

Luana Pimenta Gomes

**Avaliação dos fatores de crescimento endotelial vascular
VEGF e de seus principais receptores VEGFR-1 e -2 no
processo de cicatrização com influência da radioterapia
em ratos da linhagem Wistar**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Roberto Souza Camargo

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gomes, Luana Pimenta

Avaliação dos fatores de crescimento endotelial vascular VEGF e de seus principais receptores VEGFR-1 e -2 no processo de cicatrização com influência da radioterapia em ratos da linhagem Wistar / Luana Pimenta Gomes. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Roberto Souza Camargo.

Descritores: 1.Cicatrização/efeitos de radiação 2.Neovascularização patológica/radioterapia 3.Radioterapia 4.Fator A de crescimento do endotélio vascular 5.Receptores de fatores de crescimento do endotélio vascular 6.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-195/13

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha mãe, *Teca*, pessoa iliminada que me ensinou a valorizar as pequenas grandezas da vida. Mulher simples, forte, batalhadora, coração em forma de gente, sempre disposta a ajudar quem precisa. Mãe, você fez e faz a diferença na vida de muitas pessoas. Obrigada por me confortar nos momentos difíceis e estar ao meu lado nos mais importantes.

Ao meu pai, *Oracy*, meu herói, que se dedicou em construir um lar seguro para sua pequena grande família, que está presente em todas as horas, que vibra com cada vitória e que sempre deu amor, apoio e conforto. Agradeço por tudo que me ensinou e por toda a felicidade que me proporcionou.

Hoje, quero que saibam que todos os momentos desses anos fora de casa foram dedicados à vocês. Nosso amor incondicional me apoiou para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao *Tato*,

Você é um presente! Em pouco mais de um ano da sua existência em minha vida, atribuo a você muitas das minhas conquistas. Você me ajudou a crescer, me encorajou a aprender coisas novas e sempre acreditou em mim, me mostrando que sou mais capaz do que imaginava. Admiro muito seu caráter, a sua inteligência excepcional, a sua independência, a maneira como você me faz rir e como deixa tudo mais leve e mais simples. Você é importante para todos a sua volta. Você me deu outra linda família. Você enriquece e alegra a minha vida. Obrigada pelo seu amor, companheirismo e amizade.

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha avó, *Nancy* (in memorian) e meu avô, *Oracy*, modelos de coragem e perseverança e que me fizeram entender que o estudo é o único bem que ninguém pode nos tirar e que vale a pena todo esforço para concretizá-lo. Obrigada por compartilhar comigo muitos momentos, por me ensinarem muitas coisas que sigo até hoje e pelo amor com que ajudaram a me criar.

À minha *Família*, minha dádiva, um bem inestimável e o melhor refúgio, a quem devo a vida e o exemplo de amor. Faltam palavras para agradecer a cada um o apoio incondicional, força, carinho, dedicação e principalmente a compreensão dos momentos ausentes.

AMO VOCÊS INFINITO!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr Roberto Souza Camargo, que através da sua orientação científica, ensinamentos, incentivo, amizade, e principalmente, pela compreensão diante das minhas outras responsabilidades de trabalho contribuiu diretamente para a minha formação profissional.

Ao Dr Adhemar Longatto Filho da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), a quem muito admiro, tanto científica e academicamente quanto pessoalmente, o meu eterno agradecimento por todo o apoio, incentivo e disponibilidade em todas as fases que levaram à concretização deste trabalho. Obrigada por ter acreditado nas minhas capacidades e por ter me dado a oportunidade de trabalhar em uma área tão gratificante.

Ao Laboratório de Investigação Médica 26 (LIM 26) e aos colegas do departamento pelo respeito e a disposição em ajudar e Sandra pela confecção das lâminas histológicas.

Ao Laboratório de Investigação Médica 14 (LIM 14) e às amigas Alda Wakamatsu e Cinthya Cirqueira pela realização das imunohistoquímicas e utilização do microscópio para as fotomicrografias.

Ao Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) pelo fornecimento dos animais em especial ao Dr Eduardo Pompeu e Lígia pela orientação, amizade e realização das técnicas cirúrgicas e aos colegas deste departamento pela atenção durante os procedimentos realizados e cuidado com os animais utilizados na realização deste trabalho.

Ao Centro de Oncologia / Departamento de Radioterapia do Hospital Sírio Libanês, em especial ao Dr Eduardo Martella, colaboradores e alunos por me

receberem de portas abertas em seu local de trabalho e pela confiança em mim depositada permitindo o acesso às aulas de física médica.

Ao Instituto de Radiologia HC-FMUSP (InRad) por ter cedido prontamente o equipamento de betaterapia e em especial à Silvana pela realização das radiações nos animais deste trabalho.

Ao Gabriel Andrade Alves do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pelas sugestões e auxílio com a análise estatística desta dissertação.

Ao Dr Eduardo Anselmo Garcia por toda contribuição profissional e científica, conselhos e amizade.

Aos professores membros da minha banca de qualificação que providenciaram preciosas indicações de formas de aprimoramento do trabalho.

Aos professores das aulas de crédito que atuaram de forma profissional, séria e estimulante para o objetivo de ensinar.

Às colaboradoras do programa de pós-graduação de Fisiopatologia Experimental em especial à Tânia pelo auxílio logístico na elaboração deste trabalho.

Aos colaboradores da biblioteca central pela disponibilidade em ajudar durante todo o período do mestrado e elaboração da ficha catalográfica.

Ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) e ao Programa de Aprimoramento Profissional (PAP) por possibilitar a realização e conclusão da pós-graduação em citopatologia oncológica, o que me ofertou grandes possibilidades profissionais.

À Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP), em especial à Dra Maria Antonieta Longo Galvão da Silva, Dr Gildo Francisco dos Santos Jr. e amigos dos setores de citologia e biologia molecular por todas as experiências e ensinamentos compartilhados.

Ao Laboratório Cytolab de Mogi das Cruzes, em especial à Renata Arantes, Profº Marco Aurélio Andrade e amigas da citologia que ao mesmo tempo que me receberam em um momento difícil e de incertezas participaram da conquista de um grande passo profissional.

À empresa BD, em especial ao Juliano Paggiaro, Raquel Ortega e amigos da área de Diagnostic Systems (DS) pela confiança e permissão da liberdade de ação, que foram decisivos para que este trabalho fosse concluído. Além da oportunidade profissional, todos contribuíram com meu amadurecimento e desenvolvimento pessoal.

À amiga Carla Ducatti por me acompanhar desde nosso início profissional e grande apoio no início da pesquisa.

Aos amigos Joyce e Pedro Ivo por sempre perguntarem sobre a realização do trabalho e compreenderem minha ausência diante de tantas responsabilidades.

A Deus, pelas pessoas maravilhosas que colocou em minha vida e por iluminar o meu caminho.

NORMATIZAÇÃO

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver) através do gerenciador bibliográfico Endnote© X3 (Thompson inc©).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVEATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	9
2.1	Objetivo geral	10
2.2	Objetivos específicos	10
3	REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1	Pele	12
3.2	Estrutura da pele de mamíferos	12
3.2.1	Epiderme	13
3.2.2	Derme	16
3.2.3	Peculiaridades da pele do dorso de ratos	17
3.3	Fisiopatologia da lesão cutânea	17
3.3.1	Classificação da lesão cutânea	18
3.3.2	Classificação da lesão tecidual	20
3.3.2.1	Reparação tecidual por primeira intenção	20
3.3.2.2	Reparação tecidual por segunda intenção	21
3.3.2.3	Reparação tecidual por terceira intenção	21
3.3.2.4	Cura da ferida de espessura parcial	21
3.4	Cicatrização	22
3.4.1	Fase hemostática	22
3.4.2	Fase de inflamação	23
3.4.3	Fase de proliferação	25
3.4.3.1	Angiogênese	26
3.4.4	Proliferação fibroblásticas e dos miofibroblastos	31
3.4.5	Reepitelização	32

3.4.6 Fase de maturação / Remodelação	32
3.5 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	35
3.5.1 Histórico	35
3.5.1.1 Fator de permeabilidade vascular (VPF)	35
3.5.1.2 VEGF	36
3.5.2 VEGF e suas isoformas	37
3.5.2.1 VEGF-A	40
3.5.2.2 VEGF-B	43
3.5.2.3 VEGF-C	43
3.5.2.4 VEGF-D	44
3.5.2.5 PLGF	45
3.5.2.6 VEGFRs	46
3.6 Radioterapia	47
3.6.1 História da radioterapia	47
3.6.1.1 Aspectos físicos da radioterapia	53
3.6.1.1.1 Emissão de partículas alfa (α)	54
3.6.1.1.2 Emissão de partículas beta (β)	55
3.6.1.1.3 Emissão beta negativa (β^-)	55
3.6.1.1.4 Emissão beta positiva (β^+)	56
3.6.1.1.5 Emissão de raios gama (γ)	57
3.6.1.1.6 Emissão de raios X	57
3.6.2 Unidade de medida	58
3.6.3 Aspectos moleculares da radiobiologia	58
3.6.4 Efeito da radiação na cicatrização	61
4 MÉTODOS	66
4.1 Animais	67
4.2 Grupos de estudo	67
4.2.1 Grupo Controle (C)	67
4.2.2 Grupo Raditerapia (RT)	68
4.3 Técnica cirúrgica	68
4.4 Técnica radioterápica	70

4.5 Análise macroscópica	72
4.6 Obtenção de cortes histológicos e método de coloração	72
4.7 Análise microscópica	74
4.8 Procedimento Imunohistoquímico	74
4.9 Aspectos éticos envolvidos	79
4.10 Análise estatística	79
5. RESULTADOS	80
5.1 Algumas considerações	81
5.2 Análise macroscópica	81
5.3 Análise microscópica.....	82
5.3.1 Grupo controle (C)	83
5.3.1.1 Grupo C: 3 meses	83
5.3.1.2 Grupo C: 6 meses	84
5.3.2 Grupo radioterapia (RT)	85
5.3.2.1 Grupo radioterapia pré-cirúrgica (RT-Pré).....	85
5.3.2.1.1 RT-Pré: 3 meses	85
5.3.2.1.2 RT-Pré: 6 meses	87
5.3.2.2 Grupo radioterapia pós-cirúrgica (RT-Pós)	87
5.3.2.2.1 RT-Pós: 3 meses.....	87
5.3.2.2.2 RT-Pós: 6 meses.....	88
5.4 Análise imunohistoquímica do VEGF	89
5.4.1 Grupo controle (C)	89
5.4.1.1 Grupo C: 3 meses	89
5.4.1.2 Grupo C: 6 meses	91
5.4.2 Grupo radioterapia (RT)	93
5.4.2.1 Grupo radioterapia pré-cirúrgica (RT-Pré).....	93
5.4.2.1.1 RT-Pré: 3 meses	93
5.4.2.1.2 RT-Pré: 6 meses	95
5.4.2.2 Grupo radioterapia pós-cirúrgica (RT-Pós)	97
5.4.2.2.1 RT-Pós: 3 meses.....	97
5.4.2.2.2 RT-Pós: 6 meses.....	99

5.5 Análise imunohistoquímica do FVW.....	101
5.5.1 Grupo controle (C)	101
5.5.1.1 Grupo C: 3 meses	101
5.5.1.2 Grupo C: 6 meses	101
5.5.2 Grupo radioterapia (RT)	101
5.5.2.1 Grupo radioterapia pré-cirúrgica (RT-Pré).....	101
5.5.2.1.1 RT-Pré: 3 meses	101
5.5.2.1.2 RT-Pós: 6 meses.....	102
5.5.2.2 Grupo radioterapia pós-cirúrgica (RT-Pós)	102
5.5.2.2.1 RT-Pós: 3 meses.....	102
5.5.2.2.2 RT-Pós: 6 meses.....	102
5.6 Análise estatística	103
5.6.1 VEGF	103
5.6.2 VEGFR-1.....	104
5.6.3 VEGFR-2.....	105
5.6.4 VWF	106
6 DISCUSSÃO	108
7 CONCLUSÃO.....	122
8 REFERÊNCIAS.....	124

LISTA DE ABREVEATURAS

Bcl-2	B-cell/lymphoma 2
CAPPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
cGy	Centigray
cm	Centímetro
CO ₂	Gás carbônico
DVS	Densidade vascular sanguínea
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
aFGF	Fator ácido de crescimento de fibroblastos
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos
FDA	Food Drugs Administration
FGF- α	Fatores de crescimento de fibroblastos α
FGF- β	Fatores de crescimento de fibroblastos β
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	Gramma
Gy	Gray
G1	Fase Gap 1 do ciclo celular
G2	Fase Gap 2 do ciclo celular
GP IIIa	Receptores de glicoproteína IIIa
GP IIb	Receptores de glicoproteína IIb
HE	Hematoxilina-eosina
HIF	Fator induzido por hipóxia

H ₂ O ₂	Água oxigenada
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMRT	Técnica de modulação de intensidade do feixe
kDa	Kilodaltons
km/s	Kilometro por segundo
kV	Kilovolts
LET	Transferência linear de energia
LIM	Laboratório de investigação médica
M	Molar
M	Fase mitose do ciclo celular
MeV	Megaelétron-volts
mg/kg	Miligrama por kilograma
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NP-1	Receptores neuropilin-1
NP-2	Receptores neuropilin-2
OMS	Organização Mundial da Saúde
P53	Tumor protein p53
PAF	Fator de agregação plaquetária

PBS	Tampão fosfato-salino
PD-ECGF	Fator endotelial II derivado das plaquetas
PDGF	Fatores de crescimento derivados das plaquetas
PLGF	Fator de crescimento placentário
PLGF	Fator de crescimento placentário
PLGF ₁₃₁	Fator de crescimento placentário ₁₃₁
PLGF ₁₅₂	Fator de crescimento placentário ₁₅₂
PLGF ₂₀₃	Fator de crescimento placentário ₂₀₃
PLGF ₂₂₄	Fator de crescimento placentário ₂₂₄
rad	Dose de radiação absorvida
RTK	Receptores tirosina-quinase
S	Fase síntese do ciclo celular
SF/HGF	Fator de cicatrização/fator de crescimento do hepatócito
TGF- α	Fatores transformadores do crescimento α
TGF- β	Fatores transformadores do crescimento β
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular A
VEGF-A ₁₆₅	Fator de crescimento endotelial vascular A ₁₆₅
VEGF-A _{165b}	Fator de crescimento endotelial vascular A _{165b}
VEGF-A ₁₂₁	Fator de crescimento endotelial vascular A ₁₂₁
VEGF-A ₁₄₅	Fator de crescimento endotelial vascular A ₁₄₅
VEGF-A ₁₄₈	Fator de crescimento endotelial vascular A ₁₄₈

VEGF-A ₁₈₃	Fator de crescimento endotelial vascular A ₁₈₃
VEGF-A ₁₈₉	Fator de crescimento endotelial vascular A ₁₈₉
VEGF-A ₂₀₆	Fator de crescimento endotelial vascular A ₂₀₆
VEGF-B	Fator de crescimento endotelial vascular B
VEGF-C	Fator de crescimento endotelial vascular C
VEGF-D	Fator de crescimento endotelial vascular D
VEGFR-1 (Flt-1)	Receptor de fator de crescimento endotelial vascular 1
VEGFR-2 (KDR)	Receptor de fator de crescimento endotelial vascular 2
VEGFR-3 (Flt-4)	Receptor de fator de crescimento endotelial vascular 3
VPF	Fator de permeabilidade vascular
VWF	Fator de Von Willebrand
W	Tungstênio
⁹⁰ Sr	Estrôncio-90
⁹⁰ Y	Ytrio-90
µm	Micrômetro

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Principais mediadores e componentes sanguíneos envolvidos no processo de cicatrização.....3
- Tabela 2** - Caracterização das lesões crônicas e agudas33
- Tabela 3** - Alcance das partículas alfa e beta no ar, no tecido humano e no alumínio.....55
- Tabela 4** - Distribuição dos animais e seus respectivos grupos.....69
- Tabela 5** - Descrição dos escores atribuídos à intensidades de imunomarcção e localização da marcação, dos VEGF e VEGFRs
- Tabela 6** - Descrição dos anticorpos primários utilizados e suas condições ótimas de trabalho com seus respectivos fabricantes, proteína alvo, números dos catálogos, clones , métodos utilizados para recuperação antigênica, títulos e kit de revelação77

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema representativo da anatomia da pele11
- Figura 2** - Esquema representativo dos cinco estratos da epiderme.....14
- Figura 3** - Esquema representativo das glicoproteínas da família VEGF, seus receptores e suas interações37
- Figura 4** - Estrutura do gene de VEGF e variantes de splicing identificadas de VEGF-A. (A) Esquema representativo da estrutura gênica do VEGF-A que apresenta 16272 pares de bases e fica localizado no cromossomo 6 apresentando 8 exons. Splicing alternativo nos exons 6, 7 e 8 originam várias isoformas. Os exons 6 e 7 codificam domínios de ligação a heparina. (B) Duas famílias de isoformas de mRNA são produzidas, as isoformas pró-angiogênicas (VEGF-Axxx,a esquerda) e as anti-angiogênicas (VEGF-Axxx,b, a direita), sendo xxx o número de aminoácidos da proteína madura.....39
- Figura 5** - Ilustração da realização da incisão da pele do animal, após tricotomia 70
- Figura 6** - A - Realização da incisão cirúrgica, B - Realização da sutura, C – reparo com sutura em pontos simples separados, com distância padronizada 0,5 cm, utilizando fio de nylon monofilamentado 4-0 agulhado71
- Figura 7** - Ilustração da irradiação pela placa de estrôncio-90.....72
- Figura 8** - Ilustração das regiões de onde foram retirados os fragmentos para análise.....73
- Figura 9** - Análise macroscópica. após a irradiação β . A - 15 dias. B e C - 3 meses. D e E - 6 meses82
- Figura 10**- A- Corte representativo da área lesionada do grupo C - 3 meses, objetiva de 4x, HE. B- Corte representativo da área adjacente normal do grupo C - 3 meses, objetiva de 20x, HE.....83
- Figura 11**- A- Corte representativo da área lesionada do grupo C - 6 meses, objetiva de 4x, HE. B- Corte representativo da área adjacente normal do grupo C - 6 meses, objetiva de 20x, HE.....84
- Figura 12**- A- Corte representativo da área lesionada do grupo RT-Pré - 3 meses, objetiva de 20x, HE. B- Corte representativo da área lesionada do grupo RT-Pré - 3 meses, objetiva de 4x, HE.....85

- Figura 13-** Corte representativo da área adjacente normal do grupo RT-Pré - 3 meses, objetiva de 4x, HE.....86
- Figura 14-** A- Corte representativo da área lesionada do grupo RT-Pré - 6 meses, objetiva de 4x, HE. B- Corte representativo da área adjacente normal do grupo RT-Pré - 6 meses, objetiva de 4x, HE87
- Figura 15-** A- Corte representativo da área lesionada do grupo RT-Pós - 3 meses, objetiva de 20x, HE. B- Corte representativo da área adjacente normal do grupo RT-Pós - 3 meses, objetiva de 20x, HE88
- Figura 16-** A- Corte representativo da área lesionada do grupo RT-Pós - 6 meses, objetiva de 20x, HE. B- Corte representativo da área adjacente normal do grupo RT-Pós - 6 meses, objetiva de 4x, HE89
- Figura 17-** Corte representativo da expressão imunohistoquímica do VEGF-A, VEGFR1 e VEGFR2 das áreas lesionada (A, B e C) e adjacente normal (D, E e F) do grupo C - 3 meses, respectivamente90
- Figura 18-** Corte representativo da expressão imunohistoquímica do VEGF-A, VEGFR1 e VEGFR2 das áreas lesionada (A, B e C) e adjacente normal (D, E e F) do grupo C - 6 meses, respectivamente92
- Figura 19-** Corte representativo da expressão imunohistoquímica do VEGF-A, VEGFR1 e VEGFR2 das áreas lesionada (A, B e C) e adjacente normal (D, E e F) do grupo RT-Pré - 3 meses, respectivamente94
- Figura 20-** Corte representativo da expressão imunohistoquímica do VEGF-A, VEGFR1 e VEGFR2 das áreas lesionada (A, B e C) e adjacente normal (D, E e F) do grupo RT-Pré - 6 meses, respectivamente96
- Figura 21-** Corte representativo da expressão imunohistoquímica do VEGF-A, VEGFR1 e VEGFR2 das áreas lesionada (A, B e C) e adjacente normal (D, E e F) do grupo RT-Pós - 3 meses, respectivamente.....98
- Figura 22-** Corte representativo da expressão imunohistoquímica do VEGF-A, VEGFR1 e VEGFR2 das áreas lesionada (A, B e C) e adjacente normal (D, E e F) do grupo RT-Pós - 6 meses, respectivamente.....100
- Figura 23-** Corte representativo da expressão imunohistoquímica do FVW das áreas lesionada (A e B) e adjacente normal do grupo RT-Pré - 3 e 6 meses, respectivamente103

- Figura 24-** Análise das duas fontes de variação, grupos C, RT-Pré e RT-Pós pertencentes aos períodos de 3 e 6 meses e os locais de coleta, e correlação das diferenças individuais, para o marcador VEGF.....104
- Figura 25-** Análise das duas fontes de variação, grupos C, RT-Pré e RT-Pós pertencentes aos períodos de 3 e 6 meses e os locais de coleta, para o marcador VEGFR-1105
- Figura 26-** Análise das duas fontes de variação, grupos C, RT-Pré e RT-Pós pertencentes aos períodos de 3 e 6 meses e os locais de coleta, e correlação das diferenças individuais, para o marcador VEGFR-2..106
- Figura 27-** Média das DVSs dos grupos C, RT-Pré e RT-Pós pertencentes aos períodos de 3 e 6 meses e respectivos locais de coleta, para o marcador VWF107

RESUMO

Gomes LP. *Avaliação dos fatores de crescimento endotelial vascular VEGF e de seus principais receptores VEGFR-1 e -2 no processo de cicatrização com influência da radioterapia em ratos da linhagem Wistar* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Danos teciduais de qualquer natureza desencadeiam uma série de eventos que irão promover a regeneração ou a cicatrização do tecido lesado. Este reparo é um processo complexo que envolve a interação de diversos tipos celulares que são ativados por uma vasta gama de mediadores químicos, componentes da matriz extracelular, microorganismos e alterações físico químicas no microambiente da lesão e das áreas adjacentes. A participação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e de seus dois principais receptores (VEGFR-1 e -2) é de grande importância nos processos de cicatrização levando-se em conta a neovascularização. Após uma análise circunstanciada da literatura sobre os efeitos da radioterapia na neovascularização e a relação com a expressão do VEGF e VEGFR-1 e -2 na cicatrização observou-se que ainda há uma série de questões a serem investigadas. O objetivo desse projeto de pesquisa é estudar a expressão imuno-histoquímica do VEGF e VEGFR-1 e -2 e a densidade vascular sanguínea (DVS) após incisão e reparação cutânea em animais sob influência da radioterapia e em um período de aproximadamente seis meses. Neste estudo foram utilizados 60 ratos da linhagem Wistar distribuídos aleatoriamente em seis grupos (controle 3 e 6 meses, radioterapia pré-cirúrgica 3 e 6 meses, radioterapia pós-cirúrgica 3 e 6 meses). Após a eutanásia dos animais de acordo com os princípios bioéticos, foram retirados os espécimes alvo que foram avaliados macro e microscopicamente. O estudo imuno-histoquímico dos VEGFs foram realizados usando os anticorpos específicos supracitados nas diluições especificadas pelo fabricante, enquanto o estudo do DVS foi realizado com o anticorpo Von Willebrand Factor (VWF) que foi utilizado para marcar especificamente as células endoteliais. Nos períodos de tempo estudados, evidenciou-se a expressão significativa destes fatores de crescimento no tecido, na maioria dos casos. Os casos primeiramente irradiados apresentaram celularidade bizarra, com células gigantes e multinucleadas, estruturas do estroma hialinizadas e necrose imunomarcadas de moderada a forte para receptores de VEGF no endotélio e vasos sanguíneos. Essas características são consistentes com a literatura, uma vez que a forte relação do VEGFR-2 e a sua persistência na neovascularização e formação de tecido de granulação foram evidenciados. Os resultados mostraram que a expressão de VEGF é constantemente expressa em diferentes tempos da cicatrização de feridas e formação de cicatriz.

Descritores: 1.Cicatrização/efeitos de radiação 2. Neovascularização patológica/radioterapia 3.Radioterapia 4.Fator A de crescimento do endotélio vascular 5.Receptores de fatores de crescimento do endotélio vascular 6.Ratos Wistar

SUMMARY

Gomes LP. *Evaluation of vascular endothelial growth factors VEGF and their main receptor VEGFR-1 and -2 in the healing process with the influence of radiotherapy in Wistar rats* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

Tissue damages of any nature unchain a series of events that will promote regeneration or healing of the injured tissue. This repair is a complex process that involves the interaction of various cells types. These cells are activated by a vast gamma of chemical mediators of the extracellular matrix, microorganisms and chemical and physical alterations in the injury microenvironment and adjacent areas. The participation of vascular endothelial growth factors (VEGF) and their two main receptors (VEGFR-1 and -2) has great importance in the healing process considering neovascularization. After a detailed analysis of the literature about radiotherapy effect in neovascularization and its relation with the expression of VEGF and VEGFR-1 and -2 in the healing, it was observed that there are many questions to be investigated. The objective of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of VEGF and VEGFR-1 and -2 and sanguineous vessel density (DVS) after incision and cutaneous repairing in animals under influence of the radiotherapy at three and six months. This study used 60 Wistar rats randomly distributed in six groups: control, preoperative radiotherapy and postoperative radiotherapy, of 3 and 6 month each. The specimens evaluated macro/microscopically were removed after animal's sacrifice, in accordance to clinical ethics principles. The immunohistochemistry study of VEGFs were conducted using above-mentioned specific antibodies in manufacturer specified dilutions, while the study of the DVS was performed with the Von Willebrand Factor antibody (VWF) which was used to mark endothelial cells specifically. In both periods studied, surgical wound and radiation damages are similar in most cases. The primarily irradiated cases presented bizarre cellularity, multinucleated giant cells, stromal hyalinization structures, moderate to strong necrosis, overexpression of VEGF receptors in the endothelium and blood vessels in consequence of radiotherapy. These findings are in accordance to the literature, since the strong relationship between VEGFR-2 receptor and its persistence in neovascularization and granulation tissue formation were seen. Our results have shown that VEGF expression is constantly expressed in different times of wound healing and scar formation.

Descriptors: 1.Wound healing/radiation effects 2.Neovascularization, pathologic/radiotherapy 3.Radiotherapy 4.Vascular endothelial growth factor A 5.Receptors, vascular endothelial growth factor 6. Rats, Wistar



1. Introdução

Uma condição indispensável à vida é a capacidade de reparar e restaurar, de forma efetiva, a função dos tecidos lesados ou perdidos. O processo de reparação da lesão cutânea visa essencialmente a recuperação das propriedades de defesa da pele, de forma a diminuir a morbidade e mortalidade associadas, através de um conjunto de mecanismos fisiológicos sincronizados e independentes. Mais do que um fenômeno linear, no qual os fatores de crescimento localmente libertados desencadeiam a proliferação celular e a formação de tecidos, trata-se de um processo integrador e dinâmico que envolve mediadores solúveis, componentes sanguíneos (celulares e moleculares), matriz extracelular e células parenquimatosas. Este processo de reparação segue uma sequência temporal, que em condições normais, se resolve dando lugar à formação de uma cicatriz. Este processo pode prolongar-se no tempo (cronicidade) ou conduzir à desvios do processo de cicatrização.

O processo de cicatrização pode ser dividido em 4 fases, que são a fase hemostática, inflamatória, proliferativa e de maturação / remodelação. Os principais mediadores e componentes sanguíneos envolvidos no processo de cicatrização são mencionados na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais mediadores e componentes sanguíneos envolvidos no processo de cicatrização.

Fase de cicatrização	Principais Mediadores
Fase hemostática	Plaquetas, neutrófilos; Fatores transformadores do crescimento (TGF- α e TGF- β); Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF); Fator de crescimento epidérmico (EGF); Fatores de crescimento de fibroblastos (FGF- α e FGF- β); Interleucinas (IL-1a IL-6); Fator plaquetário IV; Fator de agregação plaquetária (PAF); Tromboxanos.
Fase inflamatória	Neutrófilos, macrófagos, monócitos; EGF; Citocinas; Fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais;
Fase proliferativa	Macrófagos, fibroblastos; FGF- α e FGF- β ; TGF- α e TGF- β ; PDGF; Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); Interleucinas (IL-1 a IL-6 e IL-8);
Fase de remodelação	Colágeno tipo III e I Fator de necrose tumoral (TNF- α); PDGF; TGF- β ; EGF.

Alterações de diversas naturezas podem comprometer o processo de cicatrização do tecido lesado.

A Radiobiologia é a área da Ciência que estuda os efeitos das radiações ionizantes sobre os seres vivos. Expostos às radiações, os tecidos biológicos apresentam alterações, interagindo diretamente com os componentes celulares (efeito direto) ou pela radiólise da água (efeito indireto) (1).

As mudanças biológicas resultantes do efeito direto podem levar minutos a semanas e traduzem-se em alterações em que, no período de latência, as células

não se apresentam seletivas, resultando lesões chamadas imediatas. Os efeitos indiretos podem levar meses ou anos, sendo conhecidas por lesões tardias (2).

Apesar dos seus efeitos lesivos, a radioterapia vem assumindo um papel cada vez mais importante no tratamento das doenças neoplásicas com fim curativo ou paliativo (3). Conhecido há muitos séculos, o câncer foi amplamente considerado como uma doença dos países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. Há aproximadamente quatro décadas, a situação vem mudando, e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos. Assim, nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média rendas. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Sem os casos de câncer da pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide para o sexo feminino (4). Entretanto, além da morbidade associada ao câncer, o seu

tratamento produz inúmeros efeitos colaterais, sendo várias as manifestações no processo de cicatrização. As modalidades de tratamento das neoplasias malignas mais comumente utilizadas são três: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. O tratamento cirúrgico do câncer tem dois objetivos principais: ressecção da massa cancerosa e de outros tecidos envolvidos, como os linfonodos e a remoção de órgãos endócrinos que podem modificar a disseminação da doença. Diferentemente do tratamento cirúrgico, a radioterapia e a quimioterapia não são específicos para o tecido, atuando pela inibição do crescimento de células que se dividem rapidamente, interferindo na divisão celular.

