



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO



PROGRAMA INTERDISCIPLINAR EM BIOCÊNCIAS APLICADAS – PIBA

Pamela Cássia Rocha Morais

**Avaliação do efeito do soro total e de frações obtidas do látex da Seringueira
(*Hevea brasiliensis*) na cicatrização de feridas em modelo experimental**

Uberaba (MG)

2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO



PROGRAMA INTERDISCIPLINAR EM BIOCÊNCIAS APLICADAS – PIBA

Pamela Cássia Rocha Morais

**Avaliação do efeito do soro total e de frações obtidas do látex da Seringueira
(*Hevea brasiliensis*) na cicatrização de feridas em modelo experimental**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas, área de concentração: Produtos naturais e sintéticos bioativos, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José de Mendonça

Uberaba (MG)

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

M826a Moraes, Pamela Cássia Rocha
Avaliação do efeito do soro total e de frações obtidas do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) na cicatrização de feridas em modelo experimental / Pamela Cássia Rocha Moraes. -- 2017.
55 f. : il., fig.

Dissertação (Mestrado Interdisciplinar em Biociências Aplicadas) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José de Mendonça

1. Cicatrização. 2. Látex. 3. Indutores da angiogênese. 4. Colágeno. I. Mendonça, Ricardo José de. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616-003.9

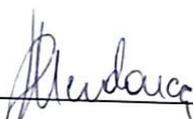
PAMELA CÁSSIA ROCHA MORAIS

**Avaliação do efeito do soro total e de frações obtidas do látex da Seringueira
(*Hevea brasiliensis*) na cicatrização de feridas em modelo experimental**

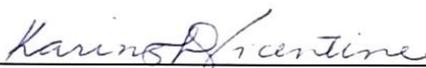
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas, área de concentração: Produtos naturais e sintéticos bioativos, para obtenção do título de mestre em Ciências.

31 de Agosto de 2017.

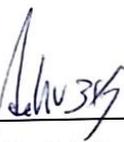
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Ricardo José de Mendonça – Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Prof.^a Dr.^a Karina Ferrazzoli Devienne Vicentine
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Prof.^a Dr.^a Elizabeth Uber Bucek
Universidade de Uberaba

Dedico esse trabalho aos meus pais, meu irmão e meus pequenos, Pick[†], Mel e Princesa, que estiveram comigo em todos os momentos de euforia e de angústia, continuamente me encorajando a fazer sempre mais e melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo José de Mendonça, por depositar em mim sua confiança e pela honra de, junto a ele, adquirir tanto conhecimento.

Aos meus pais, Rita e Elias, e ao meu irmão, Marcos Paulo, pelo apoio incondicional e por todos os valores morais transmitidos a mim que hoje me fizeram capaz de concluir algo grandioso. Amo-os infinitamente.

Ao meu grande companheiro, Renan, pela compreensão, paciência, respeito e carinho que tem comigo em todos os momentos. Te amo imensamente.

À Ana Laura, que foi essencial neste trabalho, tanto na execução quanto (principalmente) no companheirismo que tornou um prazer ainda maior a realização deste trabalho. Saiba que carrego nossa amizade sempre em meu coração.

Aos meus amigos, Rhéltheer e Thaíla, que muito mais que ajudaram no desenvolvimento dessa pesquisa, nunca me deixaram desistir, me incentivaram, me fizeram dar boas gargalhadas e dividiram comigo momentos inesquecíveis (incluindo o almoço e a volta pra casa). O meu carinho por vocês será eterno.

Aos técnicos do laboratório de bioquímica, Flávio e Geraldo, que constantemente me auxiliaram quando precisei.

Aos amigos Tuanny, Flávio e Victor, pela gratificante convivência no laboratório. Vocês foram parte fundamental para que este trabalho fosse efetivado.

Aos professores Karina Ferrazzoli Devienne Vicentine e Lenaldo Branco Rocha que me auxiliaram em partes cruciais para que este trabalho ficasse cada vez melhor e mais completo. Muito obrigada!

Aos muitos amigos e familiares que sempre me incentivaram com palavras de incentivo e de carinho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Às demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para conclusão desse mestrado.

“A coisa boa que a Ciência tem é que é verdade quer você acredite quer não.”

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

O látex extraído da seringueira (*Hevea brasiliensis*) ganhou destaque econômico nos séculos XIX e XX devido ao seu produto principal, a borracha. A partir de descobertas em relação a propriedades biológicas benéficas por parte do látex da seringueira, um conjunto de importantes pesquisas na área médica foi realizado buscando diferentes aplicações clínicas relacionadas, principalmente a cicatrização. Nesse contexto, esse trabalho objetivou avaliar o efeito do soro total e de frações obtidas do látex da seringueira na cicatrização de feridas em modelo experimental. Inicialmente foram obtidas as amostras a serem estudadas, sendo que o soro total foi extraído do látex através da coagulação do látex pela adição de ácido acético 5% e, por meio de cromatografia de troca iônica, foram isoladas três frações proteicas denominadas FrHB1, FrHB2 e FrHB3. Tais frações, assim como o soro total, foram testados em cultura de células McCoy e o crescimento desses fibroblastos foram avaliados. Realizou-se ainda o ensaio de cicatrização cutânea em camundongos, onde 5 grupos de 8 animais cada foram tratados com diferentes concentrações de FrHB1 e uma concentração de soro total, além de um grupo controle tratado apenas com o gel base. A partir de fragmentos retirados do tecido neoformado nos animais, foi feita a análise histológica, quantificação de colágeno e mensuração de mediadores inflamatórios. Em relação ao crescimento de células fibroblásticas, observou-se uma tendência de FrHB1 0,01% aumentar a quantidade de células em cultura. A menor concentração de FrHB1 testada (0,01% p/p) demonstrou atividade mais favorável em relação à redução do tempo de fechamento da ferida, confirmada na análise histológica. A produção de colágeno esteve aumentada em todos os grupos tratados, sobretudo naquele tratado com FrHB1 0,01% como mostra a análise histológica e corroborado pelo cálculo do teor de colágeno. As citocinas dosadas não apresentaram resultados conclusivos. Dessa forma, conhecendo a atividade cicatrizante do látex, descrita nesse estudo, fazem-se necessárias mais pesquisas que busquem a ampliação do espectro de conhecimento em relação ao látex da seringueira, contribuindo para a elaboração de um fitoterápico à base de *Hevea brasiliensis*.

Palavras chave: cicatrização, látex, angiogênese, epitelização, colágeno.

ABSTRACT

The latex extracted from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) showed economic prominence in the 19th and 20th centuries due to its main product, rubber. Based on the findings regarding beneficial biological properties by latex of rubber tree, a number of important researches in the medical field were carried out in search of different clinical applications related, mainly wound healing. In this context, this work aimed to evaluate the effect of total serum and fractions obtained from rubber latex on wound healing in an experimental model. Initially the total serum was extracted from the latex by the coagulation of the latex, addition of 5% acetic acid, and by means of ion exchange chromatography, three protein fractions denominated FrHB1, FrHB2 and FrHB3 were obtained. Such fractions, as well as total serum, were tested on McCoy cell culture and the growth of these fibroblasts were evaluated. The cutaneous wound healing assay was performed in mice, where 5 groups of 8 animals each were treated with different concentrations of FrHB1 and a total serum concentration, in addition to a control group treated with the base gel alone. From fragments removed from the neoformed tissue in the animals, histological analysis, collagen quantification and measurement of inflammatory mediators were done. In relation to fibroblast cell growth, a tendency of FrHB1 0,01% to increase the amount of cells in culture was observed. The lowest concentration of FrHB1 tested (0.01% w/w) showed a more favorable activity in relation to the reduction of wound closure time, confirmed by the histological analysis. The collagen production was increased in all treated groups, especially in that treated with FrHB1 0,01% as shown by the histological analysis and corroborated by the calculation of the collagen content. The dosed cytokines did not present conclusive results. In this way, knowing the healing activity of the latex, described in this study, it is necessary to do more research that seeks to broaden the knowledge spectrum in relation to rubber latex, contributing to the elaboration of a herbal medicine based on *Hevea brasiliensis*.

Key words: wound healing, latex, angiogenesis, epithelization, collagen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Protocolo do cálculo da área da lesão usando o *software ImageJ*.27
- Figura 2-** Perfil cromatográfico obtido a partir de uma etapa de purificação do soro do látex natural da seringueira em DEAE-sepharose em pH=7,8. Foi utilizada uma coluna de 20 X 2,2cm preenchida com DEAE-sepharose, fluxo de 1,0 mL/min e frações coletadas a cada 7 min.34
- Figura 3-** Atividade indutora de proliferação de células McCoy em cultura. Foram realizados 3 experimentos individuais em triplicata.35
- Figura 4-** (A) Medidas das áreas das lesões ao logos dos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10 e (B) cinetica de fechamento das feridas ao longo do tempo de experimentação.37
- Figura 5-**Seguimento clínico das lesões cutâneas. Um mesmo animal representando cada um dos grupos (Grupo 1=Controle; Grupo 2=Soro Total 0,01%; Grupo 3=FrHB1 0,01%; Grupo 4=FrHB1 0,1%; Grupo 5=FrHB1 1%) fotografado nos dias 0, 5 e 10 após a confecção da úlcera.39
- Figura 6-** Fotomicrografia das áreas das lesões tratadas topicamente, (A) Controle; (B) Soro Total 0,01%; (C) FrHB1 0,01%; (D) FrHB1 0,1%; (E) FrHB1 1%, no 10º dia de tratamento coradas com hematoxilina-eosina. Destaca-se a reepitelização (R), angiogênese (A), infiltrado mononuclear (M), remanescente do gel (SA) e anexos (AN).41
- Figura 7-** Fotomicrografia das áreas das lesões tratadas topicamente, (A) Controle; (B) Soro Total 0,01%; (C) FrHB1 0,01%; (D) FrHB1 0,1%; (E) FrHB1 1%, no 10º dia de tratamento coradas com Picro Sirius.42
- Figura 8-** Teor de colágeno nos tecidos neoformados nas úlceras após 10 dias de tratamento.43
- Figura 9-** Dosagem e IL-10, TNF- α e IFN- γ no 10º dia de tratamento.44

Figura 10- Dosagem de Óxido Nítrico (NO), Mieloperoxidase (MPO) e Eosinófiloperoxidase (EPO) no 10º dia de tratamento.44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DEAE-sepharose: Dietilaminoetil sepharose

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF: Fator de crescimento epitelial

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EPO: Eosinófilo peroxidase

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

FrHB1: Fração 1

FrHB2: Fração 2

FrHB3: Fração 3

g: gravidade

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: Ácido clorídrico

H₃PO₄: Ácido fosfórico

HCl: Ácido clorídrico

HE: Hematoxilina e Eosina

H-TAB: Brometo de Hexadecil-Trimetil Amônio

ICBN: Instituto de Ciências Biológicas e Naturais

IFN- γ : Interferon γ

IL-1: Interleucina 1

IL-10: Interleucina 10

IL-6: Interleucina 6

iNOS: Sintetase de óxido nítrico

kg: Quilogramas

KGF7: Fator de crescimento de queratinócitos

mg: Miligramas

MHC: Complexo de histocompatibilidade principal

mL: Mililitros

mm: Milímetros

MPO: Mieloperoxidase

N: Normal

NaCl: Cloreto de Sódio

NaNO₂: Nitrito de Sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

nm: Nanômetros

NO: Óxido Nítrico

p/p: peso/peso

p/v: peso/volume

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

OS: PicroSirius

TGF- α : Fator de crescimento transformante α

TGF- β : Fator de crescimento transformante β

Th: T *helper*

TMB: 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

μ L: Microlitro

v/v: volume/volume

VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Breve Histórico à Respeito do Látex da Seringueira	15
1.2 Processo Cicatricial	16
1.2.1 Fase Inflamatória.....	16
1.2.2 Fase Proliferativa	17
1.2.3 Fase de Remodelamento	17
1.3 VIAS INFLAMATÓRIAS	18
1.3.1 Sistema imunológico inato.....	18
1.3.2 Sistema imunológico adaptativo.....	19
1.3.3 Moduladores inflamatórios de interesse	19
1.3.3.1 Óxido nítrico	19
1.3.3.2 Mieloperoxidase	20
1.3.3.3 Eosinófilo Peroxidase	20
1.3.3.4 Interferon γ	20
1.3.3.5 Fator de necrose tumoral α	20
1.3.3.6 Interleucina 10	21
1.4 Colágeno	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3 METODOLOGIA	24
3.1 Obtenção da Amostra	24
3.2 Cromatografia em DEAE-Sepharose	24

3.3 Estudo do Crescimento Celular	25
3.4 Atividade Cicatricial em Camundongos	25
3.5 Análise Morfométrica da Área da Lesão	27
3.6 Análise Histológica	28
3.7 Dosagem do Teor de Colágeno	29
3.7.1 Preparação dos Reagentes.....	29
3.7.2 Curva Padrão	29
3.7.3 Preparação do Tecido	29
3.7.4 Dosagem de Hidroxiprolina	30
3.7.5 Determinação do Teor de Colágeno	30
3.8 Dosagem de Enzimas e Citocinas	30
3.8.1 Processamento do Tecido.....	30
3.8.2 Dosagem de Citocinas	31
3.8.3 Ensaio de Quantificação de Mieloperoxidase.....	31
3.8.4 Ensaio de Quantificação de Eosinófilo Peroxidase	32
3.8.5 Avaliação da Produção de Óxido Nítrico	32
3.9 Análise Estatística	32
4 RESULTADOS	34
4.1 Separação das Frações do Soro Total do Látex por Cromatografia em DEAE-Sepharose	34
4.2 Atividade Indutora do Crescimento de Fibroblastos (McCoy) das Frações e do Soro Total	35
4.3 Atividade Cicatrizante do Soro Total e da FrHB1 em Modelo de Lesão Cutânea em Camundongos	36
4.4 Análise Histológica	40
4.4.1 Coloração com Hematoxilina-Eosina.....	40
4.4.2 Coloração com Picro Sirius	40
4.5 Quantificação do Teor de Colágeno no Tecido Neoformado	42

4.6	Quantificação de Citocinas, Enzimas e Óxido Nítrico.....	43
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
	ANEXOS	55

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas no tratamento e na cura de doenças e feridas é algo tão antigo quanto a própria espécie humana. Ainda hoje em diversas regiões do país, desde pequenos povoados até grandes cidades, plantas medicinais são encontradas nos quintais de residências, comercializadas em feiras, mercados populares e lojas especializadas (Maciel et al., 2002). Nos dias atuais atrelamos conhecimento técnico e científico com as propriedades de produtos oriundos da natureza a fim de aumentar a eficácia na terapêutica utilizando produtos naturais.

