, alginatos são bastante utilizados em úlceras crônicas, porém, são escassos os estudos mostrando aplicabilidade em úlceras agudas (PEREIRA; BÁRTOLO, 2016). Os anti-sépticos são amplamente utilizados em lesões agudas (exulcerações) com o intuito, principalmente de prevenir o risco de infecções, mantendo o leito da ferida limpo e em condições ótimas de reparação (GEIER; SYKES; GEIER, 2007; MELNICK et al., 2008). Os mais utilizados são o iodo e a clorexidina, princípio ativo do Merthiolate®, apresentando ação antibacteriana e baixa toxicidade, porém não existem estudos *in vitro*, *in vivo* ou dados clínicos que comprovem sua eficácia em úlceras agudas (EARDLEY; WATTS; CLASPER, 2012).

Outros tratamentos têm sido utilizados para lesões agudas (escoriações), como laser de baixa intensidade (GUPTA et al., 2014) e fator de crescimento fibroblástico básico (NAKAMIZO et al., 2013).

Dentre os vários tratamentos para o processo cicatricial, muitas plantas medicinais também têm demonstrado um potencial terapêutico importante (PAIVA et al., 2002; SCHMIDT et al., 2009). Há muito tempo já fazem parte da terapêutica princípios ativos isolados de plantas medicinais e no mundo há uma grande variedade de espécies vegetais para uso terapêutico, cerca de 250-500 mil espécies. Aproximadamente 120 metabólitos secundários de plantas são utilizados mundialmente com drogas para algum tipo de terapêutica (KUMAR et al., 2006;

PEREIRA; BÁRTOLO, 2016), destacando dentre elas, a proteína do látex da seringueira *Hevea brasiliensis*.

1.5 Estudos do látex da seringueira *Hevea brasiliensis*

Durante o último século o látex natural derivado da seringueira *Hevea brasiliensis* tornou-se um material de muita utilidade, principalmente no cotidiano da área de saúde. A popularidade do látex é atribuída às suas características bioquímicas como elasticidade, força, resistência à rasgadura e superior qualidade de barreira a substâncias e microorganismos (WOODS et al., 1997; SUSSMAN; BEEZOLD, 1994; YIP; CACIOLI, 2002).

Destaca-se entre seus múltiplos usos, cuja matéria prima se constitui o látex natural, a biomembrana de látex que desde 1994, vem sendo pesquisada com sucesso, estabelecida como material biocompatível desenvolvido pelo setor de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo/Brasil (MRUÉ, 1996; FRADE et al., 2001).

O látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* constitui-se um fluido orgânico composto de proteínas, carboidratos além de outros componentes orgânicos e inorgânicos. As partículas hidrocarbonadas, componente elástico, constituem 25 a 45% da solução de látex. As substâncias não elásticas constituem apenas uma pequena percentagem da solução. Após ultracentrifugação (59000g), o látex pode ser separado em três frações: (1) parte superior composta de hidrocarbonos da borracha; (2) soro (C-serum) onde todas as partículas do látex estão suspensas; e (3) fração densa inferior constituída de partículas não borracha, particularmente, lutóides que contém outro soro (B-serum) (YIP; CACIOLI, 2002; BANERJEE et al., 2000).

As proteínas correspondem aproximadamente 1 a 1,5% do látex, sendo 27% destas encontradas na fase de borracha, 48% no C-serum e 25% na porção inferior (YIP; CACIOLI, 2002; BANERJEE et al., 2000). O estudo eletroforético destas proteínas revelou que há duas grandes proteínas de superfície de ligação com 14Kd e 24Kd na fase de borracha. Apesar das proteínas solúveis no C-serum alcançarem de 7Kd a 133Kd, aquelas do B-serum apresentam uma variação estreita do peso molecular de 14Kd a 45Kd. A maioria dessas proteínas é removida durante o processo de manufatura dos produtos. Apenas uma pequena fração remanescente nestes produtos funciona como estratos residuais de proteínas relacionados a reações alérgicas (YIP; CACIOLI, 2002; SCARBEEK, 1993).

Sabe-se que, como qualquer alergia, o risco de desenvolvê-la depende da rotina e da dose de exposição ao alérgeno. Portanto, o método de produção de luvas, incluindo a utilização de pó para facilitar o seu calçamento, pode influenciar a exposição eventual de pessoas sensíveis aos alérgenos derivados do látex (YIP; CACIOLI, 2002).

A biomembrana de látex natural (BLN) possui uma estrutura similar às membranas celulares, sendo produzida, quimicamente, pela indução da polimerização do poliisopreno endógeno na emulsão aquosa láctea por evaporação a baixa temperatura, onde ocorre a preservação da conformação nativa das proteínas e uma reorganização dos constituintes fosfolipídicos e proteicos do látex. Os cuidados especiais tomados na polimerização fazem com que a biomembrana adquira uma microarquitetura particular, com uma superfície natural, que permite aderência celular e estimulam os vários tipos celulares, especialmente os polimorfonucleares envolvidos nos processos de cicatrização de feridas. Essa biomembrana com tais características pode ser fabricada na forma laminar (utilizada como curativo) ou em vários formatos, como próteses, preparados a partir de moldes especiais (MRUÉ, 1996).

Frade et al. (2001) observaram sinais evidentes de estímulo à granulação que puderam ser visualizados no paciente, clínica e histopatologicamente, a partir do 15º

dia de tratamento com a BLN, havendo redução acentuada dos sintomas, inclusive o desaparecimento da dor. A estes resultados soma-se, a tese de doutoramento intitulada "Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico da cicatrização na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*" do próprio Frade, comparando o tratamento convencional de úlceras de perna (Fibrase[®]) com a BLN. Concluiu que apesar de não ter encontrado diferenças clínicas e histopatológicas estatisticamente significantes entre os dois produtos, foi observado, imunohistoquimicamente, uma redução da expressão da enzima NO-sintase induzida (iNOS) no grupo látex, proporcionando desbridamento da ferida, além de uma maior produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nesse grupo em relação ao controle o que justifica a neoangiogênese estimulada pela biomembrana. Conclui ainda que a BNL oferece uma harmonia na condução e na organização do tecido cicatricial tendo em vista o perfil dinâmico da iNOS e a expressão do fator TGF β 1 (FRADE, 2003; FRADE et al., 2012).

Andrade et al. (2011) mostram em seu trabalho a implantação subcutânea da BLN no dorso de camundongos C57BL/6 sadios comparando a membrana de látex desnaturada (luva cirúrgica) com o implante sintético de politetrafluoretileno (ePTFE) e com um trauma cirúrgico no tecido subcutâneo. Após diferentes análises de imagens em relação ao infiltrado inflamatório, angiogênese e fibroplasia; o tricrômio de Gomori quanto à colagênese; a imunoistoquímica para iNOS, IL-1 β , TGF- β 1, VEGF e dosagens por ELISA e mieloperoxidase (infiltrado neutrofílico), constatou que a BLN atua na fase inflamatória da cicatrização com um importante recrutamento de neutrófilos, parecendo assim influenciar diretamente nas fases subsequentes do processo de cicatrização, confirmado pelo estímulo à angiogênese, provavelmente não influenciada por VEGF, e pelo estímulo à fibroplasia independente de TGF- β 1 e sem modificação na produção colagênica.

Mendonça et al. (2010) mostraram atividade angiogênica da fração do soro do látex pelo ensaio da membrana cório-alantoide de ovo embrionado de galinha, além da atividade cicatrizante do soro do látex quando incorporado ao veículo

carboximetilcelulose e utilizado como tratamento em úlceras em orelha de coelhos.