Durante séculos, o tratamento de feridas variou com o objetivo de melhores resultados cicatriciais em menor tempo possível. Em uma revisão de literatura, Andrade e colaboradores (5) descreve que já na pré-história vários agentes como extratos de plantas, água, neve, gelo, frutas e lama eram aplicados sobre as feridas. Na Mesopotâmia, elas eram lavadas com água ou leite e o curativo era realizado com mel ou resina. Lã de carneiro, folhas e cascas de árvore eram utilizados para sua cobertura. Os egípcios concluíram que uma ferida fechada cicatrizava mais rápido do que aberta, por isso, utilizavam tiras de pano para manter unidas as margens da lesão. Hipócrates sugeria que as feridas contusas fossem tratadas com calor e pomadas para promover a supuração, remover material necrótico e reduzir a inflamação. No início da era cristã, Celsus preconizava o fechamento primário das feridas recentes e desbridamento das contaminadas para posteriormente poderem ser suturadas. Além disso, classificou os diferentes tipos de lesões de pele e deu detalhes do tratamento de cada uma

delas. A introdução das armas de fogo nas guerras européias no século 14 levou ao surgimento de um novo tipo de ferida de cura mais difícil, e Ambroise Paré, na Renascença reformulou seu tratamento. O avanço da química levou a descoberta de compostos de cloro e iodo que foram utilizados para limpeza do material e da pele nos séculos 18 e 19.

Nas últimas décadas, houve uma evolução nos estudos e interpretações dos fenômenos envolvidos no processo cicatricial, que passaram de avaliações macroscópicas e microscópicas para avaliações a níveis moleculares. Atualmente, conhecem-se as interações entre as células envolvidas no processo de cicatrização, dessas células com as matrizes extracelulares e a função das proteínas denominadas como fatores de crescimento. A complexidade do desenvolvimento da célula endotelial indica que sua regulação envolve muitos fatores de crescimento e diferenciação de tecidos específicos que podem se ligar e ativar receptores endoteliais. A participação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no processo de cicatrização ocorre por meio de diversos mecanismos como angiogênese, deposição de colágeno e reepitelização (6, 7, 8, 9). O VEGF recebeu essa denominação no final da década de 1980. Inicialmente foi descrito como fator de permeabilidade vascular (VPF), ele foi isolado pela primeira vez em líquido ascítico de cobais em 1983. Além dos efeitos angiogênicos e de permeabilidade vascular, outras pesquisas sugerem que o VEGF tem efeitos pró-inflamatório, neuroprotetor e mitótico sobre as células do endotélio vascular (10, 11).

A família VEGF é composta por glicoproteínas com ligação dimérica à citeína que apresentam um peso molecular aproximado de 40 kDa. Os membros da família VEGF em mamíferos são: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário (PLGF). Pertencem a uma superfamília que incluem os fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGF). Há também três receptores que pertencem à família dos receptores tirosina-quinase (RTK): VEGFR-1 (Flt1), VEGFR-2 (KDR) e VEGFR-3 (Flt4). O VEGFR-1 se liga aos VEGF-A e VEGF-B; o VEGFR-2 se liga aos VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D e o VEGFR-3 se liga aos VEGF-C e VEGF-D. O VEGF-A está relacionado principalmente a angiogênese, enquanto o VEGF-C e VEGF-D na linfangiogênese. O VEGFR-2 é o receptor de maior importância no processo de angiogênese e aumento dos efeitos da permeabilidade do VEGF, estando o mesmo envolvido no processo de diferenciação das células endoteliais (12, 13) quimiotaxia e sobrevivência celular (14).

Estes peptídeos são sintetizados por uma gama de células e quando liberado estimula múltiplos componentes da cascata angiogênica (6). Está sendo apontado como o principal regulador da vasculogênese e angiogênese (15). É super expresso durante o início do reparo quando o crescimento de capilares atinge seu máximo (6). O aumento da expressão gênica de VEGF ocorre de forma pronunciada em células como macrófagos e queratinócitos e seus receptores apresentam-se aumentados nos vasos sanguíneos do tecido de granulação.

Os VEGFs são importantes peptídeos que têm sido amplamente investigados em diversas condições, tanto fisiológicas como patológicas. E com

base no papel do VEGF relacionado aos efeitos mitogênicos, quimiotáticos, ao aumento da permeabilidade vascular e no processo de angiogênese podendo potencialmente auxiliar na promoção do reparo de lesões problemáticas (6), e tendo-se o conhecimento da possibilidade de avaliar certos aspectos da angiogênese *in vivo*, despertou-se o interesse em estudar o comportamento destes fatores de crescimento associados às condições que podem influenciar o processo de cicatrização, como por exemplo, a radioterapia, em ratos da linhagem *Wistar*.

Neste contexto, estudos experimentais que objetivam compreender melhor os processos de cicatrização e modulá-los com o intuito de torná-los mais eficientes, podem contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, e portanto têm grande interesse para a Medicina.



2. Objetivo

2.1 Ojetivo Geral

- Avaliar a expressão imunohistoquímica do fator de crescimento endotelial vascular VEGF e de seus principais receptores (VEGFR-1 e -2) em três e seis meses após incisão cutânea em animais com radioterapia pré e pós-cirúrgica.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar e comparar a arquitetura tecidual por meio da técnica de HE com a técnica de imunohistoquímica do VEGF e VEGFR-1 e -2, em três e seis meses após incisão cutânea em animais com radioterapia pré e pós cirúrgica.
- Avaliar a densidade vascular sangüínea (DVS) em três e seis meses após incisão cutânea em animais com radioterapia pré e pós-cirúrgica.
- Analisar o comportamento das áreas adjacentes normais em três e seis meses após incisão cutânea em animais com radioterapia pré e pós cirúrgica.



3. Revisão da Literatura

3.1 Pele

Esta estrutura tegumentar que apresenta a função de revestir e delimitar o corpo humano representa 16% do peso corporal, é formada por epitélio e está ancorada em um tecido conjuntivo propriamente dito. Os epitélios são tecidos formados por células justapostas, com pouca substância extracelular entre elas e não contêm vasos sanguíneos. Enquanto, os tecidos conjuntivos caracterizam-se pela abundância de material extracelular rico em fibras (16, 17).

Desempenha diversos papéis no organismo, como a proteção contra a perda de água, o atrito e contaminação por microorganismos e corpos estranhos. Através de suas terminações nervosas sensoriais, responsáveis pelo tato, pela sensação de prurido e pela percepção de dor e temperatura, a pele exerce comunicação constante com o ambiente. Por meio de vasos sanguíneos e glândulas sudoríparas, também auxilia na regulação da temperatura corporal. Outra importante função é sua ação excretora, desempenhada por suas glândulas sudoríparas, que eliminam catabólitos (16).

3.2 Estrutura da pele de mamíferos

Em geral, a estrutura da pele é similar para todos os mamíferos: possui epitélio queratinizado e pode ocorrer a presença de pêlos, unhas, glândulas sebáceas, sudoríparas e mamárias. A pele é constituída basicamente por duas camadas, a epiderme e derme. A primeira, mais superficial, é formada por tecido epitelial, enquanto a segunda, por tecido conjuntivo. A hipoderme, também conhecida como

tecido subcutâneo, é formada por tecido conjuntivo e localiza-se logo abaixo da derme, mas não é parte constituinte da pele (16) (Figura 1).

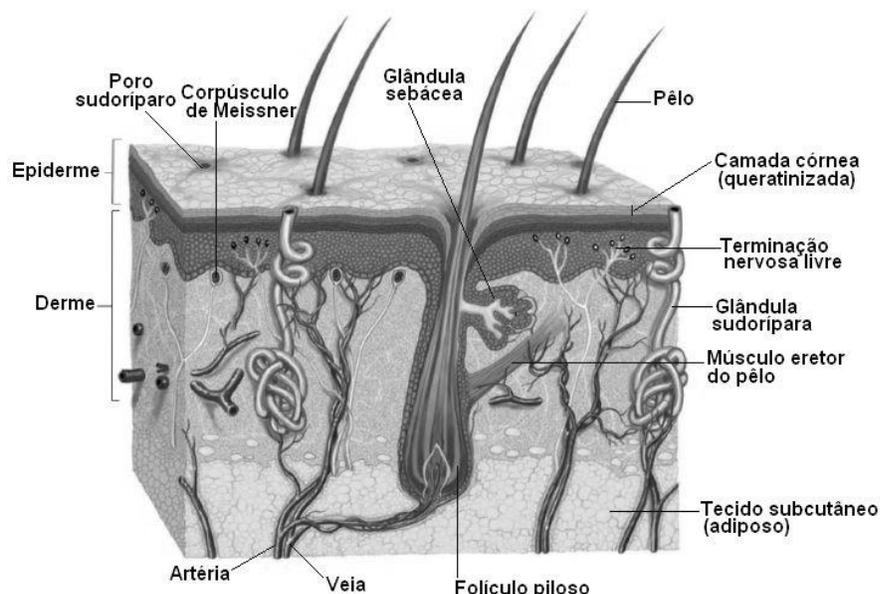


Figura 1 - Esquema representativo da anatomia da pele (18)

3.2.1 Epiderme

Constitui a camada externa da pele e o epitélio que constitui a epiderme é do tipo estratificado pavimentoso queratinizado. Estratificado, porque apresenta várias camadas de células, e pavimentoso, porque a camada mais superficial é composta por células achatadas. Quanto mais próximas da superfície, mais achatadas são as células. O número de camadas celulares que compõem a epiderme varia de acordo com a região do corpo. Geralmente apresenta uma espessura de 0,1mm, com exceção das palmas das mãos e plantas dos pés cuja espessura pode atingir 0,6mm (17).

Em sua maior complexidade, a epiderme apresenta cinco camadas, observadas na figura 2: estrato basal ou germinativo, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato translúcido e estrato córneo. A camada basal é a mais profunda, ou seja, a mais próxima da derme. Também é conhecida como camada germinativa por possuir intensa atividade mitótica e é responsável pela constante renovação da epiderme. É uma camada única de células cubóides ou prismáticas. A camada córnea é a mais superficial, constituída de 25 a 30 camadas de células mortas, achatadas, anucleadas e com o citoplasma repleto de queratina. As outras camadas são intermediárias. À medida que a célula se diferencia, a quantidade de queratina em seu citoplasma aumenta e ela avança para a superfície (16, 19).

Nas regiões onde há uma densa camada de pêlos, a epiderme é delgada e mais simples. O estrato translúcido apenas está presente em regiões onde a epiderme é espessa e desprovida de pêlos, como nos coxins plantares (20).

A epiderme sofre um processo contínuo de proliferação e descamação. As células basais, situadas na junção com a derme sofrem divisão permanente, movendo-se em direção à superfície cutânea. Durante esta migração, a morfologia celular altera-se, havendo síntese e modificação enzimática de lipídios e proteínas. O estrato granuloso é um componente vital da epiderme, pois é o local onde ocorrem as principais transformações que originam a formação do estrato córneo. As células desta camada caracterizam-se pela sua forma irregular e alongada, apresentando grânulos de queratohialina. Estas células são progressivamente transformadas em corneócitos formando o estrato córneo. Durante esta transformação, o núcleo é digerido, o citoplasma desaparece, os

lipídios são libertados para o espaço intracelular, os filamentos intermediários de queratina agregam-se formando microfibrilas e a membrana celular é substituída por um envelope celular. Os corneócitos, resultantes desta transformação, são células planas, de forma pentagonal ou hexagonal, ligadas entre si através dos desmossomos. Todo esse conjunto de transformações formam uma barreira flexível à evaporação da água através do estrato córneo e protetora da pele. A organização intracelular dos lipídios e o grau de coesão entre as células desempenha um papel fundamental na manutenção das propriedades de barreira da epiderme (21, 22).

Na epiderme, além das células epiteliais comuns, encontram-se dois outros tipos de células: os melanócitos e as células de Langerhans. Os melanócitos, geralmente permeados entre as células da camada basal e da camada espinhosa, sintetizam melanina a qual protege a pele dos raios ultravioletas. Através de seus prolongamentos citoplasmáticos, os melanócitos injetam a melanina nas células basais e espinhosas. No interior do melanócito existe uma enzima, a tirosinase, que participa do processo de síntese da melanina. Nos animais albinos, não há produção de melanina por falha da atividade tirosinásica. Já as células de Langerhans são apresentadoras de antígenos e fazem parte do sistema imunitário. Originárias de células precursoras formadas na medula óssea e trazidas pelo sangue, elas se encontram distribuídas por toda a epiderme, mas são mais freqüentes na camada espinhosa (16).

Folículos pilosos, glândulas sebáceas, sudoríparas e mamas são anexos da epiderme que se invaginam na derme e na hipoderme (20).

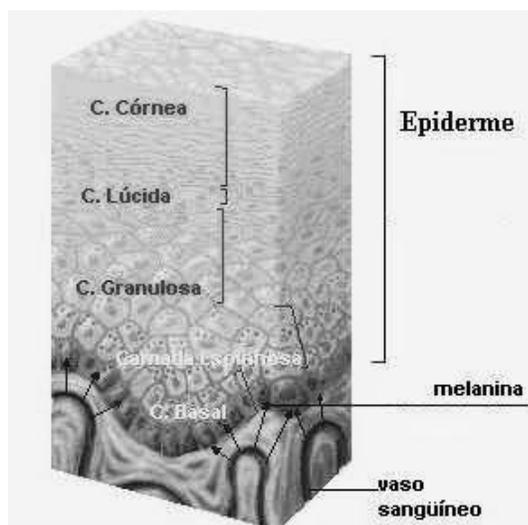


Figura 2 - Esquema representativo dos cinco estratos da epiderme (18)

3.2.2 Derme

A derme é formada por tecido conjuntivo propriamente dito, ou seja, não especializado. Esse tecido é constituído basicamente por células, matriz extracelular e fibras.

O componente celular mais abundante é a célula responsável pela síntese de fibras e de proteínas estruturais que formam a matriz extracelular. Essa célula é chamada de fibroblasto quando se encontra em plena atividade sintetizadora e de fibrócito quando entra em estado de repouso. O fibroblasto é menor, fusiforme, com menos prolongamentos citoplasmáticos e apresenta um núcleo menor e mais escuro. Frente a uma lesão, durante o processo de reparo tecidual, o fibrócito pode reassumir a forma de fibroblasto e sintetizar fibras e componentes da matriz extracelular novamente (16).

No processo de reparo tecidual, também é possível encontrar o miofibroblasto. Essa célula tem a morfologia de um fibroblasto, mas contém maior quantidade de actina e miosina, apresentando características funcionais intermediárias entre um fibroblasto e uma célula muscular lisa. O miofibroblasto auxilia no processo de contração das feridas (16).

Além dos fibroblastos, é possível encontrar outros tipos de células no tecido conjuntivo, como macrófagos, mastócitos, plasmócitos, células adiposas e leucócitos (16).

A porção extracelular do tecido conjuntivo é formada por fibras e pela matriz extracelular, um gel viscoso onde existe um arcabouço de macromoléculas ligando fibras e células. As fibras podem ser colágenas ou elásticas. No entanto, em cortes histológicos corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE), as fibras elásticas dificilmente são visualizadas (16).

3.2.3 Peculiaridades da pele do dorso de ratos

A pele do dorso de ratos é densamente coberta por pêlos. A epiderme é delgada e apresenta quatro camadas: basal, espinhosa, granulosa e córnea. Ao redor dos folículos pilosos, encontram-se as glândulas sebáceas. Não há presença de glândulas sudoríparas (nos ratos, essas glândulas estão presentes apenas nos coxins plantares). Nos ratos albinos, apesar de haver a presença de melanócitos, não há produção de melanina (23).

3.3 Fisiopatologia de lesão cutânea

A integridade cutânea pode apresentar-se alterada por perda, total ou parcial, do órgão ou por modificação da estrutura tecidual. Pode ser causada por diversos fatores, como por exemplo, a lesão, a qual compromete a função de barreira, originando uma complexa resposta de defesa. As causas subjacentes à ocorrência de lesão são multifatoriais e incluem, frequentemente, o trauma (mecânico, químico ou físico), a isquemia e/ou a pressão e a distensão.

3.3.1 Classificação da lesão cutânea

São vários os métodos de classificação das lesões cutâneas. Contudo, devido à grande variabilidade existente e à complexidade do processo de cicatrização, não existem critérios de lesão sejam universais. Desse modo, os métodos mais utilizados na classificação da lesão cutânea baseiam-se na sua etiologia, tempo de cicatrização, profundidade e extensão do tecido lesado e na sua aparência clínica (24).

A lesão cutânea pode ser classificada em função da definição da origem da doença que determinou o seu aparecimento, como por exemplo, lesão no diabético. Esta forma de classificação poderá representar um papel relevante na previsão da cicatrização (24).

Outra classificação ocorre pelo tempo de reparação da lesão cutânea em função do tempo necessário para sua cicatrização, que pode ser classificado como aguda ou crônica. A primeira, designa-se para lesões que cicatrizam sem complicações, tais como intervenções cirúrgicas em pessoas saudáveis bem como

lesões causadas por acidentes ou traumas (21). Enquanto a segunda, apresenta um processo moroso de cicatrização, geralmente com duração superior a três meses, e estão associadas a diversos processos patológicos, tais como insuficiência vascular, isquemia local, necrose e contaminação bacteriana (24).

Baseado na alteração anatomofisiológica da pele, o termo “espessura parcial” traduz uma lesão relativamente superficial, envolvendo danos na epiderme e em parte da derme. Enquanto, o termo “espessura total”, indica uma lesão que envolve tecidos das camadas subcutâneas, abrangendo uma elevada extensão de tecido (24).

E, finalmente, a aparência clínica consiste na observação da coloração e elementos predominante na superfície da lesão. Assim, a presença de uma coloração escura indica uma lesão necrosada, uma coloração amarela é geralmente indicativo de uma lesão infectada e uma coloração rosa indica a existência de um tecido de em epitelização. As lesões cutâneas também podem ser classificadas como não exsudativas, exsudativas e mistas. As lesões não exsudativas incluem as lesões necrosadas, que apresentam crostas e as lesões limpas desidratadas. As exsudativas são lesões que apresentam exsudado, o qual resulta do aumento da permeabilidade capilar e tem como principais constituintes os fluidos extravasados dos vasos sanguíneos, material secretado (tais como fatores de crescimento) a partir das células circundantes à ferida, e fragmentos das células mortas resultantes da destruição da matriz extracelular. As feridas mistas, como a denominação indica, incluem lesões que podem apresentar exsudado, necrose, infecção e zonas de diferentes fases da cicatrização (24).

3.3.2 Classificação da reparação tecidual

Vários profissionais de saúde atuam na promoção da reparação tecidual e a partir da intervenção desses terapeutas sobre as feridas, pode-se classificar estes processos de reparação em: por primeira intenção, por segunda intenção, por terceira intenção (fechamento primário tardio) e cura da ferida de espessura parcial.

3.3.2.1 Reparação tecidual por primeira intenção

Ocorre quando as bordas da ferida são aproximadas logo após o surgimento da ferida, como por exemplo, através de suturas com fios, clipe ou fita, ou ainda pela utilização de enxertos cutâneos ou fechamento com retalhos. Neste caso, a produção de colágeno pelos fibroblastos gera uma cicatriz resistente, e a sua posterior maturação / remodelação através de metaloproteinases geralmente culmina em uma cicatriz de linhas finas. A epitelização cobre a ferida, gerando uma barreira contra o meio externo, e desse modo, uma ferida cicatrizada por primeira intenção se caracteriza muito mais pelos processos de deposição de tecido conjuntivo e epitelização do que de contração, ou seja, apresenta rápida reepitelização e mínima formação de tecido granuloso. Este método é empregado em feridas sem contaminação e localizadas em áreas bem vascularizadas (25).

3.3.2.2 Reparação tecidual por segunda intenção

Ocorre quando a ferida de espessura total da pele é deixada proposadamente aberta, sendo a cicatrização dependente da granulação e

contração da ferida para a aproximação das bordas, ao invés da reepitelização. Incluem biópsias de pele tipo *punch*, queimaduras profundas e feridas infectadas (25).

3.3.2.3 Reparação tecidual por terceira intenção (fechamento primário tardio)

Quando uma lesão contaminada, ou cuja extensão ainda está mal delimitada, é deixada aberta e, após um período de tratamento, é suturada. No período em que a pele e o subcutâneo não estão coaptados, ocorre o desbridamento da lesão através de mecanismos de fagocitose ou intervenções cirúrgicas. Após um período de 3 a 4 dias, inicia-se a neoangiogênese, condição esta que permite suturar o ferimento. Neste caso não ocorre alteração na metabolização do colágeno e a cicatrização ocorre de forma semelhante à da primeira intenção (25).

3.3.2.4 Cura da ferida de espessura parcial

São ferimentos onde há lesão apenas da epiderme e uma parte superficial da derme. Exemplos deste tipo de ferimento são as áreas doadoras de enxerto de pele de espessura parcial ou áreas que sofreram abrasão superficial. Neste tipo de ferimento, a cura da lesão ocorre principalmente por reepitelização, sendo que as principais fontes de queratinócitos são as células tronco adultas localizadas na borda da lesão, ou dos pêlos e glândulas sebáceas (25).

3.4 Cicatrização

Danos teciduais de natureza física, química ou biológica desencadeiam uma série de eventos que irão promover ou a regeneração ou a cicatrização do tecido lesado. O reparo do tecido é um processo complexo que envolve a interação de diversos tipos celulares que são ativados por uma vasta gama de mediadores químicos, componentes da matriz extracelular, células sanguíneas e parenquimatosas, além de alterações físico químicas no microambiente da lesão e das áreas adjacentes (8).

O processo cicatricial é dividido em quatro fases didaticamente distintas: hemostasia, inflamação, proliferação e maturação / remodelação, as quais se inter-relacionam e se sobrepõem em determinado período do tempo, envolvendo elementos celulares e/ou extracelulares. (26).

3.4.1 Fase Hemostática

O processo normal de cicatrização inicia-se imediatamente após a lesão aguda do tecido e tem como primeiro objetivo o controle de uma possível hemorragia, através de vasoconstrição local e formação de um coágulo pela agregação das plaquetas e ativação da cascata de coagulação. As plaquetas colaboram na formação do coágulo, sendo ainda responsáveis, pela liberação de fatores de crescimento e citocinas indispensáveis à cicatrização (27).

A injúria do endotélio promove a formação de um trombo rico em plaquetas (trombo branco), que provisoriamente tampona a lesão endotelial, e logo em seguida é infiltrado pela fibrina (trombo fibrinoso). Em sequência, eritrócitos são

capturados por essa rede fibrinosa (trombo vermelho) que é a principal responsável pela oclusão do vaso sanguíneo rompido. A adesão inicial das plaquetas à superfície lesada ocorre por meio das proteínas de adesão presentes na sua membrana, como por exemplo, os receptores de glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/GP IIIa), o qual possui sítios de ligação para o fibrinogênio, fator de von Willebrand (VWF), vitronectina, fibronectina e trombospondina. Esta interação efetiva a ativação plaquetária. As plaquetas ativadas liberam PDGF, TGF α e TGF β , além de fatores de crescimento epidérmico (EGF), fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) e fatores plaquetários (8). Os coágulos de fibrina atuam como matriz para a colonização por células inflamatórias no local da lesão, atraídas por sinalização química pela ação de PDGF, TGF β , tromboxanos e fator de agregação plaquetária (PAF) e à medida que ocorrem as primeiras migrações, o gradiente é retroalimentado positivamente (8).

3.4.2 Fase de inflamação

O estudo da inflamação tem história antiga e rica, intimamente relacionada com as guerras, feridas e infecções. Celsus (30 a.C.-38 d.C.) descreveu os quatro sinais cardeais: rubor, tumor, calor e dor. John Hunter (1728-1793) compreendia a inflamação como um processo benéfico e de proteção, sem o qual animais e seres humanos não poderiam sobreviver aos seus inimigos. Uma das primeiras descrições microscópicas da inflamação foi realizada por Julius Cohnheim (1839-1884), na qual sequenciou os eventos vasculares, que são dilatação, estase do sangue, marginalização e emigração dos leucócitos (5).

A inflamação é definida como uma reação do tecido vascularizado vivo às agressões. As causas podem ser classificadas em hipóxia, agentes físicos, químicos e infecciosos, reações imunológicas, doenças auto-imunes e distúrbios genéticos. Existem alguns componentes principais no processo inflamatório: proteínas plasmáticas, que extravasam ao espaço perivascular no local da inflamação e justifica a tumefação; células teciduais fixas, como os mastócitos, fibroblastos, leucócitos e plaquetas que migram ao local lesado através da corrente sanguínea; e mediadores da reação inflamatória, que consistem de proteínas, lipídeos ácidos e aminas vasoativas (25).

O conjunto de células envolvidas no estabelecimento de uma resposta inflamatória é constituído principalmente por neutrófilos, monócitos, fibroblastos, que migram em resposta ao gradiente químico e alterações físico químicas do microambiente (comprometimento do aporte de oxigênio) e também são produtoras de substâncias quimiotáticas, como os mediadores de natureza lipídica (eicosanóides) e de natureza peptídica (quimiocinas) (8). Os neutrófilos e monócitos são as primeiras células a migrarem e chegam ao local da lesão cerca de 5 a 6 horas após a sua ocorrência (28). As selectinas, receptores presentes na superfície das células endoteliais, em conjunto com as integrinas, receptores presentes na superfície dos neutrófilos, promovem o aumento da permeabilidade vascular por meio das histaminas e prostaglandinas e auxiliam essas células inflamatórias a aderirem à parede do vaso possibilitando o processo de fuga para o meio extracelular. Assim, ao final de um dia após a lesão os neutrófilos constituirão 50% das células migradas ao local lesado (29). As próximas células

que migram para a região lesada são os macrófagos, que ocorrem ao local da ferida cerca de 4 a 28 horas após a sua ocorrência (30) e além de auxiliarem os neutrófilos na fagocitose de fragmentos celulares, neutrófilos que perdem a função e possíveis agentes contaminantes, fagocitam, processam nos fagossomas e apresentam seus peptídeos pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC) às células T auxiliares, atuando como elo entre o sistema imune inato e o adaptativo (31).

Os macrófagos desempenham um papel vital na progressão da fase inflamatória para a fase proliferativa, não apenas desenvolvendo as funções citadas acima, mas também através da síntese de matriz extracelular por secreção de citocinas (31, 32).

3.4.3 Fase de Proliferação

O período de proliferação divide-se em angiogênese, proliferação fibroblástica e dos miofibroblastos e reepitelização, persistindo do 4º até ao 14º dia, com a função de restabelecer a integridade da derme e epiderme no local da lesão. A angiogênese é essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes em um processo cicatricial e é nesta etapa que macrófagos, fibroblastos e vasos sanguíneos direcionam-se ao local lesado com início da formação do tecido de granulação. Além disso, os macrófagos produzem fatores de crescimento necessários à fibroplasia e à própria angiogênese, os fibroblastos constroem a matriz extracelular e os vasos sanguíneos transportam oxigênio e nutrientes necessários à sustentação do metabolismo celular (33). Os fibroblastos são os

principais produtores de fibras colágenas e responsabilizam-se pela síntese, deposição e remodelação da matriz extracelular, enquanto os miofibroblastos resultam da alteração fenotípica dos fibroblastos, caracterizando-se pela presença de feixes de actina-miosina e microfilamentos organizados em sua membrana citoplasmática. E finalmente, a reepitelização e contração do tecido de granulação são essenciais para manter a continuidade tecidual, reduzindo o tamanho da lesão e estimulando a formação da cicatriz definitiva (34).

3.4.3.1 Angiogênese

A hipóxia estimula a neovascularização, formação de novos vasos sanguíneos, pois o sistema circulatório é essencial para o transporte de oxigênio, nutrientes e moléculas sinalizadoras, e para remoção de dióxido de carbono, metabólitos e de produtos celulares e teciduais (35).

Os macrófagos em baixa tensão de oxigênio e expostos ao excesso de ácido láctico produzem um componente conhecido como fator de angiogênese, responsável pela atração química de células mesoteliais e endoteliais ao local da lesão. De acordo com estudos de Folkman (36), os linfócitos também liberam fator que estimula a angiogênese nos tecidos em cicatrização. Neste processo, outras substâncias angiogênicas são liberadas, como PDGF, fator de crescimento dos fibroblastos alfa e beta (FGF- α e FGF- β), TGF- α e TGF- β e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além de interleucinas um a seis que apresentam propriedades similares e são produzidas por diferentes tipos celulares. Os

diversos fatores angiogênicos executam sua função em estágios diferentes da cicatrização.

Há dois mecanismos para a formação de novos vasos sanguíneos: vasculogênese e angiogênese.

O processo de vasculogênese é caracterizado pela diferenciação *in situ* de angioblastos, com o aparecimento de células endoteliais precursoras derivadas do mesoderme, conhecidas como hemangioblastos (11, 37), que se manifestam somente durante o período embrionário, e levam à formação de um plexo vascular primário. Os fatores envolvidos neste processo são os mesmos fatores angiogênicos que também contribuem para diversos fenômenos fisiológicos e patológicos, incluindo cicatrização, resposta imune, inflamação, desenvolvimento embrionário, crescimento e processos metastáticos de tumores, entre outros (38). No embrião, os primeiros vasos sanguíneos se desenvolvem a partir de agregados de angioblastos que formam uma rede primitiva de simples tubos endoteliais (37). Com o tempo estes canais endoteliais formam um sistema mais complexo ramificado em vasos menores e maiores.

A angiogênese trata-se de um fenômeno complexo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (11, 35, 38, 39, 40) depende da matriz extracelular local para que essa sirva de suporte para as células endoteliais poderem migrar à lesão. Um dos componentes da matriz extracelular mais importante para a formação destes novos vasos é a laminina (28). Sob estímulo dos fatores de crescimento e outros mediadores, as células endoteliais do interior dos capilares intactos adjacentes passam a secretar colagenase e ativador do

plasminogênio, os quais promovem aberturas na membrana basal e permite a migração das células endoteliais em direção ao local da lesão. Uma vez na região externa do vaso, elas passam pelo processo de diferenciação para aquisição da capacidade de formação de novos tubos capilares e formam um broto capilar que em seguida une-se ao capilar de onde eram originárias para o restabelecimento do fluxo sanguíneo (8).

