UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

THIAGO ANTÔNIO MORETTI DE ANDRADE

“Atividade da biomembrana de látex natural da
seringueira *Hevea brasiliensis* na neoformação tecidual
em camundongos”.

Ribeirão Preto – SP

2007

THIAGO ANTÔNIO MORETTI DE ANDRADE

“Atividade da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* na neoformação tecidual em camundongos”.

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Médicas.**

**Área de concentração: Clínica Médica –
Investigação Biomédica
Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey
Cipriani Frade**

Ribeirão Preto – SP

2007

**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.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Andrade, Thiago Antônio Moretti de
Atividade da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* na neoformação tecidual em camundongos. / Thiago Antônio Moretti de Andrade; orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade. – Ribeirão Preto, 2007.

138 f.: fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Clínica Médica. Área de Concentração: Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Biomembrana de látex
2. *Hevea brasiliensis*
3. Cicatrização
4. Imunologia
5. Modelo animal

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thiago Antônio Moretti de Andrade

“Atividade da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* na neoformação tecidual em camundongos”.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre.

Área de concentração: Clínica Médica –
Investigação Biomédica

Aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais Paulo e Rita, pelo imenso apoio, sacrifício e incentivo durante minha formação, e por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida, lutando junto comigo nas horas difíceis, comemorando e agradecendo nos momentos de conquista. Às minhas irmãs Simone e Poliana, e toda a família que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, em especial à minha saudosa avó Claricina (in memoriam), que sempre me estimulava com suas palavras de apoio diante de uma árdua vida de pesquisador que tanto amo!!!

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a *Deus*, por ter me concedido saúde e perseverança em sempre lutar para atingir os meus objetivos propostos.

Aos meus amados *pais Rita e Paulo e irmãos Simone e Poliana*, por terem sempre me apoiado e incentivado cada vez mais na minha paixão pela pesquisa e pela imunologia.

A toda *minha família*, que de alguma forma (mesmo as vezes sem entender meu trabalho) me apoiaram a seguir minha carreira científica, em especial minha *avó Claricina (in memoriam)* que sempre se interessava em saber o andamento do trabalho, e se divertia quando ouvia eu contar sobre os camundongos. Certamente, ela está torcendo por mim, onde quer que ela esteja!

Ao meu *avô Waldemar de Andrade, avô Walter Moretti, e avó Marietta Moretti*, pelo grande apoio em minha vida, em sempre querer me ver bem e superando todas as dificuldades.

A minha *querida namorada Karina*, por ter sido paciente, compreensiva, por ter entendido a correria da minha vida, e pelo incentivo nos momentos difíceis.

Agradeço *a todos* que de alguma forma, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao *meu orientador Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade*, que acreditou na minha força de vontade e amor pela pesquisa em cicatrização e me deu oportunidade de ser seu primeiro aluno de pós-graduação, que sempre me ajudou e me orientou com muita dedicação mesmo nos momentos mais difíceis tais como

padronização de experimentos de imunohistoquímica (dentre outros) que nunca davam certo, discussões de trabalhos, etc. Agradeço por ter sido sempre paciente e detalhista, em sempre fazer seu trabalho no maior padrão possível. De alguma forma toda essa maneira séria e justa de ensinar – ainda que ao mesmo tempo amigável e descontraída – torna cada um de seus alunos o exemplo do que ele mesmo foi e é hoje como profissional. Agradeço por ter sido sempre um orientador sério, competente e paciente, e por sempre ter me orientado e ensinado muito, mesmo que muitas vezes sem tempo para me atender em meio a sua vida corrida.

Aos meus queridos *amigos de laboratório*, pelos dias árduos que convivemos juntos, alguns dos amigos mesmo que distantes ou trabalhando em outros departamentos, sempre estavam disponíveis em me ajudar independente do que eu precisasse. Agradeço muito por vocês terem feito parte de minha vida durante esse período: *Ana, Angélica, Débora, Daniela Masson, Daniel, Fernanda, Luisiane, Sâmara, Saulo, Kelly*. Em especial, agradeço grandemente o esforço, dedicação e companheirismo da *Débora* e *Luisiane* nas discussões dos métodos para análise de imagens e uso do software ImageJ®, juntamente com o *Léo, (aluno do Prof. Dr. Morgan da Farmacologia - FMRP)* no imenso apoio nas execução das pranchas no programa Adobe Photoshop CS.

A nossa *técnica Sissi*, por sempre ter sido prestativa nos experimentos de ELISA, e também, a nossa *querida técnica Marilena*, por ter se empenhado em demasia na realização das perfeitas lâminas histológicas e de imunohistoquímica, pelo seu imenso esforço e dedicação, pelo seu carinho e amor em sempre realizar seu trabalho da forma mais perfeita possível.

À *Wilde*, querida secretária da Dermatologia no Hospital das Clínicas (4º andar), pela amizade, respeito e dedicação na realização de seu trabalho sempre da forma mais séria e justa.

À *Profa. Dra. Norma Tiraboschi Foss* e a *todas as professoras* da Divisão de Dermatologia da Clínica Médica do HCFMRP-USP (*Profa. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino* e *Profa. Dra. Cacilda da Silva Souza*), que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento científico e intelectual.

A *todos os funcionários, técnicos, pós-graduandos e docentes* do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em especial aos do Laboratório de Dor e Inflamação:

Ao *Prof. Dr. Fernando de Lucioz Cunha*, por ter permitido parceria em realizar parte do meu trabalho de mestrado no seu laboratório. Muito obrigado pelo apoio.

A *todos os pós-graduandos deste laboratório*, pela amizade incondicional, pelos bons momentos que passei neste laboratório, aprendendo sempre.

A *todos os funcionários e técnicos*, em especial a *Gui*, pela grande amizade e carinho dispensados, pelos grandes ensinamentos em ELISA, e também à *Fabiola*, por sempre estar disponível em ajudar no que precisar, sempre com muito esmero e calma. À *Eleni*, por tudo que me proporcionou nos ensinamentos de histologia, pelo companheirismo e amizade durante meus ótimos momentos no laboratório de histologia no Departamento de Farmacologia. Dentre outros, *Diva*,

Ieda, Kátia, Serginho, e tantos outros funcionários do departamento, o meu muito obrigado!

Ao *Prof. Dr. José Antonio Baddini Martinez*, que muito me ajudou na dosagem de hidroxiprolina. Agradeço por ter sido sempre amável, sempre confiante e bem humorado e ao mesmo tempo sério, por ter me ensinado muito sobre o método. Agradeço pela amizade e consideração em ter confiado em minha força de vontade em ajudá-lo a dosar a hidroxiprolina nas amostras de pulmão. Infelizmente ainda não conseguimos padronizar o método nas amostras de pele de camundongo, objetivo a ser alcançado no futuro próximo.

A *todos* do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em especial do Laboratório de Neuroquímica:

Ao *Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto*, pela grande amizade e respeito, pelos grandes ensinamentos em cicatrização, por ter cedido as biomembranas prontas e esterilizadas para realização do meu trabalho, pela dedicação na padronização do método de detecção de hidroxiprolina pelo HPLC.

Às *técnicas Verinha e Silvinha*, pela amizade grandiosa e por sempre estarem prontas em me ajudarem nos experimentos de dosagem de hidroxiprolina no HPLC.

Aos *pós-graduandos Renê, Ruither, Ricardo, Leticia, Vanessa, Viviane e Larissa*, pela grande amizade e apoio em me servir sempre que precisei, e por ter aprendido muito com eles. Em especial ao *Ricardo Mendonça*, por ter se empenhado junto comigo, na dosagem de hidroxiprolina, me encaminhado até a

Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) em Uberaba, onde pude também aprender mais sobre a dosagem de hidroxiprolina.

À *todos os funcionários, técnicos, pós-graduandos* do Departamento de Bioquímica da UFTM – Uberaba, onde pude realizar alguns experimentos de dosagem de hidroxiprolina. Em especial, agradeço à *Profa. Dra. Roseli Gomes*, por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu realizasse esses experimentos, os quais ainda não conseguimos a padronização.

A *todos* do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em especial do Laboratório de Oncopatologia do Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia:

Ao *Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia* por ser sempre prestativo, sério e dedicado nas análises histológicas, por ter permitido parceria em realizar algumas lâminas histológicas em seu laboratório, por ter aceitado fazer parte da minha banca examinadora, por ter corrigido a pró-forma e me apontado as críticas e sugestões pertinentes para a melhora do trabalho.

A sua amável *técnica Rose*, por estar sempre de bem com a vida em realizar seu trabalho da melhor forma possível, e pela sua dedicação em sempre estar pronta a ajudar no que for preciso.

Aos *pós-graduandos da patologia*, que de alguma forma sempre me apoiaram e sempre foram companheiros em todos os momentos. Aos momentos legais e engraçados que tivemos no convívio no laboratório, onde aprendíamos e trabalhávamos seriamente, em um ambiente completamente descontraído e amigável.

À *Profa. Dra. Mirian Nicagami Sotto (FMUSP)*, por também ter aceitado fazer parte da banca examinadora, por analisado a pró-forma com bastante esmero, e por ter apontado diversas sugestões e críticas para melhoria do trabalho.

A *todos* do Departamento de Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em especial do Laboratório de Imunobiologia de Glicoproteínas do Profa. Dra. Maria Cristina Barreira:

À *Profa. Dra. Maria Cristina Barreira* por ter me permitido realizar ELISA das minhas amostras com os nossos kits em seu laboratório. Agradeço à atenção dispensada e também a grande dedicação de sua aluna de doutorado *Aline Pereira* na realização dos ELISA's junto comigo.

À amável *Rossana, secretária* da Pós Graduação em Clínica Médica, por sempre ser educada e amável, por ser sempre prestativa nas horas que precisei, e por sempre realizar seu trabalho com tamanha dedicação e esmero.

À *secretária Adriana* da Pós-graduação em Clínica Médica, por sempre trabalhar com afinco nas suas obrigações.

Aos *bióteristas do biotério da Clínica Médica Adalberto, Maurício, e Roni*, por sempre ajudarem na realização do meu trabalho, estando sempre dispostos a ajudarem no que preciso na medida do possível.

Aos *alunos do CEMEZ – Centro de Métodos Quantitativos da FASEPA*, por terem me ajudado bastante na revisão estatística do meu trabalho. Em especial à *aluna Adriana de Fátima Lourencon*, que revisou meus métodos estatísticos aplicados. Muito obrigado por ter sido sempre tão atenciosa e clara nas discussões dos métodos aplicados.

À *CAPES*, pelo auxílio financeiro durante os 24 meses de trabalho.

A *todos* que de alguma forma contribuíram para a realização de meu trabalho e que por ventura eu tenha me esquecido de agradecer, o meu eterno muito obrigado!!!

*"Àqueles que me ajudaram, o meu muito obrigado.
Àqueles que foram indiferentes, o meu muito obrigado por não ter me atrapalhado.
E àqueles que complicaram minha trajetória, o meu muitíssimo obrigado, pois me
fizeram aprender que é sempre possível um caminho diferente."*

Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade (tese Doutorado)

*"Às vezes, quando tudo dá errado acontecem coisas tão boas que jamais teriam
acontecido se tudo tivesse dado certo."*

*Thiago Antônio Moretti de Andrade
(durante a padronização dos experimentos de hidroxirolina e imunohistoquímica)*

RESUMO

ANDRADE, T.A.M. **Atividade da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* na neoformação tecidual em camundongos.** 2007. 138 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

A biomembrana de látex natural (BLN) da seringueira *Hevea brasiliensis*, utilizada como curativo no tratamento de úlceras crônicas em humanos, mostra-se eficaz no desbridamento e no estímulo à granulação, acelerando a cicatrização. Seu mecanismo de ação ainda é desconhecido, tornando-se importante avaliar sua atividade como implante na indução tecidual, comparando-a aos outros implantes e à cicatrização normal (SHAM). Foram utilizados camundongos C57BL/6, constituído de 5 grupos distintos pelo implante subcutâneo dorsal (1cm²): 15 implantados com BLN; 15-LUVA cirúrgica (látex desnaturado); 15-ePTFE (PoliTetraFluorEtileno Expandido – implante sintético) e 15-SHAM. A atividade dos implantes foi avaliada no 2º, 7º e 14º dias, sacrificando 5 animais/grupo/tempo para biópsias (punch-4mm). Toda pele da área implantada foi recortada e fotografada. As amostras foram submetidas a estudos histológicos por HE para contagem das células inflamatórias, fibroplasia e angiogênese, utilizando o *plugin “Cell Counter”* no *software ImageJ*®; pelo Tricrômio de Gomori para quantificação colagênica pelo *“Threshold”* no *ImageJ*®, e imunohistoquímica para iNOS, IL-1β, VEGF e TGF-β1. A partir do sobrenadante do macerado das biópsias foram realizadas as dosagens de mieloperoxidase (MPO), IL-1β e de TGF-β1 por ELISA. Macroscopicamente, viu-se maior quantidade de tecido neoformado nos animais implantados com BLN já no 2º dia, diferente dos demais grupos. À histologia (HE), constatou-se que a BLN no 2º dia estimulou denso infiltrado inflamatório, principalmente neutrófilos, seguido de maior produção de MPO e de IL-1β, diferente dos demais tratamentos (P<0,01). Com 7 e 14 dias, a quantidade de IL-1β nos grupos LUVA e SHAM foi maior que a da BLN e do ePTFE, mostrando o equilíbrio no estímulo inicial da atividade inflamatória pela BLN. Quanto a angiogênese, os grupos BLN e LUVA com 7 e 14 dias apresentaram maior formação de vasos que o ePTFE e SHAM. Entretanto, na imunohistoquímica observou-se baixa expressão de VEGF no grupo BLN no 7º e 14º dia. Quanto a fibroplasia, o ePTFE com 7 dias apresentou maior fibroplasia que todos os grupos (P<0,01). No 14º dia, a BLN apresentou maior fibroplasia, embora sem diferença estatística entre os grupos. Quanto à colagênese, pelo *ImageJ*® (*“Threshold”*) por Tricrômio de Gomori, os implantes se comportaram de maneira semelhante, inclusive com o SHAM, exceto no 14º dia que o ePTFE apresentou colagênese maior que a LUVA e BLN (P<0,01). O grupo SHAM apresentou maior concentração de TGF-β1 que os demais grupos no sétimo dia (P<0,01), semelhante à BLN e à LUVA no 14º, entretanto maior que o ePTFE (P<0,01). Conclui-se que a biomembrana de látex da seringueira *Hevea brasiliensis* atua significativamente na fase inflamatória da cicatrização, importante no recrutamento neutrofílico para o local, confirmado quantitativamente pela concentração de MPO e IL-1β e por imunohistoquímica. Este fato parece influenciar diretamente as fases subseqüentes do processo cicatricial, confirmada pela sua capacidade estimuladora de angiogênese, provavelmente não influenciada por VEGF, e pelo estímulo à fibroplasia independente de TGF-β1 e sem modificação na produção colagênica.

Palavras chave: Biomembrana de látex; *Hevea brasiliensis*; Cicatrização; Imunologia; Modelo animal.

ABSTRACT

ANDRADE, T.A.M. **The activity of the natural latex biomembrane from *Hevea brasiliensis* rubber tree in the new tissue formation in mice.**

The natural latex biomembrane (NLB) from *Hevea brasiliensis* rubber tree, used as dressing in the treatment of human chronic ulcers, has been showed efficient in the debridement and the granulation stimulation, accelerating the healing. Its mechanism of action is still unknown, becoming important to evaluate its activity as implantation in the tissue induction, comparing it with the other implants and with the normal healing (SHAM). Mice C57BL/6, consisting of 5 distinct groups had been used of the dorsal subcutaneous implantation (1cm²): 15 implanted with NLB; 15 with surgical GLOVE (unnatural latex); 15 with ePTFE (expanded polytetrafluorethylene - synthetic implantation) and 15 without implant (SHAM). The activity of the implants was evaluated in 2nd, 7th and 14th days. Five animals for group each time were sacrificed for biopsies with 4mm punch. All skin of the implanted area was cut and photographed. The samples had been submitted to the histology studies for haematoxylin-eosin for counting the inflammatory cells, fibroplasia and angiogenesis, using "Cell Counter" plugin in the ImageJ[®] software; by Gomori's thrichrome for collagen quantification using "Threshold" in the ImageJ[®], and iNOS, IL-1 β , VEGF and TGF- β 1 immunohistochemistry. From the biopsies macerated supernatant, the myeloperoxidase assay had been carried through (MPO), IL-1 β and of TGF- β 1 by ELISA. Macroscopically, it was observed a big amount of new tissue formed in the NLB implanted animals on 2nd day, different of the other groups. In histological analyze by H&E, it was observed that the NLB in 2nd day stimulated dense inflammatory infiltrated, mainly by neutrophils, followed of bigger production of MPO and IL-1 β , different of the other treatments (P<0,01). After 7 and 14 days, the amount of IL-1 β in the groups GLOVE and SHAM were greater than the NLB and ePTFE, showing the balance in the initial stimulation of the inflammatory activity by the NLB. About angiogenesis, both groups (NLB and GLOVE) after 7 and 14 days had presented greater formation of vessels than ePTFE and SHAM (P<0,01). However, in the immunohistochemistry was observed a low VEGF expression in the NLB group in 7th and 14th days. Related to fibroplasia, ePTFE after 7 days presented greater fibroplasia than all the groups (P<0,01). In 14th day, the NLB presented an important fibroplasia, even so without statistic difference between the groups. The collagen proliferation evaluated by the ImageJ[®] ("Threshold") applied in Gormori's thrichrome stained biopsies, the implants showed similar results, also with the SHAM, except in 14th day that ePTFE presented bigger collagen proliferation than the GLOVE (P<0,01). The SHAM group presented greater concentration of TGF- β 1 than the other groups in the seventh day (P<0,01), equal to the NLB and the GLOVE in 14th, however bigger than ePTFE (P<0,01). In conclusion, natural latex biomembrane (NLB) from *Hevea brasiliensis* rubber tree acts significantly in the inflammatory phase of the healing process, important in the neutrophilic recruitment to injury local, confirmed quantitatively by MPO and IL-1 β concentrations and by immuno histochemistry. This fact seems to influence directly the subsequent phases of the healing process, confirmed for its stimulatory capacity of the angiogenesis, probably not influenced by VEGF, and the fibroplasia stimulation independent of TGF- β 1 and without modification in the collagen production.