Desta forma, após todas essas considerações sobre o uso do látex como indutor de cicatrização de úlceras, porém somente úlceras crônicas, torna-se relevante o estudo da cicatrização de escoriações em ratos (úlceras agudas) tratadas topicamente com o soro do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* incorporado a um veículo gel-creme.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia do soro do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização de escoriações cutâneas em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do soro total do látex em cultura de fibroblastos NIH-3T3;
- Avaliar a influencia do soro total do látex na migração/proliferação em cultura de queratinócitos humanos;
- Padronizar o método de escoriação cutânea com aparelho dermoabrasor;
- Comparar a reepitelização das escoriações cutâneas tratadas com soro fisiológico, antisséptico e soro total do látex por meio do índice de cicatrização das escoriações (ICE);
- Avaliar por histopatologia a espessura da crosta e epiderme das escoriações cutâneas tratadas com soro fisiológico, antisséptico e soro total do látex;
- Avaliar a fase inflamatória da cicatrização pela participação dos neutrófilos, utilizando o método de quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO), nos três diferentes tratamentos.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extração do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*

O látex é extraído através de incisões em formato de meia espiral na casca de troncos dos clones RRhim 600 e GT-1 da seringueira *Hevea brasiliensis*. Essas incisões expõem o conteúdo citoplasmático dos vasos laticíferos na região do floema secundário, o látex natural, que recebeu de 0,5% a 2,0% de hidróxido de amônio ao ser coletado nos recipientes fixados às árvores, a fim de que sua coagulação espontânea seja evitada.

Ao látex amoniacal (látex acrescido de hidróxido de amônio) é acrescentada solução de ácido acético a 2,2% (1:2, v/v) sob agitação branda. O material permaneceu em repouso, à temperatura ambiente, por aproximadamente 30 minutos, tempo suficiente para que a coagulação ocorresse e a retração do coágulo iniciasse. O soro, de aspecto amarelado e translúcido, foi decantado e sua obtenção concluída através da compressão da borracha por um bastão de vidro. Ele foi então diluído em água destilada (1:1, v/v) e teve o pH elevado para 9,0 com NaOH concentrado. Nesta etapa, algumas proteínas são precipitadas, tornando necessária a filtração da solução em papel de filtro qualitativo. A cada 500 mL de látex amoniacal, 2 L de soro diluído são gerados e prontamente cromatografados.

O soro do látex puro foi diluído em meio de cultura DMEM e/ou meio específico para queratinócitos nas concentrações de 0,1%-10% para o teste de viabilidade e 0,00001%-1% para o teste de migração/proliferação.

O soro do látex e o Regederm® foram disponibilizados pela Empresa Pele Nova Biotecnologia e Valeant Farmacêutica do Brasil.

3.2 Avaliação da citotoxicidade e migração/proliferação do soro do látex em cultura de fibroblastos NIH-3T3 e queratinócitos humanos

3.2.1 Fonte de fibroblastos e queratinócitos humanos

Os fibroblastos de comundongos NIH-3T3 foram adquiridos da *American Type Culture Collection* (ATCC CRL-1658, Manassas, Virginia, U.S.A) e os queratinócitos humanos foram utilizados a partir do banco de células do Laboratório de Cicatrização e Hanseníase do Anexo B da FMFP-USP sob supervisão do Professor Doutor Marco Andrey Cipriani Frade (ANEXO A).

3.2.2 Cultura celular

Sob condições estéreis, fibroblastos NIH-3T3 e queratinócitos humanos, criopreservados em soro bovino fetal (SBF) com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), foram descongelados em banho-maria à 37°C e transferidos para tubos cônicos tipo *falcon* contendo 10 mL meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (GIBCO – Invitrogen Corporation – Grand Island, NY, EUA) gelado e centrifugados a 1000 rpm com temperatura baixa (10°C) por 10 minutos para diluir o DMSO (Sigma-Aldrich Co. LLC.). De cada *falcon* o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram ressuspensos em 8 mL de meio de cultura DMEM (fibroblastos) e meio específico para queratinócitos, ambos suplementados com 10% SBF, 1% de solução de L-glutamina e 1% solução de antibiótico e antimicótico (penicilina 10.000 U, estreptomicina 10.000 µg e 25 µg de anfotericina B) (GIBCO – Invitrogen Corporation

– Grand Island, NY, EUA), e cultivadas em garrafas de 75 cm² a 37°C em incubadora com 5% de CO₂.

Após atingir 80% de confluência, para o descolamento das células aderidas, foi adicionado à cultura 4 mL de solução de tripsina 0,05% (GIBCO – Invitrogen Corporation – Grand Island, NY, EUA) e incubada à 37°C por 5 minutos. Findado o tempo foi adicionado 5 mL de meio de cultura DMEM completo, para parar a reação. O volume foi então transferido para um tubo cônico de 15 mL e centrifugado à temperatura ambiente a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de meio de cultura. Em seguida as células foram contadas em Câmara de *Neubauer* para utilização no ensaio de citotoxicidade e migração/proliferação (FRONZA et al., 2009; MASSON-MEYERS et al., 2013)

3.2.3 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular dos fibroblastos NIH-3T3 foi aferida pelo método colorimétrico 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazólio MTT, que é baseado na capacidade de células vivas reduzirem o sal tetrazólio em cristais de formazan com coloração púrpura.

Fibroblastos NHI-3T3 foram plaqueados em microplacas de 96 poços de fundo plano, na densidade de 2×10^4 células/mL (volume de 200 µL) por poço, em triplicata. As placas foram incubas à 37°C em estufa com 5% de CO₂ para aderência e confluência. Após este período, foi retirado todo o volume do meio de cultura e adicionou-se 200 µL das soluções teste contendo soro do látex nas seguintes concentrações: 0,1%, 1% e 10%; para o controle positivo de viabilidade foi usado apenas meio de cultura DMEM e para controle negativo meio de cultura DMEM acrescido 50% de DMSO. As placas foram incubadas à 37°C em estufa com 5% de CO₂ durante os tempos de 24 e 48 horas. Após os tempos de incubação, foram

retiradas todas as soluções dos poços e as células lavadas com tampão fosfato-salino (PBS). Foi adicionado 20 µL da solução estoque de MTT (Sigma-Aldrich Co. LLC.) (5 mg/mL em PBS), associada a meio de cultura DMEM (sem vermelho de fenol) (180 µL) e as placas foram incubadas sob as mesmas condições anteriores durante 3 horas. Em seguida foi retirada a solução de cada poço e adicionado 200 µL de DMSO para solubilizar os sais de formazan e então, procedeu-se com a leitura da absorbância a 570 nm. O experimento foi realizado em triplicata (KRISHNAN et al., 2014, MOHAMMADI et al., 2015, QIAO et al., 2014).