O potencial das plantas superiores como fonte de novos compostos bioativos é admirável. Existe uma grande variedade de produtos provenientes de plantas, como, por exemplo, a morfina advinda da papoula (*Papaver somniferum*), descoberta em 1805; o ácido acetilsalicílico proveniente da cortiça do salgueiro (*Salix alba*); ou a efedrina a partir de ervas chinesas (*Ephedra*).

Dentre essas plantas, existem aquelas que apresentam propriedades cicatrizantes. O gel de *Aloe vera*, a título de exemplo, teve registros de uso na Mesopotâmia em 2100 a.C. (Freitas et al., 2014), há também a folha da *Pereskia aculeata*, chamada de ora-pro-nobis, uma trepadeira com alto poder de cicatrização (Pinto et al., 2016).

Entre as plantas com propriedades cicatrizantes, a *Hevea brasiliensis*, uma seringueira, tem-se destacado. O látex extraído da seringueira (*Hevea brasiliensis*), além de ser largamente utilizado pela indústria da borracha, apresenta uma variedade de propriedades biológicas benéficas nos processos de cicatrização ou na melhora de quadros clínicos de doenças crônicas.

1.1 Breve Histórico a Respeito do Látex da Seringueira

Durantes os séculos XIX e XX, a *Hevea brasiliensis*, planta originária da região amazônica, ganhou destaque econômico devido à extração de seu principal produto, a borracha. Este polímero foi, e ainda é, largamente utilizado pela indústria, na produção de adesivos, luvas descartáveis, preservativos, entre outros (Mendonça, 2008; Herculano et al., 2009). A partir das descobertas a respeito da atividade na proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese) por parte do látex da seringueira (Mrué, 2000; Mrué et al., 2004), outras aplicações médicas passaram a

ser estudadas, resultando em um conjunto de pesquisas importantes para a aplicação clínica. Exemplo disso são os estudos de utilização do látex da seringueira para a confecção de próteses vasculares (Grisotto, 2003); aceleração do processo cicatricial em úlceras de pés diabéticos (Frade, Valverde et al., 2001; Soares et al., 2004; Frade et al., 2012), neoformação de alvéolos dentários (Balabanian et al., 2006; Manfrin-Arnez, et al., 2012), regeneração do nervo ciático (Dias, et al., 2015), entre outros.

Dentre as frações proteicas obtidas por meio de cromatografia, existe uma em especial que possui maior atividade na angiogênese quando comparada com as demais frações isoladas. A chamada Fração 1 (FrHB1) apresenta maior atividade na indução do aumento da permeabilidade vascular, proliferação de vasos sanguíneos, redução do tempo de cicatrização e indução da proliferação de células HEK293T (Mendonça, 2008).

1.2 Processo Cicatricial

O tratamento de feridas tem como principal objetivo o rápido fechamento da lesão juntamente com a formação de uma cicatriz funcional que seja esteticamente satisfatória. Para tal é necessário compreender o processo de reparo tecidual (Singer e Clark, 1999). O processo de cicatrização pode ser dividido em três fases ou etapas que se sobrepõem, ocorrendo quase que simultaneamente. São denominadas de Fase Inflamatória, Fase Proliferativa e Fase de Remodelamento.

1.2.1 Fase Inflamatória

Caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, liberação de fatores de crescimento e o recrutamento de plaquetas, a fase inflamatória é a primeira a ocorrer durante o processo de cicatrização.

Macrófagos e neutrófilos são atraídos para o local da lesão e a coagulação plaquetária induz a liberação de citocinas e quimiocinas que tem a função de recrutar células de defesa, como os monócitos, induzidos e ativados pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), por exemplo. No tecido, esses monócitos se tornam macrófagos que são as principais células envolvidas no reparo tecidual (Clark, 1996 *apud* Mendonça e Coutinho-Netto, 2009). O macrófago secreta citocinas essenciais para a formação do tecido de granulação, como o fator de

crescimento transformante β (TGF- β), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o PDGF. Além disso, tem a função de degradar e remover componentes do tecido conjuntivo lesionado, como o colágeno, elastina e proteoglicanos e ainda secretam fatores quimiotáticos liberadores de prostaglandinas, com função de dilatar e aumentar a permeabilidade vascular dos capilares (Eming et al., 2007). A fase inflamatória tem o tempo de duração mais curto.

1.2.2 Fase Proliferativa

Em um segundo momento do processo de reparo tecidual, ocorre a fase proliferativa, caracterizada por quatro etapas: epitelização, angiogênese, formação do tecido de granulação e deposição de colágeno. A epitelização acontece por meio de agentes quimiotáticos e mitóticos, do fator de crescimento transformante α (TGF- α) e do fator de crescimento epidérmico (EGF) proveniente dos queratinócitos, além disso, começa então a formar o tecido de granulação, evidenciado pela grande quantidade de microvasos recém formados. A proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese) é fundamental para que haja transporte de oxigênio e nutrientes, essenciais para o reparo tecidual (Singer e Clark, 1999) e isto só é possível devido ao aumento da permeabilidade vascular que permite o extravasamento de proteínas para que exista a deposição extra vascular de fibrina (Dvorak, 2002).

Para que aconteça, de forma efetiva, a formação de novos vasos sanguíneos, são necessários uma série de processos, tais como: proliferação de células endoteliais, em resposta à moléculas como FGF, VEGF, TGF- β , angiogenina, angiotropina e angiopoetina-1 (Folkman e D'amore, 1996). Na matriz extracelular, fibronectina, colágeno, vibronectina, tenascina e laminina são formados a fim de dar suporte para que a angiogênese ocorra (Ruoslahti e Yamaguchi, 1991), além disso, a expressão de proteases é fundamental para a angiogênese, principalmente da fase de remodelamento (Clark, 1996 *apud* Mendonça e Coutinho-Netto, 2009).

1.2.3 Fase de Remodelamento

Em uma última fase, a fase de remodelamento, tem como meta recuperar a estrutura do tecido lesionado. Os fibroblastos presentes no tecido de granulação se transformam em miofibroblastos e passam a possuir mais mobilidade. Então a matriz

extracelular provisória passa a caminhar para a formação de uma matriz definitiva (Gabbiani et al., 1972; Mendonça, 2008). É característico desse momento do reparo tecidual, o desaparecimento de células inflamatórias por apoptose e desenvolvimento de novos vasos sanguíneos e fibroblastos, levando à formação da cicatriz (Arnold e West, 1991). Outra característica dessa fase é a deposição de colágeno e proteoglicanos de forma organizada (Gabbiani et al., 1972). A formação da cicatriz se dá pelo desaparecimento de vasos sanguíneos, fibroblastos e células inflamatórias por apoptose ou emigração (Arnold e West, 1991; Mendonça, 2008). Entre as principais citocinas envolvidas nessa fase, pode-se citar o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), PDGF e TGF- β produzidas pelos fibroblastos, assim como EGF e TGF- β produzidos pelas células epiteliais (Karukonda et al., 2000). A reepitelização ocorre a partir das bordas da ferida e são necessários três agentes para que ela aconteça: fatores de crescimento sintetizados na fase inflamatória – principalmente PDGF; fator de crescimento de queratinócitos (KGF7); TGF- β ; integrinas e metaloproteases. Queratinócitos ativam receptores de integrinas para promover a interação com proteínas provenientes da matriz extracelular e do interior da lesão e, finalmente, a ativação de metaloproteases que degradam e modificam proteínas da matriz extracelular, onde essas enzimas podem liberar fatores de crescimento ligados à matriz extracelular a fim de realizar a proliferação e migração de queratinócitos, auxiliando na reepitelização (Santoro e Gaudino, 2005).

1.3 VIAS INFLAMATÓRIAS

O sistema imunológico é dividido em dois grandes grupos: o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo.

1.3.1 Sistema imunológico inato

O sistema imune inato é composto pela barreira epitelial, macrófagos, monócitos, neutrófilos, células dendríticas, células *Natural Killer*, eosinófilos e basófilos. Trata-se da primeira linha de defesa do organismo, de resposta imediata, entretanto não específica e não produz células de memória.

As células desse sistema iniciam a inflamação secretando citocinas, quimiocinas e agentes antimicrobianos. Essa via resulta na fagocitose do antígeno e apresentação do mesmo para o sistema imune adaptativo (Wallace et al., 2014).

1.3.2 Sistema imunológico adaptativo

O sistema imunológico adaptativo é composto por células denominadas de linfócitos T e B e, ao contrário do sistema imune inato, gera uma resposta mais específica e gera células de memória que confere imunidade prolongada. Os linfócitos B, quando ativados, secretam imunoglobulinas, proteínas que se ligam de maneira específica a um antígeno (Abbas et al., 2012). Os linfócitos T amplificam a resposta inflamatória e são divididos em linfócitos TCD4 e TCD8. As células do tipo TCD4 são chamadas de T helper (Th) e secretam citocinas pró-inflamatórias e ainda podem se diferenciar em vários tipos de resposta dependendo do antígeno que lhe é apresentado (Wallace et al., 2014).

As citocinas secretadas pelos leucócitos são divididas em duas classes: pró e anti-inflamatórias. As pró-inflamatórias se caracterizam por iniciarem e amplificarem a resposta inflamatória, já as anti-inflamatórias regulam negativamente a resposta inflamatória (Calixto et al., 2004).

1.3.3 Moduladores inflamatórios de interesse

1.3.3.1 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é sintetizado por isoenzimas, entre elas, a óxido nítrico sintetase de macrófagos (iNOS), que são induzidas nos macrófagos e outras células como neutrófilos, por exemplo, por lipopolissacarídeos bacterianos ou citocinas. O NO contribui com os mecanismos de defesa do organismo por possuir ação microbicida.

Existe uma faixa muito estreita de concentração tissular para que o NO passe a ser tóxico para as células do hospedeiro e não apenas para o microrganismo, atuando como uma toxina. A determinação dessa concentração ainda não foi totalmente compreendida pelos pesquisadores (Flora Filho e Zilberteín, 2000).

1.3.3.2 Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma heme proteína produzida no interior de neutrófilos e monócitos. Essa enzima é armazenada em grânulos azurófilos citoplasmáticos e liberada no meio extracelular em resposta a um processo inflamatório. A MPO apresenta atividade microbicida e imunomodulatória, possuindo propriedades pró-oxidativas e pró-inflamatória (Loria et al., 2008). A MPO, assim como outras heme peroxidases, é capaz, em condições fisiológicas, de consumir o NO na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), modulando os níveis de NO disponível, ocorrendo uma provável interdependência entre o NO e a catálise da MPO no estado estacionário (Abu-Soud e Hazen, 2000; Roman et al., 2008).

1.3.3.3 Eosinófilo Peroxidase

A enzima eosinófilo peroxidase (EPO) é encontrada no interior dos eosinófilos. A EPO difere da MPO tanto nos aspectos bioquímicos quanto imunológicos. Apresenta atividade citotóxica quando combinada com H_2O_2 e algum dos elementos da família 7A da tabela periódica (haletos). Está presente em processos alérgicos e inflamatórios e é liberada a partir da degranulação do eosinófilo (Kroegel et al., 1988).

1.3.3.4 Interferon γ

O Interferon γ (IFN- γ) é uma citocina presente na resposta pelo linfócito TCD4, mais especificamente, Th1. Apesar de possuir atividade antiviral e antiparasitária, sua principal função é a imunomoduladora. O IFN- γ tem o poder de inibir a diferenciação de linfócitos TCD4 para determinadas respostas, induzindo a um tipo principal de resposta imune. Essa citocina inibe, ainda, a liberação de algumas imunoglobulinas e aumenta a expressão de genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classes I e II, secretados tanto por células TCD4 quanto por TCD8. Nos monócitos e macrófagos, induz a produção de receptores para imunoglobulinas e a síntese TNF- α (Abbas et al., 2012).

1.3.3.5 Fator de necrose tumoral α

O Fator de necrose tumoral α pode ser produzido por macrófagos ativados, linfócitos e monócitos. Age principalmente na resposta às bactérias classificadas

como gram negativas. Liga-se a receptores específicos que, por sua vez, promovem a apoptose. Seu principal efeito fisiológico é promover resposta imune e inflamatória, recrutando neutrófilos e monócitos para o local da lesão. Quando liberado em baixas concentrações, induz a vasodilatação e estimula as células endoteliais à secretarem quimiocinas que atraem leucócitos. Estimula proteínas de fase aguda do processo inflamatório e fibrinogênio (Vitale e Ribeiro, 2007).