Key words: Latex biomembrane; *Hevea brasiliensis*; Cicatrization; Immunology; Animal model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Camadas da pele.	2
Figura 2: Hemostase primária.	9
Figura 3: Hemostase secundária.	9
Figuras 4 A e B: “Rolling” dos leucócitos.	11 e 12
Figura 5: Resumo geral da inflamação.	13
Figura 6: Importância dos macrófagos na cicatrização.	16
Figura 7: Estrutura molecular e fibrilar do colágeno.	22
Figura 8: Corte histológico transversal da pele normal.	26
Figura 9: Estrutura química da Biomembrana de Látex Natural.	29
Figura 10: Etapas do procedimento cirúrgico.	46
Figura 11: (A): Coleta do látex na seringueira. (B): Látex. (C): Biomembrana de Látex. ...	47
Figura 12: ePTFE implantado nos animais.	48
Figura 13: (A): Os camundongos tiveram a pele do dorso recortada ao redor da região onde foi colocado o implante. (B): A pele recortada foi afixada num isopor para avaliação macroscópica.	49
Figura 14 (A) Janela do <i>software</i> de aquisição de imagens, por onde foi feito <i>white balance</i> e definido o tamanho da área de interesse (“ROI” – quadrado vermelho) para serem adquiridas as 10 mini-imagens.	51
Figura 15: Método utilizado no <i>Cell Counter</i> do ImageJ®.	52
Figura 16: <i>Plugin</i> “Cell Counter” do ImageJ®.	54
Figura 17: (A): Corte histológico da pele do camundongo corada pelo Tricrômio de Gomori, capturada pelo <i>software</i> no aumento de 100x e “ROI” pré-definido para utilização do “Threshold” pelo <i>software</i> ImageJ®.	57
Figura 18: Estudo macroscópico.	66
Figura 19: Alterações histológicas mostrando o infiltrado inflamatório.	68
Figura 20: Infiltrado inflamatório analisado pelo <i>Plugin</i> “Cell Counter” do ImageJ®.	69
Figura 21: Alterações histológicas mostrando os vasos neoformados.	71
Figura 22 (A) e (B): Angiogênese analisada pelo <i>Plugin</i> “Cell Counter” do ImageJ®.	72
Figura 23: Alterações histológicas mostrando a fibroplasia.	74

Figura 24: Fibroplasia analisada pelo <i>Plugin “Cell Counter”</i> do ImageJ®.	75
Figura 25: Alterações histológicas da pele e tecido celular subcutâneo: Coloração por Tricrômio de Gomori.	77
Figura 26: Densidade de área de colágeno.	78
Figura 27: Dosagem de Mieloperoxidase.....	79
Figura 28: Dosagem de IL-1 β por ELISA.	80
Figura 29: Dosagem de TGF- β 1 por ELISA.	81
Figura 30: Mieloperoxidase durante os tempos de seguimento (2, 7, 14 dias).	82
Figura 31: IL-1 β durante os tempos de seguimento (2, 7, 14 dias).	82
Figura 32: TGF- β 1 durante os tempos de seguimento (2, 7, 14 dias).	82
Figura 33: Imunohistoquímica do segundo dia de implante para IL-1 β e iNOS.	84
Figura 34: Imunohistoquímica do sétimo dia de implante para IL-1 β e iNOS.	85
Figura 35: Imunohistoquímica do sétimo dia de implante para VEGF e TGF- β 1.	86
Figura 36: Imunohistoquímica do décimo quarto dia para VEGF e para TGF- β 1.	87

LISTA DE SIGLAS

ADP – Adenosina Difosfato

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEMEQ – Centro de Métodos Quantitativos da FAEPA – HCFMRP

BLN – Biomembrana de Látex Natural

EGF – *Epidermal Growth Factor* (Fator de Crescimento Epidérmico)

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Método de Ligação Imunoenzimática)

ePTFE – *expanded politetrafluorethylene* (PoliTetraFluorEtileno Expandido)

FAEPA – Fundação de Apoio ao Ensino e Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP

FGF – *Fibroblast Growth Factor* (Fator de Crescimento de Fibroblastos)

FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HARP – *Heparin Affinity Regulatory Peptide* (Peptídeo Regulador de Afinidade da Heparina)

HCFMRP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HE – Hematoxilina e Eosina

HPLC – *High Pressure Liquid Column* (Coluna Líquida de Alta Pressão)

HUVEC – Células Endoteliais do Cordão Umbilical Humano

iNOS – *Induced Nitric Oxide Synthase* (Óxido Nítrico Sintase Induzida)

ILGF – Insulin Like Growth Factor (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina)

IFN – Interferon

IL – Interleucina

MCP-1 – *Monocyte Chemoattractant Protein* (Proteína Quimioatratante de Monócito)

MEC – Matriz Extracelular

MIP-1 α – *Macrophage Inflammatory Protein* (Proteína Inflamatória do Macrófago)

MMP – *Matrix Metaloproteinase* (Metaloproteinase da Matriz)

MPO – Mieloperoxidase

NO – *Nitric Oxide* (Óxido Nítrico)

PDEGF – *Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor* (Fator de Crescimento de Células Endoteliais Derivados de Plaquetas)

PDGF – *Platelet Derived Growth Factor* (Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta)

PF-4 – Fator Plaquetário – 4

PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico

PGI₂ – Prostaglandina I₂

PHA – Fitohemaglutinina

p.v. – Peso Vivo

TGF – *Transforming Growth Factor* (Fator Transformador de Crescimento)

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor α* (Fator de Necrose Tumoral α)

ROG – Regeneração Óssea Guiada

ROI's – *Reactive Oxygen Intermediated* (Espécies Reativas Derivadas do Oxigênio)

“ROI” – “*Region of Interest*” (Área de interesse)

“*SHAM*” – *n* **1** engano, logro, fraude. **2** impostor. *adj* **1** imitado. **2** fingido, falso (MICHAELIS, 2001).

TG – Tricrômio de Gomori

TIMP – *Tissue Inhibitor Metalloproteinase* (Inibidor Tecidual da Metaloproteinase da Matriz)

t-PA – *Tissue Plasminogen Activator* (Ativador do Plasminogênio Semelhante ao Tecido)

TSP - Trombospondina

TxA₂ – Tromboxano A₂

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

USP – Universidade de São Paulo

VEGF – Vascular Endothelial Factor (Fator de Crescimento de Endotélio Vascular)

VPF – *Vascular Permeability Factor* (Fator de Permeabilidade Vascular)

vWF – *von Willebrand Factor* (Fator de von Willebrand)

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO	1
1 – Morfofisiologia da pele	2
2 – Úlceras cutâneas	4
3 – Cicatrização de feridas	5
4 – O processo de cicatrização	7
4.1 – Injúria	7
4.2 – Coagulação	7
4.3 – Inflamação	10
4.4 – Formação tecidual	16
4.4.1 – VEGF	18
4.4.2 – TGF- β 1	20
4.4.3 – Colágeno	21
4.5 – Remodelagem tecidual	23
5 – Modelos animais em cicatrização	25
6 – A Biomembrana de Látex Natural (BLN)	28
6.1 – Biocompatibilidade	29
7 – A Luva Cirúrgica Estéril (LUVA)	39
8 – O PoliTetraFluorEtileno Expandido (ePTFE)	40
II – OBJETIVOS	42
III – ANIMAIS MÉTODOS	44
1 – Animais	45
2 – Procedimento cirúrgico	45
3 – Materiais utilizados como implante	46

3.1 – Coleta do látex e confecção da Biomembrana	46
3.2 – Luva	47
3.3 – ePTFE	47
4 – Padronização dos grupos	48
5 – Coleta do material para estudo	49
6 – Avaliação Macroscópica	49
7 – Estudo histológico	50
7.1 – Análise das imagens histológicas	50
7.1.1 – Avaliação quantitativa por imagem quanto ao infiltrado inflamatório, angiogênese e fibroplasia	50
7.1.2 – Avaliação quantitativa da formação colagênica	55
8 – Dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO)	58
9 – Dosagem <i>in situ</i> pelo método imunoenzimático (ELISA)	59
10 – Estudo Imunohistoquímico	61
11 – Análise dos resultados	62
IV – RESULTADOS	64
1 – Avaliação Macroscópica	65
2 – Avaliação histológica	66
2.1 – Coloração com Hematoxilina e Eosina	66
2.1.1 – Infiltrado inflamatório	67
2.1.2 – Angiogênese	70
2.1.3 – Fibroplasia	73
2.2 – Coloração com Tricrômio de Gomori	76
3 – Dosagem de Mieloperoxidase	79
4 – ELISA	82

4.1 – Quantificação da citocina IL-1 β	80
4.2 – Quantificação do fator de crescimento TGF- β 1	81
5 – Estudo Imunohistoquímico	83
V – DISCUSSÃO	88
VI – CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
ANEXO A	114

Introdução

1 – Morfofisiologia da pele

A pele recobre a superfície do corpo e apresenta-se constituída por uma porção epitelial (epiderme) e uma porção conjuntiva (derme). Abaixo e em continuidade com a derme está a hipoderme que, embora tenha a mesma origem da derme, não faz parte da pele, apenas lhe serve de suporte e união com os órgãos subjacentes (Figura 1). A pele é um dos maiores órgãos, atingindo 16% do peso corporal e apresenta múltiplas funções como: proteção do organismo contra a perda de água por evaporação (dessecação) e contra o atrito, graças à camada córnea da epiderme; comunicação constante com o ambiente através de suas terminações nervosas, termorregulação do corpo por meio de seus vasos, glândulas e tecido adiposo, além da excreção de diversas substâncias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Figura 1: (A) Representação esquemática das camadas da pele. (B) Corte histológico transversal da pele humana corado com Hematoxilina e Eosina; aumento 400x.

➤ Epiderme

É a camada mais externa constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Sua espessura e estrutura variam de acordo com o local estudado. A epiderme está organizada em camadas e à medida que as mais superficiais são eliminadas, as camadas mais profundas são restauradas por divisão celular. Em

regiões onde a pele é mais espessa, como a sola dos pés, a epiderme chega a representar cinco camadas: germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. A germinativa é a mais profunda e faz limite com a derme. A córnea é a mais superficial e é constituída de células escamosas cheias de queratina, proporcionando proteção como traumas físicos e químicos. As várias camadas de queratinócitos intimamente unidos uns aos outros, fornecem barreira contra a invasão de microorganismos e água. O pigmento melanina na epiderme protege os tecidos subjacentes dos efeitos nocivos da luz ultravioleta.

➤ **Derme**

É uma camada espessa de tecido conjuntivo sobre a qual a epiderme está apoiada; sua espessura é variável de acordo com a região observada. Sua superfície externa é bastante irregular onde são vistas saliências que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme (papilas dérmicas); em seu limite inferior está o tecido subcutâneo. Nesta camada estão presentes os anexos da pele (pêlos, unhas, glândulas sebáceas e sudoríparas), muitos vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e receptores especializados em determinar sensações de frio, calor, tato, pressão e dor. A derme fornece uma base firme para a epiderme e anexos cutâneos. As fibras colágenas proporcionam grande força de tensão e as elásticas lhe dão flexibilidade.

➤ **Hipoderme (Tecido Celular Subcutâneo)**

É composta por tecido conjuntivo frouxo, que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes. É a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas na qual se apóia. Dependendo da região em estudo e do

grau de nutrição do organismo, a hipoderme poderá ter uma camada variável de tecido adiposo que, quando desenvolvida constitui o panículo adiposo. Como a gordura é um bom isolante térmico o panículo adiposo proporciona proteção contra o frio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; SHERIDAN; TOMPKINS, 1999). Ademais, o panículo adiposo funciona como protetor mecânico a traumas.

2 – Úlceras cutâneas

Define-se úlcera cutânea como a perda circunscrita ou irregular da integridade do tegumento (epiderme e/ou derme), podendo atingir o subcutâneo e tecidos subjacentes (CARVALHO *et al.*, 2000).

Vários são os tipos de úlceras encontradas como úlceras venosas, arteriais, úlceras de pressão, anêmicas, associadas a doenças auto-imunes dentre outras, que se mantêm cronicamente abertas, tornando-se indolentes à cicatrização (FALANGA; EAGLSTEIN, 1996).

Poucos são os estudos epidemiológicos sobre úlceras, entretanto elas são muito freqüentes na prática médica e vem aumentando de acordo com o aumento da expectativa de vida da população mundial. Nos EUA, ocorrem 600 000 casos novos de úlceras de perna ao ano. Na Suécia, entre 4 a 5% da população acima de 80 anos apresenta essa patologia. Aproximadamente 1% da população do Reino Unido está sujeita á úlceras cutâneas crônicas, com aumento da prevalência entre a população idosa (PHILLIPS; DOVER, 1991).

Apesar dos inúmeros tratamentos disponíveis há grande dificuldade de se estimar os custos dos mesmos, sendo responsáveis por absorver grandes verbas da área da saúde destinadas a seu manejo. Na Inglaterra, um tratamento por 4 meses

pode chegar a U\$ 2 500, já nos EUA, os custos variam de U\$ 775 milhões a U\$ 1 bilhão ao ano (PHILLIPS, 1994).

3 – Cicatrização de feridas

As técnicas de cicatrização de feridas vem de muito tempo atrás. Os registros mais antigos citados por Zimmerman; Veith, (1961) falam de manuscritos egípcios que datam de 3000-2500 a.C., e neles são mencionados curativos à base de mel, graxa, fios de linho e diversos tipos de excrementos que faziam parte dos princípios da farmacopéia egípcia. Entre o final de 1840 e a Segunda Guerra Mundial, o foco para o tratamento de feridas e cicatrização foi a utilização de anti-sépticos e agentes tópicos com ação antimicrobiana e proteção com coberturas secas, como consequência às descobertas de Pasteur sobre a Teoria dos Germes. No início da década de 60 já aceitavam-se o pressuposto de que a criação de um ambiente úmido na ferida trazia efeitos extremamente benéficos para o processo cicatricial, bem como reduzia a dor, devido à proteção das terminações nervosas contra o dessecamento (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

A literatura atual traz uma diversidade de diferentes tratamentos indutores ou estimuladores de cicatrização tais como naturais à base de substâncias de plantas como *Aloe vera* que aumenta o colágeno na úlcera; *Centella asiática* que estimula a produção de colágeno tipo I; mel ou pasta de açúcar a qual sua glicose é convertida em ácido hialurônico e na superfície da úlcera, forma MEC (matriz extracelular) e promove cicatrização da úlcera, além de também ser antimicrobicida; *Calenula succus* que é antiinflamatório e promove a granulação; *Symphytum officinale* que promove divisão celular e crescimento de osso, cartilagem e outros

conectivos teciduais além de ser aplicado topicamente para fechamento de feridas (MACKAY; MILLER, 2003). Também há relatos de estímulo à fase inflamatória pelo uso do Ultra-som de Baixa Intensidade em úlceras vasculares (ANASTÁCIO, 2000; SANTANA, 2006), e cicatrização de úlceras pelo Laser de Baixa Intensidade através do estímulo à proliferação celular, granulação, síntese de colágeno, dentre outros. (ENWEMEKA *et al.*, 2004; KAWALEC *et al.*, 2004).

Cada tratamento varia quanto a sua eficácia, etiologia da úlcera, comodidade para o paciente quanto ao uso, custos e disponibilidade no serviço de saúde e também quanto a sua maneira peculiar de ação sobre as fases da cicatrização.

O processo de reparo de lesões ulceradas nos animais vertebrados é representado por uma seqüência de eventos moleculares que objetivam restaurar o tecido que sofreu injúria. Inicia-se tão logo que a integridade tecidual seja rompida e ocorre por interação dinâmica envolvendo mediadores solúveis, elementos celulares, matriz extracelular e células parenquimatosas.

No entanto, após o nascimento, o organismo falha em seu objetivo final de neoformar o tecido lesado, ocorrendo então reparo, com a formação de uma cicatriz, em todo o sentido da expressão, bioquímica, molecular e fenotípica, justificando assim, a freqüente denominação de cicatrização a esse processo de reparo. Apenas na fase fetal, o reparo de lesões se dá sem a formação de cicatriz, ocorrendo uma verdadeira restauração do tecido por um processo de neoformação (MACCALON; FERGUSON, 1996; MUTSAERS *et al.*, 1997; PICCINATO *et al.*, 2003).

4 – O processo de cicatrização

A cicatrização envolve cinco fases seqüenciais: **injúria**, **coagulação**, **inflamação**, **formação tecidual**, e **remodelagem tecidual**, embora alguns autores consideram didaticamente a cicatrização como 3 fases: **fase inflamatória**, **formação e proliferação teciduais** e **fase de remodelagem tecidual** (SHAI; MAIBACH, 2005). Cada fase embora distinta didaticamente ocorre temporalmente superposta e envolvem elementos celulares e/ou extracelulares específicos, como citocinas, fatores de crescimento, os quais agem como substâncias sinalizadoras, supressoras e estimuladoras, que têm a função de orquestrar de forma seqüencial todo o processo (ARNOLD; WEST, 1991; CLARK, 1996).

4.1 – Injúria

Primeira fase do processo de cicatrização, onde após a lesão, ocorre o extravasamento de sangue com seus constituintes que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares (plaquetas), aumentando a permeabilidade capilar com liberação de proteínas plasmáticas (fibrinogênio e fibronectina). Há interação dinâmica envolvendo liberação de fatores de crescimento pelas células lesadas como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e os fatores de transformação de crescimento beta e alfa (TGF- β 1 e TGF- α), matriz extracelular (MEC) e células parenquimatosas (KARUKONDA *et al.*, 2000).

4.2 – Coagulação

Após lesão vascular, as plaquetas encontram os constituintes da MEC abaixo do endotélio intacto; esses incluem colágeno (mais importante), proteoglicanos, fibronectina e outras glicoproteínas adesivas. Isso ativa as plaquetas

que mudam sua conformação e aderem-se à MEC através dos fatores de von Willebrand (Fator VIII) (adesão plaquetária – formação do tampão hemostático primário e reversível). (Figura 2) O ADP liberado pelas plaquetas induz a alteração conformacional dos receptores plaquetários GpIb em GpIIb-IIIa, permitindo que as plaquetas também se agreguem umas sob as outras ligadas por pontes de fibrinogênio (agregação plaquetária – formação do tampão secundário e irreversível) (Figura 3). O coágulo não só restabelece a hemostasia na superfície lesada dos vasos, mas ao mesmo tempo, ao ocupar os espaços vazios da ferida, transforma-se na matriz extracelular provisional que dá suporte a migração celular (JURK; KEHREL, 2005; KUMAR *et al.*, 2005).

Enquanto são ativadas, as plaquetas secretam seus grânulos alfa contendo várias proteínas adesivas (Fator de von Willebrand, trombospondina-1, vitronectina, fibronectina), fatores de coagulação (fatores V, VII, XI, XIII) e inibidores de protease (proteína C, Inibidor do Ativador do Plasminogênio-1 – PAI-1, Inibidor da Via do Fator Tecidual – TFPI), citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (PDGF, VEGF, TGF- β 1, IL-1 β , IGF, FGF's, IL-8, RANTES, MIP-1 α e outras) (ANITUA *et al.*, 2004). A P-selectina (P-CD62) também é liberada pelos grânulos alfa, recrutando plaquetas adicionais e leucócitos para o local da lesão (JURK; KEHREL, 2005). Nos Grânulos gama (corpos densos) possui ADP, Ca⁺² (importante na cascata da coagulação), histamina, serotonina e epinefrina.

A liberação dos grânulos pelas plaquetas ativadas inicia a cascata da coagulação, onde acontece uma série de ativação de fatores plasmáticos que culmina com a síntese da trombina. Esta se liga no receptor da superfície plaquetária e junto com ADP e TxA₂, causa agregação adicional. Isso é seguido pela contração plaquetária, criando uma massa densa de plaquetas irreversível

(metamorfose viscosa) constituindo o tampão hemostático secundário definitivo. Ao mesmo tempo a trombina converte o fibrinogênio em fibrina dentro e sobre o tampão plaquetário, cimentando, essencialmente, as plaquetas no local (KUMAR *et al.*, 2005).

Figura 2: Hemostase primária. Recrutamento de plaquetas para o local do dano vascular e adesão no subendotélio através do fator de von Willebrand (vWF) e trombospodina (TSP) pelo receptor plaquetário GPIb. Colágeno exposto serve como substrato adesivo de plaquetas. Ativação e agregação das plaquetas ligadas por pontes de fibrinogênio. Secreção dos grânulos com ativação da cascata da coagulação. Recrutamento de leucócitos e plaquetas adicionais no local da lesão. (ADP: adenosina difosfato; TxA₂: tromboxano A₂) (JURK; KEHREL, 2005).

Figura 3: Hemostase secundária e rolagem de leucócitos. Formação do tampão plaquetário definitivo (matriz extracelular provisional) com agregação plaquetária e formação de fibrina. Recrutamento de leucócitos e plaquetas adicionais através das moléculas de adesão endoteliais, dentre elas a P-selectina, liberada pelas plaquetas e Corpúsculos de Weibel-Palade, que são liberados pelas células endoteliais e também possuem P-selectina (ABITBOL *et al.*, 2005).

A trombina também ativa diretamente células inflamatórias mononucleares, ativa o endotélio para gerar moléculas de adesão leucocitárias e uma variedade de mediadores fibrinolíticos (ativador do plasminogênio semelhante ao tecido – t-PA), vasoativos (NO – óxido nítrico, PGI₂ – prostaciclina), ou de citocinas (PDGF). O t-PA converte o plasminogênio em plasmina que degrada depósitos de fibrina, participando da limitação da extensão do processo hemostático (KUMAR *et al.*, 2005).

4.3 – Inflamação

A resposta inflamatória é iniciada após a injúria e é caracterizada por sinais químicos que iniciam e mantêm a resposta no hospedeiro pela estimulação da célula endotelial, incluindo recrutamento de leucócitos e ativação de funções fagocíticas (CHETTIBI; FERGUSON, 1999).

As moléculas de adesão são de grande importância nesse processo. O rolamento de leucócitos ao longo do endotélio vascular é mediado pelas selectinas. A L-Selectina (L-CD62) é constitutivamente expressa na superfície dos leucócitos e é principalmente relacionada ao “*homing*” dos leucócitos para o linfonodo (ROBINSON *et al.*, 1999). Na superfície das células endoteliais há a E-Selectina (E-CD62), que é sintetizada rapidamente depois de estimuladas por citocinas (Figura 4A).

A membrana plasmática das células endoteliais funde-se com a dos corpúsculos de Weibel-Palade translocando a P-Selectina para a superfície (P-CD62) quando é estimulada por fatores de crescimento, citocinas, histamina, trombina, bradicinina, leucotrieno C₄ e radicais livres (Figuras 3, 4A e 4B) (CHETTIBI; FERGUSON, 1999). Esta selectina também é liberada pelas plaquetas e

é importante para o recrutamento de leucócitos e plaquetas para o foco infeccioso (Figura 3). Mayadas *et al.*, (1993) demonstrou *in vivo* a importância da P-Selectina no rolamento de leucócitos e seu subsequente extravasamento, onde camundongos deficientes em P-Selectina demonstraram um elevado número de neutrófilos circulantes com quase total ausência de rolamento leucocitário nos mesentérios venulares, além da demora do recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal.

Portanto, as selectinas são moléculas de adesão importantes para permitir o rolamento de leucócitos e plaquetas na margem dos vasos sanguíneos, ao passo que as integrinas, desencadeiam sinais exteriores causando modificações no citoesqueleto celular. As integrinas são expressas em baixa afinidade nas células

leucocitárias. Porém, sob estímulo inflamatório, a afinidade dessas moléculas aos seus receptores aumenta, permitindo forte ligação. Essa ligação mais forte pára a rolagem do leucócito e inicia a diapedese (Figuras 3, 4A e 4B) (LIMA, 2004).