O resultado foi expresso em percentagem de citotoxicidade, que foi determinado por meio da relação entre a densidade ótica (DO) das diferentes concentrações do soro pela DO do controle positivo, multiplicado por 100 (KRISHNAN et al., 2014, MOHAMMADI et al., 2015, QIAO et al., 2014).

$$\% \text{ Citotoxicidade} = \frac{\text{DO diferentes concentrações do soro} \times 100}{\text{DO controle positivo}}$$

3.2.4 Avaliação da migração/proliferação celular – *Scratch assay*

Queratinócitos humanos foram plaqueados em microplacas de 24 poços de fundo plano, na densidade de 3×10^4 células (volume de 500 µL), por poço, em triplicata. As placas foram incubas à 37°C em estufa com 5% de CO₂ para aderência e confluência. Com auxílio de uma ponteira estéril de 200 µL foi criado um risco "arranhão" na monocamada das células seguido pela retirada de todo volume do meio de cultura. Em seguida adicionou-se 500 µL das soluções teste contendo soro do látex nas seguintes concentrações: 0,00001%, 0,0001%, 0,001, 0,01, 0,1% e 1%, meio de cultura para queratinócitos (basal) e meio de cultura para queratinócitos acrescido 50% de DMSO (controle negativo). As placas foram incubadas à 37°C em

estufa com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após este período, os poços foram lavados com PBS, a seguir 200 µL de paraformaldeído 4% (PFA) foram adicionados e mantidos por 20 minutos, após lavou-se novamente com PBS e foi adicionado 200 µL do marcador nuclear 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific Inc. – Molecular Probes) (1 gota/ mL de PBS) e aguardou-se a reação por 5 minutos no escuro. Foram feitas 10 fotos, em microscópio invertido com fluorescência, de cada concentração ao longo de todos os campos no mesmo aumento.

As imagens foram transferidas para um computador e primeiramente tratadas no programa Photoshop® CS6 no qual foram medidas a partir do controle negativo (sem migração), as demais foram cortadas utilizando 80% do total da medida do controle negativo para ter a certeza de que todas as células quantificadas foram as que migraram. Em seguida, as imagens cortadas foram analisadas pelo *software* ImageJ 1.46 disponível gratuitamente na rede e desenvolvido por Wayne Rasband do *Research Services Branch, National Institutes of Health - NIH* (Bethesda, Maryland, EUA).

A imagem foi aberta pressionando em <Open> no *menu* <File> (figura 1A), em seguida, <Type>, <8-bit> no *menu* <Image> (Figura 1B), ainda no *menu* <Image> abriu-se <Adjust>, <Threshold> no quadro deixar marcado a opção "Over/Under" e se necessário alterar a barra de baixo (figura 1C), clicar duas vezes em "Apply", a imagem ficou com fundo branco e as células na cor preta (figura 1D). Em <Process> no *menu* abriu-se <Binary> e <Watershed> para a separação das células (Figura 1E). No *menu* <Analyze>, <Analyze Particles>, colocar na opção <Size> 30-"infinity", <Show> escolher a opção "Outlines" e marcar as opções "Exclude on edges", "Clear results" e "Summarize" (Figura 1F). Clicar em "Ok" e aparecerá a quantidade de células (Figura 1G). O experimento foi realizado em triplicata.

Figura 1: Esquema de quantificação da migração/proliferação celular das imagens com marcador nuclear DAPI usando o *software* ImageJ.

O resultado foi expresso com a média das 10 imagens de cada concentração em percentagem de migração celular, que foi determinado por meio da relação entre a quantidade de células migradas nas diferentes concentrações do soro pela quantidade de células migradas do controle basal, multiplicado por 100 (FRONZA et al., 2014).

$$\text{Resultado \%} = \frac{\text{quantidade de células migradas nas diferentes concentrações do soro} \times 100}{\text{quantidade de células migradas do controle basal}}$$

3.3 Animais

Foram utilizados 72 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, adultos (180-200g), oriundos do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os animais ficaram 5 dias no biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP para aclimação antes do procedimento cirúrgico e receberam água e comida *ad libitum*. Foram mantidos em gaiolas individuais, à temperatura constante de 22°C, com umidade relativa do ar a 60% e exaustão de ar automática e luz artificial em um ciclo alternado de claro/escuro de 12 horas (6h-18h), conforme estabelecido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, CETEA-FMRP-USP (processo no 072/2012) (Anexo B).

3.4 Padronização dos grupos

Os animais foram divididos em 3 grupos com 24 ratos cada, a saber:

Grupo Soro Fisiológico (GSF): os animais foram submetidos ao tratamento tópico com soro fisiológico 0,9%;

Grupo Antisséptico (GAS): os animais foram submetidos ao tratamento tópico com antisséptico (Merthiolate®);

Grupo Soro do Látex (GSLX): os animais foram submetidos ao tratamento tópico com soro de látex a 10% (Regederm®).

Os produtos foram aplicados sobre as escoriações sendo a primeira aplicação logo após o procedimento cirúrgico, e subsequente foram realizadas diariamente durante 10 dias, diferenciando o tipo de tratamento de acordo com os grupos pré-estabelecidos.

3.5 Procedimento cirúrgico: padronização da confecção de escoriações cutâneas dorsais

Os ratos foram pesados, anestesiados por via intraperitoneal, com solução de Tribromoetanol 2,5% (100µL/10g; Sigma Chemical Company – St. Louis, MO, EUA) em salina estéril. Foi realizada a tricotomia na pele do dorso do animal e em seguida foi feita assepsia com álcool 70%. Para realização da escoriação utilizou-se o aparelho Dermoabrasor LB-100 (BELTEC Indústria e Comércio de Equipamentos Odontológicos – Araraquara, SP) com uma lixa diamantada RH14633 (RHOSSE Instrumentos e Equipamentos Cirúrgicos – Ribeirão Preto-SP) (Figura 2A), que foi passada no dorso do animal com uma velocidade de 20-30 mil rotações por minuto (RPM) fazendo uma lesão cutânea de aproximadamente 2 cm² (Figura 2B). Após a cirurgia foi aplicado por via intraperitoneal dipirona 50 mg/Kg de peso diluída em salina, 2 vezes ao dia (12/12 horas) durante as primeiras 24/48 horas, conforme alterações comportamentais dos animais quanto à dor. Em seguida ao procedimento os animais voltaram para suas respectivas gaiolas até o final do experimento.

Figura 2: (A) Aparelho dermoabrasor utilizado para confeccionar as escoriações no dorso dos ratos. (B) Posicionamento do rato no suporte para fotografia padronizada das lesões. A régua milimetrada do suporte ao lado do rato serviu como medida conhecida para análise da reepitelização.

3.6 Avaliação clínica dos animais

Os animais foram avaliados clinicamente quanto a alterações de comportamento (agitação, prostração), reações alérgicas (presença de vesículas, eritema, pruído) ou infecções (sinais flogísticos, purulência) e também referente a quantidade de crosta e a perda da mesma frente aos tratamentos.

3.7 Eutanásia e dias de seguimento das avaliações

Os animais foram submetidos à eutanásia por dose excessiva de anestésico (Tribromoetanol 2,5%) nos dias 2, 7 e 10 após o procedimento cirúrgico. As escoriações foram fotografadas para análise da reepitelização.

3.8 Captura e análise das imagens

As escoriações de cada animal foram fotografadas nos dias 2, 7 e 10 por câmera digital Kodak EasyShare M575 no tamanho de 14 megapixels no modo básico, sem *flash* e sem *zoom*, que foi fixada em um aparelho padronizado para captura de imagens, apresentando uma régua milimetrada com referência de medida, confeccionado na Oficina de Precisão da FMRP-USP (figura 3), semelhante ao realizado por Leite et al. (2015) para úlceras cutâneas quando utilizou índice de cicatrização das úlceras (ICU).

Figura 3: Suporte utilizado para padronização da fotografia das escoriações e também para aferição das mesmas utilizando o cálculo da área das lesões (em mm²).