1.3.3.6 Interleucina 10

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória e inibe algumas citocinas com características pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α , produzidas nos macrófagos. Pelo mecanismo de cascata, induz a produção de citocinas anti-inflamatórias, aumenta a proliferação de mastócitos e impede a produção de IFN- γ pela células *Natural Killer*. Possui efeito supressivo da resposta inflamatória de um tipo específico de linfócito T *helper* (Th), o que é benéfico em doenças mais graves como sepse, artrite reumatoide e psoríase (Oliveira et al., 2011).

1.4 Colágeno

O colágeno é, sem dúvida, uma das proteínas mais importantes no processo cicatricial e também a mais abundante. O colágeno tipo I é o mais frequente, aproximadamente 80% do colágeno encontrado na derme, sendo ele sintetizado pelos fibroblastos. O colágeno é o principal componente da matriz extracelular dos tecidos, aparecendo dias após a lesão.

A cicatrização obtém sucesso quando existe um equilíbrio entre a síntese de matriz extracelular nova e a degradação de matriz extracelular antiga, havendo êxito quando a colagênese, ou seja, a síntese e deposição de colágeno são maiores. Mesmo após um ano, o local da lesão apresentará um colágeno menos organizado do que o da pele sã e a força tênsil jamais retornará ao que era antes do surgimento da lesão (Campos et al., 2007). Diversas doenças e condições do indivíduo interferem no processo de reparo tecidual, como o diabetes, escorbuto, anemia, úlcera de pressão, dentre outras. O não fechamento de uma ferida pode acarretar vários danos à saúde e bem estar do paciente, podendo levar à colonização de microrganismos, amputação e ainda danos estéticos.

O látex extraído da seringueira (*Hevea brasiliensis*) tem se mostrado promissor no tratamento de feridas, devido suas propriedades citadas anteriormente e pelo seu custo-benefício favorável, e, portanto, vem sendo estudado na intenção de compreender melhor como seus ativos modulam os mecanismos de reparação e o sistema imunológico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do soro total e de frações obtidas do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) na cicatrização de feridas em modelo experimental.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento de fibroblastos (McCoy);
- Investigar se ocorre redução do tempo de cicatrização utilizando diferentes concentrações das frações e soro total do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*);
- Avaliar o teor de colágeno do tecido neoformado;
- Quantificar os moduladores inflamatórios (IL-10, IFN- γ , TNF- α , NO, MPO e EPO).

3 METODOLOGIA

As análises foram conduzidas nos laboratórios de Bioquímica e Farmacologia, do Departamento de Bioquímica, Farmacologia e Fisiologia, laboratório de Patologia Geral do Departamento de Patologia, Genética e Evolução e laboratório de Imunologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, todos vinculados ao Instituto de Ciências Biológicas e Naturais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (ICBN/UFTM).

3.1 Obtenção da Amostra

O látex da seringueira *Hevea brasiliensis*, contendo 5% de amônia (1mol/L) como estabilizante foi gentilmente cedido pelo Instituto de Ciências e Tecnologias da UNESP de Presidente Prudente - SP.

Para obtenção do soro total do látex, o látex amoniaco foi diluído com ácido acético à 5% na proporção de 1:2 (v/v), agitando-se cuidadosamente com auxílio de um bastão de vidro até completa coagulação da borracha. O soro total, solução límpida e de cor amarelada, foi decantado e o restante do soro foi obtido por compressão mecânica do coágulo formado. Posteriormente este material foi filtrado, teve seu pH ajustado para 7,8 com NaOH 1mol/L e foi submetido à diálise contra água destilada. Foram retiradas alíquotas de 50 mL, armazenadas em tubos cônicos e congeladas em freezer -20°C.

3.2 Cromatografia em DEAE-Sepharose

Para a separação das frações do soro total, empregou-se a técnica de cromatografia de troca iônica. Foi utilizada uma coluna de vidro (20 cm x 2,2 cm) preenchida com matriz DEAE-sepharose (Sigma-Aldrich), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01 mol/L (pH 7,8). Uma alíquota da amostra foi descongelada e aplicada na coluna cromatográfica em uma câmara fria com temperatura de 8°C. Após a entrada do material na coluna, foi realizada a eluição com tampão bicarbonato de amônio 0,01 mol/L em gradiente crescente de concentração de NaCl (0 mol/L; 0,25 mol/L; 0,5 mol/L; 1,5 mol/L de NaCl).

Foi empregado um fluxo de 1 mL/min e o eluato, coletado em tubos de ensaio através de um coletor (Gilson®), monitorado por um espectrofotômetro Micronal® a

um comprimento de onda de 280 nm. O material identificado de acordo com seu perfil cromatográfico foi separado em três frações, Fração 1 (FrHB1), Fração 2 (FrHB2) e Fração 3 (FrHB3) que foram submetidas à diálise contra água destilada, liofilizadas e armazenadas sob congelamento a -80°C para posterior avaliação da atividade biológica (crescimento de células McCoy e aceleradora da cicatrização em modelo animal).

3.3 Estudo do Crescimento Celular

Células fibroblásticas da linhagem McCoy foram mantidas em meio Eagle com 10% de soro fetal bovino em estufa de cultura de células à 37°C (Devienne et al, 2001).

Após ser realizada a tripsinização, alíquotas de 0,2mL contendo aproximadamente 10^5 células/mL foram adicionadas à placa de cultura de células de 96 poços e incubadas durante 24 horas à 37°C. Passado o período de incubação, o meio de cultura foi removido da placa e foi adicionado o meio de cultura utilizado para manter as células modificado com diferentes concentrações (0,01; 0,1 e 1%) do soro total e das três frações do látex da seringueira obtidos no processo de cromatografia, assim como esse mesmo meio de cultura não modificado (Controle). Foi realizada a incubação por 24 horas em estufa à 37°C. Após esse tempo, o meio de cultura foi removido da placa e o crescimento celular foi detectado pelo ensaio de Vermelho Neutro. As placas foram levadas a um leitor de microplacas e densidade ótica foi medida à 540nm. A porcentagem de crescimento celular foi determinada pelas absorbâncias dos testes frente ao controle, segundo a equação abaixo (1):

$$\% \text{crescimento} = \frac{\text{absorbância}_{\text{teste}} \times 100}{\text{absorbância}_{\text{controle}}} \quad (1)$$

3.4 Atividade Cicatricial em Camundongos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFTM sob o número 352/2015.

Os materiais a serem testados Soro Total na concentração de 0,01% e FrHB1 nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1% m/m foram incorporados ao gel base (Gel de

Carbopol 2,5%). Após o preparo, os géis foram mantidos sob refrigeração até o momento do uso.

Foram utilizados 40 camundongos machos Balb-C, entre 7 e 9 semanas de idade, divididos em 5 grupos contendo 8 animais em cada, distribuídos da seguinte forma:

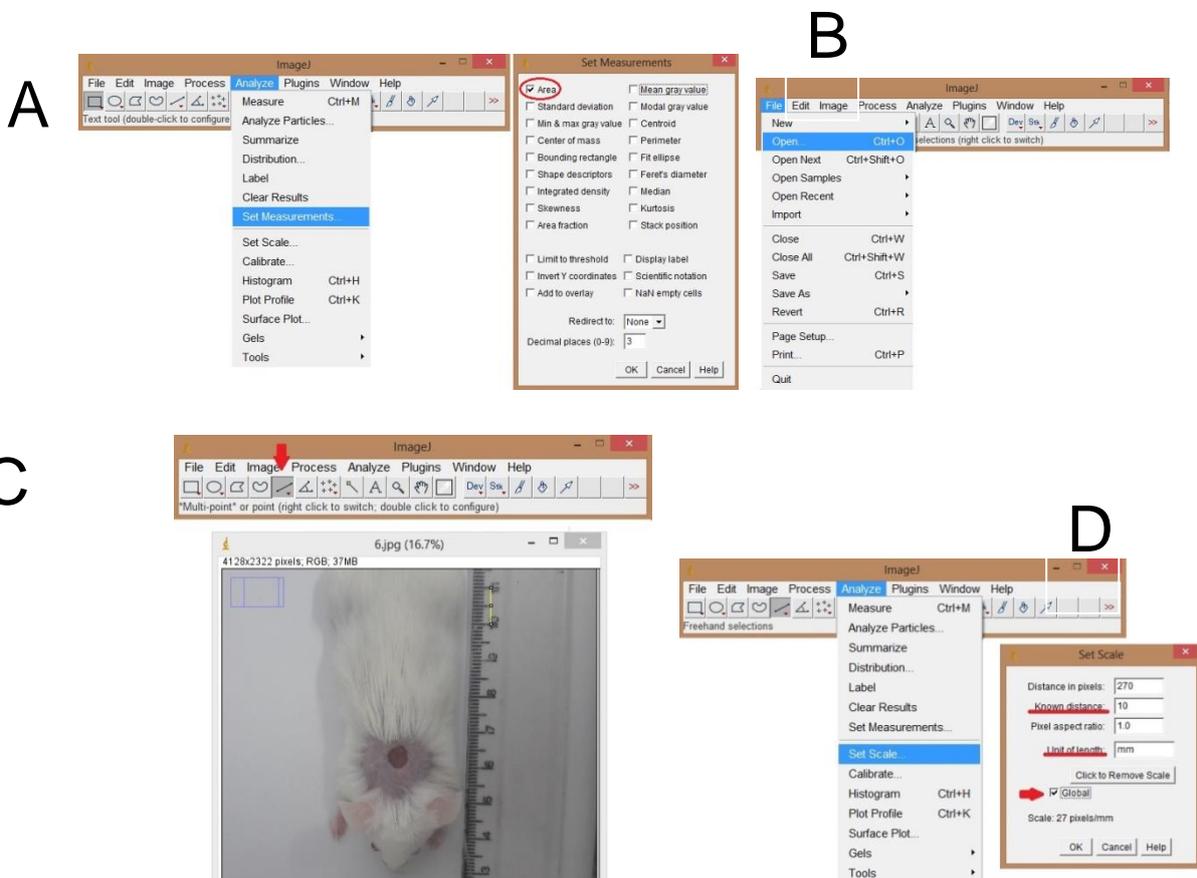
- Grupo 1: Camundongos com feridas tratadas com gel base (Controle).
- Grupo 2: Camundongos com feridas tratadas com Soro Total na concentração de 0,01%.
- Grupo 3: Camundongos com feridas tratadas com FrHB1 na concentração de 0,01%.
- Grupo 4: Camundongos com feridas tratadas com FrHB1 na concentração de 0,1%.
- Grupo 5: Camundongos com feridas tratadas com FrHB1 na concentração de 1%.

Ao longo de todo o experimento os animais foram mantidos individualmente em caixas de polipropileno, em sala com renovação constante de ar, à temperatura de 22 a 24°C e umidade entre 45 e 55%, submetidos a ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com água e ração *ad libitum*.

Para a realização das lesões, os camundongos foram previamente pesados, anestesiados com cloridrato de quetamina (100mg/kg) e cloridrato de xilazina (5mg/kg) e depilados manualmente. Posteriormente, incisões circulares foram feitas na pele do dorso dos animais recém-depilados, para isso a área previamente depilada foi limpa com álcool etílico 70% e as lesões realizadas com o auxílio de uma tesoura afiada. As lesões foram tratadas de acordo com o delineamento experimental, observadas e fotografadas diariamente durante um período de 10 dias. No décimo dia os animais foram submetidos à eutanásia para a coleta do tecido neoformado na área da lesão. Os tecidos provenientes das lesões foram congelados em freezer -80°C para posteriores análises histológicas e determinação do conteúdo de colágeno.

3.5 Análise Morfométrica da Área da Lesão

As imagens obtidas a cada dia de tratamento foram analisadas por morfometria com auxílio do *software ImageJ* versão 1.50i para a obtenção da área das lesões. Primeiramente, em <Set Measurements> no menu <Analyze>, o *ImageJ* foi programado para calcular áreas de imagens, habilitando a caixa “Area” (Figura 1A). Para abrir a imagem foi pressionado <Open> no menu <File> (Figura 1B). O *software* foi calibrado baseando-se na distância conhecida, com o uso da ferramenta “Straight”, traçou-se uma reta correspondente a 10mm na régua (Figura 1C), no menu <Analyze>, em <Set Scale>, a caixa “Know distance” foi preenchida com o número “10” e na caixa “Unit of length” digitado “mm”. A caixa “Global” deve sempre estar habilitada. Foi realizada essa calibração para cada imagem analisada (Figura 1D). Utilizado a ferramenta “Wand (tracing) tool”, com grande tolerância entre 15 e 20%, o contorno das úlceras foram traçados de acordo com sua coloração (Figura 1E). Por último, obteve-se a área traçada em mm² pressionando em <Measure> no menu <Analyze> (Figura 1F).



