



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

Purificação e caracterização de uma proteína
angiogênica, indutora de fibroplasia e
cicatrizante presente no Látex Natural da
Seringueira *Hevea brasiliensis*

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

Área de Concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Coutinho-Netto

Ricardo José de Mendonça

Ribeirão Preto

-2008-

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ricardo José de Mendonça

Purificação e caracterização de uma proteína
angiogênica, indutora de fibroplasia e
cicatrizante presente no Látex Natural da
Seringueira *Hevea brasiliensis*

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

Área de Concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Coutinho-Netto

Ribeirão Preto

-2008-

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

FICHA CATALOGRÁFICA

MENDONÇA, Ricardo José de

Purificação e caracterização de uma proteína angiogênica, indutora de fibroplasia e cicatrizante presente no látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*./ Ricardo José de Mendonça; orientador: Joaquim Coutinho-Netto - Ribeirão Preto, 2008.
147 fl.: 30 cm.

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

1. *Hevea brasiliensis*; 2. Látex; 3. Angiogênese;
4. Permeabilidade Vascular; 5. Fibroplasia; 6. Cicatrização.

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

**À minha Família,
Que me indicou caminhos e acreditou em meus sonhos**

**Ao João Pedro,
Que me faz sentir especial a cada dia,
E com um simples sorriso me completa.**

Dedico este trabalho.

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

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

À Deus, essência da vida que nos permite aprender e aprendendo, ilumina-nos a ensinar.

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

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

À Lu, pela compreensão e companheirismo. A você devo muito mais que obrigado, devo-lhe minha maior felicidade: o sorriso que me completa.

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

Aos amigos de laboratório Rene, Ruither, Vanessa, Viviane, Letícia, Letícinha, Larissa e Heloísa pelo companheirismo, amizade, ensinamentos e principalmente, pelas horas e horas de alegrias que tivemos juntos.

À Amanda Baviera pela grande amizade que tenho certeza, levarei pelo resto da minha vida.

Aos grandes amigos conquistados durante minha estadia na moradia de pós-graduação da USP, em especial Gláucio, Glaucia, Camilo, JP, Ju, Flávio, Bob, Jaque e todos os outros com quem convivi. Que esta amizade seja eterna o quanto é sincera.

Aos Profs. Drs. Eduardo B. Oliveira e Claudio M. Costa Neto, por terem demonstrado interesse em ensinar, simples, mas que muitos se mostram incapazes.

Aos Prof.(s) Dr.(s) José R. Giglio, José E. S. Roselino, Bernardo Mantovani, Antônio Rossi, Isis C. Kettelhut, Wilson R. N. Lodi, Vanderlei Rodrigues, Marcelo Dalmário e Fernando de Lucca, pela convivência, pelas dicas, pelos ensinamentos, além do empréstimo de aparelhos e reagentes.

Aos amigos da pós-graduação Dri, Sami, Tassi, Lucas, Ro, Pedro, Marília, Paty, Ju, Janaína, Ono, Vivi, Hugo e Felipe. A este último um especial muito obrigado pelas inúmeras ajudas nas análises de western blots.

À Vera L. Epifânio Sílvia H. Epifânio e José Seminate, pela assistência técnica, pela amizade e pelas alegrias e tristezas compartilhadas no nosso dia-a-dia.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia (FMRP-USP), especialmente Beto, Odete, Dorlei, L. Henrique, Pita, Sílvia, Antonieta, Neuza e Paulo pelas gentilezas e companheirismo.

À Téia, Ivone, Lúcia e Ronaldo, pela ajuda nos meandros burocráticos e pelas horas agradáveis.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Empresa PeleNova Biotecnologia S/A pela contribuição financeira que permitiu a realização dos estudos de identidade protéica.

Aos funcionários do Biotério Central.

Aos funcionários da Oficina de Precisão e Eletrônica por tornarem possível, o impossível.

À Universidade de São Paulo com seu serviço de assistência social que compreendeu minhas necessidades em termos de moradia e de creche de qualidade para meu filho.

Ao ensino público, gratuito e de qualidade que me permitiu realizar este sonho.

À todos que contribuíram para este trabalho e que por ventura eu tenha me esquecido de agradecer.

MUITO OBRIGADO.

Sumário

ABREVIATURAS:	iii
LISTA DE FIGURAS:	v
RESUMO:	viii
ABSTRACT:	ix
I – INTRODUÇÃO:	11
I-1. Breve histórico da utilização do látex natural:.....	13
I.2- Aspectos bioquímicos/moleculares da cicatrização.....	15
I.2.1- Fase Inflamatória.....	17
I.2.2- Fase Proliferativa:	20
I.2.2.2- Angiogênese:	22
I.2.2.3- Fatores de Crescimento:.....	24
I.2.2.4- Matriz Extracelular:	30
I.2.3- Fase de Remodelagem:	31
II- OBJETIVOS.....	36
II.1- OBJETIVO GERAL.....	36
II.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
III- MATERIAIS E MÉTODOS:	38
III.1-Extração do Látex:	38
III.2- Obtenção do Soro:.....	39
III.3- Cromatografia em DEAE-celulose:	39
III.4- Cromatografia de troca iônica em HPLC:.....	40
III.5- Eletroforese em gel de poliacrilamida:.....	41

III.6- Eletroforese bidimensional:	42
A- Focalização isoeétrica (1ª dimensão)	42
B- SDS-PAGE (2ª dimensão).....	43
C- Detecção das proteínas	44
D- Obtenção e análise das imagens	44
III.7- “Western blot” com anticorpo anti-FGF e anti-VEGF:	45
III.8- Espectrometria de Massa:.....	46
III.9- Estudo do aumento da permeabilidade vascular:	49
III.10- Dosagem do corante (curva padrão):	50
III.11- Teste de atividade angiogênica na membrana cório-alantóidea de embriões de galinha:	51
III.12- Estudo de cicatrização em modelos de úlceras dérmicas em orelhas de coelhos:	54
III.13- Estudo de atividade proliferativa em células HEK-293T (human embryonic kidney cells):	56
A- Preparo de soluções	56
B- Cultura de células:	57
C- Ensaio de proliferação:	57
III.14- Análises estatísticas:.....	58
IV-RESULTADOS:	60
IV.1- Caracterização do soro do látex natural da seringueira:	60
IV.1.1- Atividade de aumento da permeabilidade vascular.....	60
IV.1.2- Atividade angiogênica do soro do látex na membrana cório-alantóidea de embriões de galinha.	62
IV.1.3- Aceleração do processo de cicatrização de úlceras dérmicas experimentalmente provocadas em orelhas de coelhos pelo soro do látex natural.	63

IV.2-Purificação do soro do látex por cromatografia em coluna de DEAE-celulose:	65
IV.2.2-Atividades biológicas sobre a permeabilidade vascular, angiogênese, cicatrização e proliferação celular das frações obtidas na cromatografia em DEAE-celulose:	67
IV.2.3- Caracterização bioquímica da fração FrHB1 por análises em eletroforese SDS-PAGE, eletroforese bidimensional, “western-blot” com anticorpos anti-FGF e anti-VEGF e espectrometria de massa:.....	79
IV.3-Cromatografia em HPLC da fração FrHB1:	91
V- DISCUSSÃO:.....	96
VI- CONCLUSÕES:	112
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	115

ABREVIATURAS:

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

TGF- β - Fator de crescimento transformante β

EGF – Fator de crescimento epitelial

TGF- α - Fator de crescimento transformante α

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

PLGF – Fator de crescimento placentário

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

VPF – Fator de permeabilidade vascular

Flt – Tirosina quinase semelhante à *fms*

Flk – Quinase fetal do fígado

VEGFR – Receptor de VEGF

Ang – Angiopoetina

KDa – Kilodaltons

FGFR – Receptor de FGF

TGF- β R – Receptor de TGF- β

IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina

HB-EGF – Fator de crescimento epitelial ligado à heparina

NaOH – Hidróxido de sódio

M – Molar

mL – Mililitros

v/v – Volume/volume

p/v – Peso/volume

DEAE-celulose – Dietilamônioetileno celulose

°C – Graus centígrados
Kg – Kilogramas
NaCl – Cloreto de sódio
nm – nanometros
cm – centímetros
mL/h – Mililitros/hora
PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
HCl – Ácido clorídrico
mM – Milimolar
mA – Miliampere
V – Volts
seg. – Segundos
min. – Minutos
i.v. – Intravenoso
USP – Universidade de São Paulo
µg/mL – Microgramas/Mililitros
µg/µL – Microgramas/microlitros
RGB – Red green blue
HE – Hematoxilina-eosina
rpm – Rotações por minuto
MCA – Membrana cório-alantóidea

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Representação esquemática da especificidade celular imunológica correlacionado temporalmente com as fases da cicatrização	18
Figura 2: Família de receptores de VEGF (A) e vias de sinalização do VEGF para a síntese de prostaglandina (PGI ₂) e óxido nítrico (NO)	27
Figura 3: Esquema do FGFR e suas vias de sinalização	29
Figura 4: Atividade do soro do látex no teste de Miles.	61
Figura 5: Quantificação da atividade angiogênica apresentada pelo soro obtido do látex natural da seringueira na MCA	62
Figura 6: Quantificação das áreas das úlceras dérmicas em orelhas de coelhos, tratadas com o soro.....	64
Figura 7: Cromatograma em DEAE-celulose do soro do látex	66
Figura 8: Estudo da atividade na permeabilidade vascular das frações obtidas da cromatografia em DEAE-celulose	68
Figura 10: Quantificação da atividade angiogênica apresentada pelas frações obtidas da cromatografia em DEAE-celulose.	70
Figura 9: Atividade angiogênica na MCA.	70
Figura 11: Cortes histológicos das MCAs tratadas com as frações obtidas da cromatografia em DEAE-celulose	71
Figura 12: Cicatrização no modelo de úlcera dérmica em orelhas de coelhos.	73
Figura 13: Quantificação das áreas das úlceras ao longo do processo cicatricial.....	74
Figura 14: Análises histológicas das úlceras em orelhas de coelhos.....	76
Figura 15: Atividade indutora da proliferação de células <i>HEK293T</i>	78

Figura 16: Perfil eletroforético em PAGE –SDS à 15%, do material extraído do látex natural da seringueira.....	80
Figura 17: Resultado do “western blot” utilizando-se de anticorpos anti-VEGF ₁₆₅ e anti-FGFb	82
Figura 18: Perfil de eletroforese bi-dimensional obtido da fração FrHB1.	83
Figura 19: Western-blot realizado com o anticorpo anti-FGFb da fração FrHB1.....	84
Figura 20: Espectro de massa referente ao <i>spot1</i> obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1	85
Figura 21: Espectro de massa referente ao <i>spot 2</i> obtido na eletroforese bidimensiona da fração FrHB1.	85
Figura 22: Espectro de massa referente ao <i>spot 3</i> obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.	86
Figura 23: Espectro de massa referente ao <i>spot4</i> obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.	86
Figura 24: Espectro de massa referente ao <i>spot5</i> obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.	87
Figura 25: Espectro de massa referente ao <i>spot6</i> obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.	87
Figura 26: Espectro de massa referente ao <i>spot7</i> obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.	88
Figura 27: Espectro de massa referente ao <i>spot8</i> obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.	88
Figura 28: Espectro de massa referente ao <i>spot9</i> obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.	89

Figura 29: Espectro de massa referente ao <i>spot10</i> obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.	89
Figura 30: Espectro de massa referente ao <i>spot11</i> obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.	90
Figura 31: Perfil cromatográfico obtido em HPLC no segundo passo de purificação da proteína angiogênica.....	92
Figura 32: Perfil eletroforético em SDS-PAGE das frações obtidas da cromatografia em HPLC.....	92
Figura 33: Atividade angiogênica na MCA das frações obtidas em HPLC.....	93
Figura 34: Quantificação da atividade angiogênica apresentada pelas frações obtidas do segundo passo de purificação em HPLC.....	94

RESUMO:

Vários trabalhos têm sugerido que o látex natural, extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* possui atividade angiogênica e aceleradora do processo cicatricial. Desta forma, o estudo de uma proteína capaz de interagir com estes processos, presente no látex, é de grande importância para o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas aplicadas, principalmente, na cicatrização de feridas crônicas. Este trabalho, utilizando-se de metodologias tradicionais de purificação de proteínas por cromatografia e eletroforese em conjunto com a caracterização de atividades ligadas ao processo de cicatrização (ensaios *in vivo* e *in vitro*) permitiu o isolamento de uma proteína angiogênica, com alto grau de homogeneidade. A primeira etapa de purificação selecionou uma fração, aqui denominada FrHB,1 indutora do aumento da permeabilidade vascular, angiogênica, aceleradora do processo cicatricial, proliferadora celular da linhagem *Hek293T* e reativa com o anticorpo policlonal anti-FGFb. O estudo desta fração por eletroforese bidimensional e espectrometria de massa mostrou 11 *spots* que, apesar de limitado pelo baixo número de proteínas de origem vegetal depositados nos atuais bancos de dados públicos, permitiu a identificação de uma chaperonina de 60 KDa que, de acordo com a literatura, pode intervir junto ao processo inflamatório. A seqüência de purificação contou com a eficiência cromatográfica conseguida pela metodologia *HPLC*, o que permitiu a separação de uma proteína de ~20 KDa, constituída de 2 cadeias polipeptídicas unidas por pontes dissulfeto, PI ~5,3 que apresenta grande atividade angiogênica na MCA. Em conjunto, estes resultados apoiam a participação desta proteína na aceleração do processo cicatricial observado em estudos clínicos realizados com biomembrana de látex natural.

ABSTRACT:

Several studies have suggested that the natural latex, extracted from rubber tree *Hevea brasiliensis*, has angiogenic activity and interferes in the wound healing process. Therefore, the study of a protein present in the latex and capable to interact with these processes, is of great importance for the development of new pharmaceutical formulations, applied mainly to the healing of chronic wounds. By using traditional methodologies of protein purification by chromatography and electrophoresis, as well as the characterization of activities related to the wound healing process (*in vivo* and *in vitro* essays), the present work allowed the isolation of an angiogenic protein, with a high degree of homogeneity. In the first stage of purification, we selected a fraction, here named FrHB1. This fraction promotes the increase of the vascular permeability, is angiogenic, improves the wound healing, induces cellular proliferation of the *Hek293T* cells and finally, reacts with the polyclonal anti-FGFb antibody. The study of the FrHB1 by bidimensional electrophoresis and mass spectrometry showed 11 spots, allowing the identification of a 60 KDa chaperonin, in spite of the low number of proteins of vegetal origin found in current public data bank. It is known that this chaperonin can intervene in the inflammatory process. On the second stage, the purification counted on the chromatographic efficiency given by the HPLC methodology, which allowed the separation of a ~20 KDa protein, composed of 2 polypeptides chains joined by disulfide bridges, PI ~5,3, which presents high angiogenic activity in the CAM. Taken together, our findings support the participation of this protein on the acceleration of the wound healing process observed in clinical studies performed with natural latex biomembrane.

INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO:

O potencial das plantas superiores como fonte de novas substâncias bioativas é extraordinário. Dentre as espécies de plantas superiores, estimadas entre 250.000-500.000, apenas uma pequena porcentagem foi investigada do ponto de vista fitoquímico. Menor ainda é o número de frações/substâncias avaliadas por ensaios bioquímicos (Hamburger & Hostettmann, 1989).

Desde a antiguidade as plantas têm sido utilizadas nos tratamentos de diversas patologias, porém somente no início do século XIX é que os primeiros compostos foram isolados, sustentando o crescimento de uma nova ciência: a farmacognosia. Por exemplo, em 1805 a morfina foi isolada a partir de extratos da papoula (*Papaver somniferum*) por um farmacêutico alemão chamado Friedrich Serturmer. A este isolamento, seguiram-se outros como o ácido acetil salicílico a partir da cortiça do salgueiro (*Salix Alba*) e efedrina obtida de ervas chinesas (*Ephedra*) (Fan *et al.*, 2006).

A pesquisa com plantas medicinais passou a envolver investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica; fitoquímica, bioquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (síntese orgânica); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacêutica), assim como a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas de pesquisa no estudo

de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para a descoberta de novos medicamentos (Maciel *et al.*, 2002). Neste contexto, a elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, apresentam-se como um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e farmacologia (Gebhardt, 2000).

A angiogênese, crescimento de novos vasos a partir de uma rede vascular pré-existente, é um processo firmemente controlado pelo balanço entre fatores angiogênicos e inibidores, ocorrendo somente no desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas e ciclo reprodutivo feminino. Diversas patologias podem se originar tanto do crescimento excessivo (câncer, retinopatia diabética e psoríase) como insuficiente de vasos sanguíneos (feridas crônicas e isquemias cardíacas) que são resultados da perda de controle do balanço angiogênese/anti-angiogênese por parte do organismo (Fan *et al.*, 2006). Na medicina chinesa, muitas ervas são utilizadas no tratamento destas patologias angiogênicas, principalmente no caso de feridas crônicas e artrites reumáticas de forma a possibilitar a descoberta de novos angiomoduladores (Fan *et al.*, 2006).

Desta forma, este trabalho surgiu com a necessidade de purificar e caracterizar o princípio ativo angiogênico e indutor da fibroplasia, presente no látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*, que ficou evidenciado pela descoberta de novas utilizações aplicadas à neoformação tecidual, principalmente, na cicatrização de feridas de membros inferiores de variadas etiologias (Frade *et al.*, 2001).

Para a realização deste trabalho, várias informações das mais diferentes origens e áreas do conhecimento foram reunidas e organizadas com o objetivo de substanciar sua execução. Assim, desde o conhecimento histórico e contemporâneo da importância do setor de produção da borracha natural até o entendimento de

técnicas ultramodernas e sofisticadas de caracterização de proteínas foram utilizados como ferramentas para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Além disso, o entendimento do processo fisiológico/patológico e bioquímico/molecular, envolvido na cicatrização de feridas e proliferação de vasos sanguíneos, tornou-se necessário para o advento de novas metodologias em busca do resultado final apresentado.

I-1. Breve histórico da utilização do látex natural:

A seringueira (*Hevea brasiliensis*), é uma planta originária da região amazônica e caracterizada, principalmente, pela importância econômica dada ao seu produto principal, a borracha. De meados do século XIX, até a segunda década do século XX a borracha patrocinou um dos mais importantes ciclos de desenvolvimento brasileiro, quando o país dominava o mercado mundial de borracha natural. Este ciclo declinou-se a partir de 1910, quando entraram no mercado, as exportações de borrachas oriundas das colônias britânicas, principalmente Malásia, Ceilão e Cingapura, onde se iniciaram uma exploração intensiva da borracha natural. Com isto, o Brasil perdeu a hegemonia de produção de borracha natural ocupando, atualmente, o sétimo lugar segundo dados de 2004 (Santos & Mothé, 2007), importando em torno de 50% da borracha natural que utiliza.

O látex natural da seringueira possui propriedades únicas e superiores às de qualquer outro polímero, mesmo que seja seu análogo sintético. Por isto, muito se tem publicado a respeito de suas propriedades físico-químicas e estudos na área

biológica, que envolvem a identificação e eliminação das proteínas causadoras de processos alérgicos (Rippel, 2005). Além disso, o nítido aumento da produção mundial reflete o crescente interesse industrial neste polímero utilizado em mais de 50 mil produtos, como aplicações em adesivos, pneumáticos, luvas descartáveis, materiais cirúrgicos, preservativos, pisos e revestimento, dentre outros (Cyr, 1991).

Em âmbito científico mundial, duas vertentes principais de pesquisas se estabelecem em torno da composição protéica do látex natural: de um lado, instituições de pesquisa, preferencialmente européias e norte-americanas, que objetivam a identificação e caracterização de proteínas alergênicas no material. Concentram-se na resolução do problema econômico gerado pela alergia provocada quando da utilização de diversos materiais produzidos a partir do látex natural, identificando e eliminando estes alergenos do látex. Muitos destes materiais são usados como equipamentos de proteção individual (EPI), de uso diário por parte do trabalhador e sem possibilidade, atualmente, de ter sua composição substituída (Reddy, 1998; Sussman *et al.*, 2002; Wagner & Breiteneder, 2005).

Por outro lado, institutos de pesquisa localizados em grandes regiões produtoras de borracha, como Malásia, Tailândia e Indonésia, direcionam suas pesquisas para a ação e identificação das poli-isoprenases, enzimas responsáveis pela polimerização dos grupos isoprenos e formação da borracha. Além disso, buscam a seleção de novos clones e cultivares da *Hevea brasiliensis*, com o intuito de melhorar o rendimento da produção e o padrão de qualidade da borracha produzida (Kush *et al.*, 1990; Sakdapipanich, 2007).

Com a descoberta da atividade proliferadora de vasos sanguíneos (angiogênese) por parte do látex natural da seringueira (Mrué, 2000; Mrué *et al.*, 2004), várias outras aplicações médicas passaram a ser estudadas resultando em

um conjunto de observações sobre outras atividades importantes do ponto de vista médico. Exemplo disso são os estudos de utilização do látex natural da seringueira para a confecção de próteses vasculares (Grisotto, 2003); acelerador do processo cicatricial em úlceras de pés diabéticos (Frade *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2004); implante e neoformação óssea em alvéolos dentários (Balabanian *et al.*, 2006), dentre outros.

Com estes estudos, um novo campo de pesquisa de aplicações médico/farmacêuticas obtidas do látex natural da seringueira foi criado e despertou o interesse de empresas farmacêuticas como a PeleNova Biotecnologia S/A, detentora da patente para produção e comercialização do Biocure® (biomembrana utilizada como curativo).

1.2- Aspectos bioquímicos/moleculares da cicatrização.

O objetivo principal do tratamento de feridas é o fechamento rápido da lesão combinado a uma cicatriz funcional e esteticamente satisfatória. Para tanto, é indispensável uma maior compreensão do processo biológico envolvido na cicatrização de feridas e regeneração tecidual (Singer & Clark, 1999). Muito se tem estudado a respeito do complexo processo de reparo de feridas, onde estão envolvidas células, sinais químicos e matriz extracelular, que, em conjunto, conduzem à cicatrização.