Figuras 4 A e B: Leucócitos circulam no vaso pela área central. Estímulos produzidos no foco infeccioso e citocinas permitem que o leucócito passe a rolar pela margem do vaso através das moléculas de adesão (*"rolling"*). Esses estímulos aumentam a expressão de moléculas de adesão e também são fatores quimiotáticos para o leucócito chegar ao foco infeccioso (fase de ativação). A firme adesão se dá pela integrina com alta avidéz (fase de adesão leucocitária), permitindo mudança da conformação do leucócito que atravessa a célula endotelial e migra para o tecido (diapedese).

Os leucócitos circulam no vaso sanguíneo pela área central. A injúria permite que os leucócitos passem a rolar na margem do vaso sanguíneo através das moléculas de adesão (*rolling*) (Figuras 3, 4A e 4B). Sob estímulo do agente infeccioso, é induzida a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α). As quimiocinas agem na adesão dos leucócitos e estimulam a migração pelo espaço interendotelial sob gradiente químico de concentração (diapedese dos leucócitos, ativação pelas citocinas pró-inflamatórias e quimiotaxia de leucócitos adicionais para o local) (Figura 5) (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

mecanismos que geram radicais livres. O número de neutrófilos começa a declinar quando aumenta o número de monócitos (CHETTIBI; FERGUSON, 1999).

Os principais agentes microbicidas de neutrófilos são as enzimas proteolíticas estocadas especialmente em grânulos azurofílicos (lisossomos verdadeiros ou grânulos primários) onde estão presentes, principalmente, lisozimas, mieloperoxidase, elastase, catepsinas, hidrolases ácidas, lactoferrina, etc (SWAIN *et al.*, 2002) e espécies reativas derivadas do oxigênio (ROIs), geradas pela ativação do sistema enzimático oxidativo, acoplado a membrana plasmática, responsável pelo aumento do metabolismo oxidativo conhecido como NADPH oxidase ou simplesmente “burst” respiratório. Este é um sistema transportador de elétrons que transfere elétrons do NADPH intracelular para o oxigênio, reduzindo-o a ânion superóxido (O_2^-) (SWAIN *et al.*, 2002), o qual pode ser rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio, e estes, a radicais livres hidroxilas, denominados genericamente de intermediários reativos do oxigênio (MALECH; GALLIN, 1987).

Uma outra substância altamente reativa utilizada por neutrófilos para exercer sua função microbicida é o óxido nítrico (NO). Foi demonstrado que a produção de NO por neutrófilos de ratos através da indução da enzima iNOS foi capaz de causar a destruição de fungos e bactérias (FIERRO *et al.*, 1996; FIERRO *et al.*, 1999). Benjamim *et al.*, (2000) demonstraram que a inibição da iNOS através da aminoguanidina foi capaz de reduzir drasticamente a atividade bactericida de neutrófilos de camundongos. Entretanto, enzimas proteolíticas e as espécies ativas de oxigênio produzidas pelos neutrófilos ativados podem, em certas instâncias, serem liberadas no meio extracelular causando lesão tecidual (SWAIN *et al.*, 2002). A atividade microbicida dos fagócitos pode ser regulada por um grande número de

mediadores autócrinos e parácrinos, incluindo citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos como prostaglandinas e leucotrienos (ARONOFF *et al.*, 2004).

Os monócitos, aderidos à matriz se transformam em macrófagos ativados e continuam o trabalho dos neutrófilos. Os macrófagos participam ativamente da fase inflamatória, através de desbridamento tecidual mediante fagocitose, digerindo microorganismos patogênicos, células apoptóticas e neutrófilos senescentes, promovendo clareamento da ferida e liberação de citocinas que estimulam a angiogênese (formação do tecido de granulação) e formação tecidual. A ativação dos macrófagos se dá pela liberação inicial e transitória dos fatores provenientes dos grânulos plaquetários, citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IFN- γ além dos produtos da fagocitose de detritos celulares, como fibronectina ou colágeno. O recrutamento de monócitos para o local da injúria é realizado por vários fatores quimiotáticos produzidos pelas plaquetas e neutrófilos, como o Fator Plaquetário-4 (PF-4), fatores de crescimento como TGF- β 1 e PDGF, quimiocinas como MCP-1, -2 e -3 (monocyte-chemoattractant protein -1, -2, -3), MIP-1 α e β (macrophage inflammatory protein - 1 α e β) e citocinas como IL-1 β e TNF- α (Figura 6) (CHETTIBI; FERGUSON, 1999).

Os macrófagos são de extrema importância no processo cicatricial (Figura 6). Leibovich; Ross, (1975) mostraram que a depleção de monócitos do sangue e macrófagos do tecido local em cobaias, resulta não somente no grave retardo do desbridamento tecidual, mas também na demora da proliferação de fibroblastos e subsequente fibrose da ferida.

Figura 6: Macrófagos são de grande importância em todas as fases do processo de cicatrização (WITTE; BARBUL, 1997).

As citocinas dessa fase são derivadas principalmente destes macrófagos como PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β), FGF (Fibroblast Growth Factor), ILGF-1 (Insulin Like Growth Factor 1), TGF- α , interleucinas 1 β (IL-1 β), EGF, fator de necrose tumoral (TNF- α) além de derivadas dos neutrófilos (TGF- β , interferon gama (IFN- γ) e IL-2) (Figura 6) (KARUKONDA *et al.*, 2000).

4.4 – Formação tecidual

A quarta fase (formação tecidual) ocorre do 3º ao 12º dia com função de restabelecer a integridade da epiderme e da derme. A proliferação epitelial inicia-se por estimulação mitogênica e quimiotática induzida pelo TGF- α e EGF. Tão importante quanto à epitelização nesta fase do processo de reparo, é a chamada

“granulação tecidual”, devido à aparência granular observada do ponto de vista histológico pela presença de uma grande quantidade de capilares neoformados (HUNTER, 1787).

A granulação tecidual forma-se mediante ação de fatores de crescimento específicos que são produzidos por células parenquimatosas comprometidas com o processo, por monócitos e macrófagos. Macrófagos, fibroblastos e vasos sangüíneos são elementos importantes que atuam de maneira interdependente no interior da ferida durante o processo cicatricial. 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 tecidual. Os vasos sangüíneos neoformados têm a função do transporte de oxigênio e nutrientes para o metabolismo celular acentuado devido à neoformação e regeneração dos tecidos. Assim, o processo de granulação tecidual ocorre como consequência direta da ativação dos mecanismos de fibroplasia e angiogênese (HOM, 1995; KARUKONDA *et al.*, 2000).

A angiogênese é um fenômeno que se reveste de grande importância na fase de granulação tecidual. Trata-se da formação de novos vasos sanguíneos que envolve uma série de mecanismos complexos dependentes da MEC local, bem como de alterações fenotípicas e fatores mitogênicos estimuladores de células endoteliais protagonistas desse processo. O aumento da atividade celular durante o processo cicatricial causa aumento do metabolismo e uma demanda maior de nutrientes. A deficiência desses nutrientes pode impedir ou dificultar a cicatrização (MACKAY; MILLER, 2003). 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 peptídeos regulador de afinidade de heparina (HARP) dentre outros (ARNOLD; WEST, 1991).

4.4.1 – VEGF

A identificação, caracterização e purificação do VEGF em 1989 contribuíram significativamente para o entendimento da regulação da permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo na angiogênese (FERRARA; HENZEL, 1989; BATES *et al.*, 1999).

Os fatores de crescimento vascular possuem três principais mecanismos de ação: podem aumentar a permeabilidade dos vasos à água, pequenos solutos e macromoléculas (LEVICK, 1991); podem reduzir a distância das células teciduais em relação ao vaso sanguíneo mais próximo, pela estimulação da angiogênese, e podem também aumentar o fluxo sanguíneo ao tecido agindo como potentes vasodilatadores (BATES; HARPER, 2003).

O VEGF é o maior fator estimulatório específico de células endoteliais e o mais importante e regulador positivo da angiogênese e permeabilidade vascular, sendo por isso antigamente era conhecido como VPF – Fator de Permeabilidade Vascular (DVORAK *et al.*, 1999). Devido à sua potente propriedade angiogênica e mitogênica, o VEGF participa de processos biológicos cruciais, incluindo o reparo tissular e desenvolvimento tumoral (FERRARA; KERBEL, 2005).

A adição de anticorpos anti-VEGF inibe fortemente a formação do tecido de granulação na ferida (HOWDIESHELL *et al.*, 2001) indicando uma importante função do VEGF na angiogênese que ocorre durante a fase proliferativa. Baixa tensão de oxigênio (hipóxia), como ocorre no tecido durante a lesão, constitui-se no

maior indutor da produção deste fator de crescimento (DETMAR *et al.*, 1997). Esta indução pode ser em parte, também mediada pelo TGF- β 1.

Atualmente a família do VEGF é composta por sete genes que codificam: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, e PLGF (WERNER; GROSE, 2003).

O fator de crescimento vascular endotelial – A (VEGDF-A), por exemplo, foi originalmente descrito pela sua capacidade de aumentar a permeabilidade dos vasos a macromoléculas circulantes, incluindo fibrinogênio e outras proteínas de coagulação. Dessa forma, o sistema de coagulação é rapidamente ativado, o que resulta na deposição extravascular de fibrina favorecendo, tanto o processo cicatricial, como o desenvolvimento tumoral (DVORAK, 2002). O aumento da permeabilidade é de grande importância na cicatrização, também no sentido de permitir a umidade da ferida de modo a facilitar a mobilidade das células inflamatórias e também queratinócitos e fibroblastos, haja visto que na antiguidade, erroneamente acreditavam-se que feridas secas cicatrizavam mais rapidamente (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

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 fibroblastos (b FGF) e TGF- β 1. 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 (WELCH *et al.*, 1990; CHAN *et al.*, 1992). Uma vez no interior da ferida, os fibroblastos interagem com os elementos da MEC realizando sua síntese, deposição e remodelagem. Os fibroblastos assumem uma nova função que

é a de sintetizar proteínas, principalmente colágeno. A produção de grande quantidade de colágeno nesta fase pode ser explicada pela evidente expressão de TGF- β 1 (CHANG *et al.*, 1980).

4.4.2 – TGF- β 1

Possui 3 isoformas (TGF- β 1, - β 2 e - β 3) e é produzido por diversos tipos celulares. Imediatamente após a ocorrência da lesão, grandes quantidades de TGF- β 1 são liberados pelas plaquetas (ASSOIAN *et al.*, 1983) a fim de agirem como quimioatrativos para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos. Estes tipos celulares também servem para aumentar o nível de TGF- β 1 dentro da ferida. Outra função importante dos TGF- β 1's é a estimulação da reepitelização e formação do tecido de granulação. Gailit *et al.*, (1994) constataram que o TGF- β 1 pode induzir a expressão de integrinas nos queratinócitos necessárias à sua migração, facilitando a reepitelização e permitindo que os queratinócitos cruzem a matriz provisória da lesão rica em fibronectina.

É um dos mais importantes mediadores da cicatrização devido aos seus efeitos adversos. Apresenta-se como principal modulador da angiogênese durante a cicatrização, por regular a proliferação celular, migração, formação do tubo capilar e deposição de MEC (ROBERTS, 1998). É também identificado como indutor do crescimento de fibroblastos; imunossupressor, inibindo a proliferação da maioria das células (podendo também estimular o crescimento de algumas células mesenquimais); induz a síntese e inibe a degradação da MEC (CHETTIBI; FERGUSON, 1999).

Em incisões experimentais em animais, e em modelos de avaliação da qualidade da cicatrização de feridas, a aplicação tópica de TGF- β 1 aumentou a

resposta inflamatória e a força de tensão da ferida (PIERCE *et al.*, 1989; PIERCE *et al.*, 1991). O aumento da força de tensão da ferida está atribuído ao efeito do TGF- β 1 quanto à síntese e deposição de colágeno na MEC (CHETTIBI; FERGUSON, 1999).

Em úlceras gástricas crônicas induzidas em ratos por ácido acético 100%, a adição de TGF- β 1 reduziu significativamente o número de macrófagos no local da ferida, acelerando fortemente o processo de cicatrização (ERNST *et al.*, 1996).

4.4.3 – Colágeno

O papel do fibroblasto no início do processo cicatricial é migrar para o local da ferida e replicar. Alguns dias após, os fibroblastos começam sua alta produção de colágeno (STADELMANN *et al.*, 1998).

O colágeno é composto de uma hélice tripla de três cadeias de polipeptídeos α , com uma sequência de repetição de gly-x-y (KUMAR *et al.*, 2005). A combinação das 3 cadeias formam uma unidade básica de colágeno chamada tropocolágeno. Nesta sequência, prolina freqüentemente está na posição X e 4-hidroxiprolina freqüentemente na posição Y. A tripla hélice é estabilizada por pontes de hidrogênio e é relativamente rígida. A resistência da molécula para extensão e compressão é importante para a função biológica da proteína (Figura 7) (PROCKOP; KIVIRIKKO, 1995).

Figura 7: Estrutura molecular e fibrilar do colágeno. Notar no canto superior esquerdo um esquema da síntese do colágeno. Notar que a fibra colágena é formada por fibra colágena primitiva que é formada por fibras colágenas que são formadas por filamentos colágenos que são formados por tropocolágenos que são formados por 3 cadeias com seqüências repetidas de gly-x-y. Cada uma das 3 cadeias são enroladas entre si e também entre as 3 juntas. Toda esta disposição permite ser o colágeno um conector de tecidos e também assegura a força tensil das feridas, da pele e de órgãos (STADELMANN *et al.*, 1998).

Harrison; Laurent, (1993); Shock; Laurent, (1996) relataram que o aumento da deposição de colágeno durante a cicatrização de feridas pode ocorrer devido ao aumento da produção de colágeno e também devido ao aumento do número de células produtoras. Também é de grande importância a quimiotaxia dessas células produtoras de colágeno para o local da injúria.

O desenvolvimento do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi dos fibroblastos permitem a mudança do seu fenótipo migratório para pró-fibrótico, até apresentarem repletos de novas proteínas representadas pelos colágenos. Essa grande produção de colágeno nesta fase pode ser explicada pela evidente expressão de TGF- β 1 (STADELMANN *et al.*, 1998; CHENG *et al.*, 2002). Estes são os miofibroblastos, que apresentam características intermediárias entre fibroblastos e células musculares (KARUKONDA *et al.*, 2000; VERNET *et al.*, 2002). Os miofibroblastos contêm a α -actina (músculo liso) (fibroblastos normais contêm β - e γ -actina) que causa contração da ferida e desenvolvimento de conexões tissulares na lesão inflamatória crônica (STADELMANN *et al.*, 1998). Williams, (1991); Stadelmann *et al.*, (1998) sugerem que por volta do décimo dia após o início do processo de reparo, os miofibroblastos sofrem alterações morfológicas desencadeadas por mecanismos sinalizadores que os levam ao fenômeno de apoptose (atualmente, ainda não elucidado). O processo de migração, proliferação e diferenciação do fibroblasto e síntese de MEC é mediado por fatores de crescimento, citocinas e componentes da MEC.

A reepitelização é alcançada pela migração, proliferação e diferenciação de queratinócitos na epiderme. O objetivo do processo de cicatrização de úlceras é o completo fechamento epitelial na área da úlcera (SHAI; MAIBACH, 2005).

4.5 – Remodelagem tecidual

Na remodelagem tecidual (quinta fase), há uma tentativa de retorno à estrutura tecidual normal. É marcada por maturação dos elementos e alterações na MEC com deposição de proteoglicanas e colágeno, surgindo numa fase mais tardia

uma contração da ferida e, basicamente, uma reorganização da MEC, passando de uma matriz provisional para uma matriz definitiva (KARUKONDA *et al.*, 2000).

A remodelagem do tecido representa a última fase do processo de cicatrização e pode durar anos. O que marca esta fase é o processo contínuo e dinâmico de equilíbrio entre a síntese de colágeno novo e degradação do colágeno velho através da ação das collagenases. Os macrófagos começam a desaparecer junto à redução da angiogênese e da proliferação de fibroblastos. Inicialmente é produzido o colágeno tipo III e este é trocado pelo colágeno tipo I que é mais estável. As fibras colágenas são organizadas em um alinhamento mais forte. Esse processo leva, eventualmente, a formação de cicatriz (SHAI; MAIBACH, 2005).

Fibroblastos, macrófagos e queratinócitos, produzem metaloproteinases (MMPs) que participam da transição de uma matriz provisional para cicatriz de colágeno. As collagenases intersticiais (MMP-1 e MMP-8) são envolvidas na clivagem de colágeno tipo I (mais predominante na pele). As gelatinases MMP-2 e MMP-9 degradam o colágeno tipo IV (existente na membrana basal). Estromelisinases MMP-3 e MMP-10 degradam proteoglicanas. Harrison; Laurent, (1993) relatou que a degradação do colágeno ocorre tanto extracelularmente quanto intracelularmente. A degradação intracelular está associada com a degradação de procolágeno e a extracelular é mediada pelas metaloproteinases incluindo collagenases, gelatinases e estromelisinases (MURPHY; DOCHERTY, 1992). Tanto a degradação intracelular quanto a extracelular são importantes para a regulação da deposição da matriz na cicatrização de feridas (MAUCH *et al.*, 1994). A atividade das MMPs é regulada pelos fatores de crescimento, citocinas e TIMPs (inibidores teciduais de MMPs) produzidos pelas células da cicatrização (CHETTIBI; FERGUSON, 1999).

As principais citocinas envolvidas nesta fase são TNF- α , IL-1 β , PDGF, TGF- β 1 produzidas pelos fibroblastos, além das produzidas pelas células epiteliais como EGF e TGF- β 1.

Várias são as doenças que interferem negativamente no processo de reparo tecidual, como o diabetes, a esclerose sistêmica, a anemia, a desnutrição e doenças crônicas, entre outras. Muitas também são as condições que tornam este processo de difícil resolução, impedindo ou retardando uma completa restauração (KUMAR *et al.*, 2005).

A busca de agentes específicos como fatores de crescimento que possam acelerar a cicatrização tem sido intensamente investigada. Existe grande interesse em acelerar esse processo, com o intuito de evitar as complicações muito comuns com infecções, principalmente, em procedimento cirúrgicos. Ademais, sabe-se que uma lesão com solução de continuidade constitui sempre um caminho para infecções oportunistas.

Em vista da importância clínica das úlceras cutâneas na prática de assistência à saúde, a multiplicidade dos tratamentos preconizados como indutores de cicatrização, a complexidade do processo cicatricial e as várias dificuldades do estudo de cicatrização em humanos, torna-se essencial investir nos estudos da cicatrização em modelo animais.

5 – Modelos animais em cicatrização

Primeiramente, deve-se destacar diferenças da pele humana já descrita com a pele do camundongo. Esta apresenta estrutura variável conforme a região estudada, sendo mais espessa na região dorsal e mais fina na região ventral e nos

membros. A epiderme é pouco espessa constituída de 3 a 5 camadas de células, formada por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado com colágeno denso e abundantes fibras elásticas. Na derme, o colágeno é mais delicado e frouxo, apresentando-se constituído por fibras colágenas e elásticas finas. Nesta região, os folículos e respectivos pêlos são abundantes, havendo apenas glândulas sebáceas. Não há glândulas sudoríparas nem papilas dérmicas, e há muitos vasos e nervos. Logo abaixo da derme e separando-a do plano muscular ou ósseo encontra-se a hipoderme, constituída por tecido conectivo (colágeno) frouxo e tecido adiposo em quantidades variáveis (JUNQUEIRA; MARTINS, 1947).

Figura 8: Corte histológico transversal da pele normal (sem tratamento) do dorso do camundongo C57BL/6 corado com Hematoxilina e Eosina: aumento 100x. Epiderme de 3 a 5 camadas de células (basal, granulosa e córnea); derme com abundância de pêlos, não há glândulas sudoríparas nem papilas dérmicas; longo tecido celular subcutâneo com tecido adiposo e algumas fibras colágenas frouxas, apresentando também tecido muscular (vermelho mais denso melhor visualizado no tecido celular subcutâneo da segunda imagem).

Vários são os modelos animais de cicatrização de feridas relatados na literatura, cada um com sua importância clínica e/ou terapêutica. Reid *et al.*, (2004) relataram 4 diferentes modelos animais cirúrgicos para estudo da cicatrização, cada um com suas particularidades:

- Modelo de punch na cabeça: lesão feita na região da cabeça do camundongo com punch 6 mm para estudo da cicatrização da derme e epiderme (epitelização e formação do tecido de granulação) por mínima contração;
- Modelo de cicatrização do epitélio da orelha: lesão feita na superfície ventral da orelha do camundongo (ou coelho) com punch 3mm, para estudo da cicatrização do epitélio (epitelização) sem contração;
- Modelo de punch no dorso: lesão feita no dorso de camundongos com punch 6 mm para estudo da cicatrização em lesão contrátil;
- Modelo de incisão no dorso: duas incisões feitas no dorso do camundongo paramedianamente para estudo da tensiometria da lesão.