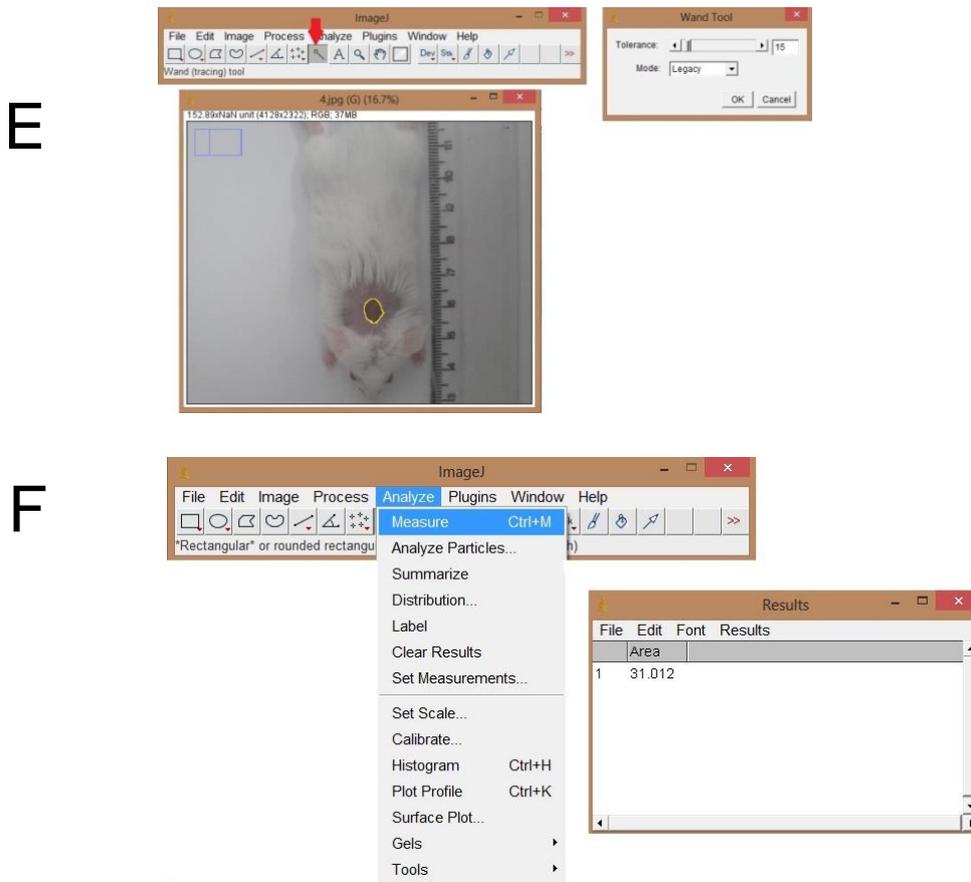


Fig 1. Protocolo do cálculo da área da lesão usando o *software ImageJ*.

3.6 Análise Histológica

Selecionaram-se as amostras de tecido neoforado dos dois camundongos com melhor perfil de cicatrização de cada grupo tendo como referência a análise das imagens. Dessa forma, foram confeccionadas 10 lâminas histológicas em parceria com o laboratório de Patologia Geral da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

O tecido neoforado de cada camundongo selecionado foi descongelado à temperatura ambiente, fixado em formaldeído 10% durante 24 horas sob agitação contínua. Após a fixação, os tecidos foram desidratados, embebidos em parafinas e realizados cortes de 5 μ m de espessura (Leite et al., 2015).

Foram utilizadas duas diferentes colorações para a confecção das lâminas histológicas: a coloração por Hematoxilina e Eosina (HE) a fim de analisar o tecido neoforado assim como a proliferação de células inflamatórias; e a coloração por PicroSirius (PS), que fornece informações em relação à produção de colágeno. As

lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Axiolab) e as imagens foram feitas através de uma câmera acoplada (Leica® DF C300FX).

3.7 Quantificação do Teor de Colágeno

A determinação do conteúdo de colágeno se deu a partir da dosagem de hidroxiprolina e foi feito de acordo com Neuman e Logan (1950) e Edwards e O'Brien (1980) com modificações, conforme descrito à seguir:

3.7.1 Preparação dos Reagentes

- Cloramina T 0,05mol/L (preparada imediatamente antes do uso):

Pesou-se 0,14g de Cloramina T e se dissolveu, sob agitação, em 10mL de água destilada.

- Solução de Ácido perclórico – aldeído (preparado até uma hora antes do uso):

Pesou-se 3g de p-dimetilaminobenzaldeído e adiciona-se 12 mL de isopropanol, mais 5,2 mL de ácido perclórico (70% v/v). Ao final, adicionou-se água destilada até alcançar o volume final de 20 mL.

- Solução tampão (com validade de até 2 meses sob refrigeração):

Pesou-se 8,31g de ácido cítrico, 22 g de acetato de sódio.3H₂O, 5,68g de NaOH e se adicionou 2 mL de ácido acético glacial e 50 mL de isopropanol. Por último, adicionou-se água até alcançar o volume de 250 mL e se ajustou o pH para 6,5 com NaOH 1 mol/L.

3.7.2 Curva Padrão

Foi feita uma curva de calibração pela diluição de uma solução de hidroxiprolina com concentração conhecida. A curva possui seis pontos com concentrações que variam entre 1,25 µg/mL a 20 µg/mL.

3.7.3 Preparação do Tecido

O tecido foi hidrolisado adicionando-se 1mL de HCl 6 mol/L para cada 10 mg de tecido e incubado por 48 horas a 50°C, passado o tempo de incubação o pH foi neutralizado com NaOH 1 mol/L e as amostras congeladas em freezer -80°C para serem posteriormente liofilizadas.

3.7.4 Dosagem de Hidroxiprolina

O conteúdo previamente liofilizado foi ressuspenso em 1 mL de solução tampão, foi adicionado 1 mL de Cloramina-T e os tubos foram mantidos em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente. Após esse período foi adicionado 1 mL da solução de ácido perclórico – aldeído e os tubos foram mantidos em banho-maria a 60°C por 15 minutos. Os tubos foram resfriados e realizada a leitura das absorbâncias à 550nm em espectrofotômetro. Todas as determinações foram realizadas em duplicata. A concentração de hidroxiprolina foi calculada pela interpolação de pontos na curva de calibração.

3.7.5 Determinação do Teor de Colágeno

A quantidade de hidroxiprolina foi convertida para seu equivalente de colágeno através da multiplicação pelo fator de conversão 7,46 e o teor de colágeno foi calculado segundo a relação expressa a seguir (2) (Neuman e Logan, 1950).

$$\%colágeno = \frac{[OHprolina] \times 7,46 \times 100}{m} \quad (2)$$

Onde,

[OHprolina] = concentração de hidroxiprolina em µg/mL;

m= massa de tecido hidrolisado em µg.

3.8 Dosagem de Enzimas e Citocinas

3.8.1 Processamento do Tecido

O tecido foi preparado para as análises em microtubos identificados de acordo com o número do camundongo e do grupo. Em cada microtubo foram adicionados 500 µL de um inibidor de protease (ELCK e NP-40) e o fragmento de tecido correspondente foi imerso nessa solução. O tecido foi triturado com um triturador de tecido (TissueRuptor Steel Probe, QUIAGEN™), após esse procedimento as amostras foram mantidas no banho maria com gelo. Até a dosagem de enzimas, citocinas e NO, as amostras foram mantidas em geladeira

convencional entre 4 e 8°C. No momento da dosagem, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 5 minutos e o sobrenadante ou homogenato do tecido foram transferidos para uma placa de 96 poços.

3.8.2 Dosagem de Citocinas

As citocinas foram quantificadas pelo método de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, BD Pharmigen™, San Diego, USA). Utilizou-se 50 µL do homogenato do tecido obtido incubados em uma placa de 96 poços contendo os anticorpos de captura e detecção para TNF- α , IL-10 e IFN- γ de acordo com as recomendações do fabricante. A revelação das reações se deu pela adição de 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) e foram interrompidas pela a adição de H₂SO₄ 2 normal (2N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a Lm-1450 nm – Lm-2570nm.

3.8.3 Ensaio de Quantificação de Mieloperoxidase

A análise da atividade da enzima MPO nos tecidos neoformados foi realizada para se determinar a quantidade de neutrófilos (Bradley et al., 1982; Krawisz et al., 1984). O fragmento de tecido retirado do dorso dos camundongos foi centrifugado à 3000 rpm durante 15 minutos à 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspense em solução tampão contendo fosfato de sódio e EDTA com o auxílio de um vórtex. Foi adicionado uma solução gelada de NaCl 0,2% para que ocorresse a lise das hemácias. Foi realizada uma nova centrifugação e o *pellet* obtido foi ressuspense em uma solução tampão contendo fosfato de sódio e Brometo de Hexadecil-Trimetil Amônio 0,5% (H-TAB).

Para que a extração de proteínas dos fragmentos de tecido fosse finalizada, as amostras foram congeladas a -20°C e descongeladas 3 vezes e posteriormente centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos a 4°C. Para a realização do ensaio enzimático foi utilizado o sobrenadante, adicionando-se 50 µL de amostra em uma placa de 96 poços. A reação foi revelada pela adição de TMB e interrompida por 25µL de H₂SO₄ 4 mol/L e realizada a leitura espectrofotométrica a 450 nm.

3.8.4 Ensaio de Quantificação de Eosinófilo Peroxidase

A avaliação da atividade da enzima EPO nos tecidos coletados foi realizada para a quantificação de eosinófilos (Strath et al., 1985). As amostras de tecidos foram trituradas e centrifugadas a 1950 g durante 10 minutos à 4°C e o *pellet* sofreu hidrólise por choque hipotônico. Esta suspensão foi novamente centrifugada e o *pellet* ressuspense em solução tampão HBSS-HTAB. Foi realizado choque térmico seguido por centrifugação e o sobrenadante foi utilizado para as reações. As amostras foram incubadas em placas de 96 poços contendo o-fenilenodiamina dihidrocloro (OPD) durante 30 minutos à temperatura ambiente e em local escuro. Interrompeu-se a reação com H₂SO₄ 4 mol/L e a densidade ótica determinada a 492nm.

3.8.5 Avaliação da Produção de Óxido Nítrico

Realizou-se a reação de Griess para a determinação da produção de NO no tecido neoformado obtido do dorso dos camundongos (Sá-Nunes, et al., 2007). Nessa reação foi feita a quantificação de nitrito no sobrenadante do homogenato do tecido como parâmetro indireto da produção de NO, para tal 50 µL do sobrenadante foi distribuído em placas de 96 poços e em seguida ocorreu a adição de 50µL da solução de revelação na proporção de 1:1 das soluções A e B, sendo que a solução A é composta de sulfamilamida 1% em H₃PO₄ 5% e a solução B de Naftiletilenodiamino Dihidroclorídrico 0,1%.

A quantificação de NO foi dada pela absorbância medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 554nm e a concentração foi calculada a partir de uma curva padrão de NaNO₂ e expressos em µmol/L.

3.9 Análise Estatística

Os resultados encontrados foram tabulados no programa *Graphpad Prism 5.0*, o qual foi utilizado para realizar as análises estatísticas. Quando a distribuição foi considerada normal e a variância homogênea foram utilizados testes *t* paramétricos não pareados ou ANOVA – One way seguido de comparação com o grupo controle pelo método de Dunnett's. Nos casos em que a distribuição não foi Gaussiana foram utilizados os testes Mann Whitney (para 2 grupos) ou Kruskal-

Wallis seguido por comparação múltipla de Dunnett's, para 3 ou mais grupos. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%).

4 RESULTADOS

4.1 Separação das Frações do Soro Total do Látex por Cromatografia em DEAE-Sepharose

Em uma primeira etapa de separação das frações do soro total do látex da seringueira, material obtido pela coagulação da borracha, foi utilizado cromatografia em resina de DEAE-sepharose. Esta resina apresenta a característica de se comportar como uma trocadora aniônica. Após a completa aplicação da amostra, iniciou-se a eluição dos componentes do soro com o tampão de equilíbrio (bicarbonato de amônio 0,01mol/L, pH 7,8) e, em sequência, com um gradiente descontínuo de eluição nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,5mol/L de NaCl no mesmo tampão de equilíbrio descrito anteriormente.

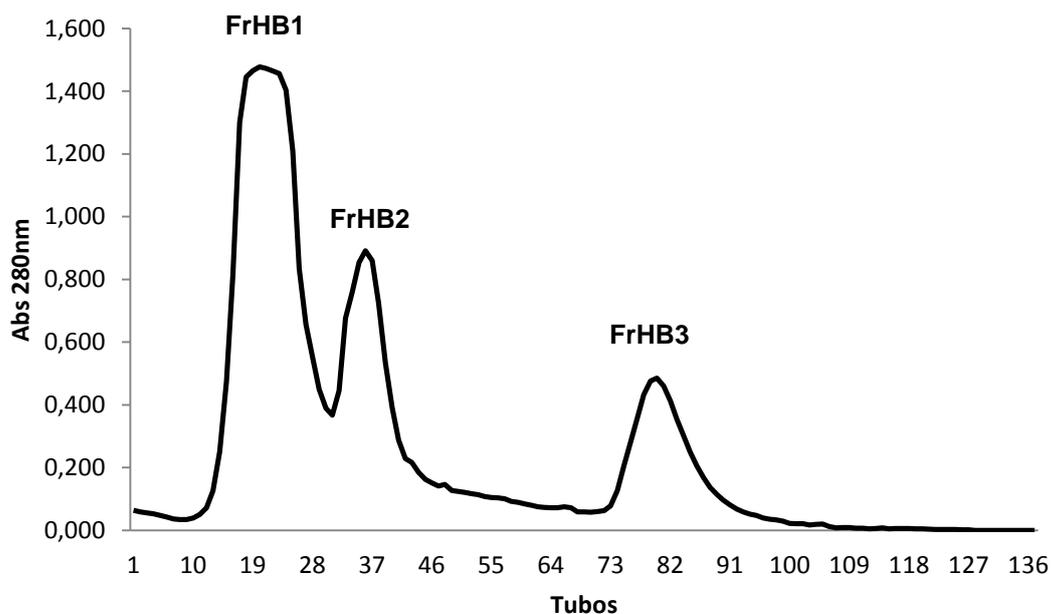


Fig 2. Perfil cromatográfico obtido a partir de uma etapa de purificação do soro do látex natural da seringueira em DEAE-sepharose em pH=7,8.