As hemácias e o plasma começam então a fluir através dos novos microvasos levando à união das redes capilares com redes vasculares mais profundas. O complexo entre uma densa camada dos novos vasos com fibroblastos recebe o nome de tecido de granulação. Uma vez que ocorre a aproximação das bordas da lesão, ocorre a remodelação capilar, devido à regressão da demanda metabólica na área lesada e à secreção de fatores inibidores da angiogênese, resultando na formação de cicatrizes maduras e relativamente avasculares (41).

A angiogênese fisiológica e patológica compartilham aspectos muito importantes como a proliferação, migração, invasão através da matriz extracelular e habilidade de acessar a rede vascular pré-existente em busca de suprimento sanguíneo. Em indivíduos adultos a angiogênese fisiológica é essencial no trato reprodutor feminino a cada novo ciclo (ovulação e formação do corpo lúteo), na placenta (nidação e embriogênese) a cada nova gestação, crescimento tecidual, desenvolvimento mamário na lactação, entre outros. No adulto saudável, o *turnover* vascular é extremamente baixo e raramente ocorre a angiogênese (36, 42). Por outro lado, a etiologia e a patogênese de algumas doenças são

determinadas pela resposta angiogênica persistente devido a um aumento dos mediadores angiogênicos ou deficiência dos inibidores de angiogênese, como por exemplo, neoplasias, metástases, psoríases, artrite reumatóide, glaucoma neovascular, oclusões vasculares, retinopatia da prematuridade e diabética, entre outras (11, 36, 42, 43).

A regulação da vasculogênese e da angiogênese é altamente complexa e envolve uma série de sinalizações moleculares ainda não totalmente compreendidas (44). Diversos fatores pró e anti-angiogênicos já foram descritos e um equilíbrio entre estes fatores deve ser mantido para que as células endoteliais se mantenham quiescentes. A maioria das moléculas pró-angiogênicas são proteínas como os fatores de crescimento e moléculas de adesão celular, sinais de diferenciação, sinais quimiotáticos e enzimas que participam do controle da formação de um novo capilar. São classificados em fatores pró-angiogênicos direto e indireto: os primeiros são FGF- α , FGF- β , interleucina 8 (IL-8) e VEGF e são responsáveis pelo estímulo da proliferação e/ou migração das células endoteliais, enquanto os outros não estimulam as células endoteliais *in vitro*, pois é assumido que a migração e/ou proliferação endotelial observada *in vivo* deve ter sido induzida por algum outro fator ou célula, por exemplo o macrófago. (45). O macrófago, derivado de monócitos, além de representar o papel central no processo de reparo, é responsável por coordenar a formação e remodelação do tecido durante o processo de cicatrização (43). Os fatores anti-angiogênicos fornecem o equilíbrio para manter a população de células endoteliais inativas, porém altamente responsiva através de sinais anulados que, se ativados, podem

levar a uma resposta angiogênica deletéria para o organismo. São diversos em sua função e composição, agindo ao atenuar ou bloquear a proliferação de células endoteliais, transdução sinalizadora, migração celular, expressão de metaloproteinase da matriz, sobrevivência celular, desenvolvimento e/ou recrutamento do precursor celular endotelial (40, 43).

Em suma, vários fatores de crescimento envolvidos na angiogênese já foram purificados, entre eles o fator ácido de crescimento de fibroblastos (aFGF), fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), a angiogenina, o fator endotelial II derivado das plaquetas (PD-ECGF), o fator induzido por hipóxia (HIF-1), o fator do crescimento α e β (TGF- α e TGF- β), o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), o fator de necrose tumoral α (TNF- α), o fator de crescimento epidérmico (EGF), a interleucina 1 (IL-1), a interleucina 2 (IL-2), o fator de cicatrização/fator de crescimento do hepatócito (SF/HGF) e o fator de permeabilidade vascular (VPF), atualmente chamado de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (43, 36).

Tanto em condições fisiológicas como patológicas, a família dos VEGFs tem sido descrita como a mais importante reguladora da angiogênese, pois trata-se de um potente mitógeno para o endotélio vascular e modula a expressão de muitas enzimas proteolíticas envolvidas nos processos da angiogênese. É encontrado em muitas áreas em tecidos adultos, indicando sua importância não somente no processo de neovascularização, mas também na manutenção dos vasos existentes. Mais detalhes sobre estas moléculas serão discutidas adiante.

3.4.4 Proliferação fibroblástica e dos miofibroblastos

A presença de macrófagos e seus produtos (mediadores químicos e fatores de crescimento) no local da lesão intensificam a migração e ativação de fibroblastos. Essas células são os principais componentes do tecido de granulação e com o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Este evento recebe o nome de fibroplasia e depende da ocorrência da neovascularização para sua eficiência, pois neste estágio é essencial que ocorra a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas. Com a fibroplasia se inicia a formação do tecido de granulação composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados que têm como suporte uma matriz frouxa de fibronectina (responsável pela fixação da própria célula), ácido hialurônico (auxilia na resistência do tecido à compressão) e colágeno tipo I e II (8). No início estas substâncias predominam na matriz, pois estes componentes propiciam um microambiente eficiente para a movimentação das células, necessária nesta etapa. Porém, os fibroblastos são células que passam por mudanças fenotípicas mais acentuadas e passam a secretar grandes quantidades de colágeno, especialmente o tipo III, o qual aos poucos substitui os proteoglicanos e fibronectina até se tornar o principal componente da cicatriz em formação, iniciando o processo de restauração da pele lesada. Gabbiani *et al.* (34) descreveu as características funcionais dos fibroblastos das regiões marginais similares às células do músculo liso, e relataram que os miofibroblastos são células intermediárias aos fibroblastos e células musculares lisas. Nesta fase, a

expressão de TGF- β explica a grande produção de colágeno e também pode estar relacionada com a contração da ferida que alcança sua eficiência máxima (28).

3.4.5 Reepitelização

Esta fase envolve a replicação e o movimento das células epiteliais através da superfície da lesão com o objetivo de reconstruir a continuidade tecidual. Esta etapa ocorre durante a fase final da cicatrização e é essencial para o restabelecimento da barreira protetora da pele prevenindo a perda excessiva de água e o tempo de exposição aos microorganismos. Este processo é delicado e depende de vários fatores como a humidade, temperatura, oxigenação e pH. Para tanto, novas células estimuladas por citocinas são formadas, oriundas da camada basal, e migram verticalmente para a região da lesão, formando no início uma camada celular simples (8, 46).

3.4.6 Fase de Maturação / Remodelação

Clinicamente, esta é a fase mais importante do processo de cicatrização. A deposição de colágeno no local da lesão caracteriza a maturação cicatricial e inicia-se em torno da 2ª semana após a lesão. O colágeno tipo III deposita-se inicialmente no tecido de cicatrização, seguido do surgimento do colágeno tipo I. Nesta etapa final, o tecido de reparação progride gradualmente de estado altamente celular e vascularizado ao estado com poucas células e vasos

sangüíneos, resultando em um tecido resistente e com fibras colágenas com alto grau de orientação, a cicatriz (8, 46).

Essa fase representa o evento mais tardio da cicatrização de feridas, onde há uma tentativa de retorno à estrutura tecidual normal. O leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, com uma rede capilar atravessando-o e, a rede linfática em franca regeneração, devido sua reconstrução ter início posterior ao da vasculatura. Devido à ação das colagenases, há o equilíbrio na deposição de colágeno novo e a lise do colágeno velho. Com a evolução do processo, o colágeno predominantemente imaturo tipo III será substituído por colágeno maduro tipo I, os macrófagos começam a desaparecer juntamente com a diminuição da angiogênese e da proliferação dos fibroblastos, a matriz extracelular é remodelada por metaloproteinases (colagenases intersticiais, colagenases tipo IV e gelatinases) e observa-se a apoptose de fibroblastos e células endoteliais, formando finalmente a cicatriz. Os principais fatores de crescimento envolvidos nesta fase são TNF- α , PDGF e TGF- β , produzidos por fibroblastos; EGF e TGF- β que são produzidos por células endoteliais (8, 28).

O processo de maturação da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A princípio, a deposição de colágeno é feita de maneira aleatória orientando-se pela organização de fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Subsequentemente, essas fibras são digeridas pela colagenase, resintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo

adjacente e lateralmente unidas por ligações covalentes entre tropocolágenos no âmbito da fibrila e as próprias fibrilas. Repetições sucessivas destes processos formam fibras maiores de colágeno e resultam em uma configuração mais regular da cicatriz (8).

Ao final desta fase, os anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente e as cicatrizes são pouco vascularizadas devido à ausência dos neocapilares.

O resultado do processo de cicatrização normal de uma lesão é o restabelecimento da arquitetura e funções dos tecidos lesados, com a formação de uma cicatriz fina e com um mínimo de fibrose. A lesão crônica, resulta do desvio, por razões múltiplas e complexas, do normal processo de reparação que se traduz, basicamente, pelo prolongamento no tempo, de todo o processo, mas fundamentalmente na passagem da fase proliferativa para a fase de remodelação. Esta parece ser no entanto uma abordagem simplista e pouco satisfatória, uma vez as lesões crônicas apresentam características diferentes quando comparadas às lesões agudas, sumarizadas na tabela seguinte (27) (Tabela 2).

Os eventos teciduais e os períodos descritos acima se referem ao processo de cicatrização por primeira intenção em seres humanos. Autores de textos de patologia voltados à medicina veterinária fazem descrições muito semelhantes para o grupo dos mamíferos, sem distinção entre as espécies (23). Todavia, a ocorrência de algumas variações, especialmente em relação aos períodos de

tempo, já é esperada quando se trata de fenômenos biológicos envolvendo diferentes espécies.

Tabela 2 - Caracterização das lesões crônicas e agudas (adaptado da referência 28)

Lesão crônica	Lesão aguda
Causa subjacente mal identificada	Causa habitualmente decorrente de trauma
Processo lento, cicatrização longa e difícil	Cicatrização rápida, fases previsíveis
Fase inflamatória prolongada/consistente	Fase inflamatória de curta duração
Elevada contaminação que causa atraso na reparação	Contaminação / biocarga bacteriana normal
Proteinases e inibidores desequilibrados / Senescência celular alterada	Reparação tecidual normal com duração inferior a 45 dias

Os eventos teciduais e os períodos descritos acima se referem ao processo de cicatrização por primeira intenção em seres humanos. Autores de textos de patologia voltados à medicina veterinária fazem descrições muito semelhantes para o grupo dos mamíferos, sem distinção entre as espécies (23). Todavia, a ocorrência de algumas variações, especialmente em relação aos períodos de tempo, já é esperada quando se trata de fenômenos biológicos envolvendo diferentes espécies.

3.5 Fator de crescimento vascular endotelial – VEGF

3.5.1 Histórico

3.5.1.1 Fator de permeabilidade vascular (VPF)

Em 1983, Senger *et al.* (10), por meio de estudos que objetivaram a identificação das propriedades fisiológicas dos vasos celulares tumorais, isolaram do líquido de porcos com ascite um peptídeo de sequência de aminoácidos até então desconhecida. Por apresentar característica de permeabilidade vascular cerca de 10000 a 50000 vezes maior que a histamina, essa proteína foi inicialmente denominada de fator de permeabilidade vascular endotelial (VPF). Com estes estudos, os autores concluíram que o VPF poderia ser considerado um mediador específico da hiperpermeabilidade de vasos sanguíneos tumorais e que poderia estar envolvido na formação de ascites associadas ao tumor. Como o VPF não foi sequenciado, permaneceu desconhecido naquela época. Em 1990, Senger *et al.* relataram a purificação e o sequenciamento terminal – NH₂ de VPF da cobaia, proteína que foi inicialmente identificada (47).

3.5.1.2 VEGF

Em 1989, Ferrara e Henzel (48), relataram o isolamento de um mitógeno celular endotelial específico, oriundo do meio que é condicionado pelas células foliculares pituitárias bovinas. Como esta proteína apresentou atividade promotora de crescimento somente em ação conjunta com as células endoteliais vasculares, ela foi denominada VEGF. A purificação e o sequenciamento terminal – NH₂ de VEGF provou que essa proteína era distinta dos outros mitógenos celulares

endoteliais já conhecidos, como FGF, não possuindo semelhança alguma com nenhuma outra proteína já catalogada nas bases de dados. Subsequentemente, o grupo de Conolly e colaboradores, em 1989, relataram o isolamento e sequenciamento do VPF humano de uma linha celular tumoral (hepatocarcinoma) (47, 49).

Ambos os grupos, em dezembro de 1989, descreveram a clonagem cDNA do VEGF e VPF (49) aparentando que o VPF e VEGF eram a mesma molécula. Desse modo, os processos de mitogênese celular endotelial e de indução de permeabilidade vascular são mediados pelo mesmo fator.

VEGF ou VPF possui uma homologia significativa com PDGF (fator de crescimento derivado de plaqueta) e com um outro membro da família do VEGF, denominado fator de crescimento placentário (PLGF). O PLGF pode formar dímeros com o VEGF e, apesar de sozinho apresentar pouca atividade mitogênica ou de permeabilidade, torna-se capaz de potencializar significativamente a atividade de concentrações muito baixas de VEGF (47). PDGF e VEGF atuam em diferentes células-alvos distintas e apresentam diferentes propriedades biológicas.

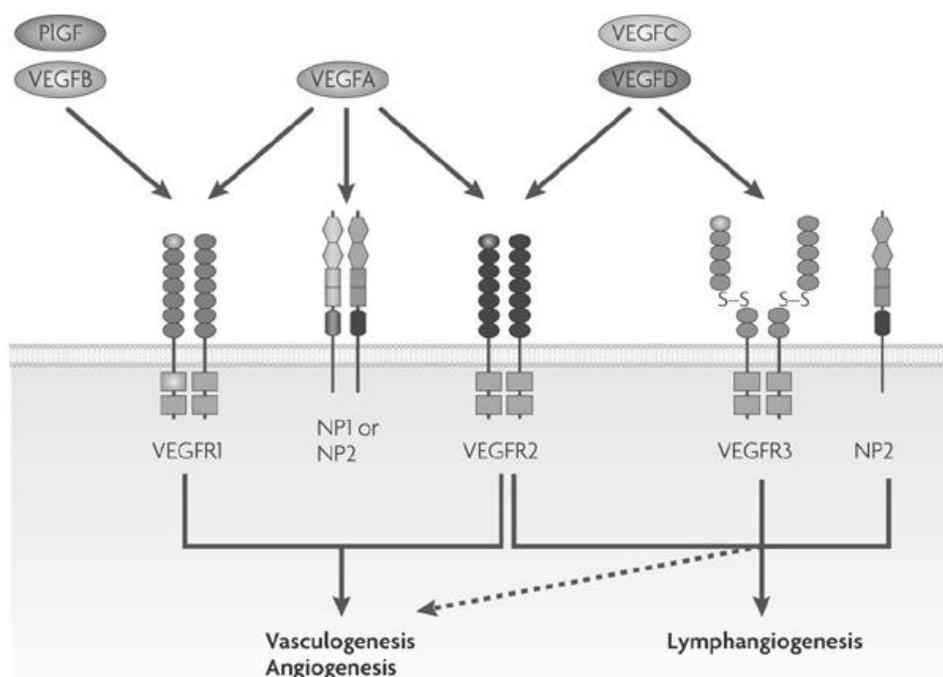
3.5.2 VEGF e suas isoformas

A complexidade do desenvolvimento da célula endotelial indica que sua regulação deve envolver muitos fatores de crescimento e diferenciação de tecidos específicos que podem se ligar e ativar receptores endoteliais, um dos principais fatores relacionados a este processo é o VEGF (9).

O gene humano VEGF está organizado em oito exons separados por sete introns e sua estrutura gênica é composta por 16272 pares de bases que ficam localizados no cromossomo 6p21.3 (50). A família VEGF é composta por glicoproteínas com ligação dimérica à citeína que apresentam um peso molecular aproximado de 40 kDa. Os membros da família VEGF em mamíferos são: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário (PLGF). Pertencem a uma superfamília que incluem os fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGF). Há também três receptores que pertencem à família dos receptores tirosina-quinase (RTK): VEGFR-1 (Flt1), VEGFR-2 (KDR) e VEGFR-3 (Flt4). O VEGFR-1 se liga aos VEGF-A e VEGF-B; o VEGFR-2 se liga aos VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D e o VEGFR-3 se liga aos VEGF-C e VEGF-D. O VEGF-A está relacionado principalmente a angiogênese, enquanto o VEGF-C e VEGF-D na linfangiogênese. O VEGFR-2 é o receptor de maior importância no processo de angiogênese e aumento dos efeitos da permeabilidade do VEGF, estando o mesmo envolvido no processo de diferenciação das células endoteliais (13, 51) quimiotaxia e sobrevivência celular (14). Os receptores neuropilin-1 (NP-1) e neuropilin-2 (NP-2) são co-receptores para algumas isoformas e subtipos de VEGF e PLGF, representados na figura 3 (37,52).

São sintetizados por uma gama de células e quando liberado estimula múltiplos componentes da cascata angiogênica (6). Está sendo apontado como o principal regulador da vasculogênese e angiogênese (15). É super expresso durante o início do reparo quando o crescimento de capilares atinge seu máximo (6). O aumento da expressão gênica de VEGF ocorre de forma pronunciada em

células como macrófagos e queratinócitos e seus receptores apresentam-se aumentados nos vasos sanguíneos do tecido de granulação.



Nature Reviews | Cancer

Figura 3 - Esquema representativo das glicoproteínas da família VEGF, seus receptores e suas interações (52)

São sintetizados por uma gama de células e quando liberado estimula múltiplos componentes da cascata angiogênica (6). Está sendo apontado como o principal regulador da vasculogênese e angiogênese (15). É super expresso durante o início do reparo quando o crescimento de capilares atinge seu máximo (6). O aumento da expressão gênica de VEGF ocorre de forma pronunciada em células como macrófagos e queratinócitos e seus receptores apresentam-se aumentados nos vasos sanguíneos do tecido de granulação.

Os VEGFs são importantes peptídeos que têm sido amplamente investigados em diversas condições, tanto fisiológicas como patológicas. E com base no papel do VEGF relacionado aos efeitos mitogênicos, quimiotáticos, ao aumento da permeabilidade vascular e no processo de angiogênese pode-se concluir o grande auxílio na promoção do reparo de lesões problemáticas (6).

3.5.2.1 VEGF-A

O VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular A), comumente referenciado como VEGF, é a principal molécula relacionada à angiogênese. Existem múltiplas isoformas geradas por *splicing* alternativo que apresentam diferentes propriedades e padrões de expressão. O *splicing* alternativo do mRNA de um único gene envolvendo oito exons codifica inúmeras formas protéicas, as isoformas pró-angiogênicas de VEGF com subunidades polipeptídicas contendo 121, 145, 148, 165, 183, 189 e 206 aminoácidos em humanos. E o *splicing* do sítio de *splicing* distal do exon 8 gera uma outra forma protéica, a isoforma anti-angiogênica de VEGF. A primeira isoforma pró-angiogênica de VEGF-A descrita foi a do VEGF-A₁₆₅, as outras isoformas foram, VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₄₈, VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₈₉ e VEGF-A₂₀₆ foram identificadas entre os anos de 1989 e 2003 sendo geradas por *splicing* alternativo dos exons 6 e 7 que codificam regiões que se ligam ao glicosaminoglicano heparina e moléculas semelhantes. Posteriormente, a isoforma anti-angiogênica, VEGF-A_{165b} foi identificada (Figura 4). Pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares que regulam a expressão das diferentes isoformas (15, 37, 53, 54).

A estrutura da proteína do VEGF-A contém os sítios de dimerização e ligação à heparina e sítios de ligação ao VEGFR-1 e VEGFR-2, que estão presentes em todas as isoformas. Os seis aminoácidos da extremidade carboxi terminal da proteína irão determinar se a isoforma de VEGF em questão é pró-angiogênica ou anti-angiogênica. Esta diferença promove profundas implicações na estrutura, interação com os receptores e função (53).

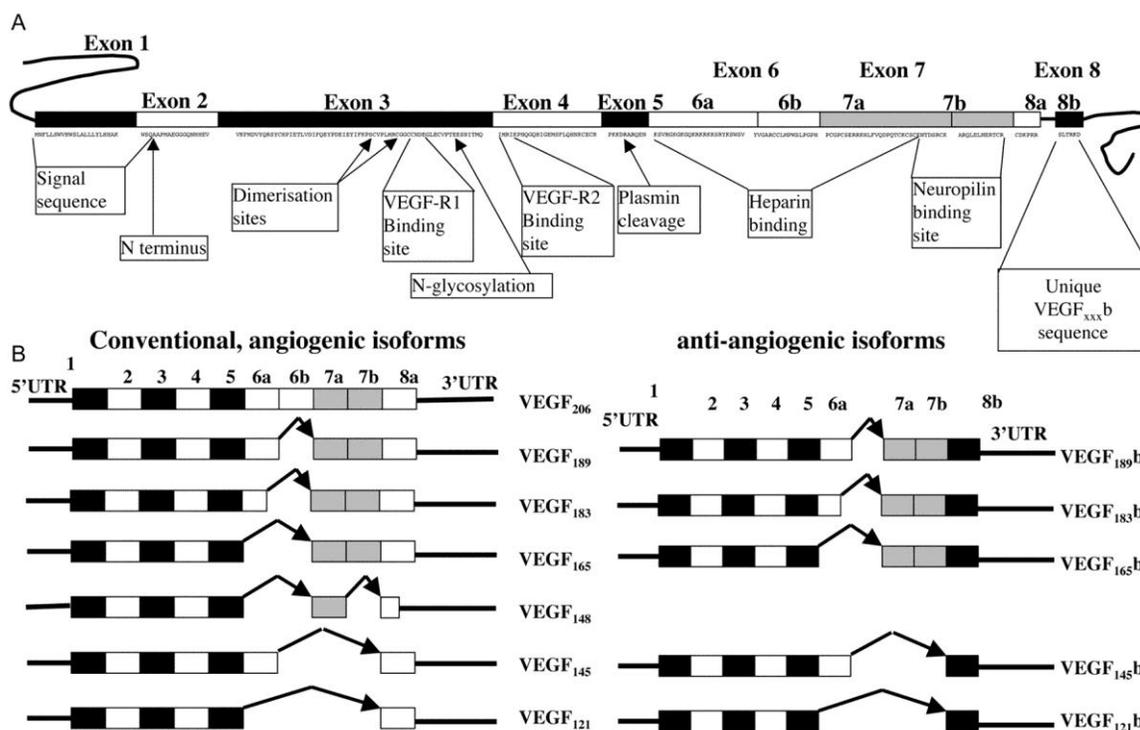


Figura 4 - Estrutura do gene de VEGF e variantes de *splicing* identificadas de VEGF-A. (A) Esquema representativo da estrutura gênica do VEGF-A que apresenta 16272 pares de bases e fica localizado no cromossomo 6 apresentando 8 exons. *Splicing* alternativo nos exons 6, 7 e 8 originam várias isoformas. Os exons 6 e 7 codificam domínios de ligação a heparina. (B) Duas famílias de isoformas de mRNA são produzidas, as isoformas pró-angiogênicas (VEGF-A_{xxx}, a esquerda) e as anti-angiogênicas (VEGF-A_{xxx}b, a direita), sendo xxx o número de aminoácidos da proteína madura. Adaptado da referência 53.

Diversos tipos celulares como células endoteliais, leucócitos, macrófagos e células T ativadas, entre outros tipos celulares, sintetizam o VEGF (11). Hipóxia e hipoglicemia são condições indutoras da síntese de VEGF-A (37).

O VEGF-A é necessário para a quimiotaxia e diferenciação das células endoteliais precursoras, proliferação de células endoteliais, na estruturação das células endoteliais em estruturas vasculares e na remodelação angiogênica (55). Esta molécula age promovendo inúmeras ações, tais como: ativação de proteínas quinase ativadoras da mitose (induz a proliferação celular), abertura de junções entre células endoteliais (aumento da permeabilidade vascular), indução da atividade de metaloproteinases que promove a invasão, estímulo de migração por ativação do óxido nítrico, sobrevivência através de inibição de caspases e indução de Bcl2, e promove alterações do citoesqueleto e hiper regulação da expressão de integrinas (11). Algumas destas funções são igualmente importantes tanto no desenvolvimento vascular em adultos quanto na progressão tumoral (55).

Atualmente, o VEGF-A tem sido descrito como o mais importante regulador da angiogênese tumoral, sendo considerado um importante alvo terapêutico (11, 56). Já existem fármacos aprovados pelo *Food Drugs Administration* (FDA), que inibem a ação do VEGF-A que são utilizados como inibidores da angiogênese no tratamento de diversos tipos de neoplasias malignas (39).

O VEGF-A₁₆₅ é a isoforma fisiologicamente mais abundante e também a mais bem estudada (37).

O VEGF-A_{165b} se liga com afinidade equivalente ao VEGF-A₁₆₅ no receptor VEGFR-2; no entanto, não promove a sua ativação ou estímulo das vias de sinalização subsequentes (15).

3.5.2.2 VEGF-B

O VEGF-B (fator de crescimento endotelial vacular B) apresenta duas isoformas resultantes de *splicing* alternativo de um pré mRNA sintetizado a partir de um único gene contendo sete exons, a isoforma VEGF-B₁₆₇ e VEGF-B₁₈₆. A primeira é a predominante e *in vivo* não é encontrada em forma livre e difusa permanecendo ligada ao proteoglicano heparan sulfato, já a segunda, é secretada e permanece livre (35, 37). O VEGF-B se liga ao receptor VEGFR-1, sendo que a isoforma VEGF-B₁₆₇ pode se ligar ao co-receptor NP-1 (37) e apresenta ampla distribuição tecidual sendo especialmente proeminente no tecido muscular (15).

Até o momento, é o membro menos estudado da família dos VEGFs e ainda não está muito claro (56) o papel biológico deste componente e a sua participação na angiogênese, permeabilidade vascular e nas neoplasias humanas. Aparentemente, este fator está relacionado a sobrevivência das células endoteliais, células musculares lisas e pericitos (35, 56).

3.5.2.3 VEGF-C

O VEGF-C (fator de crescimento endotelial vascular C) é sintetizado como uma pré-proteína que posteriormente é submetida a um processo proteolítico que irá gerar a forma madura deste fator de crescimento (35). Possui uma região com

aproximadamente 30% de homologia com o VEGF-A₁₆₅, contudo está mais relacionado ao VEGF-D por compartilharem na região C e N terminal que apenas ambos apresentam (15). O gene do VEGF-C possui sete exons, e altos níveis de mRNA podem ser encontrados no coração, ovário, placenta, músculo esquelético e intestino de humanos. Inúmeros outros tecidos produzem quantidades mais modestas deste fator de crescimento (35).

O VEGF-C apresenta modesta participação nos processos angiogênicos. Está envolvido na proliferação e migração de células endoteliais, no aumento da permeabilidade vascular e na linfangiogênese (37). Sua participação, na linfangiogênese, ocorre no desenvolvimento embrionário e na manutenção do endotélio linfático em adultos (35). Neste processo, uma forma imatura do VEGF-C se liga ao VEGFR-3, enquanto a forma madura se liga tanto ao receptor VEGFR-2 como ao VEGFR-3. O VEGF-C também interage com o co-receptor NP-2 (37).

Este fator de crescimento representa um potencial alvo nas terapias anti-neoplásicas (35), pois o aumento de VEGF-C em neoplasias malignas correlaciona-se com o aumento da disseminação de células neoplásicas para os linfonodos regionais, sendo em algumas situações, um potencial indicador prognóstico (57).

3.5.2.4 VEGF-D

O VEGF-D (fator de crescimento endotelial vascular D) também é sintetizado como uma pré-proteína que posteriormente é submetida a um

processo proteolítico, gerando a forma madura deste fator de crescimento. A forma imatura do VEGF-D irá se ligar ao receptor VEGFR-3, importante na linfangogênese, enquanto a forma madura pode se ligar ao VEGFR-2 e ao VEGFR-3. O gene do VEGF-D possui sete exons e está localizado no cromossomo X. Altos níveis de transcritos de VEGF-D são encontrados pulmão, coração, cólon e no músculo esquelético de humanos adultos (35).

Este fator de crescimento está relacionado com a indução da proliferação e migração de células endoteliais e participação tanto na angiogênese quanto na linfangiogênese (37). Também é um importante fator relacionado à linfangiogênese tumoral, pois a expressão de VEGF-D encontra-se aumentada em uma série de neoplasias malignas, caracterizando a promoção de metástases linfáticas (58). Logo, esse fator de crescimento representa um potencial alvo terapêutico (35), além de um indocador prognóstico importante (58).

3.5.2.5 PLGF

O PLGF é uma glicoproteína que apresenta homologia de cerca de 42% de sua sequência de aminoácidos, e uma estrutura terciária com características semelhantes ao VEGF-A. O gene do PLGF possui sete exons e quatro isoformas diferentes que podem ser geradas por *splicing* alternativo, como PLGF₁₃₁, PLGF₁₅₂, PLGF₂₀₃ e PLGF₂₂₄. As isoformas PLGF₁₅₂ e PLGF₂₂₄ ligam-se ao proteoglicano heparan sulfo (15, 35). Inicialmente, foi descrita na placenta de humanos, local onde é expressa durante todo o período gestacional. Contudo, sua

expressão também já foi identificada em outros tecidos como o do coração, pulmão e músculo esquelético (15).

Este fator se liga ao receptor VEGFR-1 e a isoforma PLGF₁₅₂ pode se ligar também aos co-receptores NP-1 e NP-2. Estudos relatam que, aparentemente, o PLGF apresenta pouca ou nenhuma capacidade de indução de mitose ou aumento da permeabilidade vascular. Mas, juntamente com o VEGF-A ocorre um aumento da proliferação das células endoteliais, da permeabilidade vascular e da indução da angiogênese guiada pelo VEGF-A, (37) pois o PLGF responsabiliza-se pela indução da migração de células endoteliais e aumento da ação do VEGF-A. Logo, uma outra ação do PLGF, relaciona-se com a neutralização de terapias anti-neoplásicas baseadas no bloqueio da ação do VEGF-A (35).