Também são vários os relatos na literatura sobre o modelo de implantação subcutânea de diferentes biomateriais. Chang *et al.*, (1980) relataram em seu trabalho que após a implantação subcutânea de um tecido de poliéster nos membros de ratos diabéticos houve formação do tecido de granulação. Viljanto *et al.*, (1981); Andrade *et al.*, (1987); Davidson, (1998) trabalharam com implantes subcutâneos de matrizes sintéticas de “polyvinyl alcohol (PVA) sponges, como indutor de crescimento fibrovascular. Tal biomaterial tem sido adotado como modelo adequado para quantificação da resposta angiogênica e fibrogênica na cicatrização *in vivo*. (DAVIDSON *et al.*, 1985; ANDRADE *et al.*, 1987; FAJARDO *et al.*, 1988; SEPHEL *et al.*, 1996).

Kyriakides *et al.*, (2001) relatam que o método de implantação subcutânea é preferido quando é desnecessária a influência de fatores adicionais, tais como células epiteliais e estruturas especializadas incluindo folículos pilosos e glândula sudorípara.

São vários os biomateriais relatados na literatura que são implantados subcutaneamente, mostrando ser este um modelo adequado para avaliar as modificações teciduais decorrentes dos implantes de produtos ditos como estimuladores da cicatrização e suas modificações imunológicas resultantes, como as que ocorrem com a biomembrana de látex.

6 – A Biomembrana de Látex Natural (BLN)

Em 1994, o Laboratório de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo/Brasil desenvolveu um novo material biocompatível, à base de látex natural extraído da seringueira *Hevea Brasiliensis* sob supervisão do Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto e sua aluna Fátima Mrué (MRUÉ, 1996).

O látex natural é processado para formar uma membrana estéril, denominada Biomembrana de Látex Natural (BLN) que tem sido usada, desde então, em diferentes situações.

A BLN é obtida da polimerização do látex natural, possui estrutura similar às membranas celulares, sendo produzida quimicamente, pela indução da polimerização do poliisopreno endógeno, presente 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 protéicos do látex natural (MRUÉ, 1996) (Figura 9).

Figura 9: Estrutura química da BLN: proteínas e fosfolipídios naturais do látex composto por cadeias de poliisopreno ligadas por pontes de enxofre (MRUÉ *et al.*, 2004).

Os cuidados especiais tomados na polimerização fazem com que a BLN adquira uma microarquitetura particular, com uma superfície natural, que permite aderência celular e estimula os vários tipos celulares, especialmente os polimorfonucleares envolvidos nos processos de cicatrização de feridas. Essa BLN pode ser fabricada mantendo as características, na forma laminar a fim de ser utilizada como curativo, ou em vários formatos, ou como próteses, preparadas a partir de moldes especiais (MRUÉ, 1996; THOMAZINI *et al.*, 1997).

A BLN, desde sua descoberta, tem sido objeto de vários estudos. Suas propriedades físicas, microarquitetura e biocompatibilidade foram determinadas inicialmente em modelos animais (MRUÉ *et al.*, 2004). Encontra-se hoje, em fase de utilização em humanos e a investigação bioquímica sobre a estrutura do látex natural e seus componentes ativos tornam-se, atualmente, os objetos de estudo dos pesquisadores envolvidos com o biomaterial.

6.1 – Biocompatibilidade

Para que a coexistência biomaterial-hospedeiro não desencadeie reações adversas ou incontroláveis nos sistemas biológicos, o biomaterial deve ser biocompatível. Atualmente, entende-se como biocompatibilidade a característica do material que, usado em aplicações específicas, desenvolve respostas teciduais

adequadas aos sistemas hospedeiros. Observa-se que esse conceito evoluiu e não mais se supõe que materiais biocompatíveis devam ser absolutamente inertes ou inócuos, mas que as respostas induzidas ao organismo hospedeiro sejam controláveis (CHESTER, 1987; WILLIAMS, 1987).

A biocompatibilidade dos biomateriais é avaliada principalmente pela reação do tecido onde é usada em relação ao biomaterial. Os biomateriais podem ser classificados como bioinertes ou bioativos. Bioinertes são materiais que não desempenham nenhuma atividade no hospedeiro quando implantados, enquanto que os bioativos estimulam a uma resposta desejada.

Um material biocompatível ideal, utilizado como indutor da cicatrização de feridas deveria ser bioativo, induzindo o estímulo a todas as fases da cicatrização e cessando sua atividade após o término do mesmo, além de ser reabsorvível, não sendo necessário uma segunda etapa cirúrgica para a remoção do biomaterial. Também é importante salientar que os produtos decorrentes da sua reabsorção não deveriam interferir no processo de cicatrização.

Vários modelos experimentais têm sido feitos com o intuito de estudar a atividade cicatrizante da BLN em diferentes condições. Como consequência, cada experimento acaba por mostrar a biocompatibilidade da BLN.

Mrué, (2000) evidenciou que uma prótese à base de látex da seringueira *Hevea brasiliensis* é importante indutora da cicatrização de paredes esofágicas de cães com lesões experimentalmente induzidas, atuando como indutora da neoangiogênese, formação de epitélio pseudoestratificado, neoformação glandular submucosa e neoformação de fibras musculares (MRUÉ, 1996; THOMAZINI *et al.*, 1997; MRUÉ, 2000).

Diferentes formas e modelos de próteses de látex foram utilizadas experimentalmente em diferentes tecidos, apresentando também resultados satisfatórios como, por exemplo, em prótese de artéria femoral de cães (FREITAS, 2001; LACHAT *et al.*, 2003) com regeneração da artéria femoral.

Mendonça, (2004); Maurício, (2006) utilizou a primeira das frações do látex obtida em cromatografia de DEAE-celulose e incorporou-a em gel de carboximetil-celulose (Bayer) 4% em 3 concentrações diferentes: 0,01%, 0,1% e 1% e aplicou-as sobre as úlceras dérmicas em orelhas de coelhos. A concentração 0,01% foi a mais eficiente por estimular o fechamento da lesão em menor tempo.

O látex também foi confeccionado na forma de uma membrana (Biomembrana de Látex – BLN) como substituto parcial de pericárdio em cães (SADER *et al.*, 2000). Adicionalmente, foi observado que a aplicação da BLN em córneas de coelho (PINHO *et al.*, 2004), queimaduras induzidas no dorso de porcos da raça Nilo (ARMANI; COUTINHO-NETTO, 2001), também constataram a aceleração do processo cicatricial.

Um dos mais importantes fatores na evolução da biocompatibilidade de um material é sua aceitação pelo hospedeiro, obtendo uma resposta inflamatória que deve assemelhar-se com o processo de cicatrização normal (MRUÉ *et al.*, 2004).

Mrué *et al.*, (2004) relatam em seu trabalho que o látex utilizado como biomaterial é adequado para adesão celular, mostrando por microscopia eletrônica a aparência normal das células inflamatórias aderidas à prótese. Relatou também que a reação das células inflamatórias pareceu assemelha-se à cicatrização normal, sem processo de rejeição. A BLN não contém produtos tóxicos tais como o carbamato,

que é convencionalmente utilizado nas indústrias de borracha, nem algum outro adjuvante ou conservante.

A BLN vem sendo utilizada em cirurgias de meringoplastia para a neoformação de membrana timpânica, atingindo índice de sucesso de 98% (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Em pterigioplastias, foi observado que a aplicação da BLN, em substituição ao clássico curativo com membrana amniótica humana, atuando como barreira ao crescimento do feixe fibrovascular sobre a córnea e repovoando a área excisada com epitélio sadio (COUTINHO-NETTO; MRUÉ, 2003).

Massuda; Oliveira, (2005) estudou um modelo de colesteatoma com perfuração intencional na membrana timpânica de ratos seguida da introdução da BLN. Observou que a presença a BLN pode provocar aumento da produção de citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8) e fatores de crescimento pelas células inflamatórias. A BLN parece ter proteínas responsáveis por favorecer o crescimento vascular e causarem quimiotaxia e migração de tecido epitelial no meato da orelha externa do rato, causando o colesteatoma.

A hérnia umbilical é freqüente em bovinos leiteiros e é um defeito de caráter hereditário. O tratamento considerado ideal fundamenta-se na aproximação dos tecidos do próprio animal. Porém, existem situações em que esta reconstrução é difícil de ser efetuada devido à indisponibilidade de tecido íntegro para a aproximação e correção do defeito. Nestas situações torna-se imperativo o emprego de técnicas reconstrutivas que permitam a substituição do tecido normal por implantes biológicos, os quais têm demonstrado maior viabilidade em comparação aos implantes sintéticos (SILVA *et al.*, 2004; RABELO *et al.*, 2005). Esses autores demonstraram a BLN ser um implante eficiente em hernioplastias umbilicais de bovinos leiteiros, reconstruindo o tecido.

Paulo *et al.*, (2005b) trabalharam com a BLN na herniorrafia perineal unilateral em cão Poodle. A BLN permitiu oclusão do anel herniário no cão com hérnia perineal, mas necessitou ser removida, deixando uma base tecidual.

A BLN também foi utilizada na reconstrução e defeitos abdominais em ratos e foi eliminada em média aos 13,8 dias após sua implantação, deixando uma base fibrosa de reparação (PAULO *et al.*, 2005a).

Souza, (2006) estudou a regeneração óssea guiada (ISHIMURA *et al.*) pela BLN e sua propriedade angiogênica. Seus estudos constataram que a BLN colocada em defeitos ósseos feitos na calota craniana do rato proporcionou maior formação óssea quando comparada ao sítio controle (defeito ósseo sem BLN) com observação de intensa neoangiogênese macroscópica e microscópica.

Maurício, (2006), após purificação do soro do látex por cromatografia em DEAE-celulose realizou o teste de Miles para avaliação do aumento da permeabilidade vascular. Injetou-se os picos subcutaneamente no dorso de coelhos. Dos 3 picos obtidos pela cromatografia, apenas o pico 1 apresentou maior atividade em relação aos demais picos. Para estudo da atividade angiogênica, os respectivos picos foram colocados na membrana cório-alantóica de ovos de galinha *Gallus domesticus*, sendo o pico 1 o que demonstrou ser mais eficaz em promover esta atividade. Já no estudo de citotoxicidade, o pico 1, nas concentrações de 0,01mg/mL e 0,1mg/mL não mostraram citotoxicidade em culturas de células leucêmicas da linhagem Jurkat e em culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Portanto, essas células proliferaram normalmente na presença do pico 1. A fim de analisar se o pico 1 estimularia células endoteliais, foi feita cultura de células endoteliais isoladas da veia umbilical humana (HUVEC) como descrito por Jaffe *et al.*, (1973). O pico 1 também não estimulou diretamente as células endoteliais do

cordão umbilical humano (HUVEC), comprovando que a ação angiogênica da BLN não se dá diretamente sob o estímulo proliferativo das células endoteliais, indicando assim um efeito indireto, ou seja, provavelmente sua ação angiogênica se dá pela liberação de fatores de crescimento por monócitos/macrófagos estimulados, ou ainda algum mecanismo não elucidado até o momento.

Mendonça, (2004) constatou que a atividade indutora da cicatrização, presente no látex natural, provém da fração soro do látex. Para a obtenção desta fração o látex foi mantido em condições especiais como repouso, pH ácido e temperatura ambiente, resultando na separação das fases sólida (borracha) e líquida (soro). Estudos preliminares de purificação, utilizando cromatografia clássica de colunas de troca iônica, identificaram propriedades de atividade biológicas e termolabilidade das frações do soro do látex natural, sugerindo que as frações encontradas são responsáveis pelas propriedades do látex natural, na estimulação a cicatrização observada clinicamente nas lesões tratadas com biomembrana de látex natural.

Esse soro foi fracionado através do método de cromatografia em colunas e frações obtidas foram avaliadas bioquimicamente para se identificar seus componentes ativos. Até o momento, pode-se formar que se trata de proteínas, visto que a eletroforese em poliacrilamida da fração ativa purificada mostrou peso molecular de 30000 a 40000, também compatível com o peso de proteínas. Também foi visto que a BLN perde suas atividades angiogênicas e reepitelizantes quando o látex, em confecção, é tratado em temperaturas maiores que 60°C, teste que altera sua conformação protéica ou pelo tratamento de enzima proteinase-K capaz de degradar proteínas (MENDONÇA, 2004).

Lamounier, (2004) avaliou a produção de citocinas inflamatórias *in vitro* em cultura com células mononucleares do sangue periférico (PBMC), induzidas pela BLN, pelo soro total do látex e os 3 picos do soro total, obtidos por Mendonça, (2004) através de cromatografia. As PBMC não proliferaram na presença de BLN provavelmente devido à alteração da composição, pH ou pressão osmótica do meio pelas moléculas constituintes da BLN. Na presença de soro total (conjunto dos picos separados por cromatografia) as PBMC não apresentaram alteração da resposta linfoproliferativa e da produção de citocinas, assim como na presença do pico 2 isoladamente. Na presença do pico 1, houve aumento de IL-10 sugerindo ser este componente sinalizador da resposta Th-2. A interação do pico 3 associado com o mitógeno PHA (fitohemaglutinina) induziu a diminuição da produção de IFN- γ , e o incremento acentuado de IL-10, o que sugere ação potencializadora da resposta Th-2. A autora inferiu que o princípio ativo da BLN (soro total) não se utiliza de interações celulares com os linfócitos na fase inflamatória durante a cicatrização.

Com o êxito das aplicações da BLN em modelos animais, sua utilização em humanos foi iniciada em lesões cutâneas após aprovações das Comissões de Ética dos Hospitais as Clínicas da FMRP-USP e Universitário da UFJF (FRADE *et al.*, 2001b; 2003). No estudo realizado por Frade *et al.*, (2001a; 2002) avaliaram a atividade da BLN sobre úlceras em pacientes com *diabetes mellitus*, sendo observada indução da cicatrização pela rápida estimulação da angiogênese e reepitelização das áreas ulceradas sabidamente comprometidas pelo processo de microangiopatia diabética.

Baseado nisso, Frade, (2003) propôs a biomembrana de látex natural (BLN) como alternativa eficiente, cômoda e econômica para o tratamento de úlceras

de perna, sendo este o material utilizado neste trabalho, comparando sua atividade com outros implantes.

Frade *et al.*, (2002) observaram sinais evidentes de estímulo à granulação visualizada sob o aspecto clínico e com confirmação histopatológica, associada à redução dos sintomas, especialmente da dor em úlceras de perna crônicas. Foi observado também, que a BLN induz a diferenciação do tecido de cicatrização, com aumentos da detecção e fatores de crescimento como VEGF e TGF- β 1 e redução da enzima iNOS (FRADE, 2003) Sua avaliação como curativo em lesões venosas, hipertensivas e úlceras associadas à microangiopatia diabética demonstrou, ainda, a capacidade de manter as lesões úmidas, e curativo não aderente, sendo eficaz no desbridamento e na angiogênese (FRADE *et al.*, 2005).

Frade *et al.*, (2006), em estudo da BLN no tratamento de úlceras de pressão, constataram redução de necrose e fibrina, aumento da exsudação nessas úlceras e aumento da permeabilidade vascular. A importância disso está relacionada com o estímulo ao desbridamento do local, reinfamação do estado crônico do tecido, e também a permanente hidratação da úlcera, importante durante a fase inflamatória e de formação tecidual. Também a BLN não se mostrou aderida ao leito da úlcera, permitindo assim menos dor e traumas durante as trocas. Houve também grande estímulo à formação do tecido de granulação e aceleração da cicatrização das mesmas.

Frade, (2003) relatou em seu trabalho, as dificuldades do acompanhamento dos pacientes através da realização de biópsias principalmente após o 30º e 90º dias de seguimento, tendo em vista que os pacientes apresentavam ulcerações crônicas há longo tempo e submetê-los a uma nova biópsia era contrário ao desejo dos pacientes de cicatrização da úlcera. Aliado a

isso, o autor avaliou o tratamento com a biomembrana até o 30º dia, utilizando-se de estudos imunohistoquímicos qualitativos, não podendo quantificar a participação das citocinas no processo cicatricial.

Portanto, torna-se de grande relevância os modelos animais para o estudo do mecanismo de ação da BLN. Como ressaltado anteriormente, o modelo de implantação subcutânea é adequado para avaliar as modificações teciduais decorrentes dos implantes de produtos ditos como estimuladores da cicatrização e suas modificações imunológicas resultantes. Com a implantação subcutânea da BLN no dorso de camundongos, pode-se analisar mais refinadamente seu mecanismo de ação na cicatrização, através de análises quantitativas e qualitativas do próprio tecido neoformado, acompanhado os momentos pós cirúrgicos, representativos das fases inflamatória e de formação tecidual (angiogênese e fibrogênese).

A identidade protéica do(s) componente(s) ativo(s) no látex pode sugerir uma possível homologia funcional entre esta(s) substância(s) e fatores de crescimento já muito estudados e descritos na literatura científica, como VEGF, TGF- α , FGF dentro outros. Os achados de Mendonça, (2004) e Maurício, (2006) mostraram que a BLN possui constituintes protéicos que causam sua ação. Tanto que quando Mendonça, (2004) submeteu o látex a temperaturas maiores que 60°C ou tratou-o com proteinase K, houve perda de atividade.

Devido à importância e adequação do uso da BLN nos processos reparativos em várias situações clínicas, torna-se importante o estudo do processo cicatricial até a segunda semana (14 dias) frente à injúria ocasionada pela introdução de implantes de BLN, membrana de látex desnaturado (LUVA), implante sintético (ePTFE) e, também, após somente o trauma cirúrgico no tecido subcutâneo de camundongos (SHAM).

Aliado a isso e aos outros trabalhos já realizados com a BLN, neste trabalho foram usados diversos métodos para analisar a atividade da BLN em cada uma das fases da cicatrização, podendo assim buscar informações sobre o verdadeiro mecanismo de ação da BLN na indução de neoformação tecidual.

Existem vários *softwares* para análise digital de imagens disponíveis para otimizar a avaliação de úlceras cutâneas. O ImageJ[®] é um programa de análise de imagem de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband do *National Institutes of Health (NIH)*, é um sucessor do *NIH Image* e possui a vantagem de ter aplicação multidisciplinar. Está em linguagem JAVA e pode ser usado com os sistemas operacionais Microsoft, Linux e Macintosh que possuam esta linguagem. Seus *plug-ins* que têm sido desenvolvidos permitem que profissionais de diversas áreas de atuação possam aplicá-lo às suas análises de rotina, sendo amplamente utilizado na pesquisa biológica. Destaca-se como uma ferramenta de análise 2D, entretanto, tem capacidade para explorar dados em 3D e 4D com o uso de *plug-ins* apropriados (ELICEIRI; RUEDEN, 2005; MIMS, 2005).

O *software* ImageJ[®] pode ser utilizado para a avaliação imunohistoquímica, tanto para marcação enzimática quanto fluorescente, após captura da imagem pelo microscópio. É possível efetuar a contagem de células de duas maneiras: (1) Técnica de contagem de células – “*Cell Counter*” (análoga aos contadores de células em hematologia) e (2) Método da área (GIRISH; VIJAYALAKSHMI, 2004).

No método de contagem de células (*Cell Counter Method*), as células podem ser contadas diretamente a partir da tela através da inserção de marcadores de diferentes cores: núcleo positivo e negativo, clicando com o mouse. Finalmente, o *software* vai automaticamente gerar um índice imunohistoquímico. As vantagens

desta técnica sobre a contagem convencional através do microscópio são reprodutibilidade e acurácia (GIRISH; VIJAYALAKSHMI, 2004).

Com o método da área, a área total ocupada por núcleo positivo (marrom) e negativo (azul) pode ser estimada pelo *threshold* usando esta ferramenta do ImageJ[®] para seleção destes núcleos separadamente (GIRISH; VIJAYALAKSHMI, 2004).

No estudo das modificações teciduais estimuladas pelos diferentes implantes foram utilizadas diferentes metodologias tais como análise de imagens pelo *software* ImageJ[®] de cortes histológicos corados com Hematoxilina – Eosina, quanto ao infiltrado inflamatório, angiogênese e fibroplasia; e Tricrômio de Gomori quanto à colagênese; Imunohistoquímica de iNOS, IL-1 β , TGF- β 1, VEGF; dosagem de IL-1 β e TGF- β 1 por ELISA e dosagem de mieloperoxidase ambos esses métodos feitos do macerado tecidual da região de implante. A intensidade do acúmulo de neutrófilos na pele do dorso dos animais é aferida pelo ensaio colorimétrico da mieloperoxidase.

7 – A Luva Cirúrgica Estéril (LUVA)

De acordo com o site do Senai, (2007) SBRT - Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas (respondido pelo SENAI) a fabricação de luvas de látex é realizada pelo processo de imersão. Um molde, que pode ser de cerâmica vitrificada, vidro ou metal polido, é mergulhado primeiro em uma solução coagulante para depois ser imerso num composto de látex. Podem ser utilizados coagulantes úmidos ou secos. O coagulante úmido normalmente usado é o ácido acético. Já no processo com coagulante seco (mais utilizado em escala industrial), são empregadas, à temperatura ambiente, substâncias secas, como o cloreto ou o

nitrato de cálcio, previamente dissolvidos em solvente próprio (como um álcool, por exemplo). Após o mergulho no composto de látex, é feita a secagem do material, obtendo-se um filme uniforme que recobre o molde. Em seguida, é feita a vulcanização: os moldes são levados para uma autoclave a 120°C, com vapor direto, onde deverão permanecer por um período de 20 minutos. Finalmente, as luvas são talcadas e retiradas dos moldes.