Foram obtidos três picos e identificados como Fração 1 (FrHB1), Fração 2 (FrHB2) e Fração 3 (FrHB3) (Figura 2). Tais amostras, correspondentes a cada uma das frações, foram reunidas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas para testes posteriores.

4.2 Atividade Indutora da Proliferação de Fibroblastos (McCoy) das Frações e do Soro Total

Conhecendo a atividade cicatricial da FrHB1, onde ficou evidenciada sua atividade proliferadora de células fibroblásticas (HEK293T) (Mendonça, 2008), foi realizado um ensaio para se determinar a atividade indutora da proliferação celular de fibroblastos da linhagem McCoy. A linhagem McCoy foi adotada para se realizar os estudos de proliferação celular por se tratar de uma cultura de células de fácil padronização e manipulação.

O soro total do mesmo modo que as três frações obtidas da cromatografia foram testados em culturas de células McCoy e suas capacidades de induzirem a proliferação celular *in vitro* foram avaliadas. O resultado dessa avaliação é demonstrado da figura 3.

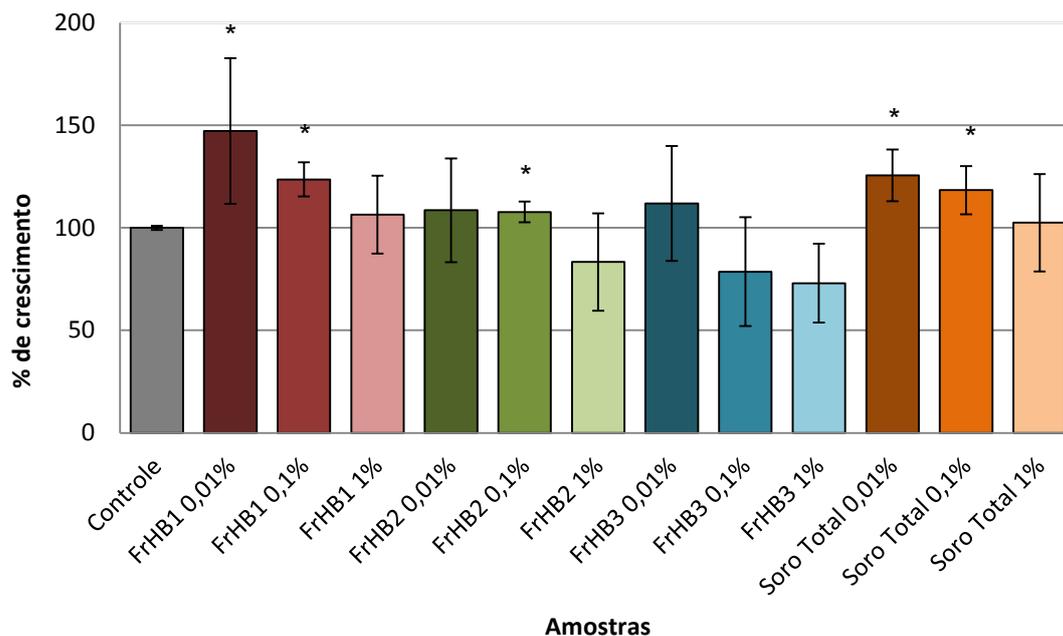


Fig. 3. Atividade indutora de proliferação de células McCoy em cultura. Foram realizados 3 experimentos individuais em triplicata. Os resultados são exibidos em média \pm desvio padrão (DP). (* $p < 0,05$).

O resultado demonstra uma indução do aumento na proliferação celular exercido principalmente pela FrHB1 na ordem de $47,1 \pm 11,3\%$ para a concentração de 0,01%. Entre os materiais testados, se destacam também o Soro Total 0,01% e a FrHB1 0,1%, com proliferação de $25,5 \pm 2,5\%$ e $23,5 \pm 1,6\%$ acima do controle,

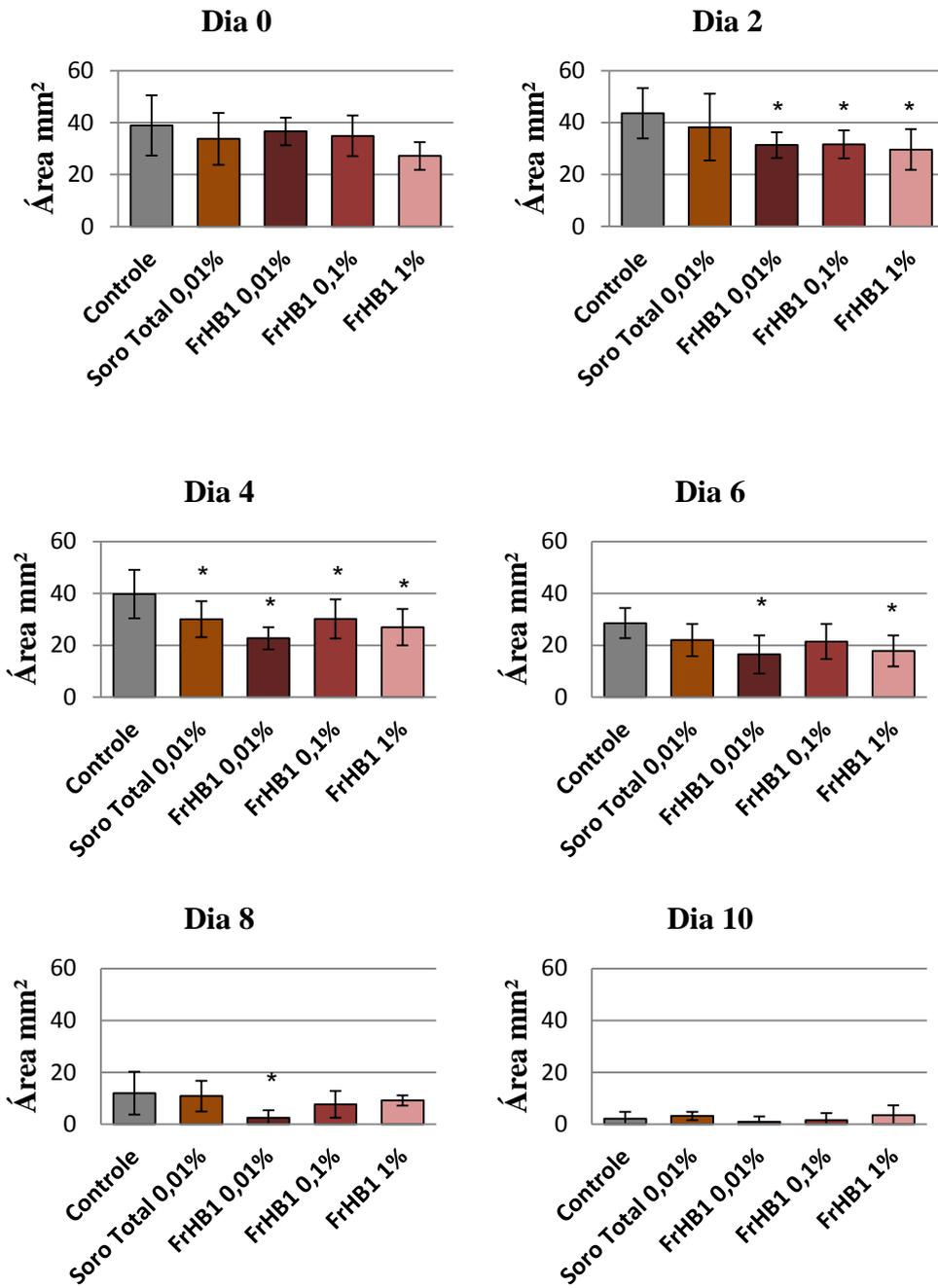
respectivamente. Houve uma proliferação menos expressiva nas culturas celulares tratadas com FrHB2 e Soro Total, ambos na concentração de 0,1%, dado que o crescimento foi de $7,7\pm 0,4\%$ para FrHB2 0,1% e de $18,3\pm 1,8\%$ para o Soro Total 0,1%. Os demais materiais testados não demonstraram diferença significativa em relação ao grupo controle. O estudo de proliferação celular por meio do ensaio de Vermelho Neutro indicou que a FrHB2 a 1% e a FrHB3 nas concentrações de 0,1 e 1% inibem a proliferação celular, na ordem de $7,045\pm 2,2\%$ e $27,0\pm 7,1\%$ para FrHB3 0,1 e 1%, respectivamente e $16,7\pm 4,7\%$ para FrHB2 1%, entretanto não houveram evidências estatísticas que comprovem essa inibição.

4.3 Atividade Cicatrizante do Soro Total e da FrHB1 em Modelo de Lesão Cutânea em Camundongos

A média da área inicial das lesões foi de $34,3\pm 4,4\text{mm}^2$ e não houveram diferenças estatísticas entre os grupos no dia em que se iniciou o tratamento. Pode-se observar que nos dias 2 e 4 após o início do tratamento ocorreu uma redução significativa na área da lesão entre o grupo tratado apenas com o veículo (Grupo 1) e os demais grupos, sobretudo em relação ao Grupo 3, tratado com FrHB1 na concentração de 0,01% m/m. No sexto e oitavo dias de tratamento é possível perceber uma maior efetividade da FrHB1 0,01% na diminuição da área ulcerada em relação aos outros grupos estudados. Já no último dia de intervenção terapêutica, não existe evidência estatística que comprove diferença na área da lesão entre os cinco grupos (Figura 4A).

O gráfico apresentado na figura 4B mostra a cinética do fechamento das lesões e observa-se a ação da FrHB1 na concentração de 0,01% m/m na aceleração do processo cicatricial. Em todos os grupos ocorre uma queda mais acentuada na área lesionada a partir do quinto dia de tratamento, sendo que apenas no Grupo 3, tratado com FrHB1 a 0,01%, a área da lesão é reduzida desde o primeiro dia de tratamento e essa redução permanece constante ao longo dos dez dias, indicando que a FrHB1 nessa concentração é mais eficiente no processo de reparo tecidual uma vez que a cicatrização deu-se com maior celeridade.

A



B

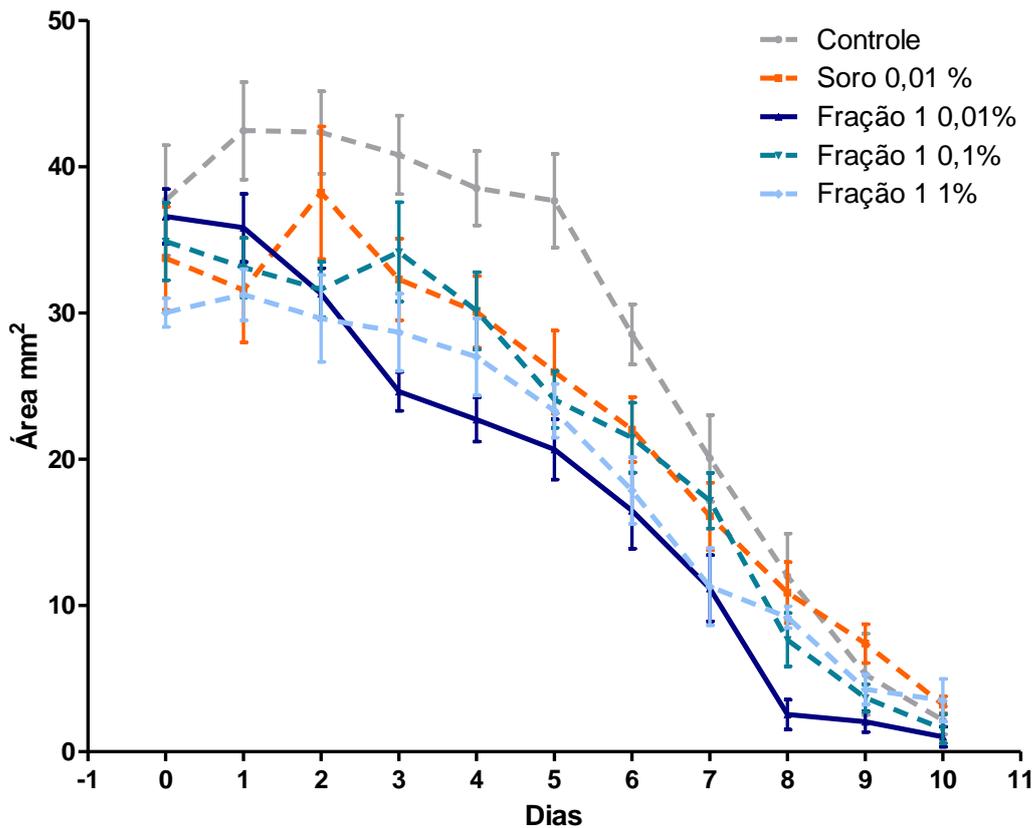


Fig. 4. (A) Medidas das áreas das lesões ao logos dos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10 e (B) cinetica de fechamento das feridas ao longo do tempo de experimentação. Os resultados são exibidos em média \pm desvio padrão (DP). (* $p < 0,05$) $n=8$.