3.5.2.6 VEGF-Rs

Os VEGFRs (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3) são proteínas tirosina quinase que consistem em um componente extracelular contendo sete domínios semelhantes à imunoglobulina, segmento transmembrana e justamembranar únicos, domínios intracelulares tirosina quinase e uma cauda carboxiterminal. A família dos receptores de VEGFs também é composta por dois co-receptores não enzimáticos, NP-1 e NP-2. O mecanismo de ativação ocorre com a ligação do fator de crescimento ao domínio extracelular do receptor transmembranar e consequente dimerização deste receptor, ativação da atividade proteína quinase, autofosforilação e por fim a ativação de proteínas de vias intracelulares (35).

O VEGFR-1 é um receptor com 180 kDa, com alta afinidade para VEGF-A, VEGF-B e PLGF e é expressado por células endoteliais vasculares, monócitos, macrófagos e células precursoras hematopoiéticas. O VEGFR-2 é um receptor de 200 a 230 kDa, com alta afinidade para o VEGF-A e para as formas maduras de VEGF-C e VEGF-D e é secretado por células endoteliais vasculares e linfáticas, megacariócitos e células precursoras hematopoiéticas. O VEGFR-3 é um receptor de 195 kDa com alta afinidade para VEGF-C e VEGF-D e é sintetizado nas células endoteliais vasculares durante o desenvolvimento embrionário e com o decorrer do desenvolvimento sua síntese diminui e fica restrita aos vasos linfáticos (15, 35, 48).

Os receptores tirosiana quinase por apresentarem características primordiais e indispensáveis, de modo fisiológico e patológico, na regulação do processo angiogênico e linfangiogênico, na permeabilidade vascular e inflamação, mostram-se medidas terapêuticas anti-angiogênicas promissoras (59).

3.6 Radioterapia

3.6.1 História da radioterapia e perspectivas futuras

A radioterapia é uma especialidade médica que utiliza fontes de radiação para o tratamento de doenças. Atualmente, divide-se em duas modalidades: teleterapia e braquiterapia. Na teleterapia a fonte de radiação está distante da lesão a ser tratada, esta distância depende, da técnica a ser empregada e do isocentro da máquina, normalmente de 100cm nos aceleradores lineares, 80cm nas unidades de telecobaltoterapia e 30 a 50cm nos equipamentos de raios X de

ortovoltagem. Já, na braquiterapia a fonte de radiação é colocada sobre ou internamente ao volume a ser irradiado. Existem, na prática, três formas de braquiterapia: intersticial (a fonte radioativa é colocada no interstício do tecido), intracavitária (a fonte radioativa é posicionada em cavidades) e superficial (realizada com aplicadores de superfície ajustados a uma curta distância a área a ser tratada).

Wilhelm Conrad Röntgen, em 1895, ao desenvolver estudos com um tubo de raios catódicos descobriu o raio X. Para esta descoberta, observou que uma placa com um material fluorescente (platinocianeto de bário) brilhava mesmo quando um livro e uma folha de alumínio eram colocados entre o tubo e a placa. Algo saía do tubo, atravessava as barreiras e atingia a placa de platinocianeto. Como os raios que saíam do tubo não eram conhecidos, Röntgen os denominou “raios X”, com o intuito de posteriormente especificar o fenômeno físico. Porém, com a repercussão imediata da descoberta, mesmo depois de descrito o fenômeno, os raios descobertos por Röntgen ficaram mundialmente conhecidos como raios X e em alguns países, como na Alemanha, por raios Röntgen. Ainda em dezembro daquele ano, em mais um estudo, Röntgen fez a radiação atravessar a mão de sua esposa, Bertha, atingindo, do outro lado uma chapa fotográfica, realizando assim, a primeira radiografia da história. Pela descoberta, em 1901, este pesquisador recebeu o primeiro Nobel de Física (60, 61).

Assim como sua repercussão após a descoberta, as aplicações médicas dos raios X e as publicações sobre as aplicações médicas deste fenômeno físico, foram imediatas. Em janeiro de 1896, já era relatada a realização de radiografias,

com fins diagnósticos, na Alemanha, Estados Unidos, Inglaterra, França e Rússia (61).

O físico francês Antonie Henry Becquerel, em 1896, descobriu que um composto de urânio podia provocar fenômenos semelhantes aos do raio X. Posteriormente, estudos do casal Marie e Pierre Curie, que se estenderam até o final de 1898, permitiram a descoberta de mais três novos elementos (tório, polônio e rádio), cunhando o termo radioatividade e descrevendo o fenômeno como uma propriedade de elementos químicos. Por estes estudos, em 1903, o casal Curie e Becquerel, receberam o Nobel de Física; em 1911, Marie Curie recebeu o Nobel de Química. Em 1935, Irene Curie (filha do casal Curie), recebeu o Nobel de Química pela descoberta da radioatividade artificial. Tão rápida quanto a incorporação dos raios X (radiação eletromagnética) à prática médica, foi a utilização dos elementos radioativos (radiação corpuscular) com fins diagnósticos e terapêuticos (61, 62).

Os efeitos dos raios X não se limitavam apenas as suas propriedades físicas, como a de sensibilizar filmes e atravessar um corpo opaco. Os efeitos biológicos foram rapidamente observados pelos próprios pesquisadores, que acabaram desenvolvendo dermatites devido à exposição aos novos raios. Foi este o fato que os levou a especular que os raios X não poderiam ser utilizados com finalidade terapêutica. Em 1896, a primeira paciente de câncer de mama foi tratada por Emil H. Grubbé e, no mesmo ano, o tratamento de um câncer gástrico também foi relatado, na França. No entanto, o uso terapêutico da radiação ficava limitado à energia que se conseguia produzir com os equipamentos da época. Até

1915, conseguia-se uma energia máxima da ordem de 100kV e, apenas em 1920, Seitz e Wintz introduziram a radioterapia profunda, com um aparelho de 200kV, e Coutard passou a utilizar filtros para aumentar a porcentagem de dose profunda. Aparelhos de megavoltagem começaram a ter aplicação apenas no meio da década de 30, quando os primeiros equipamentos de teleterapia utilizavam o rádio como fonte de radiação. No entanto, como o custo desse radioisótopo era elevado e havia dificuldade na obtenção ele foi, na década de 50, substituído pelo Cobalto-60. Apesar de o primeiro protótipo de cobaltoterapia ter sido construído em 1950 pela GE Corporation, o seu uso clínico somente se iniciou em setembro de 1953. Vários equipamentos de energias superiores à do cobalto surgiram nos anos posteriores, dando início a era dos aceleradores lineares, o que constitui atualmente o principal aparelho de um serviço de radioterapia (63).

Quanto a braquiterapia, teve início quando Pierre Curie espalhou rádio impuro em seu braço e um médico, Dr. Danlos, usou pequena quantidade de rádio para preparar aplicadores de superfície no tratamento de lesões de pele, em 1901. Os primeiros braquiterapeutas limitavam-se a inserir grandes tubos de rádio dentro do tumor e retirá-los após um certo período de irradiação. Em 1903, foi relatado o primeiro sucesso da braquiterapia em carcinomas basocelulares da região facial, seguidos das tentativas de tratamento das neoplasias do colo do útero, em 1904. As agulhas de rádio passaram a ser utilizadas em 1914, por Stevenson e Joly. No mesmo período foi desenvolvida uma nova técnica, no Memorial Hospital de Nova York, onde o gás Radônio era armazenado em tubos finos de vidro e depois inseridos no tumor e deixados indefinidamente. Com a descoberta da

radioatividade artificial, em 1934, por Irene Curie e seu esposo, Frederic Joliot, novos elementos foram sendo aplicados, conforme se demonstrava sua maior terapêutica em relação ao rádio. A partir de então vários estudos foram feitos nessa área, surgindo o tratamento a alta e baixa taxa dose, os aplicadores especiais para tratamentos ginecológicos e as técnicas de *afterloading* (1953), diminuindo consideravelmente a exposição ocupacional. Inicialmente, os problemas com a exposição à radiação intimidaram muitos radioterapeutas da época. Associada, no entanto, à falta de oportunidades no treinamento em braquiterapia, ao advento da teleterapia com o cobalto-60 e com os aceleradores lineares e a idéia errônea de que a teleterapia poderia fazer tudo, houve grande diminuição deste método de tratamento nas décadas de 60 e 70. Nos anos 80, contudo, surgiu renovado interesse em todas as formas de braquiterapia, isolada ou associada com outras modalidade terapêuticas, amparado no surgimento de novos radioisótopos, uma dosimetria refinada com uma melhor distribuição de dose, a utilização de computadores, da tomografia computadorizada e da ressonância magnética (63).

Com o advento da terapia multimodal, ou seja, a utilização de mais de uma modalidade terapêutica em pacientes com neoplasias malignas, surge a necessidade de cálculos mais precisos da distribuição da dose, bem como maior acurácia na aplicação das radiações. O tratamento do tumor maligno depende da sua localização anatômica, extensão, tipo histológico e condições gerais do paciente. De Nas últimas décadas, o grande progresso da radioterapia foi em relação às técnicas de tratamento, particularmente os sistemas de planejamento

tridimensional e a técnica de modulação de intensidade do feixe (IMRT), que possibilitam maior concentração da radiação nos alvos a serem tratados, diminuindo a dose em tecidos normais adjacentes.

A técnica de fracionamento modificado também se trata de uma novidade na área de radioterapia. Nela, mais de uma dose é ministrada diariamente e, portanto, o período total de tratamento é reduzido. Deve-se, é claro, reduzir a dose de cada aplicação devido a efeitos somáticos. A maior parte dos estudos mostra um melhor controle tumoral, contudo, há maior chance de surgirem os efeitos adversos das radiações, uma vez que a dose é em torno de 10% a 15% maior que no fracionamento padrão (uma vez por dia) (63).

A utilização de outras partículas especiais, como é o caso de prótons e nêutrons, constitui um campo promissor para radioterapia. No caso dos prótons e íons pesados, a distribuição de dose é mais localizada devido à alta inércia destas partículas e, portanto, uma maior transferência linear de energia (LET) (63).

Outros desenvolvimentos incluem elaboração de novos acessórios de imobilização, avanço das técnicas de irradiação intra-operatória, hipertermia, radioimunoconjugados sistêmicos e terapia fotodinâmica. Recentemente, isótopos radioativos têm sido conjugados com anticorpos para formação de radioimunoglobulinas. Essa combinação visa concentrar o radionuclídeo na região das células malignas. Estudos clínicos têm mostrado altas taxas de resposta positiva em pacientes com linfoma não-Hodgkin de células B (64). Outros estudos promissores ocorrem na área de terapia gênica com radioterapia. Pesquisas com o gene do TNF- α levaram ao desenvolvimento de vírus com replicação deficiente,

que podem ser injetados diretamente em tumores humanos durante o curso de radioterapia externa. Estudos de fase I mostram bons índices de resposta positiva, e novas pesquisas estão sendo realizadas para uma variedade de tumores (65).

A implantação destas novas tecnologias deve, no entanto, levar em consideração a relação custo-benefício, uma vez que inovações como estas demandam alto investimento em comparação com as técnicas padrões. Mas, mais do que inovações tecnológicas, os novos desenvolvimentos visam não só uma possibilidade de cura total, mas buscam, concomitantemente, um aumento na qualidade de vida do paciente.

Para se entender os princípios básicos da radioterapia é preciso conhecer alguns conceitos sobre os mecanismos de interação da radiação com o tecido e seus efeitos biológicos.

3.6.1.1 Aspectos físicos da radioterapia

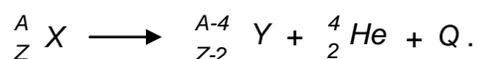
Do ponto de vista físico, as radiações podem ser corpusculares, ou eletromagnéticas. As corpusculares são as que possuem massa, tais como elétrons, prótons e nêutrons; já as eletromagnéticas não têm massa, mas diferentes comprimentos de onda com mesma velocidade, como os raios X e gama (γ). Ainda, quando a radiação interage com a matéria, ela pode ser não-ionizante ou ionizante. É dita não-ionizante, quando não possui energia suficiente para fazer com que pelo menos um elétron do átomo irradiado seja ejetado da sua camada orbital, tornando-o um átomo ionizado. As radiações ionizantes provêm de fontes naturais ou artificiais, e são consideradas quaisquer partículas ou radiações

eletromagnéticas que, ao interagir com a matéria, retira elétrons dos átomos transformando-os em íons (61). Este tipo de radiação apresenta utilidade terapêutica e, para isso, deve ter um poder de penetração no tecido suficientemente grande para permitir deposição de dose a qualquer profundidade em que os volumes-alvo se encontrem. Logo, as partículas alfa, beta e a radiação gama, bem como os raios X são radiações ionizantes (66).

3.6.1.1.1 Emissão de partícula alfa (α)

O decaimento α ocorre principalmente em núcleos pesados, ou seja, de elevados números atômicos. À medida que o número de prótons no núcleo aumenta acima de 82, as forças coulombianas de repulsão se tornam mais fortes a ponto de separar as forças nucleares que mantêm os nucleons unidos. O núcleo instável emite uma partícula composta por dois prótons e dois nêutrons. Esta partícula, que na verdade é um núcleo do Hélio, é chamada partícula α .

Como resultado do decaimento α , o átomo tem seu número atômico reduzido de duas unidades e seu número de massa reduzido de quatro unidades. Uma reação geral que representa o decaimento α pode ser descrita como:



Em que Q representa a energia total liberada no processo e é chamada de energia de desintegração, ou seja, a energia cinética da partícula α (66).

O alcance da partícula α é muito pequeno, como se pode ver na Tabela 3, e isso faz com que ela seja facilmente blindada. Mesmo sem blindagem, a referida

partícula não consegue atravessar a pele. Entretanto, a inalação ou ingestão de uma fonte emissora de partículas α pode causar danos profundos a certas partes do corpo (67). Ao que parece, são emitidas com velocidade não muito inferior a 20 000 km/s. Quando atravessam uma camada de ar, perdem rapidamente energia pela colisão com as moléculas do ar, sendo, por este motivo, retidas em poucos centímetros. Uma folha fina de alumínio barra completamente um feixe de partículas de 5 MeV (68).

3.6.1.1.2 Emissão de partícula beta (β)

A radiação β ocorre na forma de partículas β , que são elétrons de alta energia ou pósitrons emitidos de núcleos atômicos num processo conhecido como decaimento beta. A partícula beta é cerca de sete mil vezes mais leve que a partícula alfa, com velocidade que pode chegar a 95% da velocidade da luz, daí possuindo maior poder de penetração. Ela atravessa uma folha de papel, porém é interceptada por uma fina placa de chumbo. De acordo com seu alcance (Tabela 3), a radiação beta atravessa a camada superficial da pele, podendo causar queimaduras, porém sem chegar a atingir órgãos internos. Existem duas formas de decaimento beta, β^- e β^+ (63).

3.6.1.1.3 Emissão beta negativa (β^-)

Núcleos que possuem um excesso de nêutrons podem alcançar a estabilidade pela conversão de um nêutron em um próton e uma partícula (β^-). Em 1933, Wolfgang Pauli postulou a emissão de uma segunda partícula para

acompanhar cada emissão β . Esta segunda partícula carregaria a diferença de energia entre a partícula β e a máxima em cada caso e não poderia ter carga nem massa. Esta partícula recebeu o nome de neutrino (pequeno nêutron), como símbolo ν , cuja existência foi confirmada em 1956. Reines e Cowan, no mesmo ano, conseguiram detectar antineutrinos ($\bar{\nu}$), sendo que o antineutrino difere do neutrino somente na direção de seu “spin” (orientação do sentido de rotação em seu próprio eixo) (63). Uma reação geral que representa o decaimento β^- pode ser descrita como: $n \rightarrow p + e^- + \bar{\nu}_e$.

Tabela 3 – Alcance das partículas alfa e beta no ar, no tecido humano e no alumínio (70)

Energia (MeV)	Alcance (cm)		
	Ar	Tecido humano	Alumínio
Partículas alfa			
1	0,55	$0,33 \times 10^{-2}$	$0,32 \times 10^{-3}$
2	1,04	$0,63 \times 10^{-2}$	$0,61 \times 10^{-3}$
3	1,67	1×10^{-2}	$0,98 \times 10^{-3}$
4	2,58	$1,55 \times 10^{-2}$	$0,5 \times 10^{-3}$
5	3,5	$2,1 \times 10^{-2}$	$2,06 \times 10^{-3}$
Partículas beta			
0,01	0,23	$0,27 \times 10^{-3}$	
0,1	12	$1,51 \times 10^{-2}$	$4,3 \times 10^{-3}$
0,5	150	0,18	$5,9 \times 10^{-2}$
1	420	0,5	0,15
2	840	1	0,34
3	1260	1,5	0,56

3.6.1.1.4 Emissão beta positivo (β^+)

O núcleo apresenta um excesso de prótons em relação ao número de nêutrons e pode alcançar a estabilidade pela conversão de um próton em um nêutron com a emissão de uma partícula β^+ (pósitron) e um neutrino (63). Uma reação geral que representa o decaimento β^+ pode ser descrita como:



3.6.1.1.5 Emissão de raios gama (γ)

Em alguns casos, após um núcleo sofrer uma das transformações citadas nos itens anteriores, ele ainda contém um excesso de energia, ou seja, permanece em estado “excitado”. Núcleos neste estado intermediário, sofrem outra transformação, emitindo energia na forma de fótons chamados de raios γ , e, só então, retornam ao seu estado fundamental (66).

Consiste em fótons de alta energia, de comprimento de onda muito curto ($\gamma = 0,0005$ a $1,0$ mm). Devido a sua grande energia e, praticamente, ausência de massa, tem alto poder de penetração. Atravessa facilmente uma folha de papel, a placa de chumbo e até uma chapa de aço, apenas sendo barrada por uma parede de chumbo ou um enorme bloco de concreto. Esta radiação eletromagnética passa facilmente através do corpo humano, causando danos irreparáveis às células. Entretanto, quando convenientemente dosada, a radiação γ pode ser utilizada como terapia.

3.6.1.1.6 Emissão de raios X

Todos os tubos de raios X consistem em um cátodo e um ânodo, colocados dentro de uma ampola de vidro onde é feito vácuo. O cátodo consiste em um filamento helicoidal de tungstênio (W), que tem alto ponto de fusão. Quando o filamento é aquecido, elétrons são liberados termoionicamente e acelerados em direção ao ânodo através de uma diferença de potencial entre o filamento (-) e o ânodo (+), constituindo uma corrente eletrônica. Esses elétrons acelerados, ao colidirem com o ânodo, que também é conhecido por alvo, tem parte da sua energia convertida em raios X. Em volta da ampola há uma carapaça metálica que deixa passar somente uma parte da radiação emitida do alvo. Esta radiação que será utilizada nos tratamentos radioterápico é o feixe útil. Este é obtido através de um diafragma que fica no colimador primário (64). Esta radiação eletromagnética apresenta dificuldade de blindagem e têm penetração semelhante aos raios γ .

3.6.2 Unidade de Medida

Para expressar a quantidade de radiação absorvida pelos tecidos, foi proposta inicialmente uma unidade internacional, o rad (radiation absorbed dose), isto é, a diferença entre a radiação aplicada e a que atravessou os tecidos. Recentemente, esta unidade foi substituída pelo Gray, definido como 1 joule por quilograma. O Gray é abreviado como Gy, sendo que: $1 \text{ Gy} = 100 \text{ cGy} = 100 \text{ rad}$ (67).

3.6.3 Aspectos moleculares da radiobiologia

Nos anos seguintes ao descobrimento das radiações ionizantes, foram muitos os avanços tecnológicos no processo de otimização do seu uso e produção, assim como seus estudos sobre seus efeitos no homem. A resposta do organismo de um indivíduo à radiação depende de fatores como dose recebida, características orgânicas individuais, área irradiada e taxa de dose, entre outros.

Os efeitos das interações das radiações ionizantes com as células podem acontecer de forma direta, atuando diretamente nos componentes celulares e danificando uma macromolécula, como DNA, proteínas, enzimas, entre outras e corresponde a 30% do efeito biológico total causado pelas radiações. O outro mecanismo de ação, que é o predominante, ocorre de forma indireta, interagindo com o meio e produzindo radicais livres, a partir das moléculas de água que compõem todos os tecidos do corpo (1). Essas modificações celulares podem ser reparadas através da ação de enzimas. Caso isso não ocorra, surgirão lesões bioquímicas que podem causar danos como morte prematura, alteração no processo de divisão celular e alterações genéticas.

O DNA é um dos principais alvos da radiação, e a quebra das fitas de dupla hélice pode levar a uma lesão letal, ou seja, irreversível e que leva à morte celular. Enquanto, na lesão subletal, que ocorre na maior parte dos casos, ainda há possibilidade de reparo da lesão, principalmente nas células sadias (69).

Existe uma relação importante entre a fase do ciclo celular e a sensibilidade à radiação. A fase de mitose (M) é muito sensível à radiação, provavelmente pela compactação do material genético; porém, a fase de síntese (S) é menos sensível,

devido a presença de mecanismos de reparo mais atuantes. A radiação provoca um retardo em G₂, M, G₁ e S (69)

A morte celular induzida pela radiação acontece por dois mecanismos: a apoptose, mecanismo de morte celular programada, em que se envolvem os proto-oncogenes como bcl-2 e os genes supressores de tumor como p53; ou a morte clonogênica, em que há perda da capacidade de divisão celular e as células resistentes à apoptose vão necrosar, já as não resistentes podem sofrer qualquer um dos efeitos citados. Nas doses altas de radiação, predomina a morte clonogênica; enquanto, nas doses mais baixas, a apoptose (69).

Os efeitos biológicos provocados pela interação das radiações ionizantes com a matéria podem ser determinísticos ou estocásticos. Os efeitos determinísticos acontecem quando a irradiação no corpo, geral ou localizada, provoca mais morte celular do que é possível ser compensada pelo organismo. (limiar de efeitos clínicos). Acima desse limiar a severidade do dano aumenta com a dose. Apesar de esses efeitos possuírem caráter determinísticos, podem ser reversíveis ou não (2). Também podem ser entendidos como efeitos para os quais existe um limiar de dose absorvidanecessário para sua ocorrência e cuja gravidade aumenta com o aumento da dose.

Por sua vez, os efeitos estocásticos acontecem quando a irradiação no corpo humano, geral ou localizada, provoca menos morte celular do que é possível ser compensada pelo organismo. A morte de algumas células podem não causar dano algum, e a modificação de uma única células pode provocar uma lesão maligna. Esse tipo de efeito possui caráter probabilístico, ou seja, leva a um

aumento na probabilidade do dano e não na severidade do dano (2). Para a ocorrência desses efeitos não existe um limiar de dose.

3.6.4 Efeito da radiação na cicatrização

A radiação ionizante produz efeitos agudos e tardios sobre a pele e os tecidos subcutâneos (70) que têm profundas implicações para a cicatrização da ferida cirúrgica. A radiação induz alterações degenerativas agudas em membranas basais e aumenta a permeabilidade vascular. As alterações na vasculatura podem incluir estase e oclusão, edema das paredes vasculares e trombose, além disso, a radiação pode reduzir a neovascularização (71). Eventualmente, pode ocorrer perda progressiva dos vasos e substituição de tecido fibroso. Os fibroblastos podem ser permanentemente alterados pela radiação e como consequência não produzem colágeno suficiente para acompanhar as demandas da cicatriz, ou o colágeno que é produzido não amadurece rápido o suficiente para atender as demandas das fases agudas da cicatrização. Os efeitos tardios da radiação atribuíveis à lesão dos fibroblastos inclui atrofia, contrações e fibrose (70, 72, 73, 74).

Experiências clínicas anteriores mostraram que muitos tecidos irradiados cicatrizam mal, sugerindo que a radiação pode ser utilizada terapeuticamente para cicatrização pós-operatória de modulação. A betaterapia é uma modalidade de radioterapia (braquiterapia superficial) que utiliza fontes emisoras do tipo β e logo após a cirurgia pode ser focalmente irradiada no local da lesão (3), tornando-se o ideal para a prevenção e tratamento de doenças dermatológicas tais como

quelóides, algumas lesões bastante superficiais da pele e doenças oftalmológicas como pterígio (75).

Quelóides ou cicatrizes hipertróficas da pele podem aparecer em algumas pessoas como resposta incomum do organismo a algum trauma cutâneo. Estudos indicam que a incidência de quelóide é mais acentuada em pessoas de pele escura e de descendência oriental. Há uma excessiva produção de tecido fibroso que, uma vez instalado, não regride espontaneamente. Dependendo da área onde aparece, o quelóide pode provocar prurido e dor, além de expressivo efeito estético indesejável. Muitas vezes por questões psicológicas e clínicas o paciente procura o especialista desejando se livrar do problema. O tratamento típico é a cirurgia seguida por um procedimento que tente impedir ou diminuir a proliferação dos fibroblastos. A irradiação retarda a cicatrização, efeito colateral muito útil no tratamento do quelóide, que pode diminuir a taxa da recidiva da lesão de 50 a 92% dos casos tratados (63, 76).

Pterígio é uma neoformação fibrovascular da conjuntiva do bulbo bem frequente nos países tropicais, sendo que no Brasil sua incidência no Estado do Rio Grande do Norte é acentuada. A grande maioria das lesões (98%) surgem no canto nasal. Seu tratamento é inicialmente cirúrgico com excisão da lesão, no entanto apresenta taxa de recidiva em torno de 30 a 60% dos casos operados. Dentre as várias técnicas utilizadas após a cirurgia para se prevenir a recorrência do pterígio, a betaterapia é a que apresenta melhores resultados. Esta terapia administrada com placa oftalmológica de ^{90}Sr , introduzida em 1950, impede a formação da nova cicatriz por inibição das células endoteliais dos brotos

vasculares, com conseqüente inibição da migração de fibroblastos (77). Aplicações locais de até 2500 cGy de radiação β foram encontrados para ser relativamente bem tolerados pelo olho, e tem sido previamente demonstrado ser eficaz na prevenção da recidiva do pterígio (3).

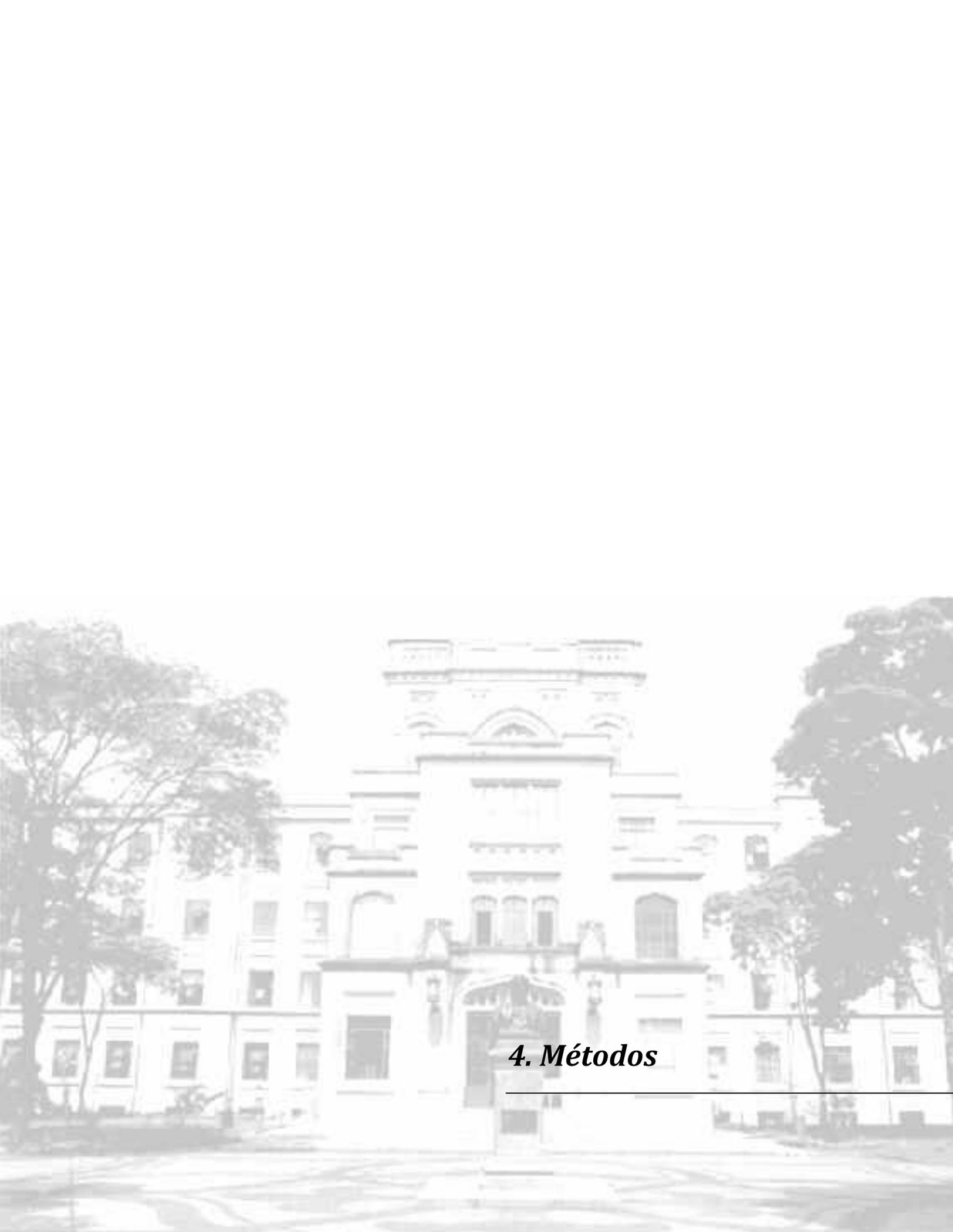
Os aplicadores mais utilizados no Brasil possuem como elemento emissor de radiação o Estrôncio-90 (^{90}Sr), que possui uma meia vida de 28,5 anos evitando a necessidade de substituição frequente do elemento no equipamento utilizado e emite partículas β de energia máxima de 0,546 MeV (66, 77, 78). Do decaimento radioativo do ^{90}Sr obtém-se o elemento Ytrio-90 (^{90}Y) com 64,1 horas de meia vida e energias de 2,279 MeV (99,99% das transições) e 0,519 MeV (0,01% das transições). O ^{90}Y por sua vez decai em zircônio-90 que é estável. A dose máxima de radiação se dá na superfície do tecido. Com estas características, os aplicadores atualmente em uso, não apresentam grandes exigências de proteção radiológica, sendo armazenados em recipientes de mínimas espessuras de chumbo e estrutura de madeira. Durante o manuseio destes aplicadores, utiliza-se como barreira primária material de baixo número atômico como plástico de espessura de aproximadamente 10mm. Os aplicadores normalmente são constituídos de placas metálicas nas quais o ^{90}Sr é depositado em uma das superfícies. Estas placas podem ser planas (com dimensões de aproximadamente 10 a 22,57 mm de diâmetro, ou 2 cm x 1 cm ou 2 cm x 2 cm) que são utilizadas em aplicações dermatológicas. Placas côncavas (com diâmetro de 10 a 15 mm de raio de curvatura) são utilizadas para aplicações oftalmológicas. A face da placa colocada em contato com a pele ou com a esclera

é coberta por um plástico de polietileno com espessura de aproximadamente 1,0 mm, no sentido de barrar os elétrons de baixa energia que são gerados no decaimento do ^{90}Sr (75, 66).