Fabricação de luvas:

Látex a 60% - 100,0 gramas

Óxido de zinco - 1,0 grama

Enxofre - 1,0 grama

Dietilditiocarbômato de zinco - 0,8 grama

8 – O PoliTetraFluorEtileno Expandido (ePTFE)

Desde 1984 o politetrafluoretileno expandido tem sido usado como barreira ao tecido epitelial da invasão no defeito periodontal, induzindo nova conexão tecidual, sendo também bastante usada na técnica de GTR – regeneração tecidual guiada. No entanto, o ePTFE não é biodegradável e necessita de uma segunda cirurgia para sua remoção (LU *et al.*, 2004). Não é conhecida alguma enzima no organismo capaz de clivar a ligação carbono–fluorina (COHEN *et al.*, 1999).

Ham; Miller, (2003) relata ser o ePTFE (Gore-Tex®) um polímero monomérico formado por dois átomos de carbono ligados por dupla ligação (monômero de etileno) e cada carbono com duas fluorinas ($-\text{CF}_2=\text{CF}_2-$)_n. O ePTFE é feito sobre pressão a seco, possuindo assim microporos e nódulos interconectados com fibras.

Hanel *et al.*, (1982) mostraram por microscopia de luz o crescimento das células mesenquimais no espaço internodal de ambos os lados do implante vascular. Visualizou-se no interstício o colágeno maturado, a formação neocapilar na superfície do implante, os fibroblastos dentro do interstício do implante e o colágeno penetrando na superfície anterior, demonstrando eficiente cicatrização dentro de 5 meses. Bauer *et al.*, (1987) notaram mínima resposta inflamatória em reparo de defeito de parede abdominal com ePTFE. Similarmente, Mass *et al.*, (1993) em estudo animal demonstraram mínima reação inflamatória que diminuiu e estabilizou ao longo do tempo.

Neel, (1983) descreveu o primeiro estudo com ePTFE em cirurgia de estética facial. Foi implantado Gore-Tex® cilíndrico no espaço pericondrial, no tecido subcutâneo da face e na região paraespinal em coelho New Zealand. O exame histológico demonstrou mínima reação histiocítica e mínima reação de corpo estranho gigante nos tecidos. Isso permitiu o crescimento tecidual e ainda o implante pôde ser facilmente removido. Esse resultado foi favorável e se mostra muito promissor, abrindo as portas do Gore-Tex® como aplicação em cirurgia estética. A partir disso, o Gore-Tex® foi estudado em cirurgia plástica incluindo reconstrução de paralisia facial (PETROFF *et al.*, 1992), aumento de volume do queixo, área malar, dorso nasal, nasolabial, labial, e defeito no olho (KARESH *et al.*, 1989) e também deficiências temporais como em preenchimento tecidual (SCHOENROCK; CHERNOFF, 1995).

Assim, diante da importância terapêutica da BLN na clínica atual, o estudo busca avaliar a influência da mesma na indução da neoformação tecidual no modelo animal em camundongos, comparando com os implantes de LUVA cirúrgica (implante desnaturado), ePTFE (implante sintético) e com SHAM (controle).

Objetivos

Geral:

Identificar os fatores envolvidos na neoformação tecidual induzida na pele e tecido subcutâneo em camundongos pela implantação de biomembrana de látex, fragmento de luva cirúrgica (látex desnaturado), membrana sintética (ePTFE), comparando-os ao trauma cirúrgico sem introdução de qualquer material (SHAM) no período de até 14 dias.

Específicos:

- Avaliar as alterações macroscópicas do sítio de injúria provocada, aos 2, 7 e 14 dias pós injúria;
- Avaliar as alterações histológicas nos diferentes grupos e respectivos tempos de seguimento quanto ao infiltrado inflamatório, presença de vasos sangüíneos e fibroplasia, através do *software* ImageJ®, em cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina;
- Quantificar, através do ImageJ®, o colágeno em cortes histológicos corados pelo Tricrômio de Gomori;
- Avaliar a participação dos neutrófilos polimorfonucleares, através da quantificação da mieloperoxidase obtida do macerado tecidual nos diferentes grupos e tempos de seguimento;
- Avaliar a participação da IL-1 β e do TGF- β 1 no processo, através de sua dosagem no sobrenadante de macerado tecidual nos diferentes grupos e tempos de seguimento;
- Demonstrar, através da técnica imunohistoquímica, a presença de expressão da IL-1 β , iNOS (fase inflamatória), VEGF (angiogênese) e TGF- β 1 (fibroplasia) nas biópsias dos diferentes grupos e respectivos tempos de seguimento.

Animais e Métodos

Todos os protocolos metodológicos utilizados para a execução do trabalho em animais em experimentação estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA), sob número 055/2005 em reunião de 1º de agosto de 2005 (Anexo A).

1 – Animais

Foram utilizados camundongos machos isogênicos da linhagem C57BL/6, com 8 a 10 semanas, obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em condições de isolamento em gaiolas individualizadas, com água e ração *ad libitum* e ciclos alternados de luminosidade a cada 12 horas no Biotério da Clínica Médica.

2 – Procedimento cirúrgico

Os camundongos foram pesados, anestesiados, por via intraperitoneal, com tribromoetanol 2,5% 100µL/10g p.v.. Em seguida, tiveram o dorso depilado e após a assepsia do local com álcool iodado realizou-se uma incisão cutânea linear de aproximadamente 0,5cm (CHANG *et al.*, 1980), pela qual foi introduzida uma pinça romba para divulsionamento entre o tecido celular subcutâneo e a fáscia muscular, local esse que acomodou os diferentes implantes. Logo após a colocação do respectivo implante, esta incisão foi suturada com fio nylon 5-0 (Figura 10). Depois de recuperarem o efeito da anestesia, os animais voltaram para as gaiolas

individualizadas, onde permaneceram no biotério até o dia do sacrifício (CHANG *et al.*, 1980).

Figura 10: Etapas do procedimento cirúrgico. Notar na primeira figura o implante de ePTFE, na segunda o de BLN, e na terceira o de LUVA.

3 – Materiais utilizados como implante

3.1 – Coleta do látex e confecção da Biomembrana

O látex natural foi obtido de diversos clones da *Hevea brasiliensis*, principalmente RRhim 600 e GT-1, através de incisões no caule da árvore de aproximadamente 60 a 90cm de altura (popularmente conhecido como sangria) e coletado em recipientes adequados (MAURÍCIO, 2006) (Figura 11).

Ao látex natural extraído da *H. brasiliensis*, utilizado para estes experimentos, foi adicionado 1,7% de hidróxido de amônia (concentração final) a fim de evitar a coagulação (látex amoniacal), seguido de centrifugação. Posteriormente, o látex foi colocado em placa de Petri em mesa plana até forrar o fundo da placa numa fina camada. A placa de Petri foi levada numa estufa plana e regulada à temperatura de 60°C para polimerização do látex. Finalmente, o produto foi esterilizado em óxido de etileno (MRUÉ, 1996). A biomembrana foi confeccionada no Laboratório de Neuroquímica do Departamento de Imunologia e Bioquímica da FMRP-USP e fornecida pelo Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto.

A partir dessas biomembranas, foram confeccionados os implantes que consistiram em fragmentos quadriculados de 1cm^2 de área, cortados no momento da cirurgia de implantação.

Figura 11: (A): Incisões em meia espiral no caule da seringueira para coleta do látex, que escorre pelo caule e cai no recipiente com amônia para não coagular. (B): Látex é levado ao laboratório onde é confeccionada a biomembrana em placas de Petri sob mesa plana e posterior vulcanização em estufa controlada à 60°C . (C): Depois de ser esterilizada em óxido de etileno está pronta para ser implantada nos animais.

3.2 – Luva

Objetivando avaliar a atividade do látex após ser submetido à alta temperatura pelo processo de vulcanização, representando látex desnaturado (sem atividade protéica) como acontece na manufatura das luvas cirúrgicas de látex (SENAI, 2007), a partir das quais foram confeccionados implantes de luvas quadriculares de 1cm^2 .

3.3 – ePTFE

Para a confecção dos implantes de ePTFE (Politetrafluoretileno expandido) (HAM; MILLER, 2003) foram utilizadas membranas de ePTFE sintético (Bionnovation biomedical – Florida – USA) (Figura 12), a partir das quais foram cortados quadrados de 1cm^2 .

Figura 12: ePTFE implantado nos animais.

4 – Padronização dos grupos

Os camundongos foram divididos em 5 grupos experimentais, distintos pelo tipo de material implantado:

- **Grupo BLN:** 15 camundongos submetidos a implantes de biomembrana de látex natural (BLN);
- **Grupo LUVA:** 15 camundongos submetidos a implantes de luva cirúrgica estéril;
- **Grupo ePTFE:** 15 camundongos submetidos a implantes de ePTFE;
- **Grupo SHAM:** 15 camundongos incisionados, divulsionados com a pinça romba e depois suturados sem colocação de implante (cicatrização normal – SHAM).

5 – Coleta do material para estudo

Cinco animais de cada grupo experimental foram sacrificados, sob anestesia em câmara com éter, em 3 momentos pós-cirúrgicos: 2, 7 e 14 dias. Os camundongos tiveram toda a pele dorsal retirada incluindo o implante e a musculatura aderida (Figura 13A). Todas as amostras coletadas foram utilizadas nos seguintes métodos, a saber: avaliação macroscópica, estudo histológico, dosagens de mieloperoxidase, IL-1 β e TGF- β 1 por ELISA a partir do macerado do tecido e imunohistoquímica.

Figura 13: (A): Os camundongos tiveram a pele do dorso recortada ao redor da região onde foi colocado o implante. **(B):** A pele recortada foi afixada num isopor para ser fotografada (avaliação macroscópica) e em seguida, foram coletadas biópsias desta pele com punch 4mm para os estudos bioquímico, imunológico e histopatológicos.

6 – Avaliação Macroscópica

O fragmento de pele coletada foi afixado em uma prancha de isopor com ajuda de alfinetes, e fotografado em 3 Mega pixels com uma câmera digital Sony (DSC - S40 4.1 Mega pixels) para que pudesse ser feito um estudo macroscópico do tecido neoformado pelos diferentes implantes nos diferentes tempos de seguimento, comparando-os com o SHAM (Figura 13B).

Em seguida, foram retirados 5 fragmentos cilíndricos sobre a região da cirurgia e implante, com a utilização de “punches” de 4mm de diâmetro, os quais tiveram as seguintes finalidades:

7 – Estudo histológico

As biópsias mantidas acondicionadas por 24h em solução de formaldeído 10% tamponado e incluídas em parafina seguindo o protocolo já estabelecido no Laboratório de Dermatologia do HCFMRP-USP. Os cortes foram de 4µm e corados simultaneamente e com o mesmo tempo com Hematoxilina e Eosina para avaliação do infiltrado inflamatório, número de fibroblastos e vasos sanguíneos, e também com Tricrômio de Gomori para análise da produção de colágeno.

7.1 – Análise das imagens histológicas

7.1.1 – Avaliação quantitativa por imagem quanto ao infiltrado inflamatório, angiogênese e fibroplasia

As lâminas histológicas coradas com Hematoxilina e Eosina foram visualizadas no microscópio óptico LEICA® DM 4000B com câmera LEICA® DFC 280 ligada ao computador AMD Athlon™64 2.00GHz equipado com placa de vídeo NVIDIA GeForce4 MX4000 e com o *software* LEICA® IMAGE MANAGER 50 para captura das imagens (Figura 14A e 14B).

Após a lâmina ser focalizada, foi feito o “*white balance*” de cada imagem no próprio *software*. Foi também pré-definido no *software* o tamanho da área de interesse (“*ROI*” – “*Region of Interest*”) de 900 *pixels* na horizontal por 300 *pixels* na vertical num aumento de 400x (Figura 14B). Foram capturadas 10 mini-imagens nessa condição pré-estabelecida, sendo 5 superficiais (derme superficial) e 5 profundas (2 imagens da derme profunda e 3 imagens da área de tecido neoformado) no “*ROI*” pré-estabelecido anteriormente (Figura 15) (CARVALHO *et al.*, 2006). Todas as imagens de todos os grupos foram capturadas antes do

processo de quantificação para a padronização da intensidade da luz do microscópio e altura do condensador.

Figura 14 (A) Janela de abertura do *software* de aquisição de imagens Image Manager 50 da Leica®. **(B):** Lâmina histológica da pele do dorso do animal SHAM - 7 dias na região do implante, corada com Tricrômio de Gomori, focada no microscópio antes da captura. Pelo *software* foi feito *white balance* e foi definido o tamanho da área de interesse (“ROI” – quadrado vermelho) para serem adquiridas as 10 mini-imagens.

Figura 15: Corte histológico da pele do camundongo implantado com BLN por 2 dias (aumento 100x), mostrando o método utilizado: 10 mini-imagens no aumento de 400x, sendo 5 superficiais e 5 profundas, utilizadas para a contagem de células no *Cell Counter* do ImageJ®.

Foi utilizado o *Plugin "Cell Counter"* do *software* ImageJ® 1.36 para contagem de células do infiltrado inflamatório, fibroblastos e número de vasos sanguíneos em cada uma das 10 mini-imagens quantificadas individualmente. Foi utilizado apenas 3 tipos de contadores do *software*, excluindo os demais (Figuras 16A e 16B), os quais foram pré-definidos como sendo o tipo 1 para contagem do infiltrado inflamatório, o tipo 2 para contagem dos fibroblastos e o tipo 3 para contagem dos vasos sanguíneos. A diferenciação de cada célula era feita pelo observador na imagem da lâmina (aumento 400x). Quando o observador visualizava na imagem do corte histológico células do infiltrado inflamatório, por exemplo, programava-se para que o *software* pudesse contar apenas em tipo 1. O *software* realizava a contagem a cada clique do observador sobre cada célula visualizada. Ao clicar na célula, o tipo correspondente ficava escrito na região do clique, comprovando o tipo de contador com seu respectivo tipo celular correspondente. Quando visualizado algum fibroblasto, por exemplo, era programado para que o *software* contasse apenas em tipo 2, e assim por diante, podendo ir para tipo 3, ou mesmo voltar para tipo 1. Ao final da análise, o *software* apresentava a contagem total e simultânea dos 3 tipos (Figuras 16A e 16B).

Com esse método não há necessidade de realizar cada uma das 3 contagens independentes, ou seja, consegue-se contar quantos tipos for necessário de uma única vez.

Esse protocolo foi aplicado em 3 amostras diferentes ($n=3$) de cada tratamento e de cada tempo, sendo o resultado final a média do número de infiltrado inflamatório, fibroblastos e vasos encontrados. Essa média representa a quantidade destas células em cada uma nas 3 amostras estudadas.

Figura 16: Plugin "Cell Counter" do ImageJ®. (A): Ao iniciar a contagem, clica-se em *Initialize* e no tipo que se deseja contar. Abre-se a janela *Counter Window*. Nesta janela clica-se o tipo correspondente na célula correspondente. O software conta a quantidade de clique para cada tipo de célula, e marca o número do tipo onde foi clicado. Ao final da contagem, clicando em *Results*, tem-se o resultado total de cada um dos tipos pré-definidos. (B): Foto das lâminas com o tipo correspondente marcado em cima da célula no momento da contagem.

7.1.2 – Avaliação quantitativa por imagem da formação colagênica

As lâminas histológicas coradas com Tricrômio de Gomori foram visibilizadas no mesmo microscópio e foi utilizado o mesmo *software* para captura das imagens (Figura 14A).

Foi ajustado o “*white balance*” de cada imagem no próprio *software*. Foram capturadas 10 mini-imagens (área de interesse – “*ROI*”) de 320 *pixels* na horizontal por 40 *pixels* na vertical no aumento de 100x, sendo 5 superficiais (derme superficial) e 5 profundas (derme profunda e tecido neoformado), sempre capturadas no sentido epiderme-derme, conforme modificado de (CARVALHO *et al.*, 2006) (Figuras 17A e 17B).

Para a análise da área de colágeno foi utilizado o *software* ImageJ® 1.36, onde foram quantificadas 10 mini-imagens individualmente. Da área total de cada mini-imagem, foi quantificada (em porcentagem) apenas a coloração azul (representada pelo colágeno nas colorações de Tricrômio de Gomori) (Figuras 17C e 17D). Este protocolo foi seguido em 3 amostras diferentes (n=3) de cada tratamento e de cada tempo, sendo o resultado final a média das 3 médias determinadas pela medição de cada uma das 10 mini-imagens.

Como neste protocolo trabalhou-se com área (da coloração azul), e a área dada pelo *software* é em *pixels*, tornou-se necessário a transformação de *pixels* em micrômetros (μm) através do ImageJ®. Capturou-se uma lâmina milimetrada (régua) na mesma condição em que foram capturadas as lâminas histológicas, com o mesmo aumento e tamanho de “*ROI*”. Foi traçado na régua um intervalo conhecido de 1 μm . O ImageJ® transformou o tamanho do traçado de *pixels* em μm , sendo que foi pré-estabelecido que o tamanho conhecido do intervalo era de 1 μm . Dessa

forma, todas as mini-imagens com dimensão pré-ajustada no *software* da LEICA® em 320x40 *pixels*, representam uma imagem de 2,64x0,33µm (Figura 17E).

Foi utilizado o *Plugin "Threshold color"* do ImageJ® para separar os tons de azul dos demais tons da imagem e posterior quantificação (em porcentagem da área). Através das barras de rolagem na tela do *Threshold* do ImageJ®, foram retirados os demais tons, restando apenas os tons de azul. A banda da cor foi ajustada por um limite de erro, a partir das áreas representativas de colágeno separadas na imagem (Figura 17D). Separados os tons de azul, a imagem transforma-se em preto (ajustada em 8 bis), onde foi quantificada apenas as áreas em preto (Figura 17C). As áreas brancas representam o que foi descartado (sem coloração azul) (Figuras 17C e 17D).

Figura 17: (A): Corte histológico da pele do camundongo SHAM - 7dias corada pelo Tricrômio de Gomori, capturada pelo *software* no aumento de 100x e "ROI" pré-definido; (B): 10 Mini-imagens capturadas ("ROI"): as 5 superiores correspondem à derme superior e as 5 inferiores correspondem a derme inferior; notar a diferença quanto ao tom de azul; (C): respectivas imagens em 8 bits (preto) após utilização do "Threshold" pelo *software* ImageJ®; (D): janela do Threshold do ImageJ®, permanecendo apenas os tons de azul; (E): traçado conhecido em *pixel* é convertido em μm , sabendo que o traçado corresponde a 1 μm .

8 – Dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO)

A intensidade do acúmulo de neutrófilos na pele do dorso dos animais foi aferida pelo ensaio da mieloperoxidase (SOUZA *et al.*, 2001) em 5 animais de cada tratamento e de cada tempo (n=5), seguindo o protocolo realizado no Laboratório de Dor e Inflamação do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP.

Para tanto, as biópsias foram acondicionadas em *ependorfs* com 200µL de tampão NaCl 0,1M, NaPO₄ 0,02M, NaEDTA 0,015M (tampão 1) gelado, em pH 4,7 e permaneceram no freezer -70°C até a dosagem. Os fragmentos foram homogeneizados em POLITRON® PT 3100 a 13000rpm. O homogeinato foi em seguida centrifugado em 3000rpm por 15 minutos a 4°C. Foi realizado então um choque hipotônico no *pellet* de células com 600µL de NaCl 0,2%, seguido de 600µL de uma solução de NaCl 1,6% e glicose 5%. Depois de uma nova centrifugação à 3000rpm por 15 minutos a 4°C, o *pellet* foi ressuspensão em tampão NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (tampão 2) e novamente homogeneizado. A seguir, esse homogeneizado foi congelado em nitrogênio líquido e descongelado por três vezes e centrifugado à 20000rpm por 15 minutos à 4°C. Após centrifugação, 5µL do sobrenadante das amostras foram colocadas em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço foram adicionadas 25µL de TMB (“3, 3’, 3, 3’ - tetramethylbenzidine” – 1,6 mM final na placa) e a placa foi incubada por 5 minutos à 37° C. Logo após, 100µL de H₂O₂ (0,5M final na placa) foram adicionados nos poços e a placa foi incubada por mais 5 minutos à 37° C. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4M. A quantificação dos neutrófilos foi feita a partir de uma curva padrão de neutrófilos obtidos na cavidade peritoneal 6 horas após camundongos serem injetados com carragenina e diluídos seriadamente em NaPO₄ 0,08M (1 x 10⁵ neutrófilos/poço por 50 µL). Foi

determinado a absorbância em leitor de ELISA (SPECTRA MAX 250; MOLECULAR DEVICES) no comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos em número de neutrófilos $\times 10^3$ /mg de tecido.