Observa-se a formação de crostas (Figura 5) em todos os grupos nas imagens capturadas no quinto dia de tratamento, já no décimo dia de tratamento é possível perceber ausência de crosta ou crosta mais tênue principalmente nos grupos 2, 3 e 4, tratados com Soro Total (0,01%) e FrHB1 nas concentrações de 0,01% e 0,1% m/m, respectivamente.

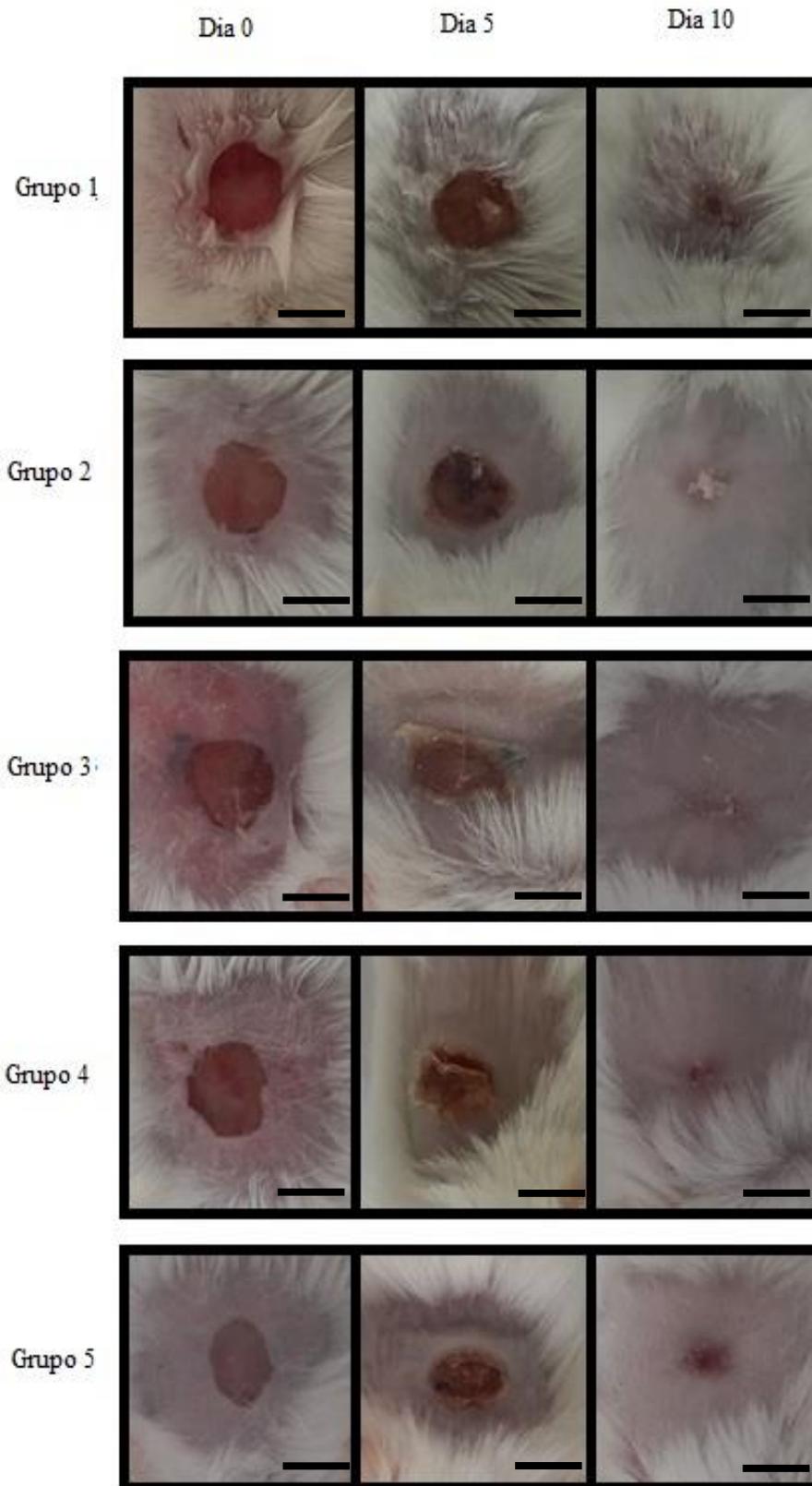


Fig. 5. Seguimento clínico das lesões cutâneas. O mesmo animal representando cada um dos grupos (Grupo 1=Controle; Grupo 2=Soto Total 0,01%; Grupo 3=FrHB1 0,01%; Grupo 4=FrHB1 0,1%; Grupo 5=FrHB1 1%) fotografado nos dias 0, 5 e 10 após a confecção da úlcera. (Barra de referência: 7mm).

4.4 Análise Histológica

4.4.1 Coloração com Hematoxilina-Eosina

Identificou-se no Grupo 1, tratado apenas com o veículo (Figura 6A) reepitelização da derme, com presença de tecido de granulação com infiltrado mononuclear típico, além de neoangiogênese, já no Grupo 2, tratado com Soro Total 0,01% (Figura 6B) além da reepitelização e tecido de granulação, com menor quantidade de infiltrado mononuclear, também foram observados vasos sanguíneos sendo formados. Na figura 6C, referente ao Grupo 3, tratado com FrHB1 0,01%, pode-se observar um processo de reparo tecidual avançado por apresentar a formação de anexos da derme (folículos pilosos, por exemplo), além de reepitelização, angiogênese e tecido de granulação típico. No Grupo 4, tratado com FrHB1 a 0,1% (Figura 6D), foi observado a formação de um epitélio mais fino e áreas com infiltrado mononuclear mais pronunciado. Por fim, no Grupo 5, tratado com FrHB1 na concentração de 1% (Figura 6E), foi constatado a presença de infiltrado mononuclear mais intenso, semelhante ao Grupo 4.

4.4.2 Coloração com PicroSirius

Observou-se no Grupo 1 (Figura 7A) fibras colágenas paralelas com arranjo relativamente frouxo, enquanto que no Grupo 2 (Figura 7B) as fibras mostraram-se desorganizadas e na área onde havia a presença de infiltrado mononuclear a produção de colágeno foi inferior. Na figura 7C, que concerne ao Grupo 3 (FrHB1 0,01%), nota-se fibras colágenas densas e bem organizadas, entretanto, em uma pequena área com infiltrado mononuclear remanescente há menor quantidade de colágeno disposto de maneira desorganizada. Em relação ao Grupo 4, é possível observar colágeno arranjado de forma mais densa na região superficial e de maneira desorganizada nas camadas mais profundas (Figura 7D), já no Grupo 5 existe uma grande área com infiltrado inflamatório e com pouca deposição de colágeno (Figura 7E).

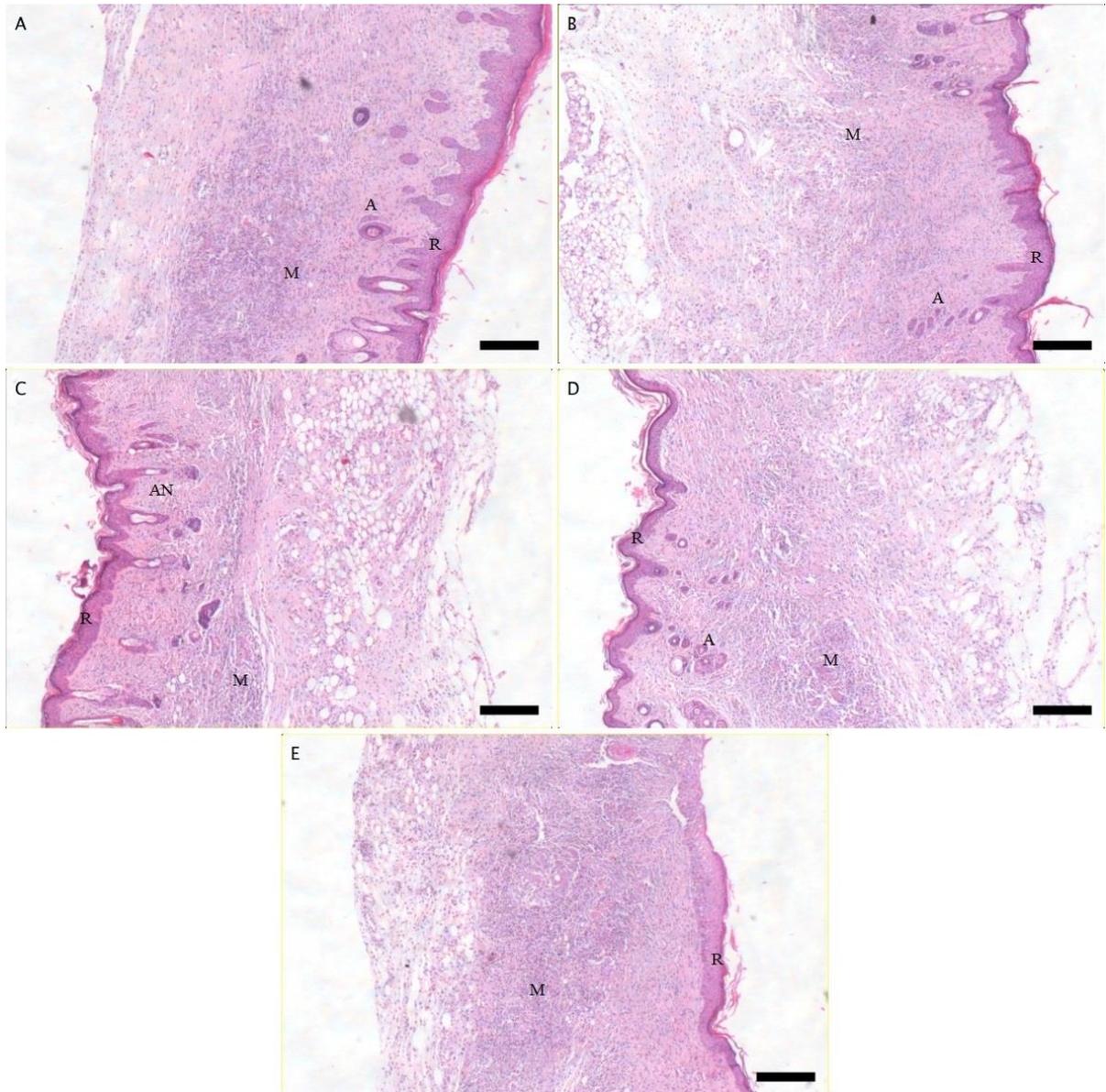


Fig 6. Fotomicrografia das áreas das lesões tratadas topicamente, (A) Controle; (B) Soro Total 0,01%; (C) FrHB1 0,01%; (D) FrHB1 0,1%; (E) FrHB1 1%, no 10º dia de tratamento coradas com hematoxilina-eosina. Destaca-se a reepitelização (R), angiogênese (A), infiltrado mononuclear (M) e anexos (AN). (Aumento: 40x. Barra de referência: 200µm).

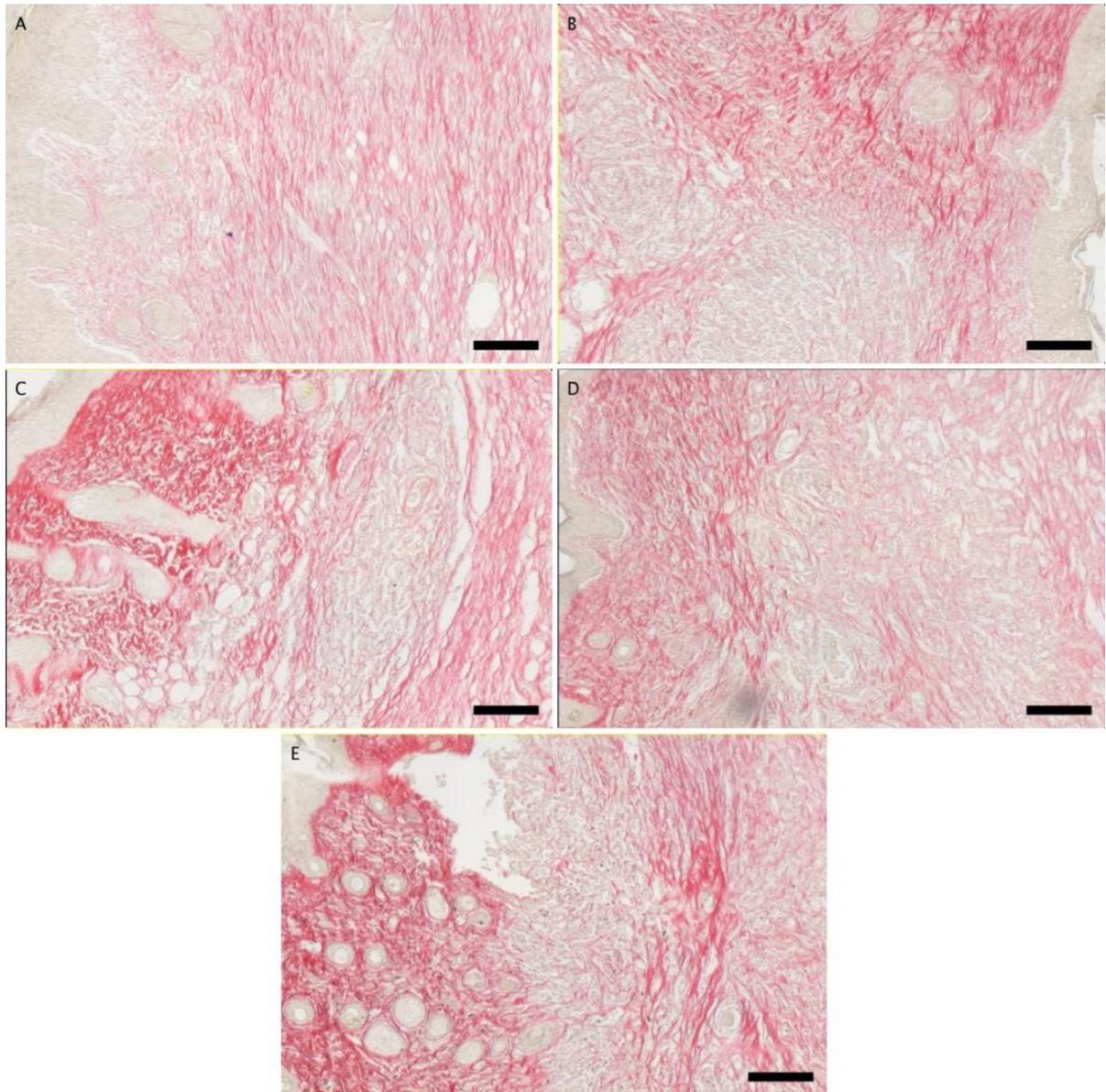


Fig 7. Fotomicrografia das áreas das lesões tratadas topicamente, (A) Controle; (B) Soro Total 0,01%; (C) FrHB1 0,01%; (D) FrHB1 0,1%; (E) FrHB1 1%, no 10º dia de tratamento coradas com PicroSirius. (Aumento: 40x. Barra de referência: 100µm).