Um dos aspectos de maior importância refere-se aos problemas médico/sociais e custos gerados por falhas no processo de cicatrização. Por

exemplo, o retardo no processo de cicatrização, como ocorre no caso de úlceras de pés diabéticos, constitui-se de um grande problema mundial, tanto financeiro, quanto social. Dados dos Estados Unidos apresentam que 15,5% da população mundial com idade acima de trinta anos, são diabéticos e destes, cerca de 15% desenvolvem úlceras de difícil cicatrização, principalmente nos membros inferiores, ao longo da vida. Assim, 6% das internações hospitalares relacionadas aos diabéticos são consequência destas úlceras e, em caso de amputação, o tempo médio de internação é de cerca de três semanas. Estes casos geram um custo extra, aos sistemas de saúde, de cerca de U\$ 8.000 à U\$ 12.000/paciente. Cerca de 39 a 68% dos amputados vão ao óbito dentro de 5 anos (Brod, 1998). No Brasil estimam-se a existência de dois milhões de casos, entre os aposentados e os que recebem auxílios-doença decorrentes da diabetes. Úlceras de membros inferiores são a segunda causa de absenteísmo ao trabalho (Ministério da Saúde 2004).

Com o rompimento da integridade tecidual nos animais vertebrados, logo se inicia o processo de reparo, que compreende uma seqüência de eventos moleculares que objetivam restaurar o tecido lesado. Após o nascimento, o organismo falha em seu objetivo final, neoformação do tecido lesado, deixando, após o reparo, uma cicatriz. Apenas durante a fase fetal, o reparo de lesões se dá sem a formação de cicatriz, ocorrendo uma verdadeira restauração do tecido, por um processo de neoformação tecidual (Mccallion & Ferguson, 1996; Martin & Leibovich, 2005).

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

I.2.1- Fase Inflamatória.

Após a ocorrência do ferimento, inicia-se o extravasamento sangüíneo que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. A agregação plaquetária e a coagulação sangüínea geram um tampão, rico em fibrina, que além de restabelecer a hemostasia e formar uma barreira contra a invasão de microorganismos, organiza uma matriz provisória necessária para a migração celular. Esta matriz servirá como um reservatório de fatores de crescimento, requeridos durante as próximas fases do processo de cicatrização (Werner & Grose, 2003; Eming, Krieg *et al.*, 2007).

As plaquetas, essenciais à formação deste tampão hemostático, também secretam múltiplos mediadores, incluindo fatores de crescimento, liberados na área lesada. As plaquetas, essenciais na cascata da coagulação, sofrem a degranulação plaquetária, induzida pela trombina, liberando fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante- β (TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformante- α (TGF- α) e fator de crescimento de células endoteliais (VEGF), além de glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospondina, que são importantes constituintes da matriz extracelular provisória (Arnold & West, 1991; Streit *et al.*, 2000). De fato, a cascata de coagulação e fatores de crescimento liberados pelas plaquetas, em conjunto com a ativação da cascata do complemento e ativação de células parênquimatosas pela lesão, produzem numerosos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos, os quais, juntos, auxiliam no recrutamento das células inflamatórias ao local da ferida (Clark, 1996).

Em adição às funções de fagocitose de bactérias, fragmentos celulares e corpos estranhos, estas células inflamatórias produzem fatores de crescimento que preparam a ferida para a fase proliferativa, quando fibroblastos e células endoteliais continuarão a ser recrutados (Singer & Clark, 1999).

Apesar da concomitância das fases da cicatrização, parece ocorrer a seguinte seqüência de eventos: saída de plasma com componentes solúveis e constituintes celulares, plaquetas seguidas por neutrófilos e monócitos (Clark, 1996). Subseqüentemente, muitos neutrófilos aderem-se ao endotélio e migram para a região da ferida. Porém, a depleção dos neutrófilos no sangue, não mostrou afetar o processo de reparo na ausência de infecção (Simpson & Ross, 1972; Werner & Grose, 2003; Eming, Werner *et al.*, 2007). Na figura 1 é apresentada a cronologia e distribuição celular no decorrer da cicatrização.

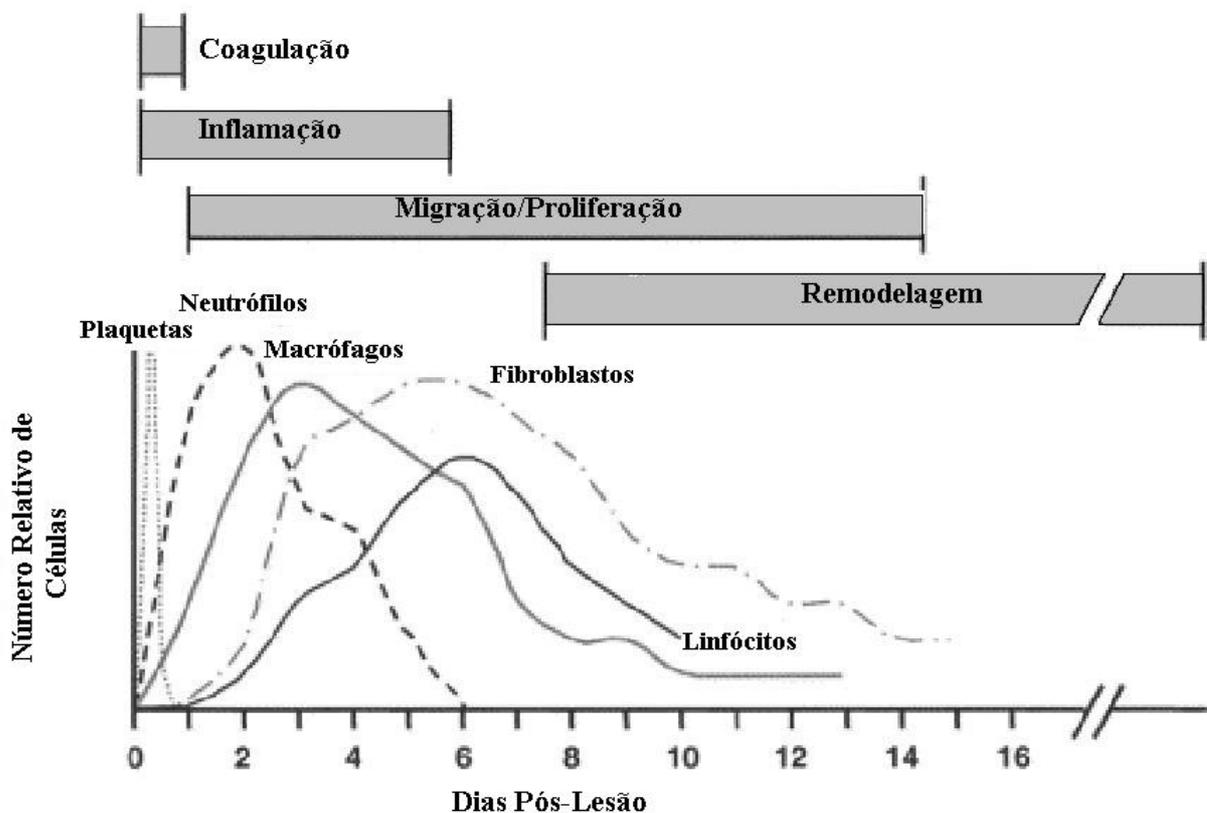


Figura 1: Representação esquemática da especificidade celular imunológica correlacionado temporalmente com as fases da cicatrização {modificado de (Park & Barbul, 2004)}.

Os monócitos do sangue periférico, tanto inicialmente, quanto durante todo o transcorrer do processo cicatricial, continuam a infiltrar-se no local da ferida em resposta a agentes quimiotáticos para monócitos, como o PDGF, por exemplo. No tecido, os monócitos são ativados e transformam-se em macrófagos que são, provavelmente, as principais células envolvidas no controle do processo de reparo (Clark, 1996; Singer & Clark, 1999).