9 – Dosagem *in situ* pelo método imunoenzimático (ELISA)

As biópsias coletadas do dorso de 5 animais de cada tratamento e de cada tempo (n=5) foram acondicionadas em *eppendorf's* com 300 μ L de tampão inibidor de proteases para ELISA e permaneceram no freezer -70°C até a dosagem. Estas foram homogeneizadas pelo aparelho POLITRON® PT 3100 à 13000rpm. Utilizou-se o sobrenadante do macerado das amostras para as dosagens de IL-1 β e TGF- β 1, seguindo o protocolo realizado no Laboratório de Dor e Inflamação do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP para dosagem do TGF- β 1 e no Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia de Proteínas do Departamento de Biologia Celular e Molecular da FMRP-USP para dosagem da IL-1 β .

Placas de 96 poços (NUNC MAXISORP) foram cobertas com 50 μ L/poço do anticorpo específico anti-TGF- β 1 (2 μ g/mL) (BD OptEIA™ kit da BD Bioscience Pharmingen - San Diego, CA – US - Cat. Nº 559119) e anti-IL-1 β (*Murine IL-1 β Elisa kit da PeproTech Mexico - Colonia Nápoles, CP – México, DF – Cat. Nº 900-K47*). Estes anticorpos foram diluídos em solução de ligação *binding bufffer* pH 9,0 e incubados por 18-24 horas, a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS/Tween-20 (0,05% SIGMA). As ligações não específicas foram bloqueadas com 150 μ L de PBS/BSA 1% por 120 minutos a temperatura ambiente. Na dosagem de TGF- β 1 as amostras foram acidificadas antes de serem adicionadas na placa. Adicionou-se em cada amostra 1N de HCL a 1:25 (100 μ l da amostra + 4 μ l de 1N

HCL) e incubou-se 60 minutos a 4°C. Em seguida, neutralizou-se com 1N NaOH a 1:25 e imediatamente pipetou-se as amostras na placa.

As amostras e o padrão (curva padrão) de TGF- β 1 e IL-1 β (2000pg/mL) foram adicionados nas placas (50 μ L/poço) e incubados por 18-24 horas a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween e foram adicionados 50 μ L dos anticorpos biotinilados específicos para TGF- β 1 (1:250) e IL-1 β (0,5 μ g/mL). Após uma hora, as placas foram lavadas com PBS/Tween, o conjugado avidina-peroxidase (1:5000 para TGF- β 1, e 1:2000 para IL-1 β) foi adicionado a cada poço e as placas incubadas por mais 30 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS/Tween e foi adicionado 50 μ L do substrato OPD (o-fenilenediamina-dihidrocloreto; SIGMA) em tampão substrato (pH 5,0) para dosagem de TGF- β 1 e TMB (Tetrametilbenzidina - SIGMA) para IL-1 β . As placas foram incubadas por 15 a 20min a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 μ L de H₂SO₄ (1M) e a densidade óptica medida a 490nm em espectrofotômetro (SPECRA MAX-250, MOLECULAR DEVICES) para TGF- β 1 e 450nm para IL-1 β . As concentrações de citocinas contidas na amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão com 11 pontos, obtida por diluição seriada, sendo as concentrações iniciais em cada curva as seguintes: 2000pg/mL para TGF- β 1 e 4000pg/mL para IL-1 β . Os resultados estão expressos em picogramas de citocina/mL de sobrenadante/mg de tecido.

10 – Estudo Imunohistoquímico

Inicialmente as biópsias foram acondicionadas em Tissue Tek® e congeladas à -70°C. Posteriormente as mesmas foram descongeladas e fixadas em solução de formaldeído a 10% tamponado e parafinizadas, conforme protocolo estabelecido no Laboratório de Dermatologia do HCFMRP-USP. Os cortes foram de 4µm em lâminas silanizadas (*3-aminopropyltriethoxy silane* - SIGMA A3648) e foi utilizado o método ABC para detecção da peroxidase.

As lâminas foram desparafinizadas com xilol I e em seguida xilol II por 20 min, passadas em álcool 100%, 95% e 80%. Os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em panela de pressão com Tampão Citrato pH 6.0 por 5min. Após lavagem com PBS 0,01M foi feito o bloqueio de peroxidase endógena com água oxigenada 3% em PBS, e bloqueio do sítio inespecífico com PBSA 1%. Foi incubado *overnight* à 4°C na concentração de 1:100 o anticorpo primário anti-IL-1β (H-153): sc-7884 *rabbit IgG anti-mouse, rat, human* (Santa Cruz Biotechnology), 1:200 de anti-NOS₂ (N-20): sc-651 *rabbit IgG anti-mouse, rat, human* (Santa Cruz Biotechnology), 1:100 de anti-VEGF (A-20): sc-152 *rabbit IgG anti-mouse, rat, human* (Santa Cruz Biotechnology), e 1:500 de anti-TGF-β1 (V): sc-146 *rabbit IgG anti-mouse, rat, human* (Santa Cruz Biotechnology). Depois de nova lavagem de PBS por 3 vezes foi incubado 1:200 de anticorpo secundário *Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L) made in goat* BA-1000 VECTOR por 30 minutos. Todos anticorpos foram diluídos em PBSA 1%. Os reagentes A e B foram incubados por 20min à 4°C e, em seguida, 50µL desta solução foi aplicada sobre os cortes permanecendo por 30min. Após as lavagens, foi aplicado o DAB (*3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride* SIGMA D5905) por 5 min. As lâminas foram colocadas na cuba e passadas em água destilada, 1 vez em água corrente, novamente em água destilada e coradas com Hematoxilina de Mayer por

2min. Depois as lâminas foram lavadas 5min para intensificar a hematoxilina. As lâminas foram desidratadas em álcool 80%, 95% I, 95% II, 95% III, 100%, álcool + xilol, xilol I e xilol II e montadas com Entelan[®].

11 – Análise dos resultados

Quanto às variáveis, número de infiltrado inflamatório, número de fibroblastos e porcentagem da área de colágeno foi proposto um modelo linear de efeitos mistos (MCLEAN *et al.*, 1991). Os modelos lineares de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos) são utilizados na análise de dados onde as respostas de um mesmo animal estão agrupadas e a suposição de independência entre observações num mesmo grupo não é adequada. Esses modelos têm pressuposto que seus resíduos tenham distribuição normal com média 0 e variância σ^2 . As respostas foram agrupadas por animal, dado que se têm várias informações obtidas para cada um deles (réplicas), sendo utilizada no modelo na forma de efeitos aleatórios. Já os efeitos fixos foram os tratamentos (BLN, LUVA, ePTFE e SHAM) e os períodos (2, 7 e 14 dias). O ajuste do modelo foi feito através do procedimento *PROC MIXED* do *software* SAS 9.0 (LITTELL *et al.*, 1996) pela aluna de pós-graduação Adriana de Fátima Lourencon do CEMEQ (Centro de Métodos Quantitativos da FAEPA) sob orientação do Prof. Edson Martinez. Após a construção do modelo, foi realizada a análise de resíduos para checar as suposições do modelo, sendo a transformação logarítmica ($\ln(\text{resposta}+1)$) considerada adequada para atender essa exigência em alguns casos.

Quanto à análise do número de vasos sangüíneos foi aplicado o teste estatístico de análise de variância para múltiplas comparações de amostras não

paramétricas (*One-Way* ANOVA e Teste de Bonferroni). Devido ao grande número de zeros nas observações (ocorrências nulas), foi feito também um modelo de Regressão Logística (HOSMER; LEMESHOW, 1989) pela aluna Adriana Lourencon do CEMEQ, considerando como variável resposta a proporção de vasos sangüíneos presentes em cada subgrupo e como variáveis independentes o grupo ao qual o animal pertencia e o período de intervenção. Índícios de *overdispersion* no conjunto de dados foram observados, ou seja, quando a variabilidade do conjunto de dados é superior àquela assumida pelo modelo construído, sendo então proposto um fator de correção a partir da função desvio (*deviance*).

Quando às variáveis dosagem de MPO, dosagem por ELISA de IL-1 β e TGF- β foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) com dois fatores (*Two-Way*). O ajuste do modelo foi feito através do procedimento PROC GLM do *software* SAS 9.0 pela aluna de pós-graduação Adriana de Fátima Lourencon do CEMEQ.

O programa utilizado para realização de tabelas e fórmulas foi o Microsoft Excel[®] 2003. Os gráficos foram feitos no *software* GraphPad Prism 3.0. 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

1 – Avaliação Macroscópica

Na avaliação macroscópica foi feita análise qualitativa dos cortes cutâneos excisionais das áreas submetidas à cirurgia e implante no dorso dos camundongos de cada grupo e tempo. A análise foi quanto à quantidade e aspecto do tecido subcutâneo neoformado em cada tempo e tratamento.

Observou-se que no 2º dia houve intensa quantidade de tecido subcutâneo neoformado, evidente nos grupos submetidos aos implantes, sendo maior no grupo de animais implantados com BLN, seguido consecutivamente dos grupos LUVA e ePTFE.

No 7º dia de seguimento observou-se diminuição da quantidade do tecido neoformado estimulado pelos implantes em relação ao 2º dia, em todos os grupos de estudo, entretanto, as diferenças entre os grupos se mantiveram conforme o observado no 2º dia (Figura 18).

No 14º dia, os cortes excisionais dos camundongos do grupo BLN e LUVA apresentaram diminuição do tecido neoformado quando comparados aos do 7º dia, enquanto no grupo ePTFE o mesmo se manteve estável, semelhante ao observado no grupo SHAM.

Entretanto, na avaliação entre os grupos foi observado que o grupo BLN apresentou maior quantidade de tecido neoformado seguido consecutivamente dos grupos LUVA, SHAM, e ePTFE (Figura 18). Também em relação ao grupo BLN, foi visto maior redução da quantidade de tecido neoformado, seguido dos grupos LUVA, SHAM e ePTFE.

Figura 18: Estudo macroscópico dos cortes cirúrgicos cutâneos dos grupos nos respectivos dias de sacrifício dos camundongos.

2 – Avaliação histológica

2.1 – Coloração com Hematoxilina e Eosina

Essa coloração foi para análise da celularidade pelo ImageJ[®] quanto ao infiltrado inflamatório, fibroplasia e angiogênese.

2.1.1 – Infiltrado inflamatório

Na análise histológica constatou-se que a BLN no 2º dia de seguimento apresentou denso infiltrado basicamente neutrofílico, ocupando até camadas mais profundas da pele (Figura 19 e 20). Isto não foi observado com tamanha intensidade nos demais tratamentos. Os animais implantados com a LUVA apresentaram maior infiltrado inflamatório que os implantados com o ePTFE, e todos os implantados apresentaram maior infiltrado que o grupo SHAM.

Na representação gráfica da média das células contadas pelo *Plugin “Cell counter”* do ImageJ[®], observou-se no 2º dia de seguimento que a BLN estimulou o recrutamento células inflamatórias para o local, superior estatisticamente ao ePTFE e ao SHAM ($P<0.01$), e o grupo LUVA foi superior ao SHAM ($P<0,01$). Não houve diferença estatística entre BLN e LUVA, nem entre ePTFE e SHAM.

No 7º dia de seguimento, o ePTFE apresentou quantidade de células inflamatórias estatisticamente menor que a BLN, LUVA e SHAM ($P<0,01$).

Com 14 dias, o grupo BLN apresentou maior número de células inflamatórias em relação ao grupo LUVA ($P<0,02$) e ao grupo ePTFE ($P<0,01$). O grupo SHAM foi maior que o ePTFE ($P<0,01$) e a LUVA ($P<0,05$) (Figuras 19 e 20).

Figura 19: Alterações histológicas (HE) da pele e tecido celular subcutâneo do dorso de camundongos implantados com BLN (A), LUVA (B), ePTFE (C) e SHAM (D) no 2º dia de seguimento, mostrando o infiltrado inflamatório [Barra 0,5 μm (100x); 0,2 μm (400x)].

Figura 20: Infiltrado inflamatório nas amostras de pele do dorso dos camundongos implantados com BLN, LUVA, ePTFE e SHAM nos 2º, 7º e 14º dias de seguimento analisado pelo Plugin "Cell Counter" do ImageJ®.

2.1.2 – Angiogênese

Na análise histológica constatou-se que a BLN apresentou inúmeros vasos sanguíneos neoformados já no 7º dia de seguimento, diferente dos demais tratamentos e do SHAM. No grupo LUVA foi observado neoformação vascular maior que no grupo ePTFE e no SHAM, porém menor que a observada no grupo BLN.

Com 14 dias de seguimento, a formação de vasos sanguíneos no grupo BLN pareceu manter-se estável. Os grupos LUVA, ePTFE e SHAM apresentaram diminuição na formação vascular (Figura 21).

Na análise estatística por *One-Way* ANOVA e Teste de Bonferroni constatou-se que o número de vasos observados foram maiores apenas com 14 dias nos grupos BLN ($P<0,01$) e LUVA ($P<0,05$) em relação do SHAM.

Já na análise estatística por Regressão Logística, com 7 dias de seguimento os grupos BLN ($P<0,02$) e LUVA ($P<0,01$) apresentaram presença de vasos sanguíneos superior ao SHAM, e com 14 dias a presença de vasos sanguíneos no grupo BLN foi maior que no grupo ePTFE ($P<0,03$) e SHAM ($P<0,01$). O grupo LUVA também teve presença superior que ePTFE ($P<0,03$) e SHAM ($P<0,01$).

Figura 21: Alterações histológicas da pele e tecido celular subcutâneo do dorso de camundongos implantados com BLN (A / E), LUVA (B / F), ePTFE (C / G) e SHAM (D / H) nos 7º e 14º dias de seguimento respectivamente, mostrando os vasos neoformados [Barra 0,5 μm (100x); 0,2 μm (400x)].

2.1.3 – Fibroplasia

Na análise histológica constatou-se que a BLN no 7º dia apresentou número de fibroblastos jovens praticamente igual ao de células inflamatórias, o que foi diferente da LUVA e SHAM, que ainda apresentavam mais células inflamatórias do que fibroblastos jovens. Já o ePTFE apresentou maior número de fibroblastos jovens do que células inflamatórias. Além disso, este grupo apresentou quantidade de fibroblastos superior à encontrada nos animais do grupo BLN (Figura 23).

Com 14 dias, a quantidade de fibroblastos nos grupos ePTFE e BLN foi maior que a de células inflamatórias, diferente da LUVA e SHAM, onde começavam a aparecer fibroblastos jovens (Figura 23). Ademais, foi observado muito mais fibroblastos nos cortes histológicos onde foi implantado o ePTFE do que nos que foi implantada a BLN por 14 dias.

Na representação gráfica da média do número de fibroblastos contados pelo ImageJ®, observou-se no 2º dia maior quantidade de fibroblastos no grupo SHAM superior a LUVA ($P<0,05$). No 7º dia o grupo ePTFE apresentou grande quantidade de fibroblastos, superior aos grupos BLN, LUVA e SHAM ($P<0,01$). O grupo SHAM foi menor estatisticamente que a BLN e LUVA ($P<0,01$). Não houve diferença estatística entre BLN e LUVA neste tempo de seguimento. Com 14 dias a BLN apresentou maior quantidade de fibroblastos que ePTFE ($P<0,01$) e SHAM ($P<0,04$) (Figura 24).

Figura 23: Alterações histológicas da pele e tecido celular subcutâneo do dorso de camundongos implantados com BLN (A / E), LUVA (B / F), ePTFE (C / G) e SHAM (D / H) nos 7º e 14º dias de seguimento respectivamente, evidenciando a fibroplasia [Barra 0,5 μm (100x); 0,2 μm (400x)].

Figura 24: Fibroplasia nas amostras de pele do dorso dos camundongos implantados com BLN, LUVA, ePTFE e SHAM nos 2º, 7º e 14º dias de seguimento analisado pelo *Plugin "Cell Counter"* do ImageJ®.

2.2 – Coloração com Tricrômio de Gomori

Foi feita avaliação quantitativa por imagem da colagênese através do *Threshold* do *software* ImageJ[®] nas lâminas coradas com Tricrômio de Gomori, onde obteve-se a porcentagem de colágeno em 10 mini-imagens com área de 2,64 x 0,33µm, em cada uma das 3 lâminas de cada grupo experimental e de cada tempo seguimento.

A densidade da coloração azul nos animais implantados apresentou-se menor que a encontrada nos animais do grupo SHAM. (Figura 25).

Na representação gráfica da média da porcentagem de colágeno das 10 mini-imagens de área fixa (2,64 x 0,33µm de área) feitas pelo ImageJ[®], foi constatado que no 14º dia o grupo ePTFE apresentou maior porcentagem de colágeno, superior aos grupos BLN e LUVA ($P < 0,01$). O grupo SHAM também foi maior estatisticamente, com $P < 0,03$ em relação ao grupo BLN e $P < 0,02$ em relação à LUVA (Figura 26). Com 2 e 7 dias de seguimento, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

Figura 25: Alterações histológicas da pele e tecido celular subcutâneo de camundongos com implante de BLN (A), LUVA (B), ePTFE (C) e SHAM (D) no 14º dia de seguimento. Coloração por Tricrômio de Gomori [Barra 0,5 μm (100x); 0,2 μm (400x)].

Figura 26: Densidade de área de colágeno na pele e tecido celular subcutâneo de camundongos com implantes de BLN, LUVA, ePTFE e SHAM nos 2º, 7º e 14º dias de seguimento analisados pelo *Threshold* do ImageJ®.

3 – Dosagem de Mieloperoxidase

A avaliação da atividade neutrofílica nas amostras de pele foi determinada através da dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO) no macerado dessas amostras.

No segundo dia o grupo BLN apresentou maior quantidade de MPO diferente estatisticamente em relação à LUVA, ePTFE e SHAM ($P<0,01$) (Figura 27).

No 7º dia, todos grupos implantados apresentaram maior quantidade de MPO que o SHAM ($P<0,01$).

Com 14 dias tanto a BLN quanto a LUVA apresentaram maior produção de MPO que o ePTFE ($P<0,01$) e SHAM ($P<0,02$) (Figura 27). Não houve diferença entre BLN e LUVA.

Figura 27: Dosagem de Mieloperoxidase do macerado de amostras de pele do dorso dos camundongos implantados com BLN, LUVA, ePTFE e SHAM nos 2º, 7º e 14º dias de seguimento.

4 – ELISA

4.1 – Quantificação da citocina IL-1 β

Para quantificação de IL-1 β foi utilizado o método ELISA e o sobrenadante da amostra macerada, coletada da pele do dorso dos camundongos implantados e não implantado.

Com 2 dias o grupo BLN apresentou maior quantidade de IL-1 β que no grupo LUVA ($P<0,03$), ePTFE, SHAM ($P<0,01$).

Com 7 dias, a quantidade de IL-1 β no grupo SHAM foi maior que no grupo BLN e ePTFE ($P<0,01$). O grupo LUVA foi estatisticamente maior que o grupo ePTFE ($P<0,02$) (Figura 28).

Com 14 dias de seguimento, não houve diferença estatística da quantidade de IL-1 β , apesar de os grupos BLN e ePTFE terem apresentado baixa quantidade desta citocina.

Figura 28: Dosagem de IL-1 β por ELISA através do macerado de amostras de pele do dorso dos camundongos implantados com BLN, LUVA, ePTFE e SHAM nos 2º, 7º e 14º dias de seguimento.

4.2 – Quantificação do fator de crescimento TGF- β 1

O TGF- β 1 foi quantificado por ELISA através do macerado da amostra coletada da pele do dorso dos camundongos implantados e não implantado.

Em 2 dias de permanência com os implantes, houve diferença estatisticamente significativa da quantidade de TGF- β 1 somente entre BLN e SHAM ($P<0,05$).

No entanto, com 7 dias, os animais implantados tiveram menos TGF- β 1 que o SHAM, apresentando diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos BLN, LUVA e ePTFE ($P<0,01$).

Já no 14º dia de seguimento, a menor quantidade de TGF- β 1 foi encontrada em amostras com implante de ePTFE, com diferença estatisticamente significativa em relação à BLN, LUVA e SHAM ($p<0,01$) (Figura 29).

Figura 29: Dosagem de TGF- β 1 por ELISA através do macerado de amostras de pele do dorso dos camundongos implantados com BLN, LUVA, ePTFE e SHAM nos 2º, 7º e 14º dias de seguimento.

A análise da participação da MPO, IL-1 β e TGF- β durante o seguimento pode ser visibilizada 31 pelas curvas de seguimento mostradas nas Figuras 30, 31 e 32 respectivamente.

Figura 30: MPO durante os tempos de seguimento (2, 7, 14 dias).

Figura 31: IL-1 β durante os tempos de seguimento (2, 7, 14 dias).

Figura 32: TGF- β durante os tempos de seguimento (2, 7, 14 dias).

5 – Estudo Imunohistoquímico

Na avaliação qualitativa da Imunohistoquímica, observou-se no 2º dia de seguimento que a BLN estimulou produção de IL-1 β intracelular superior à LUVA e ao ePTFE, porém semelhante ao SHAM (Figura 33 – linha superior). Quanto a imunomarcção para iNOS, tanto a BLN quanto o ePTFE apresentaram baixa expressão, diferente do observado no grupo LUVA que foi semelhante ao SHAM (Figura 33 – linha inferior).