Friedell, Thomas e Krohmer (1954) (78, 79) estabeleceu que o ^{90}Sr radioativo é a melhor fonte de radiação beta, eles foram os primeiros a usá-lo. Ele emite energia eficaz que penetra suficientemente nos tecidos. O seu alcance não excede a profundidade de 8 milímetros, mas seu centro com efeito terapêutico é de cerca de 3 a 4 milímetros. Setti (1960) (79, 80) experimentalmente aplicou ao antebraço esquerdo de dois pacientes, em doses únicas que variou de 90 a 7200 repetições, a fim de pesquisar reações na pele. Ele constatou que o eritema manifestou-se dentro das primeiras 24 horas começando com 450 repetições. Doses mais elevadas produziram pápulas e vesículas. As reações recuaram mais de 40 dias, não deixando sequelas.

A literatura (66) diz que as partículas β têm grande poder de ionização e pequeno alcance no tecido, desta forma, a betaterapia acumula doses grandes em volumes pequenos. De acordo com o que já foi citado, a pele consiste de duas camadas distintas, a epiderme e a derme. A epiderme tem uma espessura aproximada de 2 mg.cm^{-2} ($20\mu\text{m}$), esta espessura varia de acordo com a parte do corpo que é considerada. A derme é uma camada de tecido conectivo de 3-4 mm de profundidade e suporta várias estruturas importantes como os pêlos, as glândulas sebáceas e as sudoríparas. Existem também, redes de vasos sanguíneos que correm paralelas à pele em diferentes profundidades. É na camada basal da epiderme, considerada em um intervalo de 20 a $100 \mu\text{m}$ da

superfície, que acontece muitas das divisões celulares, podendo ocorrer os efeitos determinísticos e os estocásticos. A radiação β é capaz de ceder muita energia em um pequeno percurso, ou seja, na irradiação da pele, ela transfere a maior parte de sua energia à camada superficial celular geradora de outras células (81) e a dose absorvida em função da profundidade para várias radiações β é de 10% para 3 mm e de 6% para 4mm (82).



4. Métodos

4.1 Animais

Neste estudo foram utilizados 60 ratos machos da linhagem *Wistar* (**Rattus norvegicus albinus** *Rodentia Mammalia*), pesando de 200 a 350g provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram separados em gaiolas e tiveram acesso *ad libitum* à água e ração comercial. A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório da Disciplina de Técnica Cirúrgica Experimental – LIM-26 da Faculdade de Medicina da USP e manutenção pós-radioterapia e pós-operatória no setor de experimentação do Centro de Bioterismo da FMUSP.

4.2 Grupos de estudo

O total de animais foi distribuído aleatoriamente em seis grupos conforme descrição abaixo:

4.2.1 Grupo controle (C)

Os 20 animais pertencentes a este grupo não receberam radioterapia e permaneceram com alimentação e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para posterior confecção das amostras. Este grupo foi aleatoriamente subdividido em 10 animais submetidos à eutanásia 3 meses após o procedimento cirúrgico e 10 animais submetidos à eutanásia 6 meses após o procedimento cirúrgico.

4.2.2 Grupo radioterapia (RT)

Grupo RT-Pré – Os animais foram submetidos à radioterapia 30 dias antes do procedimento cirúrgico, para posterior confecção das amostras. Este subgrupo foi dividido aleatoriamente em 10 animais submetidos à eutanásia 3 meses após o procedimento cirúrgico e 10 animais submetidos à eutanásia 6 meses após o procedimento cirúrgico.

Grupo RT-Pós – Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico um dia antes à radioterapia para posterior confecção das amostras. Este subgrupo foi dividido aleatoriamente em 10 animais submetidos à eutanásia 3 meses após o procedimento cirúrgico e 10 animais submetidos à eutanásia 6 meses após o procedimento cirúrgico.

Tabela 4 - Distribuição dos animais e seus respectivos grupos

Grupo	Subgrupo	Nº de animais
C	3 meses	10 animais
	6 meses	10 animais
RT-Pré	3 meses	10 animais
	6 meses	10 animais
RT-Pós	3 meses	10 animais
	6 meses	10 animais

4.3 Técnica cirúrgica

Os animais foram anestesiados com associação de Xilazina a 2% (10mg/kg) e Ketamina a 5% (75mg/kg) por via intra-peritoneal. Após indução anestésica, a região dorsal dos animais foi tricotomizada e preparada para realização de incisão em toda a espessura da pele, com tamanho padronizado de

2,0 cm de comprimento (figura 5), e em seguida reparado com sutura em pontos simples separados, com distância padronizada 0,5 cm, utilizando fio de nylon monofilamentado 4-0 agulhado (figura 6).

Em todos os grupos experimentais, ao final das observações pós-operatórias, o procedimento de eutanásia foi feito através da utilização de câmara de CO₂ para roedores. Após coleta das amostras necessárias, os animais foram descartados de acordo com as normas do Grupo de Gerenciamento de Resíduos Hospitalares da FMUSP.



Figura 5 - Ilustração da realização da incisão da pele do animal, após tricotomia

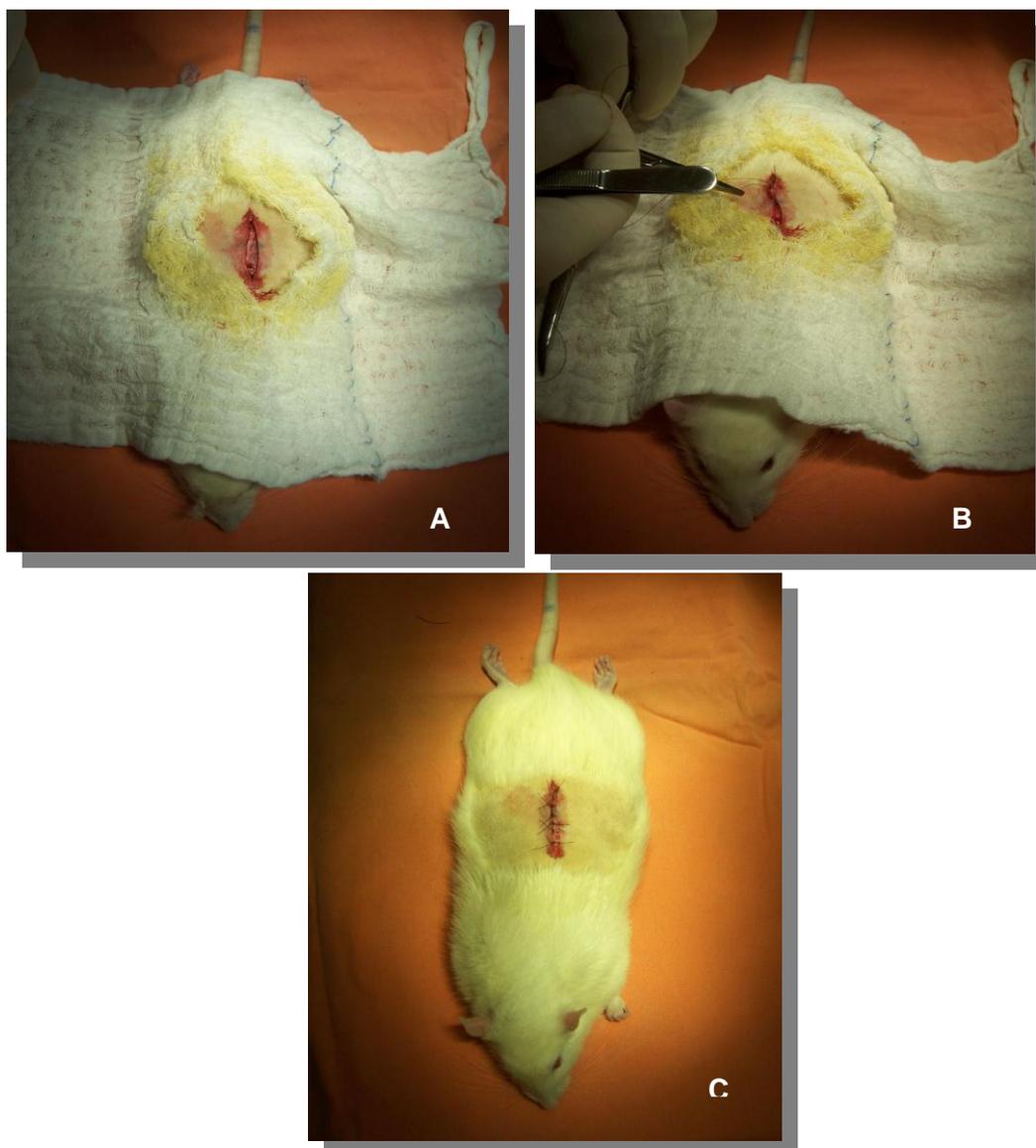


Figura 6 - A - Realização da incisão cirúrgica, B - Realização da sutura, C - reparo com sutura em pontos simples separados, com distância padronizada 0,5 cm, utilizando fio de nylon monofilamentado 4-0 agulhado

4.4 Técnica radioterápica

A radiação β foi fornecida por intermédio de uma fonte portátil, constituída por um aplicador superficial dermatológico de estrôncio 90 ($^{90}\text{Sr} + ^{90}\text{Y}$), em forma

de placa retangular, com dimensões de 2 centímetros de extensão por 2 centímetro de largura.

Os animais foram anestesiados com associação de Xilazina a 2% (10mg/kg) e Ketamina a 5% (75mg/kg) por via intra-peritoneal. A sessão consistiu no contato da placa retangular com a pele do dorso do animal e a dose prescrita antes do procedimento cirúrgico foi de 1800cGy. Para atingir esta dosagem o tempo de irradiação foi de 9 minutos e 40 segundos. Enquanto após o procedimento cirúrgico, a dose foi de 1490cGy. Para atingir esta dosagem o tempo de irradiação foi de 7 minutos e 42 segundos. Uma haste de proteção foi utilizada para facilitar o manuseamento do material radioativo e um cronômetro foi utilizado para medir o tempo (figura 7).



Figura 7 - Ilustração da irradiação pela placa de estrôncio-90

4.5 Análise macroscópica

Observações macroscópicas foram realizadas por meio de análise descritiva de cada grupo em 15 dias, 3 e 6 meses após a radiação. Nos períodos mais longos, as observações foram feitas antes da coleta dos fragmentos de pele.

4.6 Obtenção de cortes histológicos e método de coloração

Fragmentos foram retirados da incisão (área lesionada) e de uma região macroscopicamente adjacente normal, localizados no dorso do animal (figura 8).

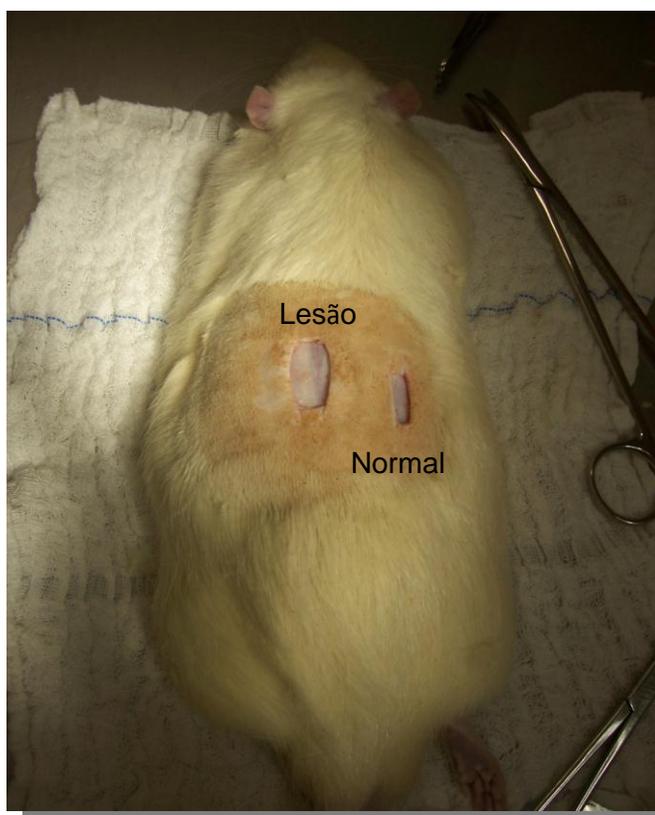


Figura 8 - Ilustração das regiões de onde foram retirados os fragmentos para análise

Os fragmentos retirados foram fixados em solução de paraformaldeído 4% (Merck, Darmstadt, Alemanha) dissolvido em Tampão Fosfato 0,1M de pH 7,2 durante 24 horas.

Para possibilitar a caracterização histopatológica das amostras e para procedermos as análises imunohistoquímicas, quatro cortes de 3 μ m de espessura, dos blocos de parafina originais, foram obtidos em micrótomo (Leica Instruments, Alemanha). Três destes cortes foram reservados para imunohistoquímica e um foi submetido à coloração pelo método da hematoxilina-eosina conforme descrição abaixo:

- desparafinização das lâminas em xilol a 60° C por quinze minutos e xilol em temperatura ambiente por quinze minutos;
- hidratação em concentrações decrescentes de etanol absoluto, etanol 95% e etanol 80%;
- hidratação em água corrente e água destilada;
- coloração pela Hematoxilina de Harris por três minutos;
- lavagem em água corrente e água destilada;
- oito imersões em solução de hidróxido de amônio 0,5%;
- lavagem em água corrente e água destilada;
- passagens sucessivas em concentrações crescentes de etanol 50%, etanol 80% e etanol absoluto;
- coloração pelo eosina por dois minutos;
- desidratação por quatro passagens em etanol absoluto;
- diafanização por quatro passagens em xilol;

- montagem em meio permanente (Entellan Merck, EUA) com lamínula

4.7 Análise microscópica histológica

Todas as observações microscópicas foram realizadas de forma qualitativa, por doutor especializado, por meio de análise descritiva obtida após o estudo cuidadoso de todos os cortes histológicos em microscópio óptico comum com objetivas de 4, 10, 40 e 100 vezes de aumento e oculares de 10 vezes. Entre os principais eventos microscópicos avaliados estão a reestruturação epitelial, análise de anexos e vasos sanguíneos.

Os cortes representativos foram fotomicrografados em microscópio óptico acoplado a uma câmera fotográfica e a um computador contendo o software Image-Pro Plus 7.0.

4.8 Procedimento Imunohistoquímico

Para a avaliação da expressão imuno-histoquímica dos VEGF e VEGFRs e da densidade vascular sanguínea, foram utilizadas secções inteiras das amostras obtidas.

Para análise dos VEGFs e VEGFRs, cada amostra foi observada por doutor especializado e considerada em sua totalidade para análise da intensidade de imunomarcacão e a localizacão da marcacão obtida, se em anexos (glândulas anexas), vasos sanguíneos (endotélio), terminacões nervosas, músculos e parênquima, também foi observada. Os cortes representativos foram fotomicrografados em microscópio óptico acoplado a uma câmera fotográfica e a

um computador contendo o software Image-Pro Plus 7.0. O sistema de graduação utilizado pode ser observado na tabela abaixo (tabela 5).

Tabela 5 - Descrição dos escores atribuídos à intensidades de imunomarcção e localização da marcação, dos VEGF e VEGFRs.

Escore	Imunomarcção
0	Negativo
1	Fraca em anexos
1	Fraca em anexos e vasos sanguíneos
2	Fraca em anexos, vasos sanguíneos e músculos
2	Fraca de terminações nervosas e glândulas anexas
3	Fraca a moderada em anexos
3	Moderada em anexos
4	Moderada em anexos e vasos sanguíneos
4	Moderada de terminações nervosas e glândulas anexas, além de endotélio e células parenquimatosas
5	Forte em anexos
5	Forte em anexos e vasos sanguíneos
5	Forte em anexos e músculos
6	Forte em anexos, vasos sanguíneos e músculos
6	Forte em anexos, vasos sanguíneos e base epitelial
7	Forte em anexos, vasos sanguíneos e base epitelial e presença de reação positiva em núcleos de estruturas pilosas
7	Imunomarcção forte em vasos sanguíneos (endotélio e músculo liso) e fraca em anexos
8	Imunomarcção forte em vasos sanguíneos (endotélio e músculo liso) e fraca em anexos. Presença de núcleos positivos em epitélio escamoso

Todas as amostras submetidas a imuno-histoquímica foram processadas de acordo com o protocolo descrito a seguir:

- desparafinização dos cortes de 3 µm de espessura:
- incubação com xilol a 60° C por 20 minutos seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 15 minutos; sub item da desparafinização

- hidratação dos cortes em concentrações de etanol a 100% com três banhos de 30 segundos cada, etanol a 95%, 80%, 70% por 30 segundos;
- lavagem em água corrente e água destilada;
- recuperação antigênica: incubação das lâminas em solução de ácido cítrico 10 mM pH 6,0 (Merck, E.U.A.) em panela a vapor; após a fervura da água da panela, colocar a cuba com as lâminas em solução de recuperação, por 40 minutos. Deixar esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente. Lavagens em água corrente e água destilada.
- bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H_2O_2) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada;
- lavagens em água corrente e água destilada;
- lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos;
- bloqueio de proteínas inespecíficas com Cas Block (Zymed, EUA) por 10 minutos a 37°C, escorrer e incubar com anticorpo primário;
- incubação das lâminas com anticorpo primário (Tabela 6) diluído em solução de albumina bovina (BSA) (SIGMA, EUA) a 1% e azida sódica NaN_3 (Inlab, Brasil) 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 minutos a 37°C e, em seguida, dezoito horas (over night) a 4°C;
- lavagens em tampão PBS com três trocas de 5 minutos cada;
- incubação com bloqueador do anticorpo primário NovoLink (Novocastra, Reino Unido) por 30 minutos a 37°C;
- lavagens em tampão PBS com três trocas de 5 minutos cada;

- incubação com polímero NovoLink (Novocastra, Reino Unido) por 30 minutos a 37°C;
- lavagens em tampão PBS com três trocas de 3 a 5 minutos cada;
- revelação da reação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (SIGMA, EUA) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfóxido p.a (Labsynth, Brasil) a 1% em PBS, em banho de cinco minutos, a 37°C;
- lavagens em água corrente e água destilada;
- contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagens em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (solução de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada;
- desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e absoluto (três trocas de 1 minuto cada);
- diafanização em 03 banhos de xilol;
- montagem em meio permanente (Entellan Merck, EUA) com lamínula;

Para cada reação imunohistoquímica realizada, foi feito um controle positivo e um controle negativo com incubação em PBS, eliminação do anticorpo primário e execução de todos os demais procedimentos imuno-histoquímicos.

Um sumário dos anticorpos primários utilizados e suas respectivas condições ótimas de trabalho padronizadas pode ser observado na tabela 6.

Tabela 6 – Descrição dos anticorpos primários utilizados e suas condições ótimas de trabalho com seus respectivos fabricantes, proteína alvo, números dos catálogos, clones , métodos utilizados para recuperação antigênica, títulos e kit de revelação.

Fabricante	Proteína Alvo	Nº Catálogo	Clone	Recuperação antigênica	Título	Revelação
<i>Abcam</i>	VEGF	Ab14994	MRVL56/1	- panela a vapor - citrate - pH 6,0	1:200	NovoLink
<i>Abcam</i>	VEGFR-1	Ab2350	Policlonal coelho	- panela a vapor - citrate - pH 6,0	1:100	NovoLink
<i>Abcam</i>	VEGFR-2	Ab2349	Policlonal coelho	- panela a vapor - TRIS 10mM + EDTA 1mM pH 9,0	1:50	NovoLink
<i>Abcam</i>	VWF	Ab6994	Policlonal coelho	- Histozyne - 5 min em TA	1:25000	NovoLink

As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada; contra-coradas com Hematoxilina de Harris e montadas com resina Entellan (Merck, Dermstadt, Germany).

As pesquisas que estudam a angiogênese, além de seguir um delineamento uniforme dos estudos, necessitam seguir critérios padronizados para a identificação e quantificação vascular.

Para análise quantitativa dos vasos, foi realizada a análise da densidade vascular sanguínea (DSV) proposta por Maeda et al., em 1995 (83). Em cada

amostra, sob microscopia de luz e com aumento de 40x, foram identificadas 10 campos que apresentavam maior densidade vascular, e posteriormente, com um aumento de 200x, contam-se manualmente os vasos, sendo o resultado expresso pelo número médio de vasos em cada secção histológica. Nestes campos foram quantificados os vasos imunorreativos ao anticorpo anti-FVW e, posteriormente, realizou-se média aritmética da quantidade de vasos marcados por 10 campos. Vasos sanguíneos, com ou sem lúmen distinto, e células endoteliais isoladas imunorreativas foram considerados no processo de contagem.

4.9 Aspectos éticos envolvidos

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o protocolo de pesquisa nº 0840/09.

4.10 Estatística

As relações dos grupos C, RT-Pré e RT-Pós pertencentes aos períodos de 3 e 6 meses e os locais de coleta das amostras (lesão ou área adjacente normal) foram examinadas para significância estatística usando-se os testes de análise de variância (ANOVA) de duas vias e pós-teste de Tukey quando apropriado. Ambos considerados significativos quando $p < 0,05$. Os dados foram relacionados e analisados com o software GraphPad Prism 6.01 (2012, Graphpad Software Inc).



5. Resultados

5.1 Algumas considerações

Dos 20 ratos que foram submetidos à radioterapia pós-operatória 2 foram a óbito; um do grupo RT - Pós correspondente a 3 meses e outro do grupo RT- Pós correspondente a 6 meses. Além disso, dos 20 ratos controles, 1 dos animais correspondente a 3 meses foi a óbito.

Alguns animais submetidos à radioterapia pré-operatória e pós-operatória apresentaram diarreia a partir do terceiro dia da irradiação, persistindo até o momento da morte nos animais do grupo submetido à radioterapia pós-operatória ou até o momento da cirurgia para a confecção da incisão e sutura no grupo da radioterapia pré-operatória. Esses ratos, após o início da diarreia, apresentaram diminuição da atividade física e indisposição para alimentação, o que provocou perda de peso significativa nos grupos submetidos à radioterapia. Os ratos do grupo controle não apresentaram os efeitos colaterais anteriormente descritos.

5.2 Análise macroscópica

A avaliação macroscópica foi realizada por meio de análise descritiva de cada grupo.

Foi realizado observações macroscópicas 15 dias, 3 e 6 meses após a radiação. Em todos os grupos, no geral, observou-se que os pêlos não cresceram após a tricotomia na região irradiada, além da perda de pigmentação da pele na mesma região (figura 9).

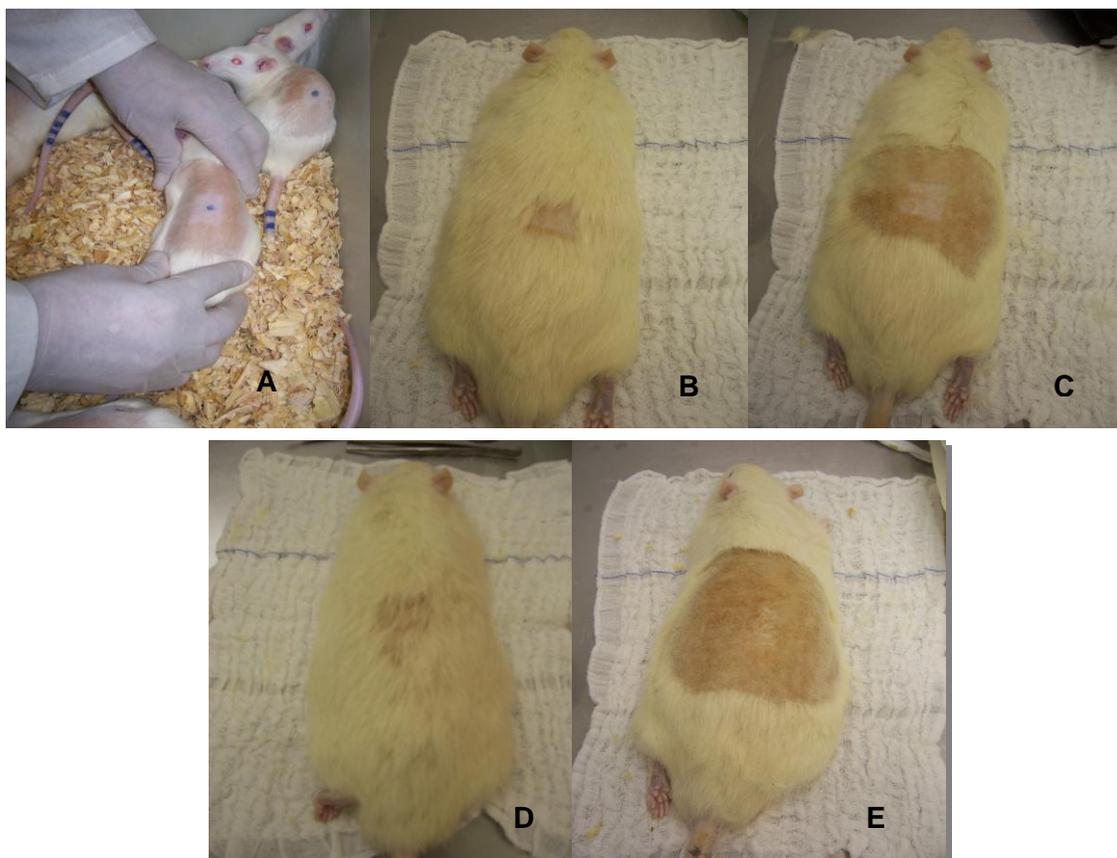


Figura 9 - Análise macroscópica. após a irradiação β . A - 15 dias. B e C - 3 meses. D e E - 6 meses

5.3 Análise microscópica

A avaliação microscópica foi realizada de forma qualitativa por meio de análise descritiva dos principais eventos microscópicos observados, como a reestruturação epitelial, análise de anexos e vasos sanguíneos.

A descrição de cada grupo representa uma visão geral dos eventos microscópicos ocorridos no tecido cutâneo (epiderme e derme) de todos os espécimes do mesmo.

5.3.1 Grupo controle (C)

5.3.1.1 Grupo C: 3 meses

Nas áreas lesionadas (figura 10A), em geral, observou-se estrutura epitelial bem preservada, com poucos anexos (glândulas sebáceas e sudoríparas, além de folículos pilosos) e vascularização sanguínea de aspecto normal. O estroma fibromuscular mostrou-se preservado com discreta infiltração de leucócitos e tecido gorduroso de entremeio. Em alguns casos, observou-se além das características já citadas, maior quantidade de tecido gorduroso.

Nas áreas adjacente normais (figura 10B), notou-se semelhança às amostras lesionadas, ou seja, com estrutura epitelial bem preservada, vascularização sanguínea normal, estroma fibromuscular preservado com discreta infiltração leucocitária e tecido gorduroso de entremeio. Apenas diferenciou-se por apresentar numerosos anexos. Em apenas um caso, observou-se, além das características já citadas, maior quantidade de leucócitos.

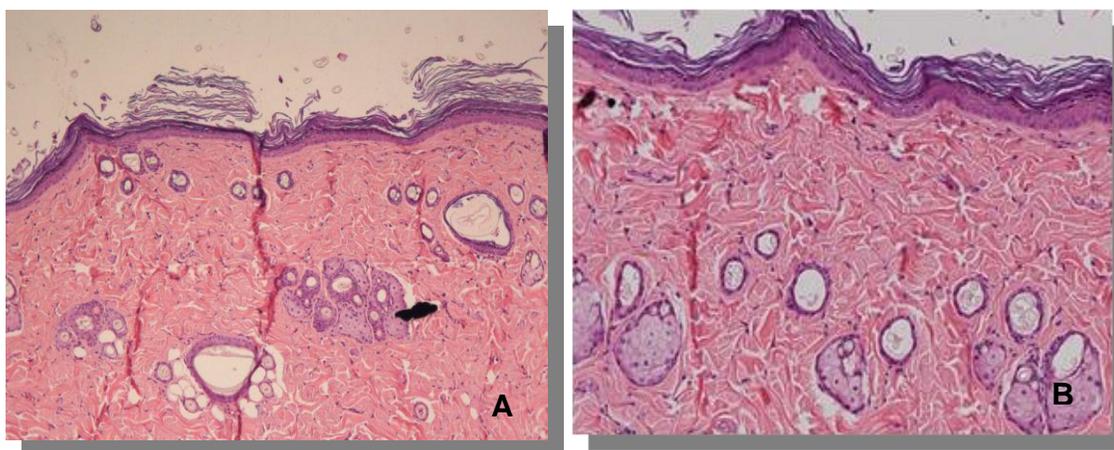


Figura 10 - A- Corte representativo da área lesionada do grupo C - 3 meses, objetiva de 4x, HE. B- Corte representativo da área adjacente normal do grupo C - 3 meses, objetiva de 20x, HE

5.3.1.2 Grupo C: 6 meses

Nas áreas lesionadas (figura 11A), em geral, observou-se estrutura epitelial bem preservada com estroma bem estruturado, numerosos anexos e vasos sanguíneos com aspectos normais. Além das características já citadas, um caso diferenciou-se por apresentar algum grau de necrose em tecido muscular. Outro caso, por apresentar infiltração gordurosa no estroma.

Nas áreas adjacentes normais (figura 11B), no geral, notou-se tecido epitelial e estroma bem preservados com anexos e vasos sanguíneos íntegros. Em apenas um caso observou-se, além das características já mencionadas, maior proliferação epitelial.