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

O macrófago ativado é a principal célula efetora no processo de reparo tecidual, degradando e removendo componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno, elastina e proteoglicanas. Além deste papel na fagocitose dos fragmentos celulares, os macrófagos também secretam fatores quimiotáticos que atraem outras células inflamatórias ao local da ferida e produzem prostaglandinas, que funcionam como potentes vasodilatadores afetando a permeabilidade dos microvasos (Arnold & West, 1991; Singer & Clark, 1999; Eming, Werner *et al.*, 2007).

Os macrófagos produzem vários fatores de crescimento, tais como o PDGF, o TGF- β , o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o VEGF, que se destacam como as principais citocinas necessárias para estimular a formação do tecido de granulação. Desta maneira, os macrófagos medeiam da fase inicial da resposta

inflamatória à fase precoce do reparo, durante processo de cicatrização da ferida (Singer & Clark, 1999).

I.2.2- Fase Proliferativa:

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

Porém, antes de descrever a angiogênese, torna-se necessário salientar que o aumento da permeabilidade microvascular é o primeiro estágio deste processo, apresentando-se como etapa importante, que permite, através do extravasamento de proteínas, citocinas e elementos celulares, a formação de uma matriz extracelular provisória necessária à migração e proliferação das células endoteliais (Dvorak *et al.*, 1999; Dvorak, 2002).

I.2.2.1- Permeabilidade vascular:

A produção de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes é acompanhada, na maioria das vezes, por um aumento da permeabilidade vascular

(Dvorak *et al.*, 1999; Bates & Harper, 2002; Dvorak, 2002). Na angiogênese patológica, o aumento da permeabilidade vascular à água e à macromoléculas apresenta importante função no processo, sendo o responsável direto pela formação do edema. Este aumento da permeabilidade capilar parece ter um menor efeito durante a angiogênese fisiológica, porém, causa danos consideráveis em determinadas patologias como na retinopatia diabética, por exemplo (Vaquero *et al.*, 2000).

O VEGF-A, por exemplo, descoberto em líquido ascítico tumoral, foi originalmente descrito pela sua capacidade de aumentar a permeabilidade dos microvasos e extravasamento de macromoléculas, incluindo fibrinogênio e outras proteínas da coagulação, resultando na deposição extravascular de fibrina o que favorece, tanto o processo cicatricial, quanto o desenvolvimento tumoral (Dvorak, 2002).

Os mecanismos básicos da regulação da permeabilidade vascular, principalmente causada pelos fatores de crescimento não foram, ainda, completamente elucidados. A função destes fatores de crescimento e o mecanismo pelo qual exercem seu efeito, são objetos de estudos de grande interesse, e seus caminhos metabólicos estão sendo, correntemente, elucidados (Dvorak, 2002; 2005).

I.2.2.2- Angiogênese:

A angiogênese é uma etapa fundamental do processo de cicatrização, pela qual novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes (Folkman & Shing, 1992). Os novos vasos participam da formação do tecido de granulação provisório e supre de nutrientes e de oxigênio o tecido em crescimento (Li *et al.*, 1999). De uma forma diferencial, a vasculogênese refere-se aos primeiros estágios do desenvolvimento vascular, durante o qual, as células precursoras do endotélio vascular, sofrem diferenciação, expansão e coalescência para formar a rede de túbulos primitivos do organismo (Risau, 1997).

Em um organismo adulto, sob condições normais, a angiogênese só ocorre no ciclo reprodutivo das fêmeas (no útero, com a formação do endométrio, e nos ovários, na formação do corpo lúteo), a vasculatura se mantém quiescente, porém apresenta a capacidade de iniciar a angiogênese, principalmente durante a cicatrização (Li *et al.*, 1999).

Assim, a angiogênese, além de ser fundamental no sistema reprodutor e no desenvolvimento do organismo, participa também do processo de cicatrização. Em condições fisiológicas, a angiogênese é finamente regulada; ativada por curtos períodos (dias) e então, completamente inibida. Entretanto, muitas patologias são consequência do descontrole desta regulação, como ocorre, por exemplo, na artrite reumatóide, onde novos capilares sanguíneos invadem a articulação e destroem a cartilagem. No diabetes mellitus, novos capilares presentes na retina, invadem o vítreo, sangram e podem causar cegueira. O crescimento de tumores e metástases são patologias dependentes de angiogênese (Folkman, 1991). A maioria dos

tumores mantêm um estímulo constante ao crescimento de novos capilares de forma a permitir o seu próprio crescimento, além de fornecer uma comunicação que permite às células tumorais invadirem a corrente sangüínea e causarem metástase em locais distantes do tumor primitivo (Folkman & Shing, 1992).

A angiogênese, em resposta à lesão tecidual, é um processo dinâmico, finamente regulado por sinais presentes, tanto no soro, quanto na matriz extracelular local (Risau, 1997). Durante o processo cicatricial, a formação de novos vasos sangüíneos torna-se necessária para a formação do novo tecido de granulação, onde as células dos vasos sangüíneos chegam a corresponder a aproximadamente 60% do tecido de reparo (Arnold & West, 1991). A angiogênese ocorre na matriz extracelular do leito da ferida com a migração e estimulação mitogênica das células endoteliais.

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

Por tratarem-se de proteínas de importante atividade, principalmente durante a fase proliferativa da cicatrização e para um maior entendimento deste trabalho, em resumo, serão explicitadas as características bioquímicas estruturais, relacionando com suas atividades durante o processo de cicatrização.

I.2.2.3- Fatores de Crescimento:

A identificação, caracterização e purificação do VEGF (do inglês “*Vascular Endothelial Growth Factor*” ou seja, fator de crescimento do endotélio vascular) em 1989 contribuíram significativamente para o entendimento da regulação da permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo na angiogênese (Ferrara & Henzel, 1989; Bates *et al.*, 1999; Glass *et al.*, 2006). O resultado do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos no tecido corresponde ao aumento do suprimento de nutrientes, assim como a uma maior eficiência na remoção de resíduos. Neste sentido, os fatores de crescimento vascular possuem três principais mecanismos de ação: 1) podem aumentar a permeabilidade dos vasos à água, pequenos solutos e macromoléculas (Michel, 1984; Levick, 1991; Adamson *et al.*, 2004); 2) podem reduzir a distância das células teciduais em relação ao vaso sanguíneo mais próximo, pela estimulação da angiogênese; 3) podem aumentar o fluxo sanguíneo ao tecido agindo como potentes vasodilatadores (Bates & Harper, 2002).

O VEGF, principal fator angiogênico, exerce sua atividade biológica predominantemente através de receptores transmembrânicos com atividade tirosina quinase presente nas células endoteliais e participa como mediador principal da angiogênese. A família de proteínas VEGF, atualmente inclui VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e o fator de crescimento placentário (PLGF) (Werner & Grose, 2003). O VEGF-A é uma glicoproteína homodimérica, cujas subunidades se mantêm unidas por duas pontes dissulfeto, sendo sintetizada a partir de rearranjos internos (“*splicing alternativo*”) de um RNAm, sob a forma de sete isoformas que contêm de 121 a 206 aminoácidos (Li *et al.*, 1999; Ferrara, 2001; Bates & Harper,

2002; Ferrara, 2004). Dentre estas, destacam-se os VEGF121, VEGF165, VEGF189 e VEGF206 como isoformas predominantes (Tischer *et al.*, 1991; Jingjing *et al.*, 1999; Mccolm *et al.*, 2004). Estas diferentes isoformas apresentam atividades biológicas similares, mas diferem em suas propriedades de ligação à heparina e matriz extracelular (Park *et al.*, 1993; Roth *et al.*, 2006). As isoformas menores (121 a 165 aminoácidos) são secretadas na forma solúvel, enquanto as maiores possuem domínios transmembrânicos, ficando inicialmente associadas às células, de onde são liberadas e ativadas por proteólise. O VEGF121 é uma proteína ácida, enquanto as demais, possuem ponto isoelétrico básico.