Posteriormente, as imagens das escoriações foram transferidas para um computador e analisadas pelo *software* ImageJ 1.46r, disponível gratuitamente na rede e desenvolvido por Wayne Rasband do *Research Services Branch, National Institutes of Health - NIH* (Bethesda, Maryland, EUA).

Primeiramente, em *<Set Measurements>* do *menu <Analyze>* o ImageJ foi programado para calcular áreas de imagens habilitando a caixa "Area" (Figura 4A). Para abrir a imagem foi pressionado *<Open>* no *menu <File>* (Figura 4B), foi realizada a calibração do *software* baseando-se em distância conhecida. Utilizando a ferramenta "Straight", foi traçado na régua o limite correspondente à 10 mm (Figura 4C). Em *<Set scale>* do *menu <Analyze>* apareceu o valor correspondente ao traço feito na régua. Na caixa "Know distance" foi digitado o número "10" e na caixa "Unit of length" digitado "mm". A caixa "Global" deve sempre ficar habilitada. Para cada imagem foi feita a calibração do *software* (Figura 4D). Utilizando a ferramenta "Polygon selections" foi traçado o contorno da escoriação (Figura 4E). Por último, pressionando em *<Measure>* do *menu <Analyze>* obteve-se o valor da área traçada em mm² (Figura 4F).

Figura 4: Esquema do cálculo da área das escoriações usando o *software* ImageJ.

Após a realização do cálculo das áreas no *software*, foi utilizado o programa Microsoft Excel 2013 para realizar o cálculo do índice de cicatrização das escoriações (ICE) pela fórmula:

$$\text{ICE} = \frac{\text{Área inicial} - \text{Área final}}{\text{Área inicial}}$$

Valores de ICE maiores que zero representam diminuição da área exulcerada (reepitelização), valores menores que zero representam aumento da área exulcerada e valores iguais a zero representam sem sinais de reepitelização, semelhante ao realizado por Leite et al. (2015) para úlceras cutâneas quando utilizou ICU.

3.9 Coleta do material para estudo

Após eutanásia, os animais tiveram toda a pele dorsal removida no local da lesão com auxílio de uma tesoura, a qual foi utilizada para as seguintes finalidades:

- ✓ **Estudo histopatológico:** Foi utilizado uma parte do tecido exulcerado de cada 8 animais (n=8 amostras) no 10º dia de cada tratamento para serem acondicionados em solução de formaldeído 10% tamponada para estudo histopatológico [coloração com hematoxilina e eosina (HE)]. As melhores secções foram escolhidas para mensurar a crosta e epiderme.
- ✓ **Estudo bioquímico:** A outra parte do tecido exulcerado de cada 8 animais (n=8 amostras) retirado nos tempos de 0, 2, 7 e 10 dias de cada tratamento foram pesados e acondicionados em *eppendorfs* com tampão específico, em freezer -80 °C para a dosagem de MPO.

3.10 Estudo histopatológico – mensuração da epiderme e da crosta

As biópsias foram incluídas em parafina seguindo o protocolo já estabelecido no Laboratório de Dermatologia do HCFMRP-USP. Os cortes foram de 5 µm, corados simultaneamente e com o mesmo tempo com HE. Empregou-se o microscópio óptico Leica DM 4000B® equipado com uma câmera LEICA DFC® 280 (Leica Microsystems, Germany) para captura das imagens histológicas no aumento de 400X. Pelo software Leica Application Suite (LAS) versão 3.2.0, as imagens foram calibradas de 242 pixels em 50µm. Posteriormente, traçou-se uma linha da camada granulosa da epiderme até a transição com a derme (espessura da epiderme) e espessura da crosta. Ao final do traçado, o software forneceu a distância em µm (LEITE et al., 2011).

3.11 Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

As biópsias coletadas (8 animais/tempo/tratamento) foram acondicionadas em *eppendorfs* de 2 mL com 200 μ L de tampão gelado de NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02M, NaEDTA 0,015M pH 4,7 (tampão 1) gelado e permaneceram no freezer a -70°C até a dosagem. Os fragmentos foram homogeneizados pelo Omni (TH) Tissue Homogenizer (Kennesaw, GA, EUA) a 13.000 rpm e após centrifugação foi ressuspenso em tampão NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (tampão 2). Em seguida, 5 μ L do sobrenadante das amostras foi colocado em placa de 96 poços para o ensaio. Para a curva padrão foi utilizada uma amostra de neutrófilos obtida da cavidade peritoneal de camundongo após 6 horas de injeção de carregenina. Em cada poço da placa foram adicionados 25 μ L de 3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma Chemical Company – St. Louis, MO, EUA) e em seguida 100 μ L de H₂O₂. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4M e lida em leitor de placas a 450 nm. Os resultados foram expressos em número de neutrófilos $\times 10^3$ /mg tecido (SOUZA et al., 2001; LEITE et al., 2015).

3.12 Análise dos resultados

Para todos os métodos foi aplicado o teste estatístico de análise de variância para múltiplas comparações de amostras não paramétricas (One-Way ANOVA e pós Teste de Bonferroni).

Foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5.0 para confecção dos gráficos e realização dos testes estatísticos.

Os valores de $p < 0,05$ mostram evidências estatísticas de que há diferença entre os dados em questão sob intervalo de confiança de 95%.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da viabilidade celular

Após 24 horas de incubação com o soro do látex, os fibroblastos nas concentrações de 1% e 0,1% apresentaram porcentagens de viabilidade comparada com o controle (100%) de 109% e 105%, respectivamente. Enquanto que as células incubadas com a concentração de 10% apresentaram apenas 9% de viabilidade (Figura 5A).

No tempo de 48 horas, após incubação, observou-se um mesmo perfil do gráfico de 24 horas, as concentrações de 1% e 0,1% com percentual de viabilidade de 91% e 94%, respectivamente, já a concentração de 10% apresentou somente 10% de viabilidade (Figura 5B), o que demonstra a segurança do uso do látex nessas respectivas concentrações.

Figura 5: Percentual de viabilidade dos fibroblastos NHI-3T3 em relação à cultura controle (correspondente a 100% células viáveis), pelo método MTT, distribuídos em várias concentrações do tratamento com soro do látex por **(A)** 24 horas e **(B)** 48 horas. Os valores são médias $\pm$ desvio-padrão (SD). Teste estatístico ANOVA, pós-teste Bonferroni: *Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo; #Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle basal.

4.2 Avaliação da migração/proliferação celular – Scratch Assay

Após 24 horas de incubação com as concentrações do soro do látex, os resultados mostraram a migração/proliferação celular de queratinócitos humanos, podendo ser observado maior números de células migradas na concentração de 0,01% diferente principalmente do controle basal e 1% (Figura 6A).

Pode-se observar que todas as concentrações do soro do látex, exceto 1%, foram superiores ao controle basal mesmo sem evidência de diferença, mostrando ainda uma superioridade da concentração de 0,01% com relação a 1% com evidência de diferença. Os resultados estão expressos como porcentagem de migração/proliferação celular de cada tratamento comparado ao grupo basal (meio de cultura (Figura 6B).

Figura 6: **(A)** Imagem microscópica fluorescente do ensaio *scratch assay* com queratinócitos humanos. A migração celular no “arranhão” foi observada em resposta a uma lesão artificial tratadas com as concentrações do soro total do látex. **(B)** Migração/proliferação celular pelo método *Scratch Assay*. Percentual de migração

dos queratinócitos humanos em relação ao meio de cultura basal distribuídos em várias concentrações do tratamento com soro total do látex (SLX) por 24 horas em cultura. Os valores são médias $\pm$ desvio-padrão (SD). Teste estatístico ANOVA, pós-teste Bonferroni. *Corresponde à diferença estatística ($p < 0,05$) entre grupos.