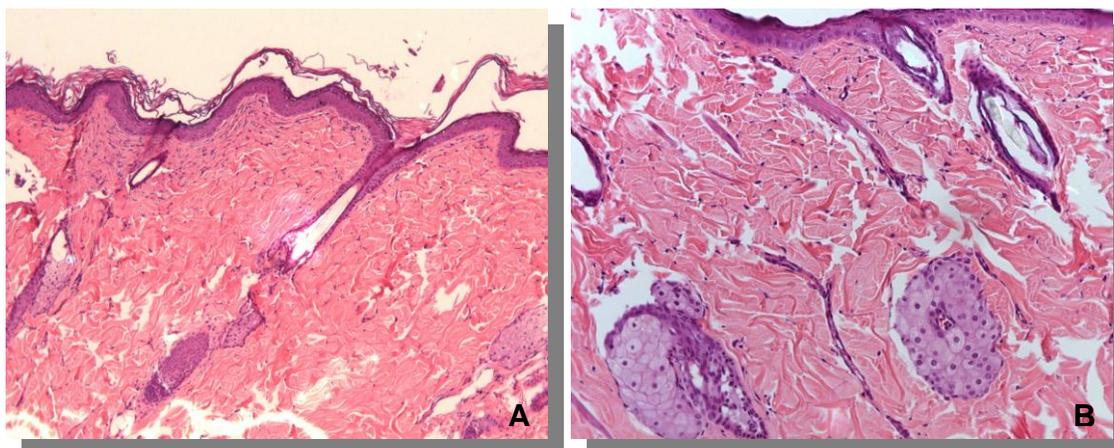


Figura 11 - A- Corte representativo da área lesionada do grupo C - 6 meses, objetiva de 4x, HE. B- Corte representativo da área adjacente normal do grupo C - 6 meses, objetiva de 20x, HE

5.3.2 Grupo radioterapia (RT)

5.3.2.1 Grupo radioterapia pré-cirúrgica (RT-Pré)

5.3.2.1.1 RT-Pré: 3 meses

Nas áreas lesionadas, em alguns casos não foram observadas alterações teciduais dignas de nota. Em outros, observou-se tecido íntegro de aspecto normal com numerosos anexos. E, em quatro dos casos, notou-se a presença de agrupamentos de células com aspecto epitelial atípico e células gigantes multinucleadas (figura 12A e 12B).

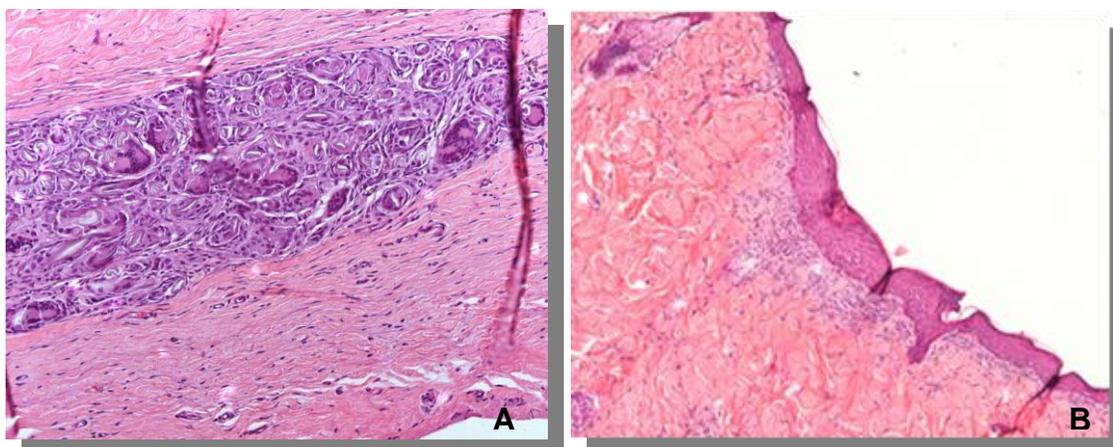


Figura 12 - A- Corte representativo da área lesionada do grupo RT-Pré - 3 meses, objetiva de 20x, HE. B- Corte representativo da área lesionada do grupo RT-Pré - 3 meses, objetiva de 4x, HE

Nas áreas adjacentes normais (figura 13), evidenciou-se porções epiteliais e estromais bem preservadas, com anexos e vasos sanguíneos bem delimitados e feixes musculares íntegros. Em alguns casos foram observados as características citadas, mas com tecido muscular de aspecto necrótico.

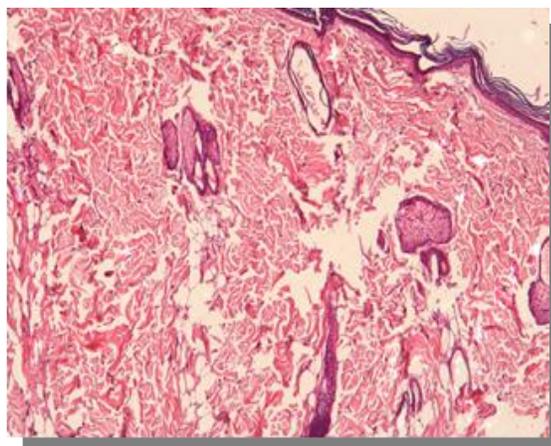


Figura 13 - Corte representativo da área adjacente normal do grupo RT-Pré - 3 meses, objetiva de 4x, HE

5.3.2.1.2 - RT-Pré: 6 meses

Nas áreas lesionadas (figura 14A), observou-se em todos os casos tecido bem preservado com camada epitelial de aspecto normal, anexos e vasos sanguíneos bem preservados e feixes fibromusculares com alterações hialinas significativas.

Nas áreas adjacentes normais (figura 14B), evidenciou-se em todos os casos do grupo tecido epitelial bem preservado, com anexos e vasos sanguíneos íntegros. O estroma apresenta-se espesso e irregular com feixes musculares hialinizados e áreas de necrose.

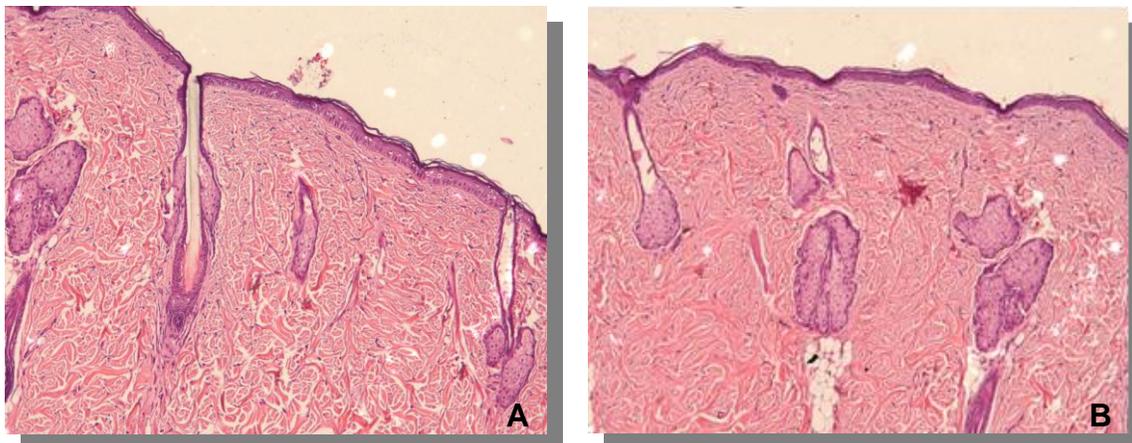


Figura 14 - A- Corte representativo da área lesionada do grupo RT-Pré - 6 meses, objetiva de 4x, HE. B- Corte representativo da área adjacente normal do grupo RT-Pré - 6 meses, objetiva de 4x, HE

5.3.2.2 Grupo radioterapia pós-cirúrgica (RT-Pós)

5.3.2.2.1 RT-Pós: 3 meses

Nas áreas lesionadas (figura 15A), todos os casos apresentaram epitélio bem preservado com anexos e vasos sanguíneos íntegros.

Nas áreas adjacentes normais (figura 15B), no geral, observou-se estrutura epitelial e anexos bem preservados e dispostos de forma usual. Em apenas um caso, evidenciou-se numerosos anexos, além das características já descritas.

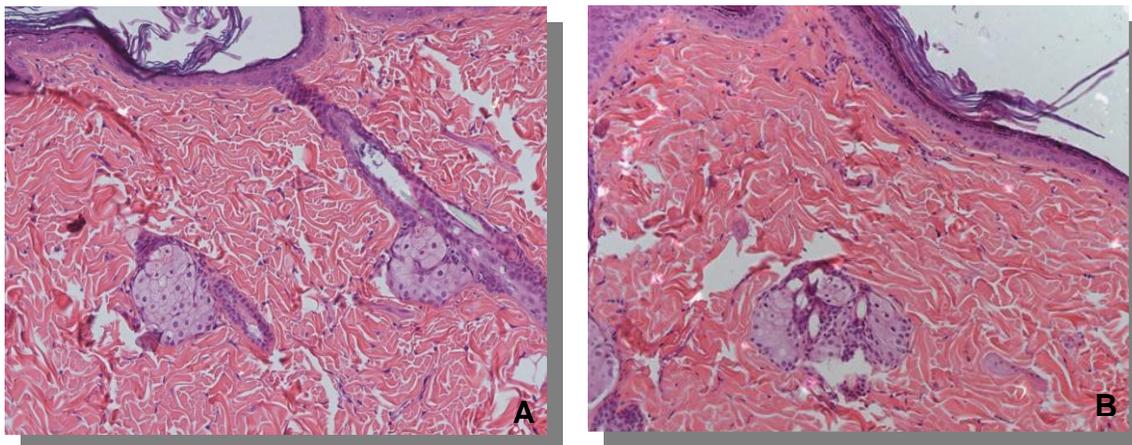


Figura 15 - A- Corte representativo da área lesionada do grupo RT-Pós - 3 meses, objetiva de 20x, HE. B- Corte representativo da área adjacente normal do grupo RT-Pós - 3 meses, objetiva de 20x, HE

5.3.2.2.2 RT-Pós: 6 meses

Nas áreas lesionadas (figura 16A), observou-se em todos os casos tecidos com porções epiteliais e estromais com aspecto normais, com numerosos anexos e vasos sanguíneos bem preservados.

Nas áreas adjacentes normais (figura 16B), evidenciou-se em todos os casos tecido com estrutura epitelial e estromal normais, tecido gorduroso preservado e disperso em meio ao estroma.

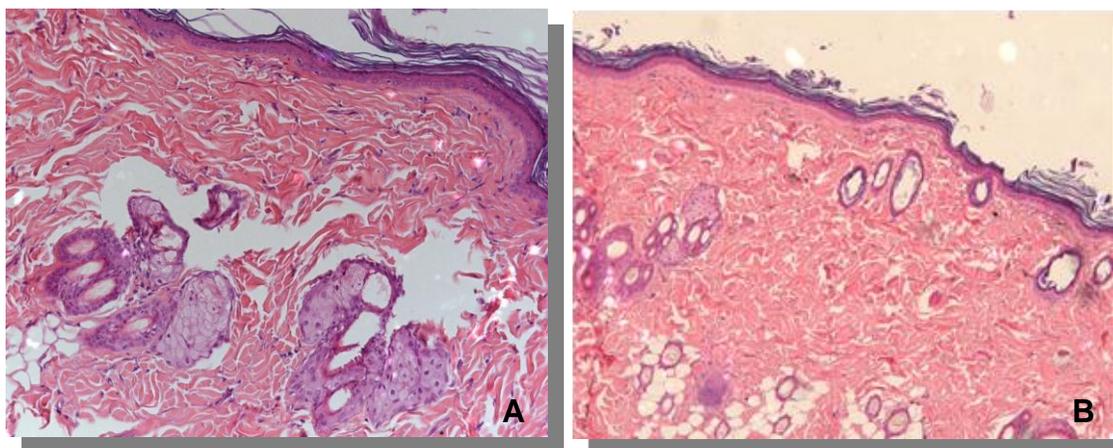


Figura 16 - A- Corte representativo da área lesionada do grupo RT-Pós - 6 meses, objetiva de 20x, HE. B- Corte representativo da área adjacente normal do grupo RT-Pós - 6 meses, objetiva de 4x, HE

5.4 Análise imunohistoquímica do VEGF

5.4.1 Grupo Controle (C)

5.4.1.1 Grupo C: 3 meses

No Grupo C 3 meses, nas áreas lesionadas, na análise do VEGF-A (Fig. 17A) em geral, observou-se imunomarcção fraca nos anexos e alguns casos negativos. Na análise do VEGFR1 (Fig. 17B) a imunomarcção foi moderada nas terminações nervosas, glândulas anexas, endotélio e células parenquimatosas e em outros casos, mostrou-se discreta nas terminações nervosas e glândulas anexas. Na análise do VEGFR2 (Fig. 17C), observou-se uma imunomarcção fraca a moderada nos anexos. Enquanto, nas áreas adjacentes normais, notou-se semelhança às amostras lesionadas para VEGF-A (Fig. 17D), ou seja, imunomarcção fraca nos anexos e alguns casos negativos. Na análise do VEGFR1 (Fig. 17E) a imunomarcção também foi moderada nas terminações

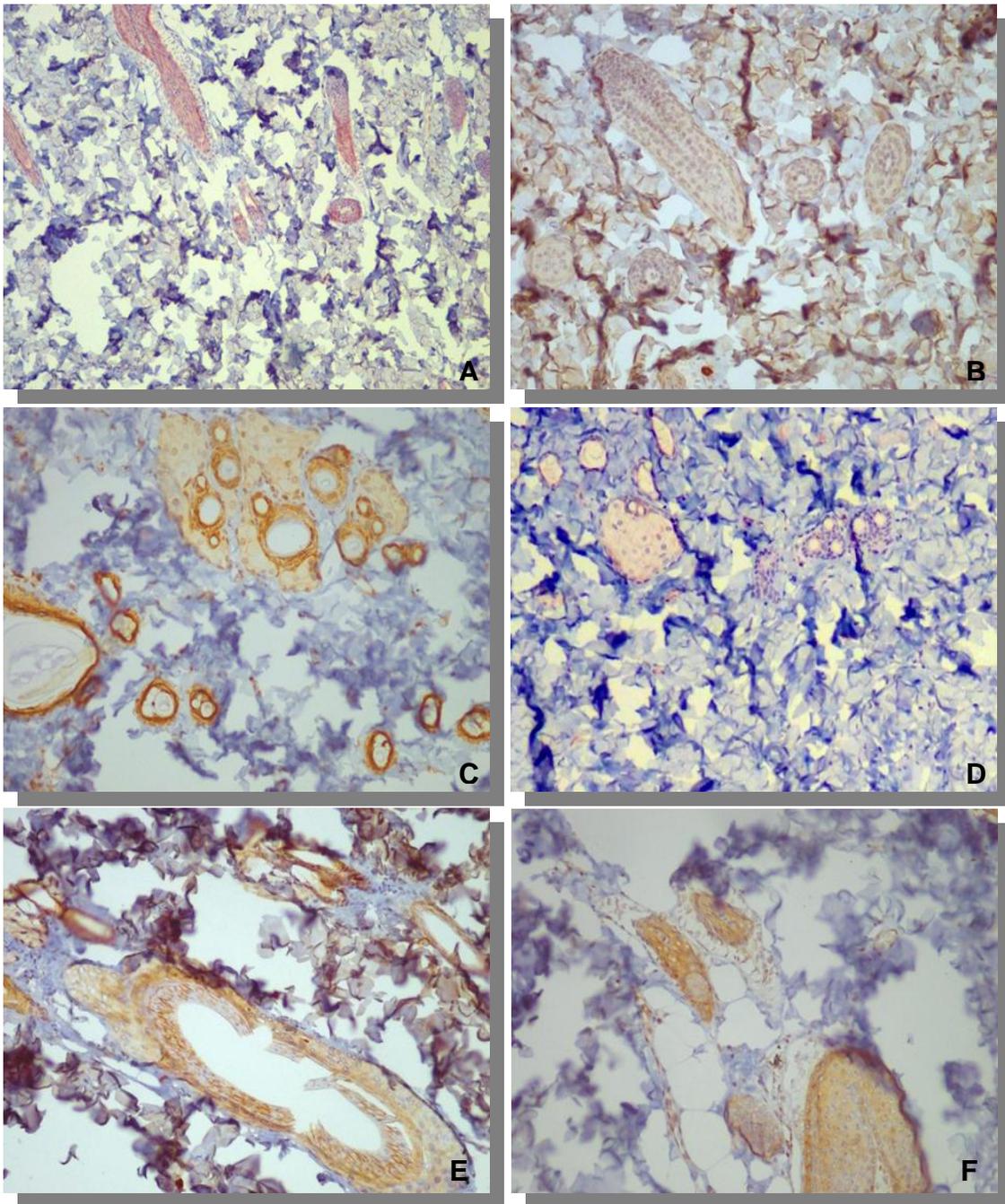


Figura 17 - Corte representativo da expressão imunohistoquímica do VEGF-A, VEGFR1 e VEGFR2 das áreas lesionada (A, B e C) e adjacente normal (D, E e F) do grupo C - 3 meses, respectivamente

nervosas e glândulas anexas, endotélio e células parenquimatosas, porém, mostrou-se negativa em um caso. Na análise do VEGFR2 (Fig. 17F), a imunomarcação variou entre fraca a moderada e forte em anexos e vasos.

5.4.1.2 Grupo C: 6 meses

No grupo C 6 meses, nas áreas lesionadas, na análise do VEGF-A (Fig. 18A) em geral, os casos foram negativos. Na análise do VEGFR1 (Fig. 24B) a imunomarcação foi discreta nas terminações nervosas e glândulas anexas. A análise do VEGFR2 (Fig. 18C) foi marcada por reações fortemente positivas nos vasos e fracas nos anexos. Enquanto, nas áreas adjacentes normais, na análise do VEGF-A (Fig. 18D), a imunomarcação foi fraca nos anexos, músculos e vasos. A análise VEGFR1 (Fig. 18E) mostrou-se com imunomarcação discreta das terminações nervosas e das glândulas anexas. Para VEGFR2 (Fig. 18F), notou-se semelhança às amostras lesionadas, ou seja, reações fortemente positivas nos vasos e fracas nos anexos.

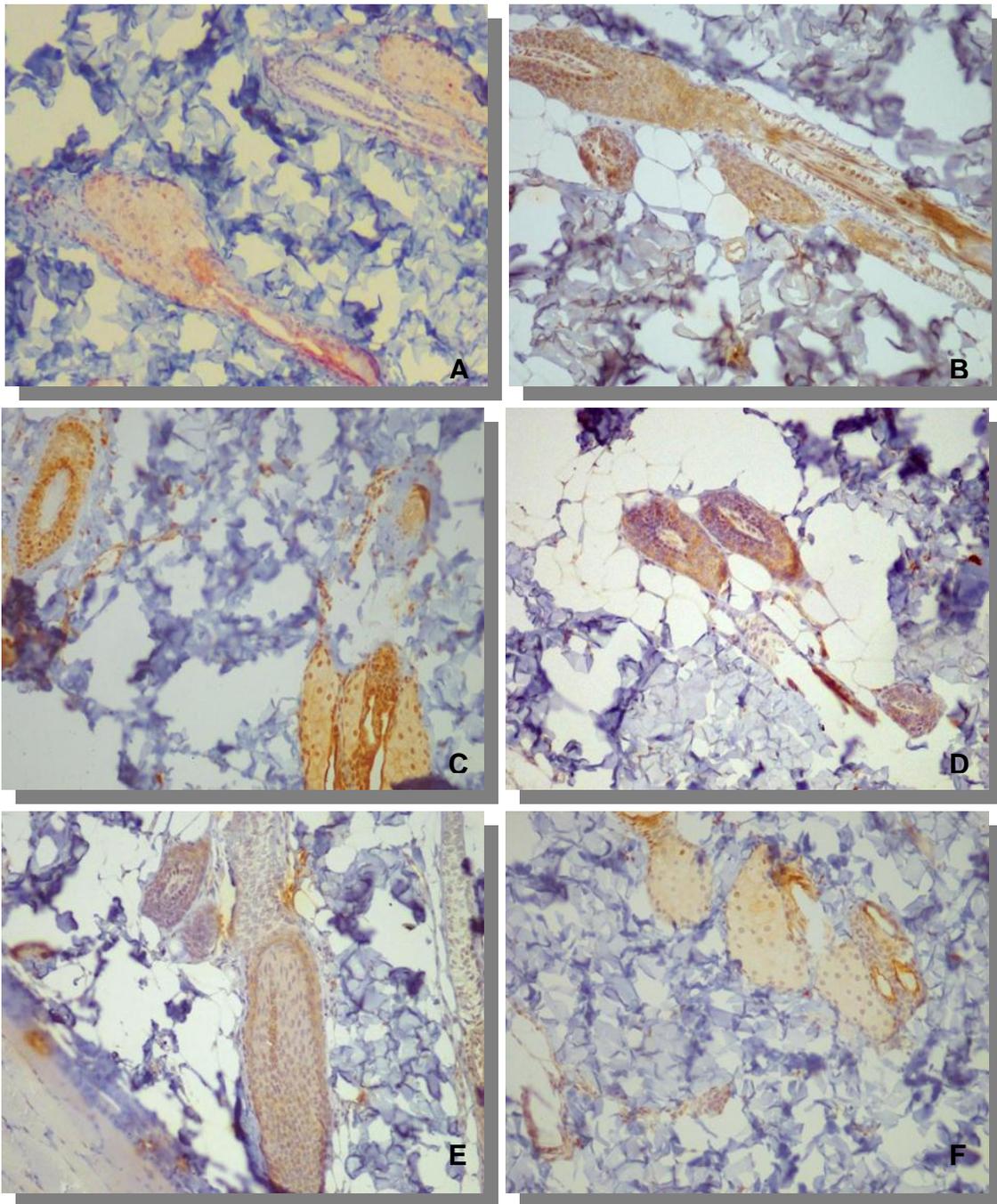


Figura 18 - Corte representativo da expressão imunohistoquímica do VEGF-A, VEGFR1 e VEGFR2 das áreas lesionada (A, B e C) e adjacente normal (D, E e F) do grupo C - 6 meses, respectivamente

5.4.2 Grupo radioterapia (RT)

5.4.2.1 Grupo radioterapia pré-cirúrgica (RT-Pré)

5.4.2.1.1 RT-Pré: 3 meses

No grupo RT-Pré 3 meses, nas áreas lesionadas, na análise do VEGF-A (Fig. 19A) em geral, a imunomarcação foi moderada nos vasos e anexos. Na análise do VEGFR1 (Fig. 19B) a imunomarcação foi de discreta a moderada nas terminações nervosas e glândulas anexas, em alguns casos também mostrou-se moderada no endotélio e nas células parenquimatosas. Um caso foi negativo. Para o VEGFR2 (Fig. 19C), as reações foram positivas fortes em vasos sanguíneos (endotélio mais músculo liso) e fracas nos anexos. Enquanto, nas áreas adjacentes normais, na análise do VEGF-A (Fig. 19D), a imunomarcação variou de moderada à forte nos anexos, vasos e músculos. Para VEGFR1 (Fig. 19E), as reações foram discretamente positivas nas terminações nervosas e glândulas anexas e em alguns casos observou-se reações moderadas nas terminações nervosas, glândulas anexas, endotélio e células parenquimatosas. O VEGFR2 (Fig. 19F) mostrou-se com imunomarcações fortes em vasos sanguíneos (endotélio mais músculo liso) e fracas nos anexos.

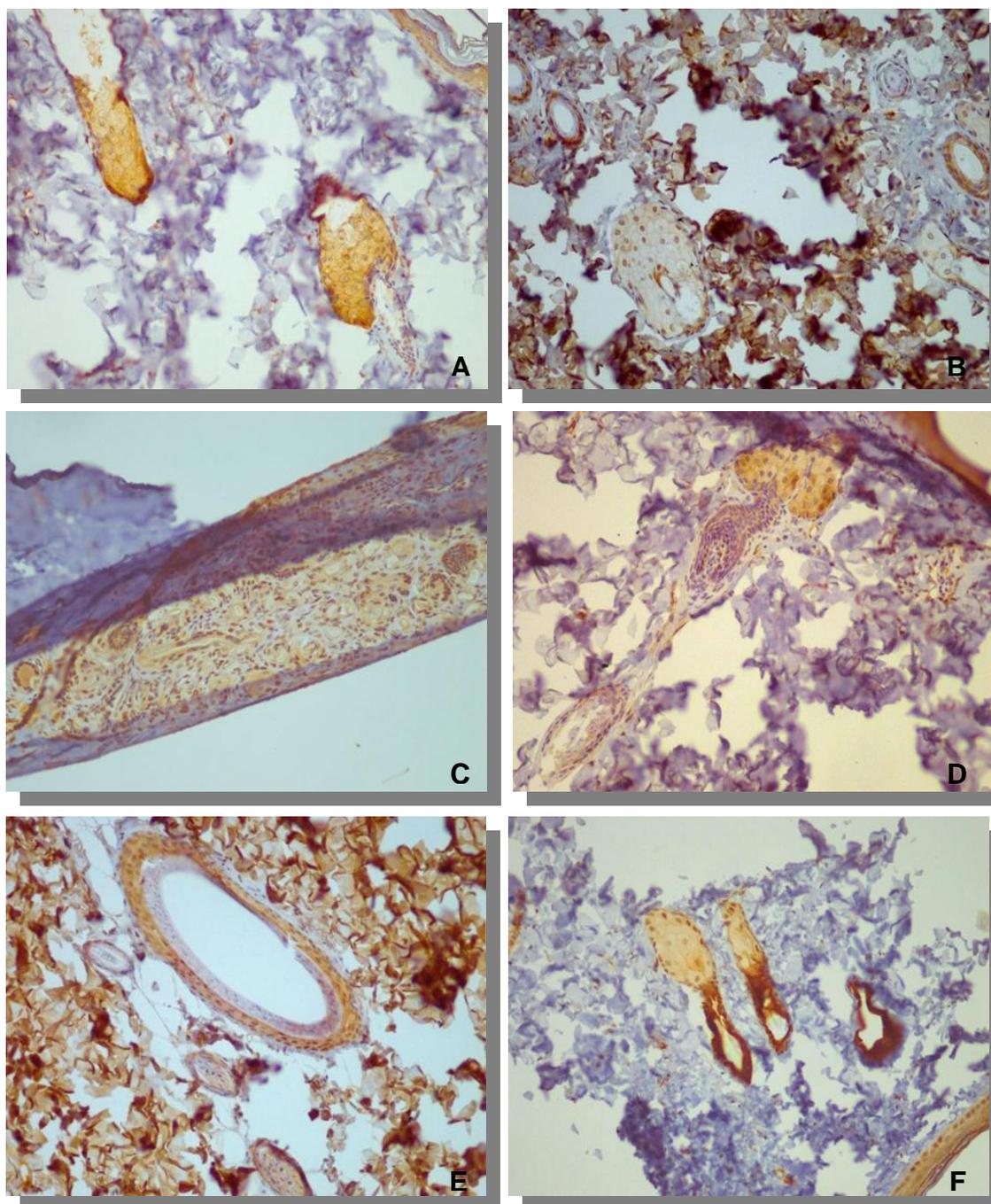


Figura 19 - Corte representativo da expressão imunohistoquímica do VEGF-A, VEGFR1 e VEGFR2 das áreas lesionada (A, B e C) e adjacente normal (D, E e F) do grupo RT-Pré - 3 meses, respectivamente

5.4.2.1.2 RT-Pré: 6 meses

No grupo RT-Pré 6 meses, nas áreas lesionadas, na análise do VEGF-A (Fig. 20A) notou-se imunomarcção moderada nos anexos e vasos. Para o VEGFR1 (Fig. 20B), as reações foram discretas nas terminações nervosas e glândulas anexas e em alguns casos observou-se reações moderadas nas terminações nervosas, glândulas anexas, endotélio e células parenquimatosas. No geral, a imunomarcção do VEGFR2 (Fig. 20C) foi forte nos vasos sanguíneos (endotélio mais músculo liso) e fraca nos anexos. Notou-se a presença de núcleos positivos em epitélio escamoso. Enquanto, nas áreas adjacentes normais, na análise do VEGF-A (Fig. 20D), a imunomarcção variou de moderada a forte nos anexos. Notou-se semelhança às amostras lesionadas para VEGFR1 (Fig. 20E), ou seja, as reações foram discretas nas terminações nervosas e glândulas anexas e em alguns casos observou-se reações moderadas nas terminações nervosas, glândulas anexas, endotélio e células parenquimatosas. Outro caso de semelhança às amostras lesionadas foi a forte imunomarcção do VEGFR2 (Fig. 20F) nos vasos sanguíneos (endotélio mais músculo liso) e fraca nos anexos. Notou-se a presença de núcleos positivos em epitélio escamoso.