O VEGF também é conhecido como fator de permeabilidade vascular (VPF) devido a sua potente ação no aumento da vasopermeabilidade, o que permite o extravasamento de proteínas, como o fibrinogênio e a fibronectina, essenciais para a formação da matriz extracelular provisória (Keck *et al.*, 1989; Dvorak *et al.*, 1999), além de aumentar a condutividade hidráulica (Bates & Curry, 1997) e fenestração (Esser *et al.*, 1998). O VEGF age também, como um potente mitógeno para células endoteliais da microvasculatura (Conn *et al.*, 1990) induzindo a migração das células endoteliais e germinação de novos vasos sanguíneos por meio da regulação de diversos receptores de integrinas endoteliais (Senger *et al.*, 1996). Além disso, o VEGF também age como um fator de sobrevivência para células endoteliais por meio da indução da expressão da Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica (Gerber *et al.*, 1998).

Esta família de VEGF exerce suas funções biológicas por interações diferenciais a três receptores transmembrânicos que apresentam atividade de tirosina quinase já identificados: receptor de VEGF-1 (VEGFR-1) [tirosina quinase semelhante à fms (Flt-1)], VEGFR-2 [quinase fetal do fígado (Flk-1)] e VEGFR-3

(Flt-4). De forma similar ao VEGF, a ativação da expressão gênica destes receptores é acionada, principalmente, pela hipóxia (Waltenberger *et al.*, 1996). Os receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 são restritos ao endotélio vascular, enquanto o VEGFR-3, juntamente com seus ligantes preferenciais, VEGF-C e VEGF-D, parecem estar envolvidos no crescimento do endotélio linfático (Kukk *et al.*, 1996; Gale & Yancopoulos, 1999). Na figura 2, estão representados os receptores de VEGF em conjunto com as vias de sinalização intracelular afetadas pela interação ligante-receptor.

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

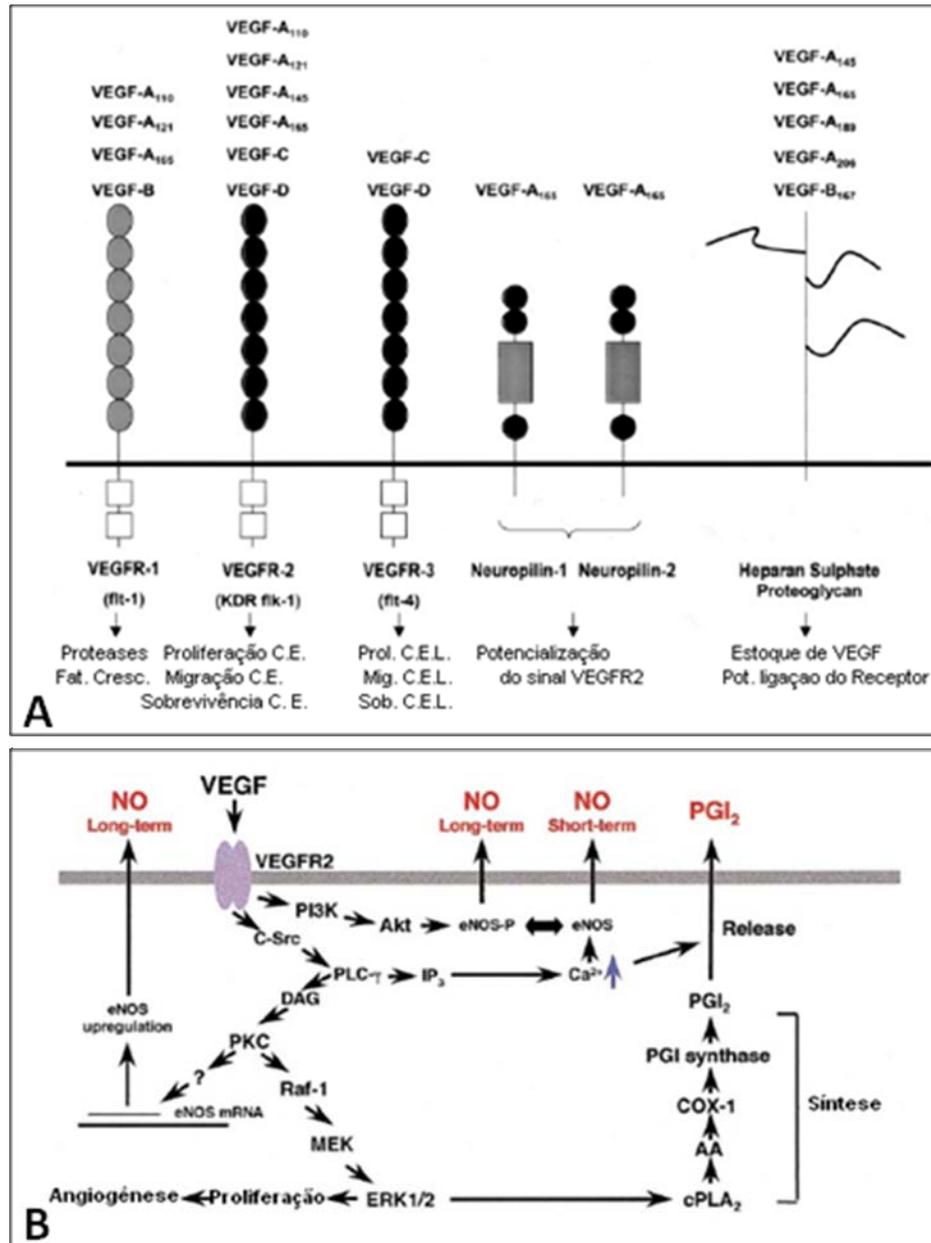


Figura 2: Esquema do VEGFR e vias de sinalização: família de receptores de VEGF (A) e vias de sinalização do VEGF para a síntese de prostaglandina (PGI₂) e óxido nítrico (NO), além do possível caminho de proliferação. Modificado de (Zachary, 2001).

Os FGFs (do inglês *"Fibroblast Growth Factor"*, ou fatores de crescimento de fibroblastos) formam uma família de proteínas que receberam a nomenclatura baseada na origem de sua atividade biológica promotora de proliferação em fibroblastos em cultura. Ainda segue-se uma designação numérica (Ornitz & Itoh, 2001), preservada pelo uso e adotada em definitivo. Atualmente, a designação FGF

tem apenas valor histórico, pois os FGFs não são exclusivamente fatores de crescimento e não exercem efeitos específicos em fibroblastos (Baird, 1993). Atualmente, esta classe de proteínas compreende 24 membros de estrutura homóloga, apresentando-se como pequenos polipeptídeos com um núcleo central contendo 140 aminoácidos. FGF1 (FGF ácido) e FGF2 (FGF básico) estão preferencialmente implicados no processo da angiogênese (Folkman & Shing, 1992; Ornitz & Itoh, 2001). Estes compostos apresentam-se como polipeptídeos com cerca de 18 KDa, de cadeia simples e não glicosilados. Eles transmitem seus sinais através de 4 receptores de FGF de alta afinidade, proteínas da família das tirosinas quinases transmembrânicas (FGFR-1 ao FGFR-4), os quais ligam à FGFs distintos com diferentes afinidades. Uma das características do FGF1 e do FGF2 é a forte interação com moléculas semelhantes à proteoglicanas, como o sulfato de heparana, presentes na matriz extracelular (Folkman *et al.*, 1988). Esta interação o que estabiliza os FGFs frente a desnaturação térmica e proteolítica, além de limitar sua difusibilidade. Desta forma, a matriz extracelular atua como um reservatório para fatores pró-angiogênicos. Porém, nem o uso de peptídeo sinal necessário à secreção, nem o mecanismo de liberação destes fatores de crescimento foram determinados até o presente momento (Werner & Grose, 2003).