No 7º dia, o ePTFE apresentou alta marcação da IL-1 β distribuída intracelularmente no tecido de granulação e na derme, marcação menor que a observada nas lâminas dos grupos BLN, LUVA e SHAM. Considerando a granulação, o grupo BLN teve maior marcação que os grupos LUVA e SHAM (Figura 34 – linha superior). Quanto a iNOS os grupos LUVA e ePTFE apresentaram-se mais imunomarcados em relação à BLN e ao SHAM (Figura 34 – linha inferior).

Em relação ao VEGF no 7º dia, todos os grupos apresentaram importante marcação a qual se manteve nos grupos BLN, ePTFE e SHAM, enquanto diminuiu no grupo LUVA no 14º dia (Figuras 35 e 36 – linhas superiores).

Quanto ao TGF- β 1, o grupo BLN apresentou maior marcação no 7º dia em relação aos outros grupos (Figura 35 – linha inferior), enquanto no 14º dia, esta marcação apresentou decréscimo importante (Figura 36 – linha inferior), contrapondo aos grupos ePTFE e SHAM que apresentaram maior expressão de TGF- β 1 neste dia (Figuras 35 e 36 – linhas inferiores).

Figura 33: Marcação Imunohistoquímica do segundo dia de implante para IL-1 β (linha superior) e para iNOS (linha inferior) dos grupos BLN (A / E), LUVA (B / F), ePTFE (C / G) e SHAM (D / H) [detalhe: controle negativo] [0,2 μ m (400x)].

Figura 34: Marcação Imunohistoquímica do sétimo dia de implante para IL-1 β (linha superior) e para iNOS (linha inferior) dos grupos BLN (A / E), LUVA (B / F), ePTFE (C / G) e SHAM (D / H) [detalhe: controle negativo] [0,2 μ m (400x)].

Figura 35: Marcação Imunohistoquímica do sétimo dia de implante para VEGF (linha superior) e para TGF- β 1 (linha inferior) dos grupos BLN (A / E), LUVA (B / F), ePTFE (C / G) e SHAM (D / H) [detalhe: controle negativo] [0,2 μ m (400x)].

Figura 36: Marcação Imunohistoquímica do décimo quarto dia de implante para VEGF (linha superior) e para TGF- β 1 (linha inferior) dos grupos BLN (A / E), LUVA (B / F), ePTFE (C / G) e SHAM (D / H) [detalhe: controle negativo] [0,2 μ m (400x)].

Discussão

O modelo empregado para aplicação de implantes subcutâneos mostrou-se apropriado para avaliação da capacidade dos mesmos de induzir a neoformação tecidual nos seus aspectos imunohistológicos. Kyriakides *et al.*, (2001) relatam que esse método de implantação subcutânea é preferido quando é desnecessária a influência de fatores adicionais, como por exemplo microorganismos em modelos de úlcera aberta, que de alguma forma modificariam o processo cicatricial. Dessa forma, optou-se por utilizar o método de implantação subcutânea (modelo de úlcera fechada) para estudar a indução de neoformação tecidual estimulada pela BLN com o mínimo de interferências externas.

Frade, (2003) estudou a BLN em úlceras venosas constatando sua importante atividade desbridante na fase inflamatória e indutora da formação do tecido de granulação. Frade *et al.*, (2004) utilizou a BLN em úlceras diabéticas, no entanto, nesse tipo de úlcera a BLN pareceu estimular também a reepitelização, concluindo que a etiologia da úlcera e patologias associadas à mesma constituem fatores que influenciam no comportamento da BLN na cicatrização, diferenças estas que aumentam a relevância da realização de estudos sobre o real mecanismo de ação da BLN.

A biomembrana de látex da seringueira *Hevea brasiliensis* induziu maior formação tecidual macroscópica quando implantada no subcutâneo dos camundongos, comparada com os que receberam implante de LUVA, ePTFE e SHAM.

Cerca de 3 horas após o experimento de implantação, apenas os animais implantados com a BLN apresentaram exsudação através da excisão feita no dorso, fato não apresentado em nenhum outro tratamento. Essa intensa exsudação causada pela BLN foi observada por Frade, (2003) a qual desempenhou um papel

importante na não adesão da BLN no leito da úlcera, o que facilitou as trocas sem agressão ao tecido de cicatrização, além de atenuar a dor. Maurício, (2006) verificou pelo Teste de Miles que a fração 1 do látex foi mais ativa no aumento da permeabilidade vascular em relação as outras duas frações. Sendo assim, a exsudação causada pela BLN (aumento de permeabilidade) parece ser relevante em sua ação na fase inflamatória, recrutando leucócitos para o local da lesão, importante no desbridamento, verificado nos diferentes modelos estudados.

Após a aplicação dos implantes subcutâneos, pôde-se avaliar o processo cicatricial dos sítios cirúrgicos nas fases inflamatória e de formação tecidual (fibroplasia e angiogênese).

No 2º dia de seguimento, importante para avaliação da fase inflamatória da cicatrização, os leucócitos são recrutados até o local da lesão para o desbridamento local, fagocitose de bactérias e tecidos necróticos, destacando principalmente a produção de enzimas indicadoras de inflamação (iNOS e MPO) e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β dentre outras (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

No estudo, à análise de 2 dias, a BLN participou ativamente da fase inflamatória como demonstrado pelo número médio das células inflamatórias significativamente maior que nos demais grupos, principalmente às custas do intenso número de neutrófilos, ocupando até camadas mais profundas da pele (Figura 19). Nos demais tratamentos não foi observado recrutamento de leucócitos tão intenso como nos animais implantados com BLN.

Esse resultado foi corroborado pelos achados semelhantes em relação à dosagem de MPO, o que indica participação e atividade neutrofílica, e também, pela

dosagem de IL-1 β pelo método de ELISA feito a partir do sobrenadante do macerado do tecido.

Por ser a menor célula do sistema imune, os neutrófilos são de grande importância para o início da fase inflamatória, chegando rapidamente ao foco infeccioso e realizando o desbridamento do local, principalmente às custas de radicais do oxigênio (H₂O₂ – água oxigenada) e nitrogênio (NO – óxido nítrico) e também enzimas azurofílicas (MPO – mieloperoxidase) (SWAIN *et al.*, 2002; ABBAS; LICHTMAN, 2003; KUMAR *et al.*, 2005). Tais achados reafirmam a propriedade desbridante da BLN no tratamento de úlceras cutâneas crônicas, observada clinicamente por (FRADE *et al.*, 2001b; 2003; 2004).

No grupo LUVA não foi observado atividade neutrofílica semelhante à apresentada pela BLN, confirmando a importância da atividade da(s) proteína(s) nativa(s) do látex no processo cicatricial como descrito por Mrué, (1996). Achados semelhantes foram observados por Mendonça, (2004) quando tratou o látex com proteinase K ou submetendo-o ao aquecimento maior que 60°C, ambos evidenciando a importância da conformação nativa das proteínas do látex para sua atividade no processo cicatricial.

Chester, (1987); Williams, (1987) relataram que o material biocompatível ideal, utilizado como indutor da cicatrização de feridas deveria ser bioativo, induzindo o estímulo a todas as fases da cicatrização e cessando sua atividade após o término do processo. Em relação à BLN, tal comportamento foi observado, tanto pela grande estimulação de IL-1 β no 2º dia, pela dosagem de MPO quanto pela contagem de células inflamatórias, seguida da diminuição da resposta após esse período, podendo indicar sua bioatividade (autocontrole). Esse comportamento foi didaticamente demonstrado nas Figuras 30 e 31, cujos gráficos de linhas mostraram

perfil de MPO e IL-1 β respectivamente durante o seguimento, comprovando também a biocompatibilidade da BLN.

Devido a BLN estimular fortemente o recrutamento neutrofílico para o local da lesão, pode-se sugerir que a grande quantidade de IL-1 β detectada no 2º dia de seguimento neste grupo, possa advir principalmente da população neutrofílica. Esses achados foram confirmados pela imunohistoquímica para IL-1 β no 2º dia com diminuição da marcação no 7º dia. O aumento desta citocina no 7º dia de seguimento no grupo LUVA poderia indicar baixa biocompatibilidade, entretanto, a grande quantidade desta citocina no grupo SHAM neste período, parece não confirmar tais achados. Quanto ao iNOS, a LUVA e o ePTFE apresentaram aumento de sua expressão imunohistoquímica no 7º dia, enquanto a BLN pareceu não influenciar na expressão da mesma tanto no 2º quanto no 7º dia de avaliação.

O estímulo da produção desta citocina pelo ePTFE foi baixo e, além disso, tornou-se menor durante o seguimento. Lu *et al.*, (2004) trabalhou com o Gore-Tex® (ePTFE) suturado na região dorsal de ratos, e também o PDCM (*Porcine Dermal Collagen Membranes*). Depois de 7, 10 e 14 dias foram coletadas amostras para imunohistoquímica de IL-2 e IFN- γ , a fim de analisar se o padrão de resposta induzido pelos implantes é Th-1, e também IL-4, IL-10 e IL-13 para análise do padrão de resposta ser Th-2. O resultado mostrou que ambos os implantes tiveram níveis similares da expressão das citocinas da resposta Th1 nos 3 períodos de seguimento do estudo (7, 10 e 14 dias), diferente do ePTFE que induziu fortemente a resposta Th-2.

Foi observado que o estímulo do ePTFE à inflamação foi significativamente inferior à BLN no segundo dia e semelhante no sétimo dia.

No sétimo dia cabe ressaltar que a BLN se portou semelhante à cicatrização normal (SHAM) na análise do infiltrado inflamatório, entretanto, todos os grupos de implantes mostraram produção estatisticamente maior de MPO em relação ao SHAM, caracterizando a participação e/ou estimulação neutrofílica duradoura pelos implantes. Na análise da citocina IL-1 β foi observada menor produção pelos grupos BLN e ePTFE quando comparados ao SHAM, sendo a produção deste semelhante à LUVA.

No 14º dia, o infiltrado inflamatório se mostrou quase ausente em todos os grupos, enquanto a atividade neutrofílica (MPO) da BLN e LUVA foram maiores que os grupos implantados com ePTFE e SHAM. Entretanto, a dosagem de IL-1 β nos grupos BLN e ePTFE foi semelhante com baixa produção da citocina quando comparada à LUVA e também ao SHAM.

A importância da angiogênese está relacionada com a implementação de nutrientes e oxigênio para o local (BATES; JONES, 2003). Foi observado que os implantes com BLN e LUVA estimularam a neoformação de vasos evidentes já no sétimo dia de seguimento, superior ao SHAM. Resultados estes semelhantes aos observados no 14º dia de seguimento, sendo também superior ao ePTFE. Os resultados do látex confirmam esta estimulação angiogênica da BLN, conforme demonstrado por Mendonça, (2004) e Maurício, (2006). Quanto ao implante ePTFE não houve diferença estatística em relação ao SHAM nesses dias de avaliação. Esse mesmo resultado foi observado por Kidd *et al.*, (2002). No estudo imunohistoquímico foi observado que apenas o grupo LUVA apresentou diminuição da expressão do VEGF do 7º para o 14º dia, sendo sua distribuição difusa na matriz extracelular, não limitada às células endoteliais, enquanto, nos outros grupos a expressão foi similar entre os dias e com marcação intracelular. O aumento na

presença de vasos nos grupos BLN e LUVA no 7º e 14º dias e a não modificação na expressão do VEGF nesses grupos e tempos, sugerem que a angiogênese possa estar relacionada à intensa atividade dos macrófagos descritas previamente. Sisco *et al.*, (2007) relatam que a formação do tecido de granulação é particularmente dependente a função macrofágica que desempenha um papel de orquestrador da migração e proliferação fibroblástica, deposição de matriz e angiogênese, o que corrobora com a hipótese descrita acima, e também com a hipótese de Maurício, (2006) que comprovou que a ação angiogênica da fração 1 do látex não se dá diretamente sobre o estímulo proliferativo das células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVEC) e sim por fatores de crescimento indiretos estimulados por macrófagos/monócitos.

Na avaliação da fibroplasia o implante ePTFE mostrou-se estimulador do fibroblasto no 7º dia diferente estatisticamente da BLN, LUVA e SHAM.

Apesar da estimulação fibroblástica superior do ePTFE ao 7º dia, esta não se reflete na produção de TGF- β 1 a qual foi superior no grupo SHAM em relação a todos implantados, podendo-se inferir que tal produção parece ter origem macrofágica.

Quanto à produção colagênica, analisada pelo ImageJ®, destaca-se que os implantes não estimularam diferenças na produção durante o 2º e 7º dias de seguimento. Apenas os grupos ePTFE e SHAM aumentaram a produção colagênica em relação à LUVA e à BLN no 14º dia, apesar de apresentar menor número de fibroblastos e menor concentração de TGF- β 1 em relação à LUVA.

Tanto a BLN, LUVA quanto o SHAM estimularam concentrações superiores de TGF- β 1 em relação ao ePTFE no 14º dia.

À imunohistoquímica para o TGF- β 1, foi observado diminuição deste fator do 7º para o 14º dia nos grupos ePTFE e SHAM, enquanto o grupo LUVA se manteve com baixa expressão entre os dias 7º e 14º dias de seguimento.

Enfim, esses achados mostram que a biomembrana feita do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* participa ativamente das fases da cicatrização estimulando a inflamação através do recrutamento de leucócitos para o local, proporcionando o desbridamento local. Atua na angiogênese, estimulando a neoformação vascular para melhor nutrição e oxigenação da ferida. Estimula a proliferação de fibroblastos igual à LUVA e diferente do SHAM, embora sem diferença estatística. Na colagênese foi semelhante aos demais tratamentos.

Conclusão

- A biomembrana de látex se mostrou macroscopicamente indutora da neoformação tecidual como implante, estímulo superior à LUVA, ePTFE e à cicatrização normal;
- A BLN participou ativamente da fase inflamatória da cicatrização, com recrutamento principalmente de neutrófilos seguido de altas concentrações de IL-1 β e MPO;
- A BLN, semelhante à LUVA, proporcionou forte estímulo à angiogênese em relação ao ePTFE e à cicatrização normal, estímulo que parece não estar relacionado com o VEGF;
- A BLN apresentou forte estímulo à fibroplasia no 14º dia, contrapondo à baixa concentração de TGF- β 1 e não modificação na produção de colágeno, diferente do observado com o ePTFE que apresentou baixa fibroplasia, seguida de alta colagênese e baixa produção de TGF- β 1.
- Enfim, a biomembrana de látex da seringueira *Hevea brasiliensis* atua significativamente na fase inflamatória da cicatrização, importante no recrutamento neutrofílico para o local, o que parece influenciar diretamente as fases subseqüentes do processo cicatricial, confirmada pela sua capacidade estimuladora de angiogênese, provavelmente não influenciada por VEGF, e pelo estímulo à fibroplasia independente de TGF- β 1 e modificação na produção colagênica.

Referências *

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ABBAS, A., LICHTMAN, A. Saunders. **Cellular and Molecular Immunology**. 5th. Philadelphia. 2003. 562 p.

ABITBOL, R.; FONSECA, M.; SANTOS, L., FERRARONI, N. Papel das selectinas na atividade inflamatória: MedStudents. 2005 2005.

ANASTÁCIO, M. **Reparação epelial em úlceras vasculares após estimulação do ultra-som pulsado de baixa intensidade**. 89. Mestrado. Interunidades em Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Univeridade de São Paulo, São Carlos, 2000.

ANDRADE, S.; FAN, T., LEWIS, G. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model.: **Br J Exp Pathol**, n.68, p.755-766. 1987.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P., NURDEN, A. T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration: **Thromb Haemost**, v.91, n.1, p.4-15. 2004.

ARMANI, A., COUTINHO-NETTO, J., **Aceleração do reparo tissular em modelo experimental de úlcera dérmica induzida por biomembrana de látex natural extraído da seringueira Hevea brasiliensis**. In. Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2001, Ribeirão Preto. 9º SIICUSP - CD-ROM, p.

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

ARONOFF, D. M.; CANETTI, C., PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP: **J Immunol**, v.173, n.1, p.559-565. 2004.

ASSOIAN, R. K.; KOMORIYA, A.; MEYERS, C. A.; MILLER, D. M., SPORN, M. B. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization: **J Biol Chem**, v.258, n.11, p.7155-7160. 1983.

BATES, D., HARPER, S. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factor: **Vascular Pharmacology**, v.39, p.225-237. 2003.

BATES, D. O., JONES, O. P. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing: **Lower Extremity Wounds**, v.2, n.2, p.107-120. 2003.

BATES, D. O.; LODWICK, D., WILLIAMS, B. Vascular endothelial growth factor and microvascular permeability: **Microcirculation**, v.6, n.2, p.83-96. 1999.

BAUER, J. J.; SALKY, B. A.; GELERT, I. M., KREEL, I. Repair of large abdominal wall defects with expanded polytetrafluoroethylene (PTFE): **Ann Surg**, v.206, n.6, p.765-769. 1987.

BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis: **J Infect Dis**, v.182, n.1, p.214-223. 2000.

CARVALHO, M.; BASTOS, S.; FRADE, M., GAMONAL, A. Dermatologia Elementar. **Úlceras de Perna**. 1ª. Juiz de Fora. 2000. 115-117 p.

CARVALHO, P. T.; MAZZER, N.; DOS REIS, F. A.; BELCHIOR, A. C., SILVA, I. S. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats: **Acta Cir Bras**, v.21, n.3, p.177-183. 2006.

CHAN, B. M.; KASSNER, P. D.; SCHIRO, J. A.; BYERS, H. R.; KUPPER, T. S., HEMLER, M. E. Distinct cellular functions mediated by different VLA integrin alpha subunit cytoplasmic domains: **Cell**, v.68, n.6, p.1051-1060. 1992.

CHANG, K.; UITTO, J.; ROWOLD, E. A.; GRANT, G. A.; KILO, C., WILLIAMSON, J. R. Increased collagen cross-linkages in experimental diabetes: reversal by beta-aminopropionitrile and D-penicillamine: **Diabetes**, v.29, n.10, p.778-781. 1980.

CHENG, B.; FU, X.; SHENG, Z.; GU, X.; SUN, T., SUN, X. The effect of basic fibroblast growth factor on myofibroblasts and its significance on wound healing: **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v.82, n.17, p.1187-1191. 2002.

CHESTER, U. **Progress in biomedical engineering**. London. Elsevier Science. 1987.

CHETTIBI, S., FERGUSON, M. W. J. Wound Repair: An Overview. In: GALLIN, J. I., WILLIAMS & WILKINS, R. S. L. (Ed.). **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. Philadelphia, 1999. p.865-881.

CLARK, R. The Molecular and Celular Biology of Wound Repair. **Wound repair overview and general considerations**. 2º. New York. Plenum Press. 1996. 95-141 p.

COHEN, M.; CONSTANTINO, P., FRIEDMAN, C. Biology of implants used in head and neck surgery: **Facial Plast Surg Clin North Am**, v.7, n.1, p.17-33. 1999.

COUTINHO-NETTO, J., MRUÉ, F., **Biomembrana**. In. Apresentação da Biomembrana à Academia Brasileira de Estudos Avançados Dr. Adolfo B. M. Cavalcanti, 2003, São Paulo. p.

DAVIDSON, J. M. Animal models for wound repair: **Arch Dermatol Res**, v.290 Suppl, p.S1-11. 1998.

DAVIDSON, J. M.; KLAGSBRUN, M.; HILL, K. E.; BUCKLEY, A.; SULLIVAN, R.; BREWER, P. S., WOODWARD, S. C. Accelerated wound repair, cell proliferation, and collagen accumulation are produced by a cartilage-derived growth factor: **J Cell Biol**, v.100, n.4, p.1219-1227. 1985.

DETMAR, M.; BROWN, L. F.; BERSE, B.; JACKMAN, R. W.; ELICKER, B. M.; DVORAK, H. F., CLAFFEY, K. P. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin: **J Invest Dermatol**, v.108, n.3, p.263-268. 1997.

DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy: **J Clin Oncol**, v.20, n.21, p.4368-4380. 2002.

DVORAK, H. F.; NAGY, J. A.; FENG, D.; BROWN, L. F., DVORAK, A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis: **Curr Top Microbiol Immunol**, v.237, p.97-132. 1999.

ELICEIRI, K. W., RUEDEN, C. Tools for visualizing multidimensional images from living specimens: **Photochem Photobiol**, v.81, n.5, p.1116-1122. 2005.

ENWEMEKA, C. S.; PARKER, J. C.; DOWDY, D. S.; HARKNESS, E. E.; SANFORD, L. E., WOODRUFF, L. D. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study: **Photomed Laser Surg**, v.22, n.4, p.323-329. 2004.

ERNST, H.; KONTUREK, P.; HAHN, E. G.; BRZOZOWSKI, T., KONTUREK, S. J. Acceleration of wound healing in gastric ulcers by local injection of neutralising antibody to transforming growth factor beta 1: **Gut**, v.39, n.2, p.172-175. 1996.