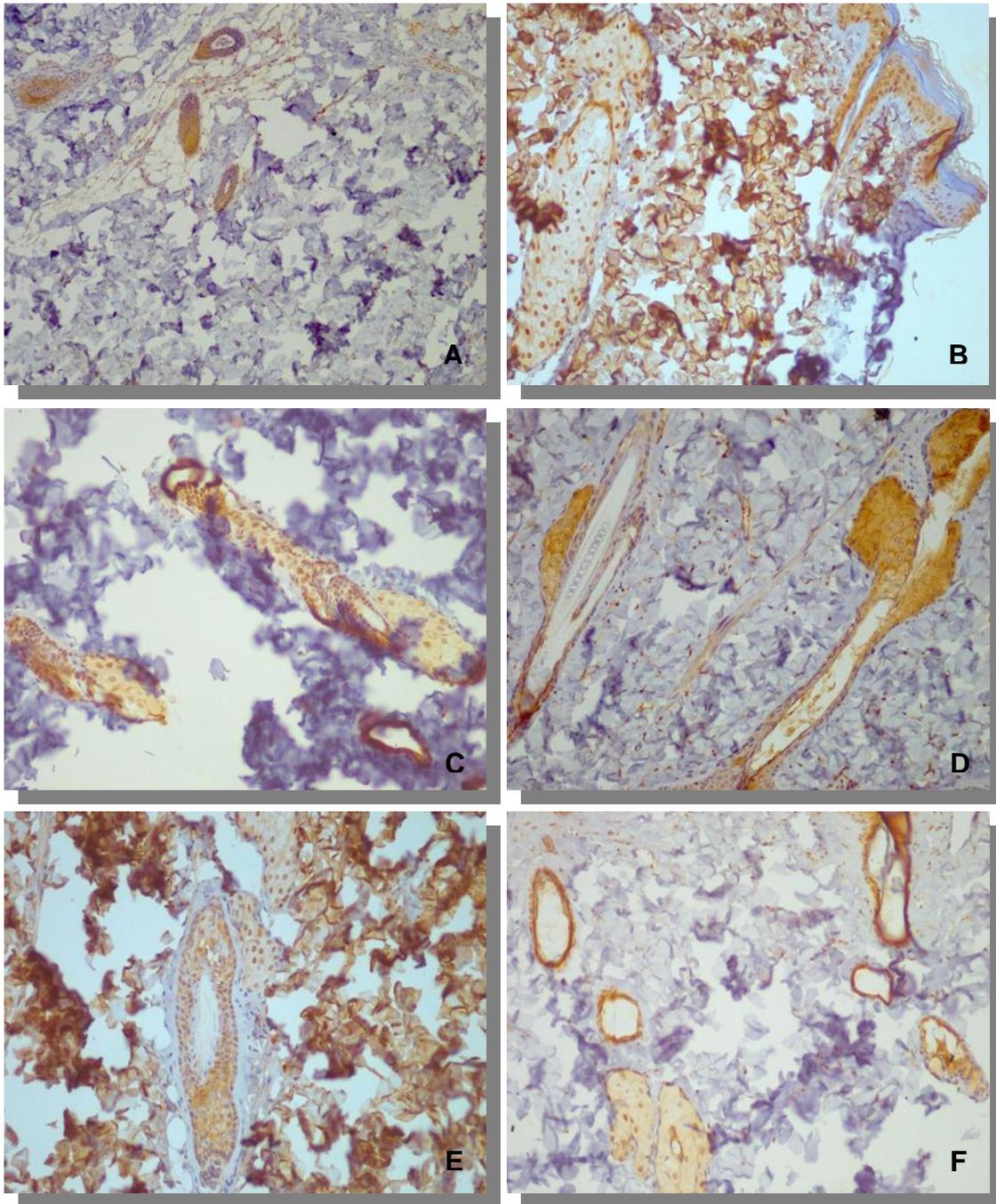


Figura 20 - Corte representativo da expressão imunohistoquímica do VEGF-A, VEGFR1 e VEGFR2 das áreas lesionada (A, B e C) e adjacente normal (D, E e F) do grupo RT-Pré - 6 meses, respectivamente

5.4.2.2 Grupo radioterapia pós-cirúrgica (RT-Pós)

5.4.2.2.1 RT-Pós: 3 meses

No grupo RT-Pós 3 meses, nas áreas lesionadas, na análise do VEGF-A (Fig. 21A) em geral, a imunomarcação foi fraca nos anexos. Para o VEGFR1 (Fig. 21B), a imunomarcação foi discreta nas terminações nervosas e glândulas anexas. A análise do VEGFR2 (Fig. 21C) mostrou-se com reações fortemente positivas em base epitelial, anexos e vasos. Em alguns casos, essa reação também foi positiva em núcleos de estruturas pilosas. Enquanto, nas áreas adjacentes normais, na análise do VEGF-A (Fig. 21D), a imunomarcação foi fraca nos anexos e vasos. Para o VEGFR1 (Fig. 21E), a imunomarcação foi discreta nas terminações nervosas e glândulas anexas. Alguns casos tiveram reação moderada nas terminações nervosas, glândulas anexas, endotélio e células parenquimatosas. Notou-se semelhança às amostras lesionadas para VEGFR2 (Fig. 21F), ou seja, reações fortemente positivas em base epitelial, anexos e vasos. Em alguns casos, essa reação também foi positiva em núcleos de estruturas pilosas.

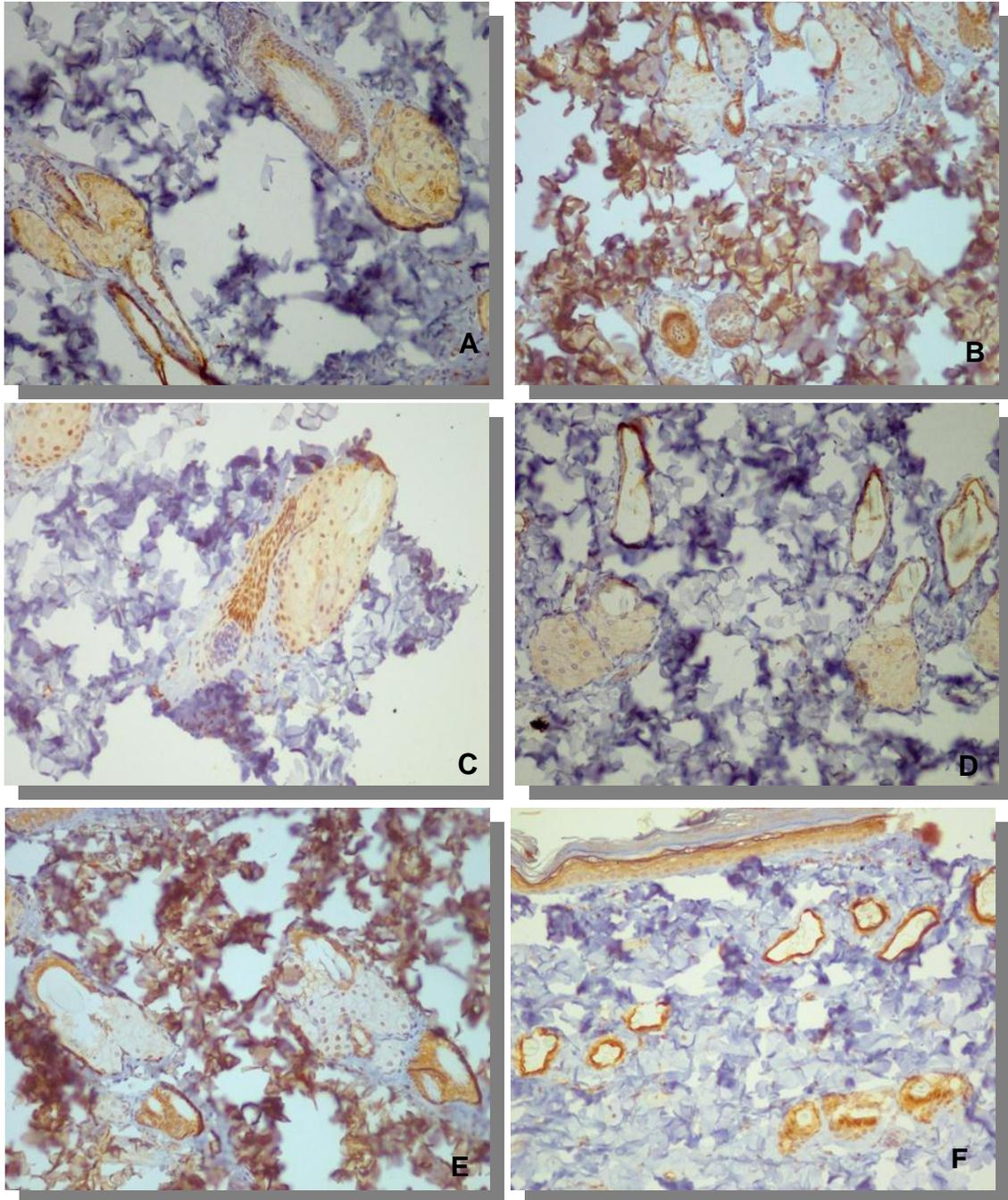


Figura 21 - Corte representativo da expressão imunohistoquímica do VEGF-A, VEGFR1 e VEGFR2 das áreas lesionada (A, B e C) e adjacente normal (D, E e F) do grupo RT-Pós - 3 meses, respectivamente

5.4.2.2.2 RT-Pós: 6 meses

No grupo RT-Pós 6 meses, nas áreas lesionadas, na análise do VEGF-A (Fig. 22A) em geral, a imunomarcação variou de discreta   moderada nos anexos. Para o VEGFR1 (Fig. 22B), a imunomarcação foi moderada nas terminações nervosas, glândulas anexas, endotélio e células parenquimatosas. No geral, as reações para VEGFR2 (Fig. 22C) foram positivas fortes em vasos sanguíneos (endotélio mais músculo liso) e fracas nos anexos. Enquanto, nas áreas adjacentes normais, na análise do VEGF-A (Fig. 22D), a imunomarcação variou de fraca   moderada nos anexos e vasos. A análise do VEGFR1 (Fig. 22E) foi negativa. O VEGFR2 (Fig. 22F) mostrou-se com imunomarcações fortes em vasos sanguíneos (endotélio mais músculo liso) e fracas nos anexos.

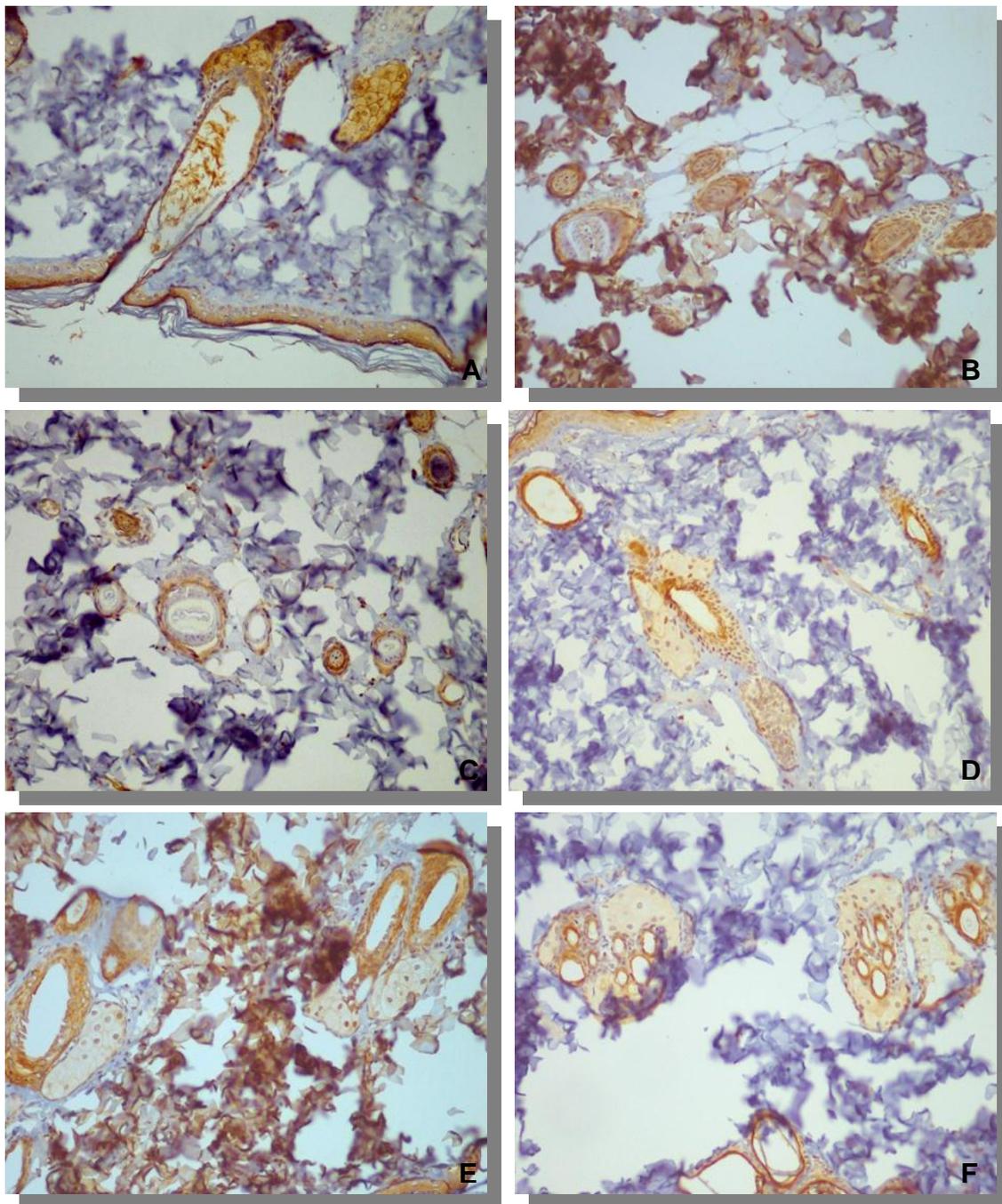


Figura 22 - Corte representativo da expressão imunohistoquímica do VEGF-A, VEGFR1 e VEGFR2 das áreas lesionada (A, B e C) e adjacente normal (D, E e F) do grupo RT-Pós - 6 meses, respectivamente

5.5 Análise imunohistoquímica do FVW

Verificou-se imunomarcção do FVW em células endoteliais de vasos sanguíneos com lúmen conspícuo, assim como em brotamentos capilares de lúmens poucos distintos e células isoladas.

5.5.1 Grupo controle (C)

5.5.1.1 Grupo C: 3 meses

Observou-se no grupo controle de 3 meses, nas áreas lesionadas, imunomarcção com média da DVS de 2,1. Enquanto, nas áreas adjacentes normais, a média da DVS foi de 0,9.

5.5.1.2 Grupo C: 6 meses

Observou-se no grupo controle de 6 meses, nas áreas lesionadas, imunomarcção com média da DVS de 2,6. Enquanto, nas áreas adjacentes normais, a média da DVS foi de 1,6.

5.5.2 Grupo radioterapia (RT)

5.5.2.1 Grupo radioterapia pré-cirúrgica (RT-Pré)

5.5.2.1.1 RT-Pré: 3 meses

Observou-se no grupo RT-Pré 3 meses, nas áreas lesionadas, imunomarcção com média da DVS de 4,8 (Fig. 23A). Enquanto, nas áreas adjacentes normais, a média da DVS foi de 3,6.

5.5.2.1.2 RT-Pré: 6 meses

Observou-se no grupo RT-Pré 6 meses, nas áreas lesionadas, imunomarcção com média da DVS de 1,8 (Fig. 23B). Enquanto, nas áreas adjacentes normais, a média da DVS foi de 0,8.

5.5.2.2 Grupo radioterapia pós-cirúrgica (RT-Pós)

5.5.2.2.1 RT-Pós: 3 meses

Observou-se no grupo RT-Pós 3 meses, nas áreas lesionadas, imunomarcção com média da DVS de 2,3. Enquanto, nas áreas adjacentes normais, a média da DVS foi de 1,2.

5.5.2.2.2 RT-Pós: 6 meses

Observou-se no grupo RT-Pré 6 meses, nas áreas lesionadas, imunomarcção com média da DVS de 1,0. Enquanto, nas áreas adjacentes normais, a média da DVS foi de 0,7.

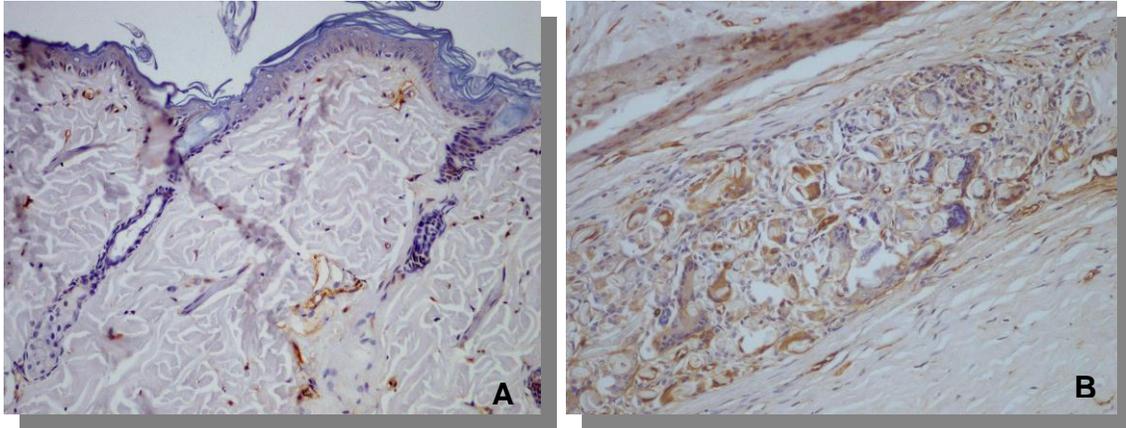


Figura 23 - Corte representativo da expressão imunohistoquímica do FVV das áreas lesionada (A e B) e adjacente normal do grupo RT-Pré - 3 e 6 meses, respectivamente

5.6 Análise estatística

5.6.1 VEGF

Neste caso, pela ANOVA, foi possível apenas atribuir diferenças estatísticas significativas em decorrência dos grupos C, RT-Pré e RT-Pós pertencentes aos períodos de 3 e 6 meses ($p < 0,0001$). Os locais de coleta das amostras (lesão ou área adjacente normal) e à interação entre estes fatores não apresentaram estas diferenças, com $p = 0,1837$ e $p = 0,6604$, respectivamente. Foram encontradas diferenças significativas entre os seguintes grupos, segundo o pós-teste de Tukey (Figura 24):

- Área normal: C de 3 meses vs. RT-Pré de 3 meses;
- Área normal: RT-Pré de 3 meses vs. RT-Pós de 3 meses;
- Área lesionada: C de 6 meses vs. RT-Pré de 6 meses.

Nas áreas lesionadas, não houve diferenças significativas entre o C de 6 meses vs. RT-Pós de 6 meses.

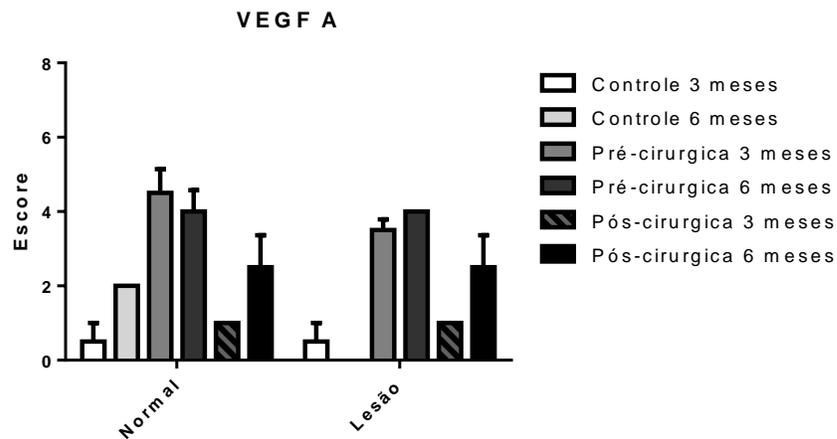


Figura 24 - Análise das duas fontes de variação, grupos C, RT-Pré e RT-Pós pertencentes aos períodos de 3 e 6 meses e os locais de coleta, e correlação das diferenças individuais, para o marcador VEGF

5.6.2 VEGFR-1

Neste caso, não foi detectado diferenças significativas entre os grupos C, RT-Pré e RT-Pós pertencentes aos períodos de 3 e 6 meses ($p=0,2681$), os locais de coleta das amostras (lesão ou área adjacente normal) ($p>0,9999$) e a interação entre estes fatores ($p=0,1465$), não sendo possível afirmar que eles diferem sob qualquer aspecto (Figura 25).

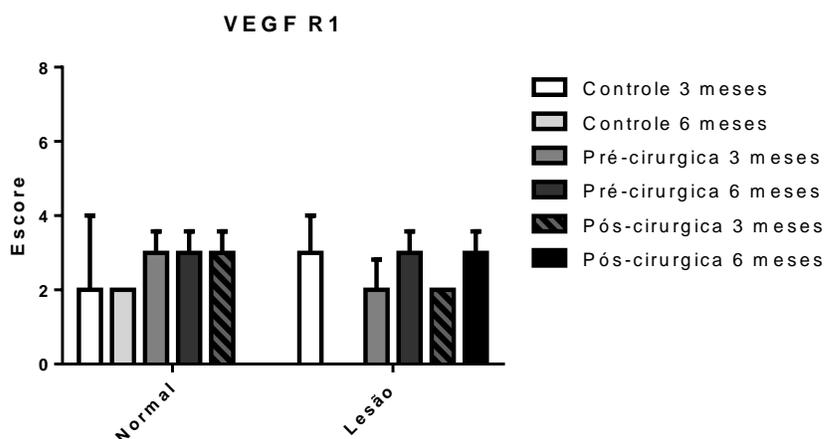


Figura 25 - Análise das duas fontes de variação, grupos C, RT-Pré e RT-Pós pertencentes aos períodos de 3 e 6 meses e os locais de coleta, para o marcador VEGFR-1

5.6.3 VEGFR-2

Já nesse caso, as três fontes de variação geraram diferenças significativas ($p < 0,0001$), ou seja, apresentando diferenças tanto nos grupos C, RT-Pré e RT-Pós pertencentes aos períodos de 3 e 6 meses quanto nos locais de coleta das amostras (lesão ou área adjacente normal), além da interação entre esses fatores. Foram encontradas diferenças significativas entre os seguintes grupos, segundo o pós-teste de Tukey (Figura 26):

- Área lesionada: C de 3 meses vs. RT-Pré de 3 meses;
- Área lesionada: C de 3 meses vs. RT-Pós de 3 meses;
- Área lesionada: C de 6 meses vs. RT-Pré de 6 meses;
- Área lesionada: C de 6 meses vs. RT-Pós de 6 meses;
- Área lesionada: RT-Pré 6 meses vs. RT-Pós 6 meses

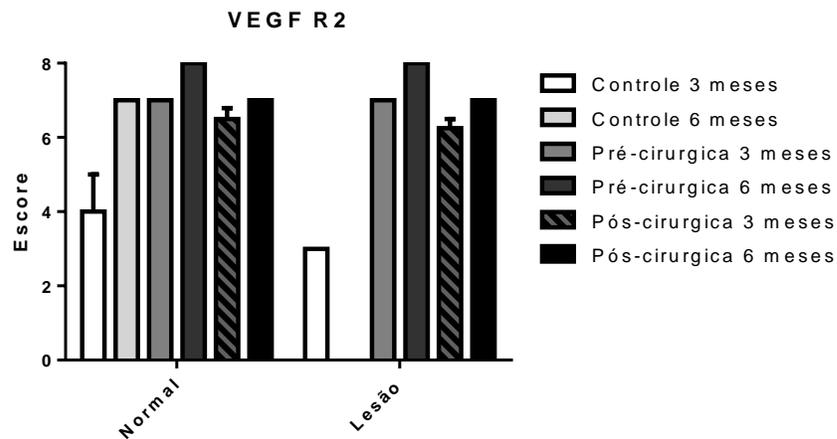


Figura 26 - Análise das duas fontes de variação, grupos C, RT-Pré e RT-Pós pertencentes aos períodos de 3 e 6 meses e os locais de coleta, e correlação das diferenças individuais, para o marcador VEGFR-2

5.6.4 VWF

Para a análise da DVS foram quantificados os vasos imunorreativos ao anticorpo anti-FVW e, posteriormente, realizou-se média aritmética da quantidade de vasos marcados por 10 campos (Figura 27) e observou-se que o anticorpo anti-FVW reagiu positivamente em todos os casos analisados, com as maiores médias nos grupos pertencentes à área adjacente normal, destacando-se a média do grupo RT-Pré de 3 meses, seguida pela média do grupo C de 6 meses e RT-Pós de 3 meses, de ambas as áreas.

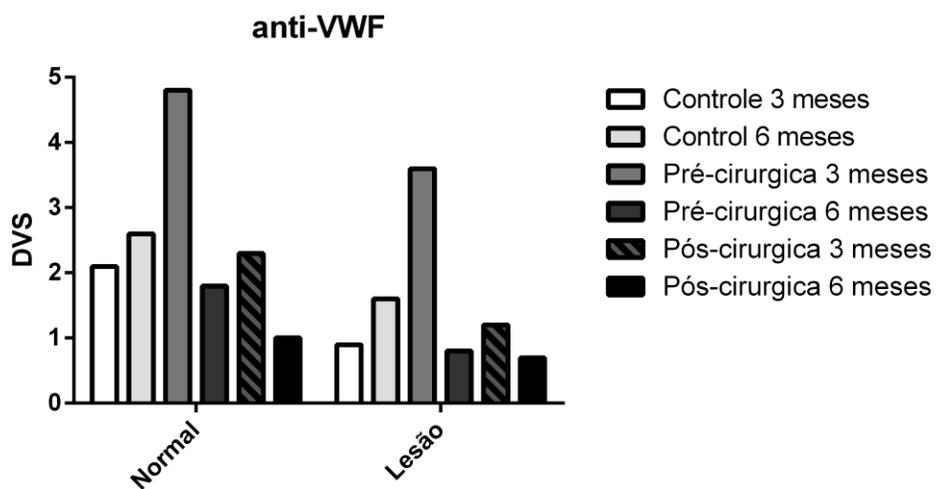


Figura 27 - Média das DVSs dos grupos C, RT-Pré e RT-Pós pertencentes aos períodos de 3 e 6 meses e os respectivos locais de coleta, para o marcador VWF



6. Discussão

A neovascularização sanguínea ocorre em diversos eventos fisiopatológicos como um dos mais importantes eventos para consolidar os mecanismos de inflamação e reparo. Nosso estudo avaliou marcadores moleculares envolvidos em angiogênese e demonstrou, ainda, a micro-densidade vascular de tecidos lesados por irradiação, comparando-os ao de tecidos de aspecto normal adjacente às lesões. A radiação ionizante foi o modelo de escolha por seu papel essencial na terapêutica do câncer, e por sua bem conhecida capacidade de lesar tecidos orgânicos. De modo geral, houve uma marcante diferença na expressão de VEGFR-2 em diferentes tempos do experimento o que demonstra que esse receptor primariamente relacionado com a expressão de VEGF-A, ou apenas VEGF, a mais importante e potente molécula angiogênica do organismo, tem de fato um papel primordial nos eventos de neovascularização, o mesmo não ocorrendo para o receptor, também angiogênico, VEGFR-1, sabidamente menos ativo na neovascularização sanguínea.

Danos teciduais de qualquer natureza desencadeiam uma série de eventos que irão promover a regeneração ou a cicatrização do tecido lesado. Este reparo é um processo complexo que envolve a interação de diversos tipos celulares que são ativados por uma vasta gama de mediadores químicos, componentes da matriz extracelular, microorganismos e alterações físico químicas no microambiente da lesão e das áreas adjacentes (8).

Apesar dos seus efeitos lesivos, a radioterapia vem assumindo um papel cada vez mais importante no tratamento das doenças neoplásicas com fim curativo ou paliativo (3).

As úlceras na pele irradiada continuam a ser um desafio para os profissionais de saúde. A radiação ionizante produz efeitos agudos e crônicos sobre a pele e os tecidos subcutâneos (84) que têm profundas implicações para a cicatrização da ferida cirúrgica, influenciando na qualidade de vida do paciente.

A radiação beta do estrôncio-90 tem sido utilizada na profilaxia e tratamento complementar pós-resssecções de cicatrizes hipertróficas e queloidianas. Justamente pela radiação β ser capaz de ceder muita energia em um pequeno percurso, ou seja, na irradiação da pele, transferir a maior parte de sua energia à camada superficial celular geradora de outras células e a dose absorvida em função da profundidade para a radiação β ser de 10% para 3 mm, e de 6% para 4mm (81) e a derme apresentar de 3-4mm de profundidade (16), resolvemos estudar o seu efeito na pele. Em paciente saudável, uma ferida cirúrgica exige pelo menos 2 anos para cicatrizar completamente por primeira intenção (85). É bem sabido que feridas traumáticas cicatrizadas sofrem um processo de remodelação continuamente durante anos após a lesão inicial. Em contraste, a viabilidade dos tecidos irradiados e sua capacidade de remodelação estão freqüentemente comprometidas por disfunções celulares ou mudanças no estroma de suporte. O processo inflamatório pode promover mais estresse às linhagens de tecidos epiteliais irradiados quando falhas no processo de reparação resultarem em função de barreira epitelial insuficiente. Interligado a isso, é observada depleção progressiva da matriz celular com substituição desta por fibrose, sendo este quadro reconhecido como um efeito tardio à radiação. Diversos aspectos sobre os efeitos da radiação são observados na clínica, porém entender sobre o

seu efeito crônico levou a desenvolver um trabalho experimental controlado para avaliar alguns aspectos da radiação β nas feridas operatórias crônicas em ratos wistar.

Estudos dos diferentes diâmetros das placas e os campos emanados da radiação beta do Estrôncio-90, fazem supor que a região central é a com maior eficácia (78, 79, 86). Logo, a coleta do segmento de pele para estudo histológico da área lesionada foi realizada respeitando os 2 cm correspondente a placa para que nenhuma área adjacente fosse erroneamente coletada.

A dose de radiação é definida como a unidade de energia absorvida (joules) por quilograma de tecido. O rad foi substituído pelo Gy. Um rad é igual a 0,01 Gy. Uma dada dose de radiação destrói um percentual constante de células, não um número constante. Em doses elevadas de radiação a sobrevivência celular diminui, enquanto, em doses de radiação menores há menor taxa de morte celular e talvez represente a presença de mecanismos de reparo celular.

Em 1951, Snider e Raper relataram que 2500 cGy provocaram alterações fisiológicas e no reparo da pele de ratos (79). Aplicações focais de radiação β até 2500 cGy foram relativamente bem tolerados pelo olho (3). Doses únicas de radiação β até 1000 cGy eficazmente induz um rápido início e período sustentado de parada do crescimento dos fibroblastos provenientes da cápsula de Tenon, associado com um aumento nos níveis da p53, envolvida na regulação do ciclo e morte celular em muitas células (87).

As doses prescritas foram realizadas pelos físicos em medicina do Serviço de Radioterapia do Hospital Sírio Libanês, utilizando um sistema conhecido como

“modelo linear quadrático”. Este modelo desenvolvido por Barendsen, em 1982 (88), e aperfeiçoado por Dale, em 1985 (89, 90) é um dos modelos mais aplicáveis em modelagem matemática para o tratamento do câncer por radioterapia devido a sua gama de aplicações, no qual considera-se a razão “alfa/beta”, onde alfa (componente linear) representa as células mortas pela irradiação “single hit”, e beta (componente quadrático) o número de células mortas após algum reparo. Dessa forma, determinou-se que as doses equivalentes recebidas pela pele seriam únicas e de 1800 cGy antes do procedimento cirúrgico e 1490 cGy após o procedimento cirúrgico.