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

Grose, 2003). A figura 3 demonstra esquematicamente a interação entre o FGF e o receptor FGFR assim como as vias de sinalização disparadas por esta ligação.

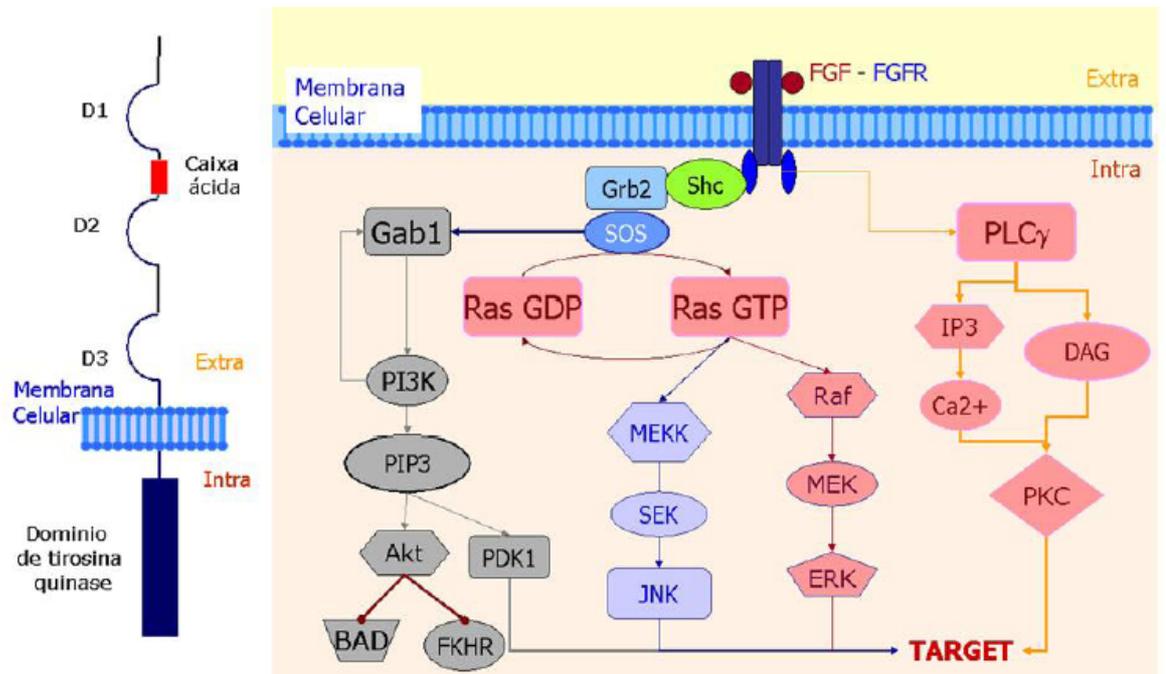


Figura 3: Esquema do FGFR e suas vias de sinalização. À esquerda é demonstrado um diagrama de estrutura do FGFR. À direita, as principais vias de sinalizações disparadas pelo complexo FGF-FGFR-HS, (Dermargos, 2007)

Os fatores FGF1 e FGF2 são sintetizados por uma variedade de tipos celulares envolvidos na angiogênese e cicatrização, incluindo células inflamatórias (Baird *et al.*, 1985), células endoteliais (Schweigerer *et al.*, 1987) e fibroblastos da derme (Kandel *et al.*, 1991). Eles agem sobre as células endoteliais de forma parácrina, liberados a partir da matriz extracelular, ou de forma autócrina, quando liberados pelas próprias células endoteliais (Schweigerer *et al.*, 1987), promovendo a proliferação e diferenciação celular (Kanda *et al.*, 1996). Durante a formação do tecido de granulação, FGF2 promove a migração celular por meio de receptores de superfície para integrinas, os quais medeiam a ligação das células endoteliais à matriz extracelular (Sepp *et al.*, 1994).

Além destes, muitos outros fatores de crescimento e proteínas interagem durante o orquestrado e complexo processo de cicatrização. Proteínas, tais como TGF- β além de agirem como quimioatrativos para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, estimulam a formação do tecido de granulação, evidenciando-se sua importância durante todo o processo de cicatrização. O TGF- β apresenta-se como importante modulador da angiogênese durante a cicatrização, por regular a proliferação celular, migração, formação do tubo capilar e deposição da matriz extracelular (Roberts, 1998).

I.2.2.4- Matriz Extracelular:

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

A proliferação das células endoteliais, adjacentes e dentro da ferida, leva a deposição, de forma transitória, de grandes quantidades de fibronectina na parede do vaso (Clark, 1996). Assim, a angiogênese requer a expressão de receptores para

fibronectina pelas células endoteliais (Brooks *et al.*, 1994), organizando a fibronectina como um canal de modo a permitir o movimento das células endoteliais. Expressão e atividade de proteases também são necessárias à angiogênese, principalmente na fase de remodelagem (Clark, 1996).

1.2.3- Fase de Remodelagem:

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

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

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

A reepitelização, que é o recobrimento da ferida com um novo epitélio e consiste tanto da migração quanto da proliferação dos queratinócitos a partir da periferia da lesão, também ocorre durante a fase proliferativa. Estes eventos são regulados por três principais agentes: fatores de crescimento, integrinas e metaloproteases (Santoro & Gaudino, 2005).

Durante a fase inflamatória a liberação de fatores de crescimento pelo plasma, fibroblastos e macrófagos/neutrófilos ativam os queratinócitos localizados nas margens da ferida. Dentre os fatores de crescimento destacam-se o PDGF que induz a proliferação de fibroblastos com conseqüente produção da matriz extracelular durante a contração da ferida e reorganização da matriz, o KGF₇ que é considerado o principal regulador da proliferação dos queratinócitos, assim como o TGF- β , responsável principal pelo estímulo inicial da migração das células epiteliais. A ativação de receptores de integrinas pelos queratinócitos permite a interação com uma variedade de proteínas da matriz extracelular na margem e no leito da ferida. Por outro lado, a expressão e ativação de metaloproteases promovem a degradação e modificação das proteínas da matriz extracelular no sítio da ferida, facilitando a migração celular. A própria atividade proteolítica destas enzimas pode liberar fatores de crescimento ligados à matriz extracelular de forma a manter constante o estímulo à proliferação e migração dos queratinócitos, acelerando o processo de reepitelização (Santoro & Gaudino, 2005).

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

Muitas também são as condições que tornam este processo de difícil resolução, impedindo ou retardando uma completa restauração dos tecidos. Dentre estas condições podem ser ressaltadas as ressecções extensas da parede abdominal, como aquelas em que a peritoniotomia se faz necessária. Por dificultarem, de alguma maneira, o reparo tecidual, essas doenças ou condições contribuem potencialmente para um aumento da morbidade e mortalidade (Mrué, 2000; Mrué *et al.*, 2004).

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

Dentre as substâncias que possuem ação direta no processo de reparo destacam-se alguns fatores de crescimento que, quando aplicados topicamente sobre a ferida, demonstram boa capacidade de acelerar o reparo tecidual em experimentos animais (Mustoe *et al.*, 1991; Pierce *et al.*, 1992; Pierce *et al.*, 1994). Neste grupo, merece destaque o REGRANEX[®], um produto a base de PDGF recombinante humano, que interfere diretamente de maneira a favorecer o processo de reparo, apresentando bons resultados na cicatrização de úlceras de pacientes diabéticos (Pierce *et al.*, 1992; Steed, 1998). No entanto, são curativos de alto custo, que encontram-se distantes da realidade sócio-econômica da maioria da população portadora de úlceras crônicas. Outras substâncias contendo agentes enzimáticos como as pomadas à base de DNase e colagenase atuam promovendo o desbridamento da ferida (Hebda *et al.*, 1990) e auxiliam, desta forma, o curso da restauração tecidual de maneira discreta e indireta. Estas últimas são largamente

utilizadas na prática clínica, entretanto, apresentam baixa eficácia na cicatrização de feridas crônicas.