FAJARDO, L.; KOWALSKI, J.; KWAN, H.; PRIONAS, S., ALLISON, A. The disc angiogenesis system: **Lab Invest**, n.58, p.718-724. 1988.

FALANGA, V., EAGLSTEIN, W. **Úlceras dos membros inferiores: diagnósticos e tratamentos**. Rio de Janeiro. Revinter. 1996.

FERRARA, N., HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells: **Biochem Biophys Res Commun**, v.161, n.2, p.851-858. 1989.

FERRARA, N., KERBEL, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target: **Nature**, v.438, n.7070, p.967-974. 2005.

FIERRO, I. M.; BARJA-FIDALGO, C.; CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H. The involvement of nitric oxide in the anti-Candida albicans activity of rat neutrophils: **Immunology**, v.89, n.2, p.295-300. 1996.

FIERRO, I. M.; NASCIMENTO-DASILVA, V.; ARRUDA, M. A.; FREITAS, M. S.; PLOTKOWSKI, M. C.; CUNHA, F. Q., BARJA-FIDALGO, C. Induction of NOS in rat

blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity: **J Leukoc Biol**, v.65, n.4, p.508-514. 1999.

FRADE, M. **Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico da cicatrização na presença da biomembrana de látex natural da seringueira Hevea brasiliensis**. 01/02/2003. 164. Doutorado. Clínica Médica - Divisão de Dermatologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2003.

FRADE, M.; CURSI, I.; ANDRADE, F.; COUTINHO-NETTO, J.; BARBETTA, F., FOSS, N. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane: **Med Cutan Iber Am**, v.32, n.4, p.157-162. 2004.

FRADE, M.; CURSI, I.; ANDRADE, F.; COUTINHO-NETTO, J., FOSS, N., **Benefícios da biomembrana de látex na cicatrização em paciente diabética**. In. Congresso Brasileiro de Dermatologia, 2001a, Goiânia. Anais do 56º Congresso Brasileiro de Dermatologia, 158 p.

_____, **Stimulation of diabetic wound healing by natural latex biomembrane dressing**. In. World Congress of Dermatology, 2002, Paris. Annales de Dermatologie et de Vénéréologie, p.

FRADE, M.; CURSI, I.; ANDRADE, F.; SOARES, S.; RIBEIRO, W.; SANTOS, S., FOSS, N., **Úlceras de perna: um estudo de casos em Juiz de Fora-MG (Brasil) e região**. In. 2005. An Bras Dermatol, 41-46 p.

FRADE, M.; SALATHIEL, A.; MAZZUCATO, E.; COUTINHO-NETTO, J., FOSS, N. A natural biomembrane as a new proposal for the treatment of pressure ulcers: **Med Cutan Iber Lat Am**, v.34, n.3, p.133-138. 2006.

FRADE, M.; VALVERDE, R.; DE ASSIS, R.; COUTINHO-NETTO, J., FOSS, N. Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal: **Int J Dermatol**, v.40, n.3, p.238-240. 2001b.

FREITAS, M. **Uso de próteses do composto de látex natural em arterioplastias femorais. Estudo experimental em cães**. Mestrado. Departamento de Clínica

Cirurgia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

GAILIT, J.; WELCH, M. P.; CLARK, R. A. TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds: **J Invest Dermatol**, v.103, n.2, p.221-227. 1994.

GIRISH, V., VIJAYALAKSHMI, A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ: **Indian J Cancer**, v.41, n.1, p.47. 2004.

HAM, J., MILLER, P. J. Expanded polytetrafluoroethylene implants in rhinoplasty: literature review, operative techniques, and outcome: **Facial Plast Surg**, v.19, n.4, p.331-339. 2003.

HANEL, K. C.; MCCABE, C.; ABBOTT, W. M.; FALLON, J., MEGERMAN, J. Current PTFE grafts: a biomechanical, scanning electron, and light microscopic evaluation: **Ann Surg**, v.195, n.4, p.456-463. 1982.

HARRISON, N., LAURENT, G. Diseases of the Heart and Lung. Respiratory MEDicine: Recent advantages. **Mechanisms for the pathogenesis of pulmonary fibrosis**. Ed Barnes PJ, v.2º. 1993. 190-210 p.

HOM, D. B. Growth factors in wound healing: **Otolaryngol Clin North Am**, v.28, n.5, p.933-953. 1995.

HOSMER, D., LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression**. John Wiley & Sons. 1989.

HOWDIESHELL, T. R.; CALLAWAY, D.; WEBB, W. L.; GAINES, M. D.; PROCTER, C. D., JR.; SATHYANARAYANA; POLLOCK, J. S.; BROCK, T. L., MCNEIL, P. L. Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation: **J Surg Res**, v.96, n.2, p.173-182. 2001.

HUNTER, J. The works of John Hunter. **Lectures on the principles of surgery**. Ed. Palmer J. London, v.1. 1787. 368 p.

ISHIMURA, K.; MOROGUCHI, A.; OKANO, K.; MAEBA, T., MAETA, H. Local expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 on wound healing of intestinal anastomosis during endotoxemia in mice: **J Surg Res**, v.108, n.1, p.91-97. 2002.

JAFFE, E. A.; NACHMAN, R. L.; BECKER, C. G., MINICK, C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria: **J Clin Invest**, v.52, n.11, p.2745-2756. 1973.

JUNQUEIRA, L., CARNEIRO, F. **Histologia Básica**. 9th. Guanabara Koogan S.A. 1999.

JUNQUEIRA, L., MARTINS, E. Atlas de Anatomia Microscópica do Rato. **Apêndice: Pele**. USP: Tipografia Rosso Lillo. 1947. 106-108 p.

JURK, K., KEHREL, B. E. Platelets: physiology and biochemistry: **Semin Thromb Hemost**, v.31, n.4, p.381-392. 2005.

KARESH, J. W.; FABREGA, M. A.; RODRIGUES, M. M., GLAROS, D. S. Polytetrafluoroethylene as an interpositional graft material for the correction of lower eyelid retraction: **Ophthalmology**, v.96, n.4, p.419-423. 1989.

KARUKONDA, S. R. K.; FLYNN, T. C.; BOH, E. E.; MCBURNEY, E. I.; RUSSO, G. G., MILLIKAN, L. E. The effects of drugs on wound healing: part I: **International Journal of Dermatology**, v.39, p.250-257. 2000.

KAWALEC, J. S.; HETHERINGTON, V. J.; PFENNIGWERTH, T. C.; DOCKERY, D. S., DOLCE, M. Effect of a diode laser on wound healing by using diabetic and nondiabetic mice: **J Foot Ankle Surg**, v.43, n.4, p.214-220. 2004.

KIDD, K. R.; NAGLE, R. B., WILLIAMS, S. K. Angiogenesis and neovascularization associated with extracellular matrix-modified porous implants: **Inc. J Biomed Mater Res**, v.59, p.366-377. 2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran. Patologia: bases patológicas das doenças**. 7th. Rio de Janeiro. Saunders. 2005. 49-124 p.

KYRIAKIDES, T. R.; ZHU, Y. H.; YANG, Z.; HUYNH, G.; BORNSTEIN, P. Altered extracellular matrix remodeling and angiogenesis in sponge granulomas of thrombospondin 2-null mice: **Am J Pathol**, v.159, n.4, p.1255-1262. 2001.

LACHAT, J. J.; GRISOTTO, P. C.; THOMAZINI, J. A.; COUTINHO-NETTO, J., PICCINATO, C. E. Successful of segmental femoral artery substitution with prothesis manufactured from the natural latex of *Hevea brasiliensis*: **Acta Microscopica**, v.12, n.B, p.505-506. 2003.

LAMOUNIER, F. **Avaliação da produção de citocinas inflamatórias "in vitro", induzidas pela biomembrana de látex natural da seringueira Hevea brasiliensis**. 115. Mestrado. Departamento de Clínica Médica, Divisão de Dermatologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

LEIBOVICH, S. J., ROSS, R. The role of the macrophage in the wound repair: **Am J Pathol**, v.78, p.71-100. 1975.

LEVICK, J. R. Capillary filtration-absorption balance reconsidered in light of dynamic extravascular factors: **Exp Physiol**, v.76, n.6, p.825-857. 1991.

LIMA, H. **Tópicos em imunodermatologia clínica**. São Paulo. Segmento farma. 2004. 131 p.

LITTELL, R.; MILLIKEN, G.; SROUP, W., WOLFINGE, R. **SAS System for Mixed Models**. Cary, NC. SAS Institute Inc. 1996.

LU, H. K.; KO, M. T., WU, M. F. Comparison of Th1/Th2 cytokine profiles of initial wound healing of rats induced by PDCM and e-PTFE: **Inc. J Biomed Mater Res Part B**, v.68B, p.75-80. 2004.

MACCALON, R., FERGUSON, M. The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. **Fetal wound healing and the development of antiscarring therapies for adult wound healing**. 2^o. New York. Plenum Press. 1996.

MACKAY, D., MILLER, A. L. Nutritional support for wound healing: **Altern Med Rev**, v.8, n.4, p.359-377. 2003.

MALECH, H. L., GALLIN, J. I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases: **N Engl J Med**, v.317, n.11, p.687-694. 1987.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P., MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part I: **An Bras Dermatol**, v.78, n.4, p.393-410. 2003.

MASS, C.; GNEPP, D., BUMPOUS, J. Expanded polytetrafluoroethylene (Gore-Tex soft tissue pack) in facial augmentation.: **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v.119, p.1008-1014. 1993.

MASSUDA, E. T., OLIVEIRA, J. A. A new experimental model of acquired cholesteatoma: **Laryngoscope**, v.115, n.3, p.481-485. 2005.

MAUCH, C.; KRIEG, T., BAUER, E. A. Role of the extracellular matrix in the degradation of connective tissue: **Arch Dermatol Res**, v.287, n.1, p.107-114. 1994.

MAURÍCIO, V. **Aceleração do reparo tissular induzido por uma fração angiogênica purificada do látex natural da seringueira Hevea brasiliensis**. 111. Mestrado. Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MAYADAS, T. N.; JOHNSON, R. C.; RAYBURN, H.; HYNES, R. O., WAGNER, D. D. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice: **Cell**, v.74, n.3, p.541-554. 1993.

MCLEAN, R.; SANDERS, W., SROUP, W. A unified approach to mixed linear models. **The American Statistician**. v.45. 1991. 54-64 p.

MENDONÇA, R. **Caracterização biológica de uma fração angiogênica do látex natural da seringueira Hevea brasiliensis**. Mestrado. Departamento de Bioquímica e Imunologia da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo Ribeirão Preto, 2004.

MICHAELIS. **Dicionário escolar inglês**. São Paulo. 2001.

How to analyze digital images., 2005.
http://www.sas.org/tcs/weeklyIssues_2005/2005-10-21/feature2/. 23 de julho de 2007

MRUÉ, F. **Substituição do esôfago cervical por prótese bio sintética de látex. Estudo experimental em cães**. Mestrado. Clínica Cirúrgica - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

_____. **Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex com polilisina. Aplicabilidade em neoformação esofágica e da aprede abdominal. Estudo experimental em cães**. 01/12/2000. 112. Doutorado. Clínica Cirúrgica - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

MRUÉ, F.; COUTINHO-NETTO, J.; CONEVIVA, R.; LACHAT, J. J.; THOMAZINI, J. A., TAMBELINI, H. Evaluation of The Biocompatibility of New Biomembrane: **Materials research**, v.7, n.2, p.277-283. 2004.

MURPHY, G., DOCHERTY, A. J. The matrix metalloproteinases and their inhibitors: **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.7, n.2, p.120-125. 1992.

MUTSAERS, S. E.; BISHOP, J. E.; MCGROUTHER, G., LAURENT, G. J. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis: **Int J Biochem Cell Biol**, v.29, n.1, p.5-17. 1997.

NEEL, H. B., 3RD. Implants of Gore-Tex: **Arch Otolaryngol**, v.109, n.7, p.427-433. 1983.

OLIVEIRA, J. A. A.; HYPPOLITO, M. A.; COUTINHO-NETTO, J., MRUÉ, F. Miringoplasia com a utilização de um novo material biossintético: **Rev Bras Otorrinolaringol**, v.69, n.5, p.649-655. 2003.

PAULO, N. M.; LIMA, F. G.; SIQUEIRA JUNIOR, J. T.; FLEURY, L. F.; SANT' ANA, F. J.; BORGES, A. C., TELLES TDA, C. [Seringueira's latex membrane (Hevea brasiliensis) with and without polylysine 0.1% and marlex mesh for the reconstruction of iatrogenics abdominal wall defects in rats]: **Acta Cir Bras**, v.20, n.4, p.305-310. 2005a.

PAULO, N. M.; SILVA, M. A. M., CONCEIÇÃO, M. Biomembrane of natural latex (Hevea brasiliensis) with polylysine 0,1% for the perineal Herniirrhaphy in a dog: **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.1, p.79-82. 2005b.

PETROFF, M. A.; GOODE, R. L., LEVET, Y. Gore-Tex implants: applications in facial paralysis rehabilitation and soft-tissue augmentation: **Laryngoscope**, v.102, n.10, p.1185-1189. 1992.

PHILLIPS, T. **Chronic Cutaneous Ulcers: Etiology and Epidemiology**. J Invest Dermatol, v.102. 1994. 38-41 p.

PHILLIPS, T., DOVER, J. **Leg ulcers**. J Am Acad Dermatol, v.25. 1991. 965-987 p.

PICCINATO, C.; COUTINHO-NETTO, J., CHERRI, J. Tratado de otorrinolaringologia. **Cicatrização**. 1º. São Paulo. Ed Roca, v.Cap 12. 2003. 189-2000 p.

PIERCE, G. F.; BROWN, D., MUSTOE, T. A. Quantitative analysis of inflammatory cell influx, procollagen type I synthesis, and collagen cross-linking in incisional wounds: influence of PDGF-BB and TGF-beta 1 therapy: **J Lab Clin Med**, v.117, n.5, p.373-382. 1991.

PIERCE, G. F.; MUSTOE, T. A.; LINGELBACH, J.; MASAKOWSKI, V. R.; GRAMATES, P., DEUEL, T. F. Transforming growth factor beta reverses the glucocorticoid-induced wound-healing deficit in rats: possible regulation in

macrophages by platelet-derived growth factor: **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.86, n.7, p.2229-2233. 1989.

PINHO, E. C. C. M.; SOUSA, S. J. F.; SCHAUD, F.; LACHAT, J. J., COUTINHO-NETTO, J. Experimental use of latex biomembrane in conjunctival reconstruction: **Arq Bras Oftalmol**, v.67, p.27-32. 2004.

PROCKOP, D. J., KIVIRIKKO, K. I. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy: **Annu Rev Biochem**, v.64, p.403-434. 1995.

RABELO, R.; SANT'ANA, F.; PAULO, N.; ROMANI, A.; SILVA, L.; VIU, M.; ALVES, C.; LIMA, C., SILVA, O. Use of the polilisine 0.1% and poliamide, latex membrane in the surgical correction of recidivating umbilical hernias in dairy cattle: **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.2, p.169-175. 2005.

REID, R. R.; SAID, H. K.; MOGFORD, J. E., MUSTOE, T. A. The future of wound healing: pursuing surgical models in transgenic and knockout mice: **J Am Coll Surg**, v.199, n.4, p.578-585. 2004.

ROBERTS, A. B. Molecular and cell biology of TGF-beta: **Miner Electrolyte Metab**, v.24, n.2-3, p.111-119. 1998.

ROBINSON, L. A.; STEEBER, D. A., TEDDER, T. F. The Selectins in Inflammation. In: GALLIN, J. I., WILLIAMS & WILKINS, R. S. L. (Ed.). **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. 3rd. Philadelphia, 1999. p.571-583.

SADER, S. L.; COUTINHO-NETTO, J.; BARBIERI-NETO, J.; MAZZETTO, S. A.; ALVES-JR, P.; VANNI, J. C., SADER, A. A. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural: **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v.15, n.4, p.338-344. 2000.

SANTANA, L. **Tratamento de úlceras venosas por ultra-som de baixa intensidade: Avaliação por análise de imagem e imunohistoquímica**. 126. Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos. Instituto de Química de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

SCHOENROCK, L. D., CHERNOFF, W. G. Subcutaneous implantation of Gore-Tex for facial reconstruction: **Otolaryngol Clin North Am**, v.28, n.2, p.325-340. 1995.

Fabricação de luvas., 2007. <http://www.sbrt.ibict.br/upload/sbrt590.pdf> 6/3/07

SEPHEL, G.; KENNEDY, R., KUDRAVI, S. Expression of capillary basement membrane components during sequential phases of wound angiogenesis.: **Matrix Biol**, v.263-279, n.15. 1996.

SHAI, A., MAIBACH, H. **Wound Healing and Ulcer of the Skin: Diagnosis and herapy - the practical approach**. New York. Springer. 2005. 270 p.

SHERIDAN, R. L., TOMPKINS, R. G. Skin substitutes in burns: **Burns**, v.25, n.2, p.97-103. 1999.

SHERWOOD, E. R., TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response: **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v.18, n.3, p.385-405. 2004.

SHOCK, A., LAURENT, G. Lung Biology in Health and Disease. Adhesion molecules and the lung. **Cell adhesion in wound healing and pulmonary fibrosis**. New York. Eds Ward PA and antone, JC. 1996. 177-209 p.

SILVA, R.; LIMA, G.; LIMA, C.; PAULO, N.; SILVA, L.; SANT'ÁNA, F.; VIU, M.; ROMANI, A., RABELO, R., **Uso do compósito de látex, poliamida e polilisina a 0,1% na hernioplastia recidivante em bovinos leiteiros e avaliação pós-operatória**. In. XII Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Goiás – UFG, 2004, Santo Antônio de Goiás – GO. p.

SISCO, M.; CHAO, J. D.; KIM, I.; MOGFORD, J. E.; MAYADAS, T. N., MUSTOE, T. A. Delayed wound healing in Mac-1-deficient mice is associated with normal monocyte recruitment: **Wound Repair Regen**, v.15, n.4, p.566-571. 2007.

SOUZA, D. G.; CASSALI, G. D.; POOLE, S., TEIXEIRA, M. M. 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.

SOUZA, R. **Regeneração óssea guiada pela biomembrana de látex natural e sua propriedade angiogênica**. 76. Mestrado. Departamento de Ortopedia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G., TOBIN, G. R. Physiology and Healing Dynamics af Chronic Cutaneous Wounds: **Am J Pathol**, v.176, n.2A, p.26S-38S. 1998.

SWAIN, S. D.; ROHN, T. T., QUINN, M. T. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents: **Antioxid Redox Signal**, v.4, n.1, p.69-83. 2002.

THOMAZINI, J.; MRUÉ, F.; LACHAT, J.; ZBOROWSKI, A.; DURAN, J.; CENEVIVA, R., COUTINHO-NETTO, J. Morphological and biochemical characterization of a prothesis manufactured from natural latex of *Hevea brasiliensis* foi medica utilization: **Microscopica Acta**, v.6, p.798-799. 1997.

VERNET, D.; FERRINI, M. G.; VALENTE, E. G.; MAGEE, T. R.; BOU-GHARIOS, G.; RAJFER, J., GONZALEZ-CADAVID, N. F. Effect of nitric oxide on the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts in the Peyronie's fibrotic plaque and in its rat model: **Nitric Oxide**, v.7, n.4, p.262-276. 2002.

VILJANTO, J.; PENTTINEN, R., RAEKALLIO, J. Fibronectin in early phases of wound healing in children: **Acta Chir Scand**, v.147, n.1, p.7-13. 1981.

WELCH, M. P.; ODLAND, G. F., CLARK, R. A. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction: **J Cell Biol**, v.110, n.1, p.133-145. 1990.

WERNER, S., GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines: **Physiol Rev**, v.83, n.3, p.835-870. 2003.

WILLIAMS, D. **Definitions in biocompatibility. Proceedings of a Consensus Conference of the European Societ for Biomaterials**. London. Elsevier Science. 1987.

WILLIAMS, G. T. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis: **Cell**, v.65, n.7, p.1097-1098. 1991.

WITTE, M. B., BARBUL, A. General principles of wound healing: **Surg Clin North Am**, v.77, n.3, p.509-528. 1997.

ZIMMERMAN, L., VEITH, I. **Great ideas in the history**. Baltimore, Wilkins & Wilkins. 1961.

Anexo A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 055/2005, sobre o projeto intitulado *“Identificação e quantificação dos fatores envolvidos na cicatrização dos implantes de biomembrana de látex natural em camundongos normais e diabéticos. Padronização do ELISA in situ”*, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. 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** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **1º de agosto de 2005**.

(We certify that the protocol nº 055/2005, about *“The identification and quantification of factors involved in the healing with the natural latex biomembrane in normal and diabetic mice. Standardizing ELISA in situ”*, 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 08/1th/2005 meeting.).

Ribeirão Preto, 03 de agosto de 2005.

Prof. Dra. LUIZA DA SILVA LOPES
Vice-Presidente, em exercício, da Comissão
de Ética em Experimentação Animal