4.5 Quantificação do Teor de Colágeno no Tecido Neoformado

Quanto ao teor de colágeno estimado a partir da concentração de hidroxiprolina, pode-se observar que todos os grupos tratados, tanto com Soro Total 0,01% quanto com todas as concentrações de FrHB1, foram superiores quando comparados ao controle, indicando maior produção de colágeno pelos fibroblastos presentes do tecido neoformado. Destaca-se ainda uma maior porcentagem de colágeno nos tecidos tratados com FrHB1, sobretudo na concentração de 0,01%,

sugerindo que essa fração tem a propriedade de induzir a produção de colágeno pelas células fibroblásticas (Figura 8).

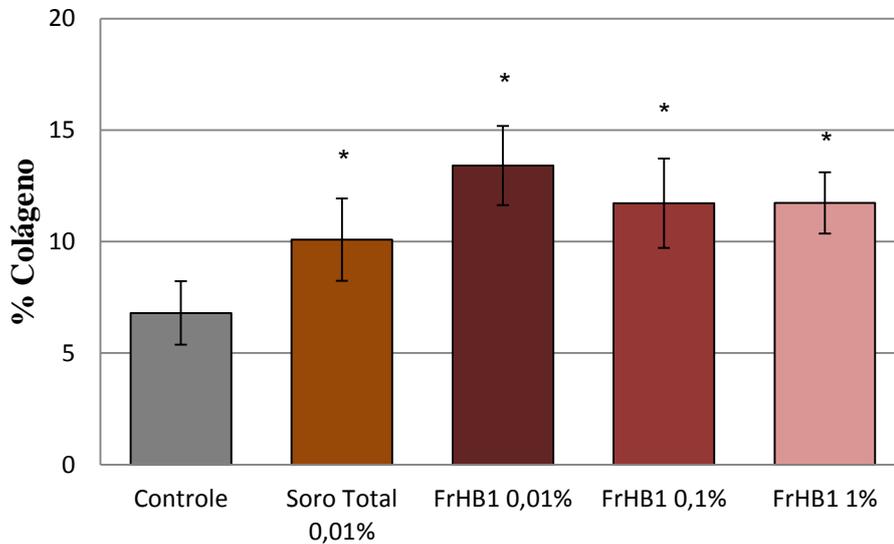


Fig. 8. Teor de colágeno nos tecidos neoformados das úlceras após 10 dias de tratamento. Os resultados são exibidos em média±desvio padrão (DP). (* $p < 0,05$).

4.6 Quantificação de Citocinas, Enzimas e Óxido Nítrico

Na investigação do efeito do uso do gel contendo diferentes concentrações de FrHB1 e Soro Total na produção de IL-10, TNF- α , IFN- γ , NO, EPO e MPO. Em relação às citocinas, não houveram evidências estatísticas que comprovem diferenças entre os grupos, como mostrado na figura 9.

Na figura 10, pertinente à dosagem de NO, EPO e MPO, é possível constatar uma grande disparidade entre os grupos estudados, entretanto no que concerne NO não há diferenças estatísticas significativas. Ocorre uma redução dos parâmetros de MPO e EPO nos Grupos 2 e 3, tratados com Soro Total e FrHB1 ambos na concentração de 0,01% m/m, por outro lado, o Grupo 5, tratado com FrHB1 a 1% se mostrou aumentado em relação ao controle. Não houve diferença estatística entre o Grupo 4 e o controle.

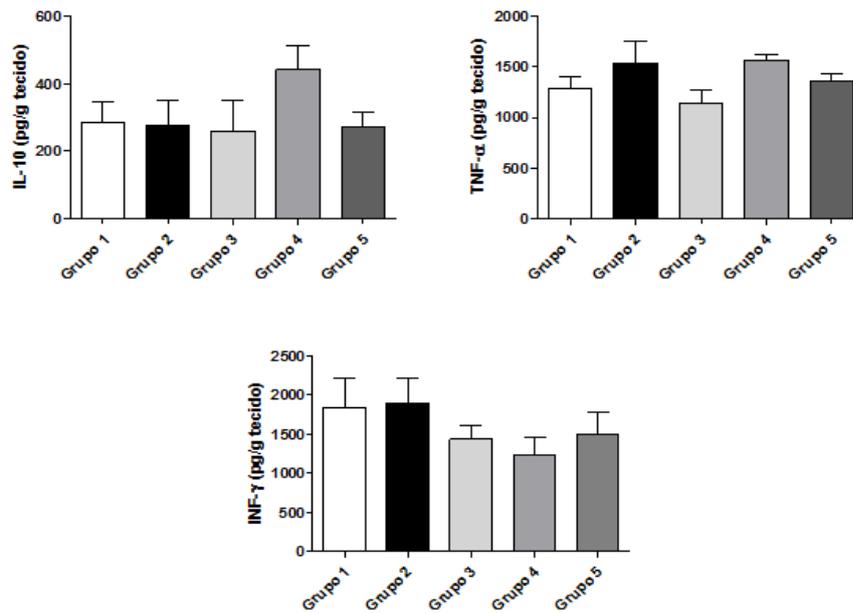


Fig. 9. Dosagem de IL-10, TNF- α e IFN- γ no 10^o dia de tratamento. Grupo 1: Controle; Grupo 2: Soro total 0,01%; Grupo 3: FrHB1 0,01%; Grupo 4: FrHB1 0,1%; Grupo 5: FrHB1 1%. Resultado expresso em média \pm desvio padrão (DP) n=8.

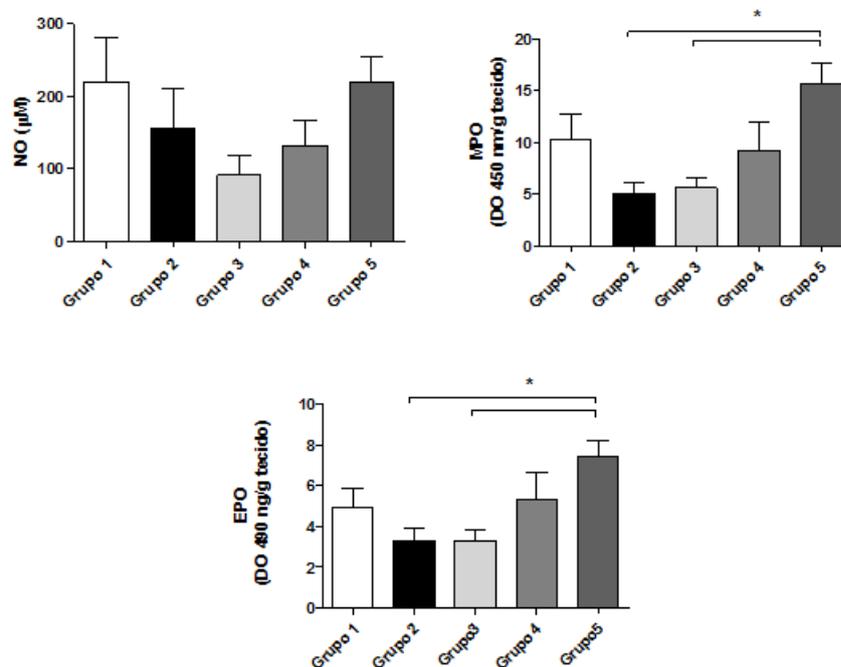


Fig. 10. Dosagem de Óxido Nítrico (NO), Mieloperoxidase (MPO) e Eosinófiloperoxidase (EPO) no 10^o dia de tratamento. Grupo 1: Controle; Grupo 2: Soro total 0,01%; Grupo 3: FrHB1 0,01%; Grupo 4: FrHB1 0,1%; Grupo 5: FrHB1 1%. Resultado expresso em média \pm desvio padrão (DP) n=8. (* p<0,05).

5 DISCUSSÃO

O látex oriundo da seringueira (*Hevea brasiliensis*) tem demonstrado ser um material promissor para o uso como acelerador do processo de cicatrização, devido seu potente efeito angiogênico e anti-inflamatório, além de baixo custo para obtenção. Por essas razões, estudos relativos às propriedades do látex da seringueira, assim como compostos provenientes do mesmo, fazem-se necessários. A fim de compreender melhor os mecanismos de ação que levam compostos bioativos presentes no látex da seringueira a acelerarem o processo de reparo tecidual, este trabalho utilizou um modelo experimental de ferida cutânea em camundongos, relacionando o tempo de cicatrização da lesão com o aumento do número de fibroblastos, produção de colágeno, assim como a avaliação de citocinas e enzimas presentes no processo inflamatório.

Analisando os resultados referentes à proliferação celular de fibroblastos (McCoy), percebeu-se que a FrHB1 na concentração de 0,01% m/m induziu o crescimento das células em $47,1 \pm 11,3\%$ frente ao controle, sendo a fração e a concentração que demonstrou os melhores efeitos nesse certame. Resultados semelhantes foram descritos por Mendonça, 2008, onde essa mesma fração do soro do látex com a menor concentração testada (0,01mg/mL) apresentou os melhores efeitos no crescimento de células semelhantes a fibroblastos primários (HEK293T) (Mendonça, 2008). Outro estudo análogo utilizou diferentes concentrações do soro total do látex em uma linhagem de fibroblastos e observou um crescimento celular onde foi aplicado o soro nas concentrações de 0,1 e 1%, sendo esse crescimento de 9% e 5%, respectivamente (Leite, 2016). Neste estudo, foi demonstrado um crescimento celular de $18,3 \pm 1,8\%$ a mais que o controle quanto usado o soro total 0,1%, enquanto que a 1% não houve diferença estatística. Em contrapartida, utilizando de uma concentração mais baixa do soro total (0,01%) foi obtido um resultado melhor em relação ao crescimento celular, aproximadamente 25,5% a mais frente ao controle.

Quanto à atividade cicatrizante da FrHB1 e do Soro Total do látex da seringueira, foi observado que a FrHB1 a 0,01% p/p reduziu significativamente a área da lesão ao longo de todos os dias de tratamento, demonstrando-se mais eficiente que as demais concentrações e materiais testados. Este resultado foi

corroborado ao analisar os cortes histológicos realizados no fragmento retirado do dorso do animal após os 10 dias de tratamento, percebeu-se que no grupo tratado com a FrHB1 0,01% se encontrava com um processo de reepitelização avançada e já apresentava anexos da derme, enquanto os demais grupos demonstraram um processo de cicatrização mais atrasado quando comparado ao grupo em questão.

Fazendo uso da mesma fração do soro do látex, Mendonça (2008) demonstrou resultados semelhantes aos expostos neste trabalho. A fração incorporada em carboximetilcelulose foi aplicada em orelha de coelho e apresentou redução da área ulcerada a partir do terceiro dia de tratamento, sobretudo com a concentração de 0,01% p/v (Mendonça, 2008). Utilizando o soro total do látex, da mesma maneira descrita acima, a redução da área da lesão se deu com mais eficiência na concentração de 0,01% (Mendonça et al., 2010). Fazendo uso de uma membrana de látex natural, politetrafluoretileno expandido e um fragmento de luva cirúrgica, foi realizado um ensaio de atividade cicatricial em modelo experimental, apresentando resultados promissores em relação à membrana de látex natural que demonstrou uma maior formação de tecido macroscopicamente (Andrade et al, 2011).

No que se refere à produção de colágeno, a coloração com PicroSirius demonstrou que em todos os grupos houve a formação de colágeno, em quantidade e nível de organização distintos. O grupo tratado com FrHB1 a 0,01% apresentou uma deposição de colágeno mais densa em relação ao demais grupos, entretanto o colágeno depositado se encontrava desorganizado em áreas onde havia infiltrado inflamatório. A determinação do teor de colágeno nos fragmentos de tecidos, calculado a partir da concentração de hidroxiprolina encontrada nos mesmos, confirmaram o resultado descrito acima. Em todos os grupos houve a produção de colágeno, todos os grupos tiveram resultados superiores em relação ao controle com destaque para o grupo 3, tratado com FrHB1 0,01%, que aumentou a produção de colágeno em aproximadamente 97% em relação ao controle.