4.3 Avaliação clínica dos animais

Durante o período de tratamento, por meio da observação clínica, nenhum animal apresentou alterações comportamentais, reações alérgicas ou infecções. As escoriações de todos os grupos apresentaram crosta por volta do 2º dia. No entanto, a queda das mesmas aconteceu de forma mais rápida no GSLX (a partir do 5º dia), ao passo que nos demais grupos foi a partir do 7º dia. Além disso, foi observada crosta mais tênue nas escoriações do GSLX.

4.4 Evolução do processo de reepitelização

Quanto ao cálculo dos ICEs, no 2º dia após o procedimento cirúrgico não mostrou evidência de diferença entre os grupos estudados. Já no 7º dia, as escoriações do GSLX apresentaram maiores índices de reepitelização em relação ao GSF e GAS com evidência de diferença. No 10º dia, praticamente todas as escoriações estavam reepitelizadas no GSLX, diferentemente dos demais grupos que ainda apresentavam crosta e atraso na reepitelização. (Figuras 7A e B).

Figura 7: (A) Seguimento clínico das escoriações dérmicas. (B) Quantificação da reepitelização (pelo índice de cicatrização) tratadas com SF, AS e SLX. Teste estatístico ANOVA, pós-teste Bonferroni. *Corresponde à diferença estatística ($p < 0,05$) entre grupos.

4.5 Avaliação histopatológica

A análise histológica da crosta e da epiderme foi realizada pela coloração das lâminas por hematoxilina-eosina somente no dia 10 de cada tratamento. A histologia mostrou a situação de melhor e pior reepitelização dentro do mesmo grupo no dia 10. O grupo GSLX mostrou uma menor quantidade de crosta e uma epiderme bastante espessa com maiores camadas de queratinócitos deixando assim mais resistente, diferentemente dos demais grupos que ainda tinham maior quantidade de crosta e uma epiderme mais tênue (Figura 8).

Com relação à espessura da crosta, observou-se um aumento do GSF em relação ao GAS e GSLX com evidência de diferença mostrando assim dificuldades na reepitelização das escoriações (Figura 9A). Com relação à média da espessura da epiderme grupo GSLX mostrou evidência de diferença em relação ao GSF e GAS (Figura 9B).

Figura 8: Fotomicrografia das áreas exulceradas tratadas topicamente com SF, AS e SLX no 10º dia de seguimento coradas com hematoxilina-eosina, destaca-se a quantidade de crosta e espessura da epiderme, sendo uma fotomicrografia pior e melhor em cada grupo e tratamento. As setas vermelhas indicam a espessura da epiderme.

Figura 9: (A) Distribuição da média da espessura (μm) da crosta e **(B)** distribuição da média da espessura (μm) da epiderme dos grupos tratados com SF, AS e SLX no 10º dia de segmento. Teste estatístico ANOVA, pós-teste Bonferroni. *Corresponde à diferença estatística ($p < 0,05$) entre grupos.

4.6 Avaliação bioquímica: Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

O ensaio bioquímico foi realizado para avaliar a participação de neutrófilos no processo inflamatório. No 2º dia observou-se um aumento dos níveis de MPO em todos os grupos. Já no 7º dia observou-se uma diminuição da enzima nos grupos, mostrando evidências de diferença do 2º para o 7º dia nos grupos GSLX e GAS. No 10º dia os grupos apresentaram o mesmo perfil do 7º dia, porém observando já uma similaridade dos grupos GSLX e GAS em relação ao controle basal (Figura 10).

Figura 10: Quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO) das escoriações dérmicas tratadas topicamente com SF, AS e SLX por 2, 7 e 10 dias de seguimento. Teste estatístico ANOVA, pós-teste Bonferroni. *Corresponde à diferença estatística ($p < 0,05$) entre os dias no mesmo grupo.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Úlceras cutâneas constituem um importante problema de saúde pública que afeta milhões de pacientes em todo o mundo (RANZATO et al., 2011). O objetivo principal no tratamento de úlceras é conseguir uma rápida cicatrização com resultados funcionais e estéticos ideais. Lesões de agudas (escoriações) espera-se um processo de cicatrização mais rápido e sem sequelas quando se utiliza produtos que previnem infecções e fornecem ambiente adequado para o processo (NICKS et al., 2010; SINGER; DAGUM, 2008; WARNER et al., 2008).

Estudos na literatura com lesões de exulcerações são escassos, contudo é de grande importância que se façam estudos sobre a eficácia e segurança dos produtos empregados no tratamento dessas lesões de forma a oferecer diferentes alternativas para o tratamento mais adequado, uma vez que segundo Nicks et al. (2010) é frequente a chegada de pacientes com este tipo de lesões nos serviços de emergência.

Estudos têm sido realizados para a melhor compreensão do processo cicatricial e também há na incessante busca por novos tratamentos. Vários são os produtos naturais conhecidos por suas propriedades cicatrizantes, baseadas tanto em conhecimento popular quanto evidências científicas (MASSON-MEYERS et al., 2013; RANZATO et al., 2011).

Dentre esses produtos naturais, podemos destacar o látex da seringueira *Hevea brasiliensis*, utilizado por Frade et al. (2001) e Frade (2003), que propôs o uso da biomembrana de látex como uma alternativa eficiente e econômica para o tratamento de úlceras de perna. Clinicamente foram observados estímulos à granulação e confirmado por histopatologia, associada à redução dos sintomas, principalmente com relação à dor em pacientes com úlceras de perna crônicas. A BLN ainda induziu a diferenciação do tecido de cicatrização apresentando aumento dos fatores de crescimento TGF- β 1 e VEGF e redução da enzima iNOS.

Frade et al. (2004) utilizou a biomembrana de látex em pacientes com úlceras crônicas diabéticas e mostrou ser eficaz nas várias fases da cicatrização, realizando o desbridamento (remoção do tecido necrótico), estimulando a proliferação e granulação tecidual e também a reepitelização das úlceras. O uso do látex no tratamento das úlceras crônicas está bem estabelecido e relatado na literatura, no entanto, o mesmo não acontece com as lesões agudas, o que reforça a importância do nosso trabalho em estudar um modelo agudo de dermoabrasão para avaliar a eficácia do látex da seringueira *Hevea brasiliensis*.

Em relação à citotoxicidade foi feito o teste de MTT em fibroblastos NIH-3T3 em diferentes concentrações do látex onde se observa a capacidade de células vivas reduzirem o sal tetrazólio em cristais de formazan com coloração púrpura. Neste teste, o SLX mostrou-se viável nas concentrações de 1% (109%) e 0,1% (105%), diferentemente na concentração de 10% (9%) onde se observou baixa viabilidade, semelhante ao controle negativo (7%) no tempo de 24 horas e mostrando um mesmo perfil no gráfico de 48 horas. Com resultados semelhantes ao nosso estudo, Almeida et al. (2014) mostrou viabilidade de fibroblastos NIH nos tempos de 24, 48 e 72 horas quando expostos em cultura com biomembranas de látex da *Hancornia speciosa*.

Mendonça (2008), avaliou a citotoxicidade do soro do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* nas concentrações de 0,1 e 0,01 mg/mL em fibroblastos *HEK293T* no tempo de 48 horas e concluiu que não houve citotoxicidade do látex, corroborando com os achados do atual estudo. Andrade (2012) utilizou uma fração proteica do soro látex (F1) na concentração de 0,01% para avaliar a citotoxicidade em fibroblastos 3T3 NIH durante 24 horas e encontrou viabilidade celular em seus resultados. Ambos os estudos corroboram com o atual trabalho.