A pesquisa cirúrgica em animais utilizados em laboratório tem se expandido nas últimas décadas, especialmente em decorrência do melhor suporte anestésico, da sofisticação da infra-estrutura material para monitorização contínua preoperatória e de uma busca incessante por modelos que reproduzam condições mórbidas da espécie humana. Os focos principais destas pesquisas têm sido aprimorar o conhecimento acerca dos mecanismos fisiopatológicos de doenças, estudar marcadores biológicos e avaliar novas técnicas com perspectivas de aplicabilidade na espécie humana (91).

A diversidade de cenários que vinculam as necessidades humanas ao uso de animais fomentou, ao longo da história, reflexões éticas, bioéticas, filosóficas e religiosas direcionadas para pesquisa em animais vertebrados (91). Por esta razão, este projeto foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A maior parte da pesquisa na área básica é empreendida nos animais de pequeno porte, como por exemplo, o rato. Um levantamento nas bases de dados da Biblioteca Regional de Medicina incluindo a Medline (National Library of Medicine- USA), Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), SciELO (Scientific Eletronic Library Online) e Biblioteca Cochrane (The Cochrane Database of Systematic Reviews) sobre as seis espécies animais mais comumente citadas, num período de quatro anos, mostrou que o rato, nestas quatro bases de dados, é o animal mais usado em pesquisa, seguido pelo camundongo, coelho, cão, suíno e primatas. Cerca de 85% dos artigos da Medline e 70,5% dos artigos da Lilacs são referentes a ratos e camundongos como espécies utilizadas nos laboratórios (91, 92). Quanto mais se aproxima, em suas características fisiológicas, anatômicas e orgânicas ao ser humano, maior a aplicabilidade das conclusões obtidas. Ratos com freqüência são selecionados para o uso em pesquisas que abordam aspectos nutricionais, choque, sepse, câncer e cicatrização.

Para este trabalho foram utilizados animais padronizados quanto ao gênero, idade e peso corporal, evitando assim que diferenças nesses parâmetros fossem variáveis, alterando os resultados. O rato wistar foi escolhido como material experimental por ser um animal de fácil obtenção e manuseio no laboratório.

Para a confecção das incisões, foram eleitas áreas no dorso que não coincidisse com a coluna vertebral, onde haveria maior possibilidade de reabertura dos cortes pela tensão exercida durante a movimentação do animal.

Além disso, a região dorsal foi selecionada para o procedimento cirúrgico por encontrar-se relativamente menos exposta às contaminações, pelo menor contato com a urina, fezes e saliva do animal, diminuindo os riscos de infecção.

No referente ao processo de reparo, esse animal apresenta tanto a composição da pele quanto a capacidade de regeneração tecidual semelhante ao humano.

A utilização de lados diferentes do mesmo animal como teste e controle foi descartada para evitar qualquer influência que a aplicação da radiação β pudesse exercer sobre o lado controle, por espalhamento, mesmo mantendo uma distância considerável entre as incisões.

Efetuar anestesia demanda um conhecimento do mecanismo de ação e vias de acesso dos anestésicos. Deve-se atentar para o custo, a viabilidade e a possibilidade de interferência das substâncias administradas com os parâmetros que serão analisados no experimento. Inicialmente, requer do pesquisador o domínio dos procedimentos de imobilização do animal. As vias de administração da anestesia mais utilizadas são: intramuscular, intravenosa, intraperitoneal e inalatória, ou a combinação delas, com vantagens e desvantagens. A combinação ketamina e xilasina, por via intramuscular ou intraperitoneal, é uma das mais utilizadas em animais de pequeno porte e mantém o animal em plano anestésico de 40 a 60 minutos, com possibilidade de reforço da dose, caso prolongue o tempo cirúrgico (91). Neste trabalho, a associação de Xilazina a 2% (10mg/kg) e Ketamina a 5% (75mg/kg) por via intra-peritoneal foi considerada efetiva e sem complicações que comprometessem a evolução pós-operatória dos animais.

Outro fator importante de grande interferência no processo de cicatrização é o material utilizado na confecção da lesão cutânea: o fio de sutura. A aplicação de fios de sutura interfere nesses fenômenos, daí a busca incessante de material que produza a menor reatividade biológica. Todavia não se chegou ao material ideal. Existem evidências de que os fios monofilamentares inabsorvíveis, tal como os de polipropileno e *nylon*, provoquem menor reação tecidual e, portanto, menor interferência no processo cicatricial. A utilização do fio monofilamentar de *nylon* 4-0, no presente estudo, é justificada por se desejar mínima reação inflamatória tecidual pela presença do corpo estranho, pois esta poderia interferir no processo de cicatrização ocasionando eventuais erros na análise dos resultados (93), além de ser indicado para aproximação e/ou ligação de tecidos lisos em geral.

A diarreia pode influenciar o processo de cicatrização, muito embora alguns estudos experimentais demonstraram que a cicatrização parece ser independente disso (94).

A escolha dos períodos de cicatrização, 3 e 6 meses, após a lesão tecidual baseou-se em analisar os efeitos da dose de radiação aplicada com a ferida crônica, diretamente relacionada com a qualidade de vida do paciente. Além disso, na literatura, os achados da pesquisa mostraram haver maior número de trabalhos que demonstraram o processo de reparação tecidual cutâneo relacionados com a fase de inflamação. Quanto a estudos de reparação da pele envolvendo períodos a longo prazo foi identificado uma escassez de análise.

A lesão crônica, resulta do desvio, por razões múltiplas e complexas, do normal processo de reparação que se traduz, basicamente, pelo prolongamento

no tempo, de todo o processo, mas fundamentalmente na passagem da fase proliferativa para a fase de remodelação. Duas teorias dominam o conhecimento atual em relação à causa de lesões de radiação tardias. Uma teoria explica que a lesão final é uma conseqüência do esgotamento dos elementos do parênquima e estroma. Em contraste, a outra teoria baseia-se na hipóxia e isquemia como responsáveis pelo dano tardio da radiação (95).

A análise histológica tem sido usada no estudo da cicatrização em cirurgias experimentais por diversos autores. Neste estudo, cortes de 3 µm foram corados pela hematoxilina de Harris e eosina para avaliação morfológica dos tecidos. A coloração de hematoxilina-eosina permite a caracterização da evolução da cicatrização em lesões cutâneas mediante a variável de descrição das características estruturais observadas no tecido, além de ser um método de coloração simples. Os resultados da microscopia foram analisados comparando-se ferida controle com a irradiada.

As primeiras 24 a 48 horas após a lesão são as mais críticas com relação à cura bem sucedida. Irradiação terapêutica administrada 3 ou 4 semanas após a cirurgia provavelmente não produzirá complicações devido a fase proliferativa que está completa e os efeitos da radiação tem menor impacto clínico. Os pacientes que recebem radiação semanas antes da cirurgia têm mais dificuldades de cicatrização quando comparado com pacientes que receberam doses semelhantes de radiação 6 meses antes da cirurgia (85).

De acordo com Tibbs (85), a radiação administrada após a cirurgia corrobora com as análises histológicas obtidas. Em ambos os períodos a longo

prazo (3 e 6 meses), foram observados da área lesionada, estruturas epiteliais e estromais com aspectos normais, com numerosos anexos e vasos sanguíneos bem preservados. E, nos mesmos períodos de tempo, na área adjacente normal, notou-se estruturas epiteliais e estromais e anexos bem preservados e dispostos de forma usual.

Segundo o mesmo autor (85), a radiação administrada antes da cirurgia corrobora em alguns aspectos com as análises histológicas obtidas. No período a longo prazo de 3 meses, foram observados da área lesionada a presença de agrupamentos de células com aspecto epitelial atípico e células gigantes multinucleadas. Enquanto, no período a longo prazo de 6 meses, observou-se tecido bem preservado com camada epitelial de aspecto normal, anexos e vasos sanguíneos bem preservados e feixes fibromusculares com alterações hialinas significativas. E, nos mesmos períodos de tempo, na área adjacente normal, no geral notou-se porções epiteliais e estromais bem preservadas, com anexos e vasos sanguíneos bem delimitados e feixes musculares íntegros. Olascoaga e colaboradores (95), comentaram sobre alterações morfológicas nucleares provavelmente causadas pela necrose celular, que foram consistentes com este trabalho nas áreas lesionadas pertencentes ao grupo RT-Pré de 3 meses.

Pesquisas realizadas ao longo das duas últimas décadas têm demonstrado que o VEGF desempenha um papel essencial na regulação embrionária (11, 37, 53), pós-natal e de processos patológicos e fisiológicos da angiogênese (38). Uma variedade de modelos animais têm gerado muita informação sobre a biologia do VEGF (96). Os resultados obtidos em estudos experimentais foram

substancialmente confirmados e disseminados. De acordo com o que foi encontrado na literatura (8, 33), o VEGF é expresso principalmente durante a fase proliferativa (4^o-14^o dia) da cicatrização restabelecendo a integridade da derme e da epiderme no local da lesão (26). Nos períodos de tempo estudados neste trabalho, evidenciou-se pela análise microscópica, a expressão significativa deste fator de crescimento no tecido, na maioria dos casos (mesmo após 14 dias), com e sem influência da radiação.

Estatisticamente, observou-se diferenças significativas na análise dos grupos estudados e ao buscar as diferenças individuais foi observado uma diferença crescente de expressão do VEGF entre C e RT-Pré de 6 meses da área lesionada, enquanto não houve diferenças estatísticas significativas entre C e RT-Pós, além disso, nas áreas lesionadas pertencentes ao grupo RT-Pré de 3 meses, a celularidade bizarra, com células gigantes e multinucleadas, estruturas do estroma hialinizadas e necrose mostraram-se imunomarcadas de moderada a forte para receptores de VEGF no endotélio e vasos sanguíneos corroborando com outros estudos, para os efeitos da radioterapia (97, 98), confirmando o que foi observado microscopicamente e sugerindo maior influência da radioterapia pré-cirúrgica na cicatrização quando comparada à radioterapia pós-cirúrgica.

De acordo com o que foi citado anteriormente, a cicatrização trata-se de um processo integrador e dinâmico que envolve mediadores solúveis, componentes sanguíneos (celulares e moleculares), matriz extracelular e células parenquimatosas, ou seja, além de alterações físico químicas no microambiente da lesão, as áreas adjacentes também sofrem essas modificações (8). Assim,

observou-se diferenças estatísticas significativas crescentes da expressão do VEGF entre C vs. RT-Pré e C vs. RT-Pós de 3 meses da área normal adjacente estudada.

Limitando-se ao modelo e aos períodos de tempo estudados, observou-se que em todos os grupos a expressão do VEGFR-1 e VEGFR-2 foram constantes entre 3 e 6 meses, mostrando fundamental participação na formação da rede vascular e considerável especificidade durante o reparo. Outro ponto importante é que o VEGFR-2 é um receptor de domínio para inserção de quinase tipo III e que tem alta capacidade de ativar quinases e estimular sinais biológicos tanto nas células endoteliais quanto em outros tipos celulares, possibilitando um melhor reparo.

Na análise estatística, não houve qualquer evidência de uma diferença significativa para a marcação do VEGFR-1 pelo teste ANOVA. Enquanto, para a marcação de VEGFR-2 houve diferenças significativas e ao buscar as diferenças individuais destacou-se os pontos comentados abaixo.

O VEGFR-1 está envolvido principalmente na migração e manutenção vascular e na indução de fatores teciduais e quimiotaxia de monócitos e o aumento da expressão das metaloproteinases nas células do músculo liso vascular. A expressão inicial do VEGFR-1 durante a resposta inflamatória está associada com a ativação/migração celular, apresentando-se em um nível constante nos período iniciais da inflamação, indicando que este receptor promoveria a formação da rede vascular nos estágios iniciais (99). Embora, o VEGFR-2 também participe da mitogênese e da proliferação celular, induzindo as

células endoteliais à mitogênese, quimiotaxia e alterações morfológicas, trabalho recente de Reumann, em 2010 (100), mostrou uma mudança dinâmica nos níveis de expressão do VEGFR-2 em camundongos, aumentando gradualmente durante o processo de reparo. Aparentemente, esse modelo de atuação dos receptores foi compatível com o observado no atual trabalho, confirmado estatisticamente pelas diferenças significativas crescentes de VEGFR-2 entre C vs. RT-Pré e C vs. RT-Pós de 3 e 6 meses.

Essas características também são consistentes com os estudos de Takahashi e Olsson que também mostram a relação dos receptores de VEGF, principalmente a superexpressão do VEGFR-2 e a sua persistência na neovascularização e formação de tecido de granulação (15, 101).

Assim como o VEGF, o VEGFR-2 também apresentou diferenças estatísticas significativas crescentes entre RT-Pré vs. RT-Pós de 6 meses, sugerindo maior influência da radioterapia pré- cirúrgica na cicatrização quando comparada à radioterapia pós-cirúrgica.

Com a expressão de fatores de crescimento que estimulam a neovascularização superior a dos inibidores, ocorre o aumento da vasculatura dos tecidos. Desse modo, a análise da DVS é uma forma indireta, mas importante, do estudo da neovascularização e de seu significado clínico. Para a marcação dos vasos na imunohistoquímica os principais anticorpos utilizados são o anti-CD31, anti-CD34, anti-CD105 e anti-FVW. O anti-CD31 foi inicialmente amplamente utilizado, entretanto atualmente a preferência é pelo anti-CD34 pois o anti-CD31 apresenta reação cruzada com células plasmáticas que são comuns em áreas

inflamatórias ocasionando falsos positivo. O anti-CD105 parece ser um marcador promissor, porém poucos estudos o utilizam. O anti-FVW tem a capacidade de identificar vasos maduros e imaturos (102,103), motivo pelo qual, diante da expressão de marcadores circulantes de ativação endotelial e inflamatória promovida pela radiação ionizante, escolhemos o fator de von Willebrand (FVW) para analisar a DVS.

O FVW é uma glicoproteína multimérica sintetizada pelos megacariócitos e células endoteliais. Está presente no plasma, no subendotélio, nos grânulos α das plaquetas e nos corpúsculos de Weibel-Palade das células endoteliais. O gene do FVW está localizado no braço curto do cromossomo 12 (104) e possui 178 kb e 52 exons (105). Os multímeros armazenados nos grânulos secretórios são secretados quando há estímulo por *shear stress*, trombina, fibrina, hypoxia e/ou histamina (106). O FVW está envolvido na hemostasia primária e no processo de coagulação, no qual é transportador do FVIII (107). No caso de lesão endotelial, os multímeros de FVW alteram sua conformação e tornam-se aptos para interagir com as plaquetas circulantes através da ligação com a integrina plaquetária e glicoproteína específicas para iniciar a adesão plaquetária (108).

Confirmando sua eficiência na identificação das estruturas vasculares, observou-se que o FVW reagiu positivamente em todos os casos analisados. Diferente, do VEGF e VEGFR-2, houve maior expressão do FVW no grupo RT-Pré quando comparada ao grupo RT-Pós, ambos de 3 meses e de ambas as localizações, sugerindo que mesmo com a expressão dos fatores de crescimento e receptores sofrendo influência do modo como a radioterapia foi processada, o

estímulo da neovascularização ainda ocorre. E, do mesmo modo como o VEGF, esta análise mostrou a fundamental participação das áreas adjacentes em todo o processo de cicatrização evidenciada pelas médias do grupo controle de 6 meses na área normal.



7. Conclusão

1 As expressões do VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2 foram constantemente expressas nos diferentes períodos estudados da cicatrização de feridas sob efeito da radioterapia pré e pós-cirúrgica. Uma superexpressão do VEGFR-2 e a sua persistência na neovascularização e formação de tecido de granulação também foi observada nas mesmas condições.

2 A radioterapia pré-cirúrgica teve uma influência maior que a radioterapia pós-cirúrgica, microscopicamente caracterizada pela presença de agrupamentos de células com aspecto epitelial atípico e células gigantes multinucleadas, e imunohistoquimicamente caracterizada pela diferença de expressão do VEGF e VEGFR-2 entre os modos de aplicação da radioterapia.

3 A expressão do FVW foi maior na radioterapia pós-cirúrgica quando comparada à radioterapia pré-cirúrgica, logo os resultados obtidos dos diferentes modos de radioterapia para VEGF e VEGFRs não influenciou a expressão do FVW.

4 As áreas adjacentes normais também sofreram modificações físico químicas, além do microambiente da lesão, conforme demonstrado pelos nossos resultados.



8. Referências

1. Nias AHW. *An introduction to radiobiology*. 2^a ed. West Sussex: John Wiley & Sons; 1998.
2. ICRP. The International Commission on Radiological Protection. 1990 Recommendation of the International Commission on Radiological Protection: Pergamnpn Press, 1991.
3. Constable PH, Crowston JG, Ocleston NL, Cordeiro MF, Khaw PT. Long term growth arrest of human Tenos's fibroblast following single applications of β radiation. *Br J Ophthalmol*. 1998;82(4):448-52.
4. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Pesquisa. Pesquisa da estimativa de câncer no Brasil.[acessado em 25/02/2012]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=2>
5. Andrade MNB, Seward R, Melo JRC. Curativos. *Rev Méd Minas Gerais*. 1992;2(4):228-36.
6. Bao P, Kodra A, Canic MT, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *Journal of Surgical Research*. 2009;15;153(2):347-58.
7. Nogami M, Hoshi T, Arai MKT, Takahashi I. Vascular endothelial growth factor expression in rat skin incision wound. *Med Mol Morphol*. 2007;40(2):82-87.
8. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;41(1):27-51.

9. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinase VEGF receptor 2 (Flt1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(2):548-53.
10. Senger DR et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation on ascites fluid. *Science*. 1983;219(4587):983-85.
11. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004;25(4):581-611.
12. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*. 1999;13(1):9-22.
13. Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med*. 1999;5(12):1359-64.
14. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-76.
15. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science*. 2005;109 (3):227-41.
16. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 10ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
17. Wysocki, AB. *Skin Anatomy, Physiology and Pathophysiology*. *The Nursing Clinics of North America*. 1999;34(4):777-97.

18. Campos D. Daniportal [Internet]. São Paulo: Abril de 2011 [acessado em 25/02/2012]. Disponível em: <http://daniportal.blogspot.com/2011/04/anatomia-da-pele.html>.
19. Cartlidge P. The epidermal barrier. *Semin Neonatol*. 2000;5(4):273-80.
20. Bacha WJJ, Bacha LM. Atlas colorido de medicina veterinária. 2ª ed. Rio de Janeiro: Roca; 2003.
21. Wikett RR, Visscher MO. Structure and function of the epidermal barrier. *Am J Infect Control*. 2006;34(10):98-110.
22. Harding CR. The estratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther*. 2004;17(1):6-15.
23. Banks WJ. Histologia veterinária aplicada. 2ª ed. São Paulo :Manole; 1992.
24. Rocha MJ, Proença e Cunha E, Dinis AP, Coelho CO. Feridas uma arte secular – Avanços tecnológicos no tratamento de feridas. Rio de Janeiro: Minerva; 2006.
25. Abbas AK, Kumar V, Fausto N. Robbins & Cotran Patologia: Bases patológicas das doenças. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
26. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin N Am*. 1997;77(3):509-27.
27. Magro JM, Rodrigues LM. Fisiopatologia da lesão cutânea – Mecanismos humorais e celulares. *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*. 2004;2:67-76.

28. Li Jie, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*. 2007;25:9-18.
29. Engelhard E, Toksoy A, Goobeler M, Debus S, Brucker EB, Gillitzer R. Chemokines IL-8, Groa, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phasespecific infiltration of leucocyte subsets in human wound healing. *Am. J.Pathol*. 1998;153:1849-60.
30. Koopmann CF Jr. Cutaneous wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am*. 1995;28(5):835-45.
31. Casey G. Wound repair: advanced dressing materials. *Nursing Standart*. 2002;17(4):49-53.
32. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*. 2007;127(3):514-25.
33. Tonnesen MG, Feng X, Clark RAF. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2000;5(1):40-6.
34. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*. 2003;200(4):500-3.
35. Roskoski R, Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;62(3):179-213.
36. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992;267(16):10931-4.
37. Yamazaki Y, Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers*. 2006;10(4):515-27.
38. Folkman J. Angiogenesis: initiation and control. *Ann N Y Acad Sci*. 1982;401:212-27.

39. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(4):273-86.
40. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005;438(7070):932-6.
41. Arnold F, West DC. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther.* 1991;52(3):407-22.
42. Zetter BR. Angiogenesis. State of the art. *Chest.* 1988;93(3Suppl):159S-66S.
43. Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995;6(3):230-47.
44. Hillen F, Griffioen AW. Tumor vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(3-4):489-502.
45. Folkman J. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med.* 1995;333:1757-63.
46. Gaffney EA, Pugh K, Maini PK, Arnold F. Investigating a simple model of cutaneous wound healing. *J Math Biol.* 2002;45(4):337-74.
47. Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol.* 2004;128(3):303-9.
48. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for Vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161(2):851-58.

49. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 1999;246 4935:1309-12.
50. Vicent V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*. 1996;93(8):1493-95.
51. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*. 1999;13(1):9-22.
52. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature Reviews Cancer*. 2008;8:579-91.
53. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer*. 2008;8(11):880-7.
54. Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, Lodomery MR, Harper SJ and Bates DO. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *Journal of Cell Science*. 2008;121:3487-95.
55. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(6):464-78.
56. Zhang F, Tang Z, Hou X, Lennartsson J, Li Y, Koch AW, Scotney P, Lee C, Arjunan P, Dong L, Kumar A, Rissanen TT, Wang B, Nagai N, Fons P, Fariss R, Zhang Y, Wawrousek E, Tansey G, Raber J, Fong GH, Ding H, Greenberg DA, Becker KG, Hebert JM, Nash A, Yla-Herttuala S, Cao Y,

- Watts RJ, Li X. VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(15):6152-7.
57. Jussila L, Alitalo K. Vascular Growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev*. 2002;82(3):673-700.
58. Yosuka H, Nakamura Y, Zuo H, Tang W, Takamura Y, Miyauchi A, et al. VEGF-D expression and lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 2005;18(8):1127-33.
59. Underiner TL, Ruggeri B, Gingrich DE. Development of vascula endothelial growth factor receptor (VEGFR) kinase inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer. *Curr Med Chem*. 2004;11(6):731-45.
60. Martins RA. A descoberta dos raios X: o primeiro comunicado de Röntgen. *Revista Brasileira de Ensino de Física*. 1998;.20(4):373-91.
61. Navarro MVT, Leite HJT, Alexandrino JC, Costa EA. Controle de riscos à saúde em radiodiagnóstico: uma perspectiva histórica. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*. 2008;15(4):1039-47.
62. Mould RF. A century of X-rays and radioactivity in medicine. 2^a ed. Philadelphia: Institute of Physics Publishing, 1995.
63. Salvajoli JV, Souhami L, Faria SL. Radioterapia em oncologia. 1^a ed. Rio de Janeiro, MEDSI Editora Médica e Científica LTDA; 1999.
64. Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F, Czuczman MS, Emmanouilides C, Joyce R, Pohlman BL, Bartlett NL, Wiseman GA, Padre N, Grillo-López AJ, Multani P, White CA. Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled

- ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2002;20(10):2453-63.
65. Weichselbaum RR, Kufe DW, Hellman S, Rasmussen HS, King CR, Fisher PH, Mauceri HJ. Radiation-induced tumour necrosis factor-alpha expression: clinical application of transcriptional and physical targeting of gene therapy. *Lancet Oncol.* 2002;3(11):665-71.
66. Scaff LA. Física da Radioterapia. 1ª ed. São Paulo: Sarvier; 1997.
67. Biral AR. Radiações Ionizantes para físicos médicos e leigos. 1ª ed. Florianópolis: Editora Insular; 2002.
68. Okuno E. Radiação: Efeitos, Riscos e Benefícios. 1ª ed. São Paulo: Editora Habra; 1998.
69. Segreto RA, Segreto, HRC. Radiação ionizante e resposta celular – atualidades. *Radiol bras.* 1997;30(6):301-7.
70. Bernstein EF, Sullivan FJ, Mitchell JB et al. Biology of chronic radiation effect on tissues and wound healing. *Clin. Plast. Surg.* 1993;20:435-53.
71. Doyle JW, Li Y, Salloum A, FitzGerald TJ, Walton RL. The effects of radiation on neovascularization in a rat model. *Plas. Reconstr. Surg.* 1996;98(1):129-39.
72. Drake DB, Oishi SN. Wound healing considerations in chemotherapy and radiation therapy. *Clin, Plast. Surg.* 1995;22(1):31-37.

73. Gorodestsky R, Mou X, Fisher DR, Taylor JMG, Withers HR..Radiation effect in mouse skin: dose fractionation and wound healing. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* May 1990;18(5):1077-81.
74. Tokarek R, Bernstein EF, Sullivan F, Uitto J, Mitchell JB. Effect of therapeutic radiation on wound healing. *Clin. Dermatol.* 1994;12(1): 57-70.
75. Coelho TS, Fernandes MAR, Yoriyaz H, Louzada MJQ. Análise dosimétrica de perfis de distribuições radiais de doses relativas de um aplicador de betaterapia de $^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y}$ utilizando o código MCNP-4C e filmes radiocrômicos. *Revista Brasileira de Física Médica.* 2011;4(3):7-10.
76. Borok TL, Bray M, Ian S, Placker J, LaBirth L., Rolins C. Role of ionizing irradiation for 393 keloids. *Int J Radiation Oncology Biol Phys.* 1988;15(4):865-70.
77. Wilder BW, Bauti KM, Kittelson JH, Shimm DS, Harari PM, Rogoff EE, Cassady JR. Pterygium Treated with Excision and Postoperative Beta Irradiation. *Int J. Radiation Oncology Biol Phys.* 1992;23(3):533-7.
78. Friedell HL, Thomas CI, Krohmer JS. An evaluation of the clinical use of a strontium 90 betaray applicator with a review of the underlying principles. *Am J Roentgenol Radium Ther.* 1954;71(1):25-39.
79. Filho GVP, Nunes JMC, Yui F. Experimental model of the morphological and the morphometric aspects of tissue repair in skin wounds submitted to beta radiation emitted by Strontium-90 in rats. *Acta Cir Bras.* 2004;19(1):51-8.

80. Setti RI. Atualização do emprego do estrôncio 90 em oftamologia. Arg Bras Oftamol. 1961;24(1):174-83.
81. Daltro TFL, Campos LL, Bañados Pérez HE. Thermoluminescence Dosimeter for Equivalent Dose Assessment in a Mixed Beta and Gamma Field. Radiat Prot Dosimetry. 1999;85(1-4):145-8.
82. Filho GVP, Goldenberg S, Novo NF, Simões MJ. Estudo histológico e morfométrico da reparação de feridas cutâneas, provocadas em ratos, submetidas à radiação beta do Estrôncio-90. Arq. Med ABC. 1998;(1e2):04-16.
83. Maeda KS et al. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic as prognostic indicators in gastric carcinoma. Br. J. Cancer. 1995;72(2):319-23.
84. Bernstein, E.F., Sullivan, F.J., Mitchell, J.B. et al. Biology of chronic radiation effect on tissues and wound healing. Clin. Plast. Surg. 1993;20: 435-53.
85. Tibbs MK. Wound healing following radiation therapy: review. Radioterapy and Oncology. 1997;42(1):97-106.
86. Baroncelli G, Magno L, Tunesi G. La posizione dello stronzio 90 nella radioterapia di contatto: proprietà fisiche, modalità tecn-che d'impiego, indicazioni cliniche. Radiol Med. 1962;48(1):635-62.
87. Constable PH, Crowston JG, Ocleston NL, Khaw PT. The effects of single doses of β radiation on the wound healing behaviour oh Human Tenos's capsule fibroblast. Br J Ophthalmol 2004;88:169-73.

88. Barendesen GW. Dose fractionation, dose rate and iso-effect relationships for normal tissue. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1982;8:1981-97.
89. Dale RG. The application of the linear-quadratic dose-effect equation to fractionated and protracted radiotherapy. *Br. J. Radiol.* 1985; 58:515-28.
90. Dale RG. Dose Rate effects in targeted radiotherapy, *Phi. Medicine Biology.* 1996;41:1871-84.
91. Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras.* 2004;19(4):441-7
92. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critério de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras* 2004;19(1):59-65.
93. Koruda MJ, Rollandeli RH. Experimental studies on the healing of colonic anastomosis. *J Surg Res.* 1990;48(1):504-15.
94. Irvin TT. Effects of malnutrition on colonic healing. *Ann Surg.* 1973;180(6):765-72.
95. Olascoaga A, Vilar-Compte D, Poitevin-Chaco'n A, Contreras-Ruiz J. Wound healing in radiated skin: pathophysiology and treatment options. *Int Wound J.* 2008;5:246-57.
96. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur. Cytokine Netw.* 2009;20(4),158-63.
97. Mendelsohn FA, Divino CM, Reis ED, Kerstein MD. Wound care after radiation therapy. *Adv Skin Wound Care.* 2002;15,216-24.

98. Dormand E-L, Banwell PE, Goodacre TEE. Radiotherapy and wound healing. *Int Wound J.* 2005;2,112-27.
99. Sawano A, et.al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood.* 2001;97(3):785-91.
100. Reumann MK, et.al. Production of VEGF receptor 1 and 2 mRNA and protein during endochondral bone repair is differential and healing phase specific. *J Appl Physiol.* 2010;109(6):1930-8.
101. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7, 359-71.
102. Vermeulen P, Gasparini G, Fox S, Colpaert C, Marson L, Gion M, Beliën JA, de Waal RM, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris AL, Dirix LY.. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. *Eur J Cancer.* 2002;38(12):1564-79.
103. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J. Pathol.* 1995; 147(1):9-19.
104. Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, Donlon TA, Bruns GAP, Latt SA, Orkin SH. Human von Willebrand factor (VWF): Isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science.* 1985;228;1401-6.

105. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Alevy YG, Sadler JE. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1989; 264(33):19514-27.
106. Tsai HM, Nagel RL, Hatcher VB, Seaton AC, Sussman II. The high molecular weight form of endothelial cell von Willebrand factor is released by regulated pathway. *Br J Haematol.* 1991;79:239-45.
107. Ruggeri ZM, Ware J. von Willebrand factor. *FASEB J.* 1993;7:308-16.
108. Ferreira MS, Lopes AAB, Coelho V, Guilherme L, Kalil J. Two novel anti von Willebrand factor monoclonal antibodies. *Thromb Res.* 2000;97:3-13.