As citocinas dosadas neste estudo não apresentaram evidências de diferenças, provavelmente pela fase em que se encontrava a inflamação. O mesmo ocorreu na dosagem de óxido nítrico. Dessa forma, seria necessário que fossem realizadas as dosagens desses compostos em diferentes momentos do tratamento

para que fossem obtidos resultados mais conclusivos. No tocante às enzimas medidas, houve uma redução nos parâmetros de MPO e EPO nos grupos tratados com Soro Total e FrHB1 na concentração de 0,01%, enquanto o grupo tratado com FrHB1 a 1% esse parâmetro se encontrou aumentado.

Estudos recentes utilizando diferentes plantas medicinais para acelerar o reparo tecidual relataram achados semelhantes ao deste estudo. Ao testar o extrato etanólico da erva-de-passarinho (*Struthanthus vulgaris*) incorporado a uma pomada base na concentração final de 5%, ocorreu redução significativa dos níveis de MPO e NO até o 7º dia de tratamento, já nas dosagens subsequentes, no 14º e 21º dia não houveram diferenças estatísticas (Gramma et al, 2016). Em outro estudo recente foi usado extrato de *Leea macrophylla* em carboximetilcelulose e foi relatada a redução nos parâmetros de NO e MPO, principalmente quando o extrato foi utilizado topicamente (Joshi et al, 2016).

Embora não existam diferenças estatísticas na medida das áreas da lesão entre o grupo controle e os demais grupos em todos os dias de tratamento, a imagem mostra que na cicatrização com o soro total e FrHB1, ambos a 0,01%, há um recobrimento tecidual da ferida, sugerindo recuperação da lesão enquanto que as outras permanecem abertas. Além disso, a figura 4 mostra uma tendência de redução da ferida quando tratada com FrHB1 0,01% , assim como a análise histológica comprovou um reparo tecidual avançado e maior produção de colágeno. Estes fatos devem ser levados em consideração, pois para o tratamento em humanos, se dando da mesma forma, a melhora de um dia é crucial para o conforto e bem estar do paciente. Diante do exposto, podemos salientar ainda que são necessários novos estudos com concentrações mais baixas, assim como toxicidade crônica e aguda, para se definir a dose mínima eficaz e também a melhor concentração/resposta clínica.

6 CONCLUSÃO

A análise conjunta dos resultados nos permite concluir que tanto o Soro Total na concentração de 0,01% m/m quanto a FrHB1 em diferentes concentrações, agem de forma positiva no processo de cicatrização, acelerando a regeneração do tecido local e contribuindo para o fechamento da lesão de maneira mais efetiva e rápida quando comparado com o veículo isolado.

Em relação ao crescimento de células fibroblásticas, este estudo demonstrou que a FrHB1 0,01% aumenta de maneira significativa a quantidade de fibroblastos em cultura.

Dentre as concentrações de FrHB1 testadas, a menor concentração (0,01% m/m) mostrou atividade mais favorável no que se refere à redução do tempo de cicatrização, atividade essa confirmada nos cortes histológicos com estágio avançado no processo de reparação tecidual, havendo inclusive o aparecimento de anexos dérmicos.

Outro fator de notável importância é a produção de colágeno que esteve aumentada em todos os materiais testados, com destaque para FrHB1 0,01%, apresentado nas análises histológicas e corroborada no cálculo do teor de colágeno nos tecidos neoformados.

Existe uma provável relação entre o crescimento de fibroblastos e aumento na produção de colágeno e a consequente aceleração do processo de cicatrização.

As citocinas dosadas não apresentaram resultados conclusivos possivelmente devido à fase do processo de cicatrização em que foram analisadas.

Conhecendo a atividade cicatrizante do soro total e das frações do látex da seringueira, descrita nesse estudo, faz-se necessário mais estudos para completa compreensão de seu mecanismo de ação, bem como estudos que envolvam outras fases do processo de reparo tecidual, determinação de dose mínima eficaz, testes de toxicidade aguda e crônica, estudo de caracterização química, a fim de contribuir com o estudo de viabilidade de elaboração de um fitoterápico à base de *Hevea brasiliensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. *et al.* **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier. 2012.
- Abu-Soud, H. M. e Hazen, S. L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.8, Feb 25, p.5425-30. 2000.
- Andrade, T. A., Iyer, A., *et al.* The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Brazil Journal Medical Biological Research**, v.44, n.10, Oct, p.1036-47. 2011.
- Arnold, F. e West D. C.. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacological Therapy**, v.52, n.3, Dec, p.407-22. 1991.
- Balabanian, C. A. C. A., Coutinho-Netto J., *et al.* Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. **Journal of Oral Science**. v.48, p.201-205. 2006.
- Bradley, P., Zone J., *et al.* Cellular and Extracellular Myeloperoxidase in Dermatitis- Herpetiformis - Effect of Dapsone. **Journal of Investigative Dermatology**, v.78, n.4, p.348-348. 1982.
- Calixto, J. B., Campos, M. M., *et al.* Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**, v.70, n.2, Feb, p.93-103. 2004.
- Campos, A. C. Borges-Branco, L. A., *et al.* Cicatrização de feridas. **ADCB, Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva.**, v.20, n.1, p.51-58. 2007.
- Devienne, K., F., Raddi, M. S. G., *et al.* *In Vitro* Cytotoxicity of Some Natural and Semi-Synthetic Isocoumarins from *Paepalanthus bromelioides*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.52, p.85-88. 2001.

Dias, F. J., Issa, J. P., *et al.* Morphometric and high resolution scanning electron microscopy analysis of low-level laser therapy and latex protein (*Hevea brasiliensis*) administration following a crush injury of the sciatic nerve in rats. **Journal of Neurology Science**, v.349, n.1-2, Feb 15, p.129-37. 2015.

Dvorak, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v.20, p.4368-4380. 2002.

Edwards, C. A. e O'Brien, W. D. Modified Assay for Determination of Hydroxyproline in a Tissue Hydrolyzate. **Clinica Chimica Acta**, v.104, n.2, p.161-167. 1980.

Eming S. A., Werner S., *et al.* Accelerated wound closure in mice deficient for interleukin-10. **American Journal of Pathology**. v.170, p.170-188. 2007.

Flora Filho, R. e Zilberstein, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo , síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.46, n.3, p.265-71. 2000.

Folkman, J. e D'Amore, P. A. Blood vessel formation: what is its molecular basis? **Cell Press**, v.87, n.7, Dec 27, p.1153-5. 1996.

Frade, M. A., Assis, R. V., *et al.* The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.87, n.1, Jan-Feb, p.45-51. 2012.

Frade, M. A., Valverde, R. V., *et al.* Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **International Journal of Dermatology**, v.40, n.3, Mar, p.238-40. 2001.

Freitas, V. S., Rodrigues, R. A. F., *et al.* Pharmacological activities of Aloe Vera (L.) Burm. f. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.2, p.299-307. 2014.

Gabbiani, G., Hirschel, B. J., *et al.* Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. **Journal of Experimental Medicine**, v.135, n.4, Apr 1, p.719-34. 1972.

Gamma, L. S. D., Marques, F. M., *et al.* *Struthanthus vulgaris* ointment prevents an over expression of inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v.190, Aug 22, p.319-327. 2016.

Grisotto, P. C. **Desenvolvimento de uma nova prótese vascular derivada de látex natural e sua utilização na substituição da artéria femoral de cães.** Tese (Doutorado em Medicina; Área: Cirurgia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, p.157 f. 2003.

Herculano, R. D., Silva, C. P., *et al.* Natural Rubber Latex Used as Drug Delivery System in Guided Bone Regeneration (GBR). **Materials Research-Ibero-American Journal of Materials**, v.12, n.2, Apr-Jun, p.253-256. 2009.

Joshi, A., Joshi, V. K., *et al.* Systematic investigation of ethanolic extract from *Leea macrophylla*: Implications in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v.191, Sep 15, p.95-106. 2016.

Karukonda, S. R., Flynn, T. C., *et al.* The effects of drugs on wound healing--part II. Specific classes of drugs and their effect on healing wounds. **International Journal of Dermatology**, v.39, n.5, May, p.321-33. 2000.

Krawisz, J. E., Sharon, P., *et al.* Quantitative Assay for Acute Intestinal Inflammation Based on Myeloperoxidase Activity - Assessment of Inflammation in Rat and Hamster Models. **Gastroenterology**, v.87, n.6, p.1344-1350. 1984.

Kroegel, C., Yukawa, T., *et al.* Platelet-activating factor induces eosinophil peroxidase release from purified human eosinophils. **Immunology**, v.64, n.3, Jul, p.559-61. 1988.

Kumar, B., Vijayakumar, M., *et al.* Ethnopharmacological approaches to wound healing--exploring medicinal plants of India. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, n.2, Nov 1, p.103-13. 2007.

Leite, C. F., Lopes, C. S., *et al.* Endogenous resident c-Kit cardiac stem cells increase in mice with an exercise-induced, physiologically hypertrophied heart. **Stem Cell Research**, v.15, n.1, Jul, p.151-164. 2015.

Leite, M. N. **Eficácia do soro do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização de escoriação cutânea em ratos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, 2016. 77 f p.

Loria, V., Dato, I., *et al.* Myeloperoxidase: A new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators of Inflammation**. 2008.

Maciel, M. A. M., Pinto A. C., *et al.* Echevarria A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. V.25, n.3, p. 429-438. 2002

Manfrin Arnez, M. F., Xavier, S. P., *et al.* Implant osseointegration in circumferential bone defects treated with latex-derived proteins or autogenous bone in dog's mandible. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**. v.14, n.1, p.135-143. 2012.

Mendonça, R. J. **Purificação e caracterização de uma proteína angiogênica, indutora de fibroplasia e cicatrizante presente no Látex Natural da Seringueira *Hevea brasiliensis*.** Tese (Doutorado em Ciências - Área: Bioquímica), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, 2008. 145 f p.

Mendonça, R. J. e Coutinho-Netto, J. Cellular aspects of wound healing. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.3, p.257-62. 2009.

Mendonca, R. J., Mauricio, V. B., *et al.* Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Phytotherapy Research**, v.24, n.5, May, p.764-8. 2010.

Mrué, F. **Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com poli-lisina. Aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães.** Tese (Doutorado em Medicina; Area : Cirurgia) Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto - USP, Ribeirao Preto, 2000. 111 f p.

Mrué, F., Coutinho-Netto, J., *et al.* Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials Research**, v.7, n.2, p.277-283. 2004.

Neuman, R. E. e Logan, M. A.. The Determination of Hydroxyproline. **Journal of Biological Chemistry**, v.184, n.1, p.299-306. 1950.

Oliveira, C. M. B., Sakata, R. K., *et al.* Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.61, n.2, p.260-65. 2011.

Pinto, N. C., Cassini-Vieira, P., *et al.* *Pereskia aculeata* Miller leaves accelerate excisional wound healing in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.194, Dec 24, p.131-136. 2016.

Roman, R. M., Wendland, A. E., *et al.* Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.91, n.1, Jul, p.e11-9. 2008.

Ruoslahti, E. e Yamaguchi, Y.. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. **CellPress**, v.64, n.5, Mar 8, p.867-9. 1991.

Sá-Nunes, A., Faraldo, A.C., *et al.* Nitric oxide synthase activity in tissues of the blowfly *Chrysomyamegacephala* (Fabricius, 1794). **Biocell**, v.31, p.205-211, 2007.

Santoro, M. M. e Gaudino, G.. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental Cell Research**, v.304, n.1, Mar 10, p.274-86. 2005.

Singer, A. J. e Clark, R. A.. Cutaneous wound healing. **New England Journal of Medicine**, v.341, n.10, Sep 2, p.738-46. 1999.

Soares, S. C., Cursi, I. B., *et al.* Úlcera de perna: Tratamento e cicatrização. **HURevista - Revista de Medicina do Hospital Universitário de Juiz de Fora**, v.30, n.2-3, p.16-19. 2004.

Strath, M., Warren, D. J., Sanderson, C. J., Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **Journal of Immunological Methods**, v.83, n.2, p.209-215, 1985.

Vitale, R. F. e Ribeiro, F. A. Q.. O papel do fator de necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia.**, v.73, n.1, p.123-27. 2007.

Wallace, K. L., Zheng, L. B., *et al.* Immunopathology of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v.20, n.1, Jan 7, p.6-21. 2014.

ANEXOS



Ministério da Educação

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Rua Madre Maria José, nº122 – Unidade Administrativa Temporária II - Bairro Abadia

CEP: 38025-100 – Uberaba - MG - Telefone: (034) 3318 5764 - E-mail: ceua@pesqpg.uftm.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação do efeito do soro total e de frações cromatográficas obtidas do Látex Natural da Seringueira *Hevea brasiliensis* em modelo de cicatrização de ferida cutânea experimental.”, protocolo nº 352, sob a responsabilidade de Ricardo José de Mendonça – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em reunião de 27/11/2015.

Vigência do projeto	27/11/2015 à 31/12/2016
Espécie/Linhagem	Camundongos Isogênicos C57BL/6
Nº de animais	84
Peso/idade	20 gramas / 50-60 dias
Gênero	Fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade de São Paulo – USP, Campus Ribeirão Preto


Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira

Coordenador em exercício da CEUA/UFTM