Na literatura não há estudos in vitro sobre proliferação envolvendo o soro do látex da seringueira *Hevea brasiliensis*. O método *scratch assay* já é bem descrito na literatura como um ensaio de proliferação e/ou migração para cicatrização podendo utilizar drogas tanto inibidoras quanto estimuladoras no tratamento (AICHELE et al.,

2013; FRONZA et al., 2009; JOHNSTON et al., 2016; RIAHI et al., 2012; UPTON et al., 2011). No presente estudo foram utilizados queratinócitos humanos para o ensaio no tempo de 24 horas submetidos às várias concentrações do soro do látex. A concentração de 0,01% do SLX promoveu a proliferação dos queratinócitos com 89%, superior ao controle, propriedade importante na ação cicatrizante. Entretanto, a concentração de 1% não mostrou eficácia proliferativa, tendo demonstrado paradoxalmente uma ação antiproliferativa, o que pode sinalizar necessidade de estudos futuros quanto à atividade dose-dependente do látex na proliferação celular, um efeito paradoxal que pode ter importante aplicação no tratamento de cicatrizes hipertróficas e quelóides, por exemplo.

Diante dos resultados positivos nos estudos *in vitro* do presente estudo e ausência de relatos na literatura sobre o uso do soro do látex em exulcerações, buscamos padronizar um modelo de escoriação, utilizando um dermoabrasor rotativo com lixa adiamantada de espessura padronizadas para que todas as lesões induzidas fossem semelhantes em todos os animais.

Com relação ao índice de cicatrização das escoriações, os animais que receberam o tratamento com o Regederm® (látex) apresentaram índices superiores comparado com os demais grupos, antisséptico (Merthiolate®) e soro fisiológico no 7º dia de segmento, mostrando assim, consequentemente melhor reepitelização. No 10º dia praticamente todos os animais do grupo Regederm® estavam reepitelizados diferentemente dos demais grupos, os quais foram observados atraso na reepitelização e grande quantidade de crosta, resultados estes demonstrados clinicamente (Figuras 7A e 8).

Mendonça et al. (2010) utilizaram o soro do látex veiculado em carboximetilcelulose para tratar úlceras em orelhas de coelhos na concentração de 0,01% do soro do látex. Andrade (2012) utilizou uma das proteínas (F1) do soro do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* na concentração de 0,01%, também em veículo carboximetilcelulose, para tratar úlceras cutâneas em ratos diabéticos. Em ambos

trabalhos observou-se o poder cicatrizante do látex corroborando assim com os resultados do nosso estudo.

Nakamizo et al. (2013) realizaram estudo utilizando modelo semelhante com a indução de uma lesão no abdômen de camundongos (C57BL/6 e BKS.Cg) fazendo-se vários arranhões na pele dos animais utilizando escova de aço inoxidável. Essas lesões foram tratadas com fator de crescimento fibroblástico básico e mostrou que as lesões ainda não estavam reepitelizadas até o 15º de tratamento, diferentemente dos resultados obtidos com o soro do látex em nosso estudo.

Com relação à espessura da crosta, constituída por exsudato, dependente da fase inflamatória e da presença de sujidades, no 10º dia verificamos que os animais tratados com Regederm® estavam praticamente sem crosta (Figura 7A). No entanto, esta observação se deu a partir do 5º dia, pois neste grupo vários animais já se encontravam sem crosta, enquanto que no grupo do Merthiolate® e do soro fisiológico ainda havia crostas, o que resultou diretamente no atraso de sua reepitelização. Gupta et al. (2014) utilizou um modelo de escoriação semelhante, promovendo uma lesão de 1,2 cm x 1,2 cm com uma lâmina de bisturi estéril n.15 em camundongos BALB/c, que foram tratados posteriormente com laser de baixa intensidade (730um e 908um) notando que ainda permaneciam com crosta no 8º dia, semelhante aos resultados acima descritos com Merthiolate e soro fisiológico, diferente ao observados com o uso do Regederm®. Já as lesões tratadas com potência 635um e 810um pareciam mais reepitelizados e sem a crosta. Destaca-se porém, que a área lesada foi menor e a reepitelização ocorreu no 8º dia, diferente do presente estudo em que a área lesada foi quase o dobro do tamanho, além de mostrar a eficácia do uso do Regederm®, quando comparado aos demais grupos estudados em nosso trabalho, além de outros tratamentos mostrados na literatura.

Assim como na espessura da crosta, na espessura da epiderme não foi diferente, nas lesões tratadas com Regederm® podemos observar um número maior de camadas de queratinócitos, resultando em uma pele morfofisiologicamente mais adequada do que nos demais grupos estudados. Gupta et al. (2014) observou ainda

camadas de queratinócitos mais espessa somente no grupo tratado com laser na potência de 810nm. Sendo assim, podemos afirmar que o SLX (Regederm®) atuou com maior eficácia e rapidez na cicatrização das exulcerações, pois em 10 dias as lesões de uma área quase o dobro de tamanho comparadas às usadas por Gupta et al. (2014), já se encontravam praticamente reepitelizadas e sem crostas.

A resposta inflamatória é um passo importante no processo cicatricial, uma vez que prepara o ambiente da lesão para o processo de reparo. Entretanto, esta fase não deve ser persistente, pois pode retardar a reepitelização (ARAÚJO et al., 2010).

Vários são os trabalhos que mostraram o potencial inflamatório do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* nos primeiros dias de tratamento, mostrando ser importante no desbridamento da ferida pelo recrutamento de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos. Os autores também mostraram o efeito anti-inflamatório após 7 a 15 dias sendo importante nas fases subsequentes da cicatrização (ANDRADE et al., 2011; DOMINGOS et al., 2009; FRADE et al., 2004; FRADE et al., 2006; FRADE et al., 2012).

Para avaliar o potencial inflamatório do produto, a dosagem da mieloperoxidase (MPO), presente principalmente em neutrófilos (um monócito contém 1/3 de toda MPO encontrada nos neutrófilos), indica o nível de infiltrado neutrofílico na lesão. Por esta análise, podemos observar que os três grupos foram capazes de recrutar uma grande quantidade de neutrófilos para lesão no 2º dia, embora não persistente, uma vez que no 7º dia houve uma diminuição significativa da enzima nos grupos Merthiolate® e Regederm®, diferente do grupo soro fisiológico. Já no 10º dia todos os grupos estavam com níveis de enzima parecidos com o basal. Apesar de não encontrarmos diferenças significantes entre os grupos quanto a dosagem de MPO, podemos observar um atraso na reepitelização nos grupos Merthiolate® e soro fisiológico.

Os resultados do presente estudo sugerem que o soro do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* é seguro em culturas de células, não prejudica o tecido cutâneo, parece promover a cicatrização devido ao seu potencial proliferativo aos

queratinócitos humanos, e também, seu potencial inflamatório na fase inicial e consequente autorregulação, o que acelerou a reepitelização das lesões, diferente dos grupos Merthiolate® e soro fisiológico.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

➤ O soro do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* mostrou-se seguro por não apresentar citotoxicidade *in vitro* aos fibroblastos NIH-3T3 nas concentrações de 1% e 0,1% nos tempos de 24 e 48 horas;

➤ O soro do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* mostrou potencial proliferativo/migratório para queratinócitos humanos principalmente na concentração de 0,01% no tempo de 24 horas;

➤ Foi padronizado modelo de escoriação cutânea na região dorsal de ratos utilizando uma lixa adiamantada acoplada ao aparelho dermoabrasor sob rotação constante e padronizada;

➤ O soro do látex (Regederm®) no modelo de escoriação, estimulou primeiramente a fase inflamatória que pareceu sofrer autorregulação, proporcionando evolução com menor formação de crosta, reepitelização com maior número de camadas epiteliais e acelerando cicatrização frente aos grupos tratados com Merthiolate® e Soro Fisiológico, o que consolida sua eficácia e segurança para o tratamento das escoriações cutâneas.

Referências

REFERÊNCIAS

ALCHELE, K. et al. Oberringer Bromelain down-regulates myofibroblast differentiation in an in vitro wound healing assay. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol**, v. 386, p. 853–863, 2013.

ALMEIDA, L. M. et al. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 25, p. 2153-2162, 2014.

ANDRADE, T. A. et al. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Braz J Med Biol**, v. 44, n. 10, p. 1036-1047, 2011.

ANDRADE, T. A. M. **Modificações teciduais e mecanismos de ação da fração F1 do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos diabéticos**. 2012. 184 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

ARAÚJO, L. U. et al. Profile of wound healing process induced by allantoin. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 25, n. 5, p. 460-466, 2010.

ARNOLD, F.; WEST, D. Angiogenesis in wound healing. **Pharmac Ther**, Oxford, v.52, p.407-422, 1991.

BANERJEE, B. et al. Unique and shared IgE epitopes of Hev b 1 and Hev b 3 in latex allergy. **Molecular Immunology**, v. 37, p. 789-798, 2000.

BARANOSKI, S.; AYELLO E. A. **Wound Care Essentials**. 1st ed. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

BEANNES, S. R. et al. Skin repair and scar formation: the central role of TGF – β . **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, p. 1-11, 2003.

BEHM, B. et al. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, p. 812- 820, 2012.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E, Wound healing: An overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, p. 1e-S-32e-S, 2006.

BRYANT, R. A. **Wound Healing Physiology**: Acute & Chronic wounds. St Louis: Nursing Management. 2000. p. 17-39.

BRYANT, R. A.; NIX, D. P. **Wound Healing Physiology**: Acute & Chronic Wounds: Current Management Concepts. 2012, p. 63-82.

CARDOSO, T. A. O. Manual de Primeiros Socorro. **Fundação Oswaldo Cruz**, p. 123. 2003.

CHAN, B. M. et al. Distinct cellular functions mediated by different VLA integrin alpha subunit cytoplasmic domains. **Cell**, v. 68, p.1051-1060, 1992.

CHILDRESS, B. B.; STECHMILLER J. K. Role of nitric role in wound healing. **Biological Research for Nursing**, v. 4, n 1, p. 5-15, 2002.

CLARK, R. A. F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. G. Tissue engineering for cutaneous wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1018–1029, 2007.

DOMINGOS, A.L. et al. Use of a latex biomembrane for bladder augmentation in a rabbit model: biocompatibility, clinical and histological outcomes. **Int Braz J Urol**, v. 35, p. 217-224, 2009.

DOUGHTY, D. B; SPARKS-DeFRIESE, B. Wound healing physiology. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. Acute and chronic wounds. Current management concepts. 4th ed. Missouri: Elsevier Mosby, 2012. cap.4, p.63-82.

EARDLEY, W. G.; WATTS, S. A.; CLASPER J. C. Limb wounding and antisepsis: iodine and chlorhexidine in the early management of extremity injury. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 11, n. 3, p. 213-223, 2012.

EDWARDS, S.L. Innate Defences. In: MONTAGE, S.E.; WATSON, R.; HERBERT, R.A. Physiology for nursing practice. 3rd ed. Spain: Elsevier, 2005. p. 635-683.

EHRENREICH, M.; RUSZCZAK, Z. Update on Tissue-Engineered Biological Dressings. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 9, p. 2407-2424, 2006.

EMING S. A.; KRIEG T.; DAVIDSON J. M.; Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 514-25, 2007.

FAZIO, M. J.; ZITELLI, J. A.; GOSLEN, J. B. Cicatrização de feridas. In: Coleman III WP, Hanke CW, Alt TH, Asken S. Cirurgia Cosmética - Princípios e Técnicas. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. p. 18-23.

FIERRO, I. M. et al. The involvement of nitric oxide in the anti-Candida albicans activity of rat neutrophils. **Immunology**, v. 89, n. 2, p. 295-300, 1996.

FRADE, M. A. C. et al. Chronic phlebopatic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **International Journal of Dermatology**, v. 40, n. 3, p. 289-291, 2001.

FRADE, M. A. C. **Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico da cicatrização na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis***. 2003. 164 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

FRADE, M. A. C. et al. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. **Med Cutan Iber Am**, v. 32, n. 4, p. 157-162, 2004.

FRADE, M. A. et al. A natural biomembrane as a new proposal for the treatment of pressure ulcers. **Med Cutan Iber Lat Am**, v. 34, p. 137-142, 2006.

FRADE, M. A. C. et al. Biomembrana vegetal na cicatrização de úlceras venosas crônicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, p. 45-51, 2012.

FRONZA, M. et al. Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126. p. 463-467, 2009.

FRONZA, M. et al. Hyaluronidase modulates inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112297, 2014.

GÁL, P. et al. Open Wound Healing In Vivo: Monitoring Binding and Presence of Adhesion/Growth-Regulatory Galectins in Rat Skin during the Course of Complete Re-Epithelialization. **Acta Histochem Cytochem**, v. 44, n. 5, p. 191–199, 2011.

GEIER, D. A.; SYKES, L. K.; GEIER, M. R. A review of Thimerosal (Merthiolate) and its ethylmercury breakdown product: specific historical considerations regarding safety and effectiveness. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v.10, n.8, p. 575-596, 2007.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. **Cell**, v. 60, p. 849-59, 1990.

GUPTA, A.; DAI, T.; HAMBLIN, M. R. Effect of red and near infrared wavelengths on low-level laser (light) therapy induced healing of partial-thickness dermal abrasion in mice. **Lasers Med Sci**, v. 29, n.1, p. 257-265, 2014.

HENG, M. C. Y. Wound healing in adult skin: aiming for perfect regeneration. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 9, p. 1058–1066, 2011.

JOHNSTON, S. T. et al. Quantifying the effect of experimental design choices for in vitro scratch assays. **Journal of Theoretical Biology**, v. 400, p. 19-31, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica – Texto e Atlas**. 12th. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A. 2013. 556 p.

KARUKONDA, S. R. et al. The effects of drugs on wound healing: Part 1. **International Journal of Dermatology**, v. 39, p. 250-257, 2000.

KENDALL, A. C.; NICOLAOU, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. **Prog Lipid Res**, v. 52, p. 141-64, 2013.

KOKANE, D. D. et al. Evaluation of wound healing activity of root of Mimosa pudica. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 311–315, 2009.

KRISHNAN, K.; MANI, A.; JASMINE, S. Cytotoxic Activity of Bioactive Compound 1, 2- Benzene Dicarboxylic Acid, Mono 2- Ethylhexyl Ester Extracted from a Marine Derived Streptomyces sp. VITSJK8. **Int J Mol Cell Med**, v. 3, n. 4, p. 246-254, 2014.

KUMAR, M. S. et al. Wound healing potential of *Cassia fistula* on infected albino rat model. **Journal of Surgical Research**, New York, v. 131, p. 283-289, 2006.

LAZARUS, G. S. et al. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 2, n. 3, p. 165–170, 1994.

LEE, Y. S. et al. Wound Healing in Development. **Birth Defects Research**, v. 96, p. 213-222, 2012.

LEITE, S. N. et al. Modelos experimentais de desnutrição e sua influência no trofismo cutâneo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 681-688, 2011.

LEITE, S. N. et al. Phototherapy improve wound healing in rats subjected to high fat diet. **Lasers in Medical Science**, v. 1, p. 1-7, 2015.

LI, J.; CHEN, J.; KISNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 9-18, 2007.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MASSON-MEYERS, D. S. et al. Cytotoxicity and wound healing properties of *Copaifera langsdorffii* oleoresin in rabbits. **International Journal of Natural Product Science**, v. 3, n. 3, p. 10-20, 2013.

MCLAFFERTY, E.; HENDRY, C.; ALISTAIR, F. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. **Nurs Stand**, v. 27, p. 35-42, 2012.

MELNICK, J. G. et al. Molecular Structures of Thimerosal (Merthiolate) and Other Arylthiolate Mercury Alkyl Compounds. **Inorg. Chem**, v. 47, n. 14, p. 6421–6426, 2008.

MENDONÇA, R. **Purificação e caracterização de uma proteína angiogênica, indutora de fibroplasia e cicatrizante presente no Látex Natural da Seringueira *Hevea brasiliensis***. 2008. 147 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

MENDONÇA, R. et al. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Phytother Res**, v. 24, n. 5, p. 764-768, 2010.

MENKE, N. B. et al. Impaired Wound Healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 19-25, 2007.

MOHAMMADI, E, VATANPOUR, H, SHIRAZI, F. H. Immunomodulatory effects of bee venom in human synovial fibroblast cell line. **Iran J Pharm Res**, v. 14, n. 1, p. 313-320, 2015.

MRUÉ, F. **Substituição do Esôfago Cervical por prótese biossintética de Látex – Estudo Experimental em Cães**. 1996. 114 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, São Paulo - Brasil.

NAKAMIZO, S. et al. Topical Treatment with Basic Fibroblast Growth Factor Promotes Wound Healing and Barrier Recovery Induced by Skin Abrasion. **Skin Pharmacol Physiol**, v. 26, p. 22-29, 2013.

NICKS, B. A. et al. Acute wound management: revisiting the approach to assessment, irrigation, and closure considerations. **Int J Emerg Med**, v. 3, p. 399-407, 2010.

PAIVA, L. A. F. et al. Investigation on the wound healing activity of oleoresin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**, London, v. 16, p. 737-739, 2002.

PARKS, W. C. Matrix metalloproteinases in repair. **Wound Repair and Regeneration**, v. 7, p. 423-32, 1999.

PEREIRA, R. F., BÁRTOLO, P. J. Traditional Therapies for Skin Wound Healing. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 5, n. 5, p. 208-229, 2016.

QIAO, J. et al. Photodynamic effects on human periodontal-related cells in vitro. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 11, n. 3, p. 290-299, 2014.

RANZATO, E.; MARTINOTTI, S.; BURLANDO, B. Wound healing properties of jojoba liquid wax: an in vitro study. **J Ethnopharmacol**, v. 134, n. 2, p. 443-449, 2011.

RIAH, R. et al. Advances in wound-healing assays for probing collective cell migration. **J. Lab. Automat**, v. 17, n. 1, p. 59-65, 2012.

ROBSON, M. C.; STEED, D. L.; FRANZ, M. G. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. **Current Problems in Surgery**, v. 38, n. 2, p. 72–140, 2001.

ROLDÁN-MARÍN, R. et al. Fixed sporotrichosis as a cause of a chronic ulcer on the knee. **International Wound Journal**, v. 6, n. 1, p. 63- 66, 2009.

ROLSTAD, B. S.; BRYANT, R. A.; NIX, D. P. Topical Management. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. **Acute and chronic wounds**. Current management concepts. 4th ed. Missouri: Elsevier Mosby, 201

SCARBEEK, K. Latex: is it safe? **Acad. Gen. Dent**, v. 21, p. 2-6, 1993.

SCHMIDT, C. et al. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 523-532, 2009.

SHAI, A.; MAIBACH, H. I. Antibiotics, antiseptics and cutaneous ulcers. In: Wound healing and ulcers of the skin. Diagnosis and Therapy – the practical approach. Germany: Springer, 2005. p.135-150.

SINGER, A. J.; DAGUM, A. B. Current Management of Acute Cutaneous Wounds. **The New England journal of Medicine**, v. 359, p. 1037-1046, 2008.

SINNO, H.; PRAKASH, S. Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. **Plastic Surgery International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

SOUZA, D. G. et al. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **Br J Pharmacol**, v. 134, n. 5, p. 985-994, 2001.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 176 (Suppl 2-A), p. 26S-38S, 1998.

STRONCEK, J. D.; BELL, N.; REICHERT, W. M. Instructional powerpoint presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 90, p. 1230-1238, 2009.

SUSSMAN, G. L.; BEEZOLD, D. H. Latex allergy – a clinical perspective. **J. Long-Term Effects Med Implants**, v. 4, p. 95-101, 1994.

UPTON, Z. et al. Human pilot studies reveal the potential of a vitronectin: growth factor complex as a treatment for chronic wounds. **Int. Wound J**, v. 8, n. 5, p. 522–532, 2011.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **The Journal of International Medical Research**, v. 37, n. 5, p. 1528–1542, 2009.

WARNER, R. L. et al. MDI 301, a nonirritating retinoid, improves abrasion wound healing in damaged/atrophic skin. **Wound Repair Regen**, v. 16, n. 1, p.117-124, 2008.

WHITNEY, J. D. Overview: acute and chronic Wounds. **Nursing Clinics of North America**, v. 40, n. 2, p. 191-205, 2005.

WOODS, J. A. et al. Natural rubber latex allergy: spectrum, diagnostic approach, and therapy. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 15, n. 1, p. 71-85, 1997.

YIP, E.; CACIOLI, P. The manufacture of gloves from natural rubber latex. **J. Allergy Immunol**, v. 110, n. 2, p. S1-S14, 2002.

YUN-SHAIN, L. et al. Wound Healing in Development. **Birth Defects Research (Part C)**, v. 96, p. 213-222, 2012.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 10 de junho de 2008

Ofício nº 2038/2008
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 5606/2008

Prezado Professor,

O Comitê de Ética em Pesquisa analisou “**AD REFERENDUM**” a proposta de “Criação do banco de amostras biológicas da Dermatologia” e a enquadrando na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento de guarda do material**.

Atenciosamente.

DR^a MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. MARCO ANDREY CIPRIANI FRADE
Depto. de Clínica Médica - Dermatologia

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 072/2012, sobre o projeto intitulado “*Estudo comparativo entre o soro do látex natural da seringueira Hevea brasiliensis a 10% (REGEDERM®) em gel-creme com merthiolate na cicatrização de escoriações cutâneas em ratos.*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Marco Andrey Cipriani Frade** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 24 de setembro de 2012.

(We certify that the protocol nº 072/2012, about “*Comparative study between 10% natural latex serum in gel-cream and merthiolate to treat cutaneous erosions triggered by experimental dermabrasion*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 09/24/2012.

Ribeirão Preto, 24 de setembro de 2012.

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior
Vice-Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal, em exercício