OBJETIVOS

II- OBJETIVOS.

II.1- Objetivo geral.

- Caracterização química e biológica da proteína indutora de angiogênese do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*.

II.2- Objetivos específicos.

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

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

***MATERIAIS E
MÉTODOS***

III- MATERIAIS E MÉTODOS:

III.1-Extração do Látex:

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

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

Durante todo o projeto, o material foi fornecido pela empresa Agrolatex, situada no município de Mirassol, na região de São José do Rio Preto – SP.

III.2- Obtenção do Soro:

O látex natural amoniacal (pH=10,4), não centrifugado, foi diluído com ácido acético à 2,2%, na proporção de 1:2 (v/v), até pH=4,7. A diluição foi realizada sob agitação branda. A solução ficou em repouso absoluto por 30 minutos, tempo necessário para que a coagulação ocorresse e o processo de retração do coágulo se iniciasse. O soro, de aspecto límpido e amarelado, foi decantado. O restante do soro foi obtido após a compressão mecânica do coágulo.

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

O pH do soro foi elevado para 9,0 com NH_4OH 1M, determinando-se a quantidade de base utilizada para cálculo aproximado da força iônica final, essencial para reprodutibilidade nos procedimentos cromatográficos. Devido à precipitação de proteínas durante o processo de acerto de pH, o soro foi filtrado em filtros de poro=1 μm (Millipore).

III.3- Cromatografia em DEAE-celulose:

Em uma primeira etapa de purificação cromatográfica utilizou-se uma coluna de vidro preenchida com matriz DEAE-celulose (Sigma-Aldrich) (5 cm x 50 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01 M (pH 9,0).

O soro, material extraído do látex após ter o seu pH corrigido para 9,0 com NH_4OH 1M foi aplicado diretamente na coluna cromatográfica, à temperatura ambiente e eluído com tampão bicarbonato de amônio 0,01 M em gradiente descontínuo e crescente de NaCl (0 M; 0,15 M; 0,25 M e 1,5 M de NaCl).

O fluxo empregado foi de 7 mL/min e o eluato monitorado a 280 nm em espectrofotômetro Hitachi U-2000. Este comprimento de onda permite a detecção de sistemas de ressonância como os da tirosina e do triptofano. As frações foram coletadas em tubos de ensaio, na razão de 30 mL por tubo, com auxílio de um coletor Gilson. O material, de acordo com o perfil cromatográfico, teve suas frações características reunidas e submetidas à diálise contra água destilada, liofilizados e armazenados à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para posterior análise de atividade biológica (angiogênese na membrana cório-alantóidea - MCA, aumento da permeabilidade vascular no teste de Miles, proliferação celular de células *HEK293T* e aceleradora da cicatrização em úlceras dérmicas nas orelhas de coelhos).

III.4- Cromatografia de troca iônica em HPLC:

O material coletado que apresentou maior atividade em induzir a angiogênese, denominado FrHB1, foi submetido à cromatografia líquida em alta pressão (HPLC) em um equipamento Shimadzu LC7-A (Shimadzu corp., Kioto, Japão) acoplado a um espectrofotômetro UV-vísivel SPD 10A (Shimadzu corp., Kioto, Japão), com uma coluna preparativa de troca iônica (Asahipak ES 502-NP). Um volume de 5 mL do material FrHB1 em uma concentração de 5 mg/mL,

dissolvido em tampão fosfato (0,01 M pH=7,8) foi aplicado ao sistema e eluído em gradiente contínuo de NaCl (0 a 1M) utilizando-se um fluxo de 6,0 mL/min. O eluato foi monitorado pelo detector espectrofotométrico à $\lambda=280$ nm.

O programa do equipamento constava de 15 min. de corrida com o tampão A (tampão fosfato 0,01 M, pH=7,8), após a aplicação do material, seguidos de 40 min. de mistura crescente e contínua do tampão B (tampão fosfato 0,01 M, NaCl 1 M, pH=7,8) e 10 min. de 100 % do tampão B. A coluna era sempre reequilibrada em tampão A durante 20 min. antes de um novo ciclo de purificação.

III.5- Eletroforese em gel de poliacrilamida:

O processo de purificação foi analisado pelo perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (PAGE), segundo descrito por (Laemmli, 1970).

Utilizou-se de um gel de acrilamida 15% (p/v), bisacrilamida 0.8% (p/v), Tris-HCl 480 mM (pH=8,9). A corrida foi realizada sob amperagem constante de 20 mA e voltagem crescente até o limite de 200 V, utilizando-se o tampão Tris-HCl 0,5 mM e glicina 3,8 mM, (pH= 8,3). O final da corrida foi indicado pela chegada do corante azul de bromofenol ao extremo inferior do gel. As proteínas foram fixadas e coradas durante 10 min. com o uso de uma solução de coomassie blue G-250 (Sigma-Aldrich) 0,1% em metanol 50% v/v e descoradas por repetidas lavagens em uma solução de ácido acético à 7% v/v.

III.6- Eletroforese bidimensional:

A- Focalização isoelétrica (1^a dimensão)

As proteínas foram primeiramente separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI), através do processo de focalização isoelétrica (IEF), usando o Sistema Ettan IPGphor 3 (GE-HealthCare). A caracterização das proteínas presentes na amostra foi realizada com fitas IPG de 13 cm com gradiente linear de pH de 3-10.

As fitas IPG (Immobilized pH Gradient dry-strips, GE-HealthCare) foram hidratadas durante 12 horas à 20 °C no aparato de focalização isoelétrica com 250 µL da amostra. A amostra continha 400 µg de proteínas precipitadas com kit 2D-clean-up (GE-HealthCare) e solubilizadas em tampão (7M Uréia, 2 M Tiuréia, 10 mM ditiotretitol (DTT), 0,4 % v/v Triton X-100, 4 % p/v CHAPS, 0,5 % v/v Anfólitos (IPGbuffer) e 0,005 % p/v Azul de Bromofenol). Sobre as fitas IPG acrescentou-se 1,5 mL de óleo mineral (Cover Fluid, GE-HealthCare) para evitar a evaporação dos reagentes durante a hidratação.

A focalização isoelétrica foi realizada nas seguintes condições: 500 V por 1 hora, 1000 V (gradiente) por 1 hora, 8000 V (gradiente) por 2 horas e 30 minutos, 8000 V por 30 minutos. Após a focalização, as fitas foram retiradas do aparato de focalização isoelétrica, lavadas com água destilada e armazenadas à -20 °C ou utilizadas imediatamente na segunda dimensão.

B- SDS-PAGE (2ª dimensão)

Após a focalização, as fitas IPG foram equilibradas por 15 minutos em solução de equilíbrio e redução (50 mM Tris-HCl pH=8,8, 6 M Uréia, 30 % v/v Glicerol, 2 % p/v dodecil sulfato de sódio - SDS e 2 % p/v DTT) e por 15 minutos em solução de alquilação (50 mM Tris-HCl pH=8,8, 6 M Uréia, 30 % v/v Glicerol, 2 % p/v SDS, 2,5 % p/v Iodoacetamida e 0,05 % p/v de Azul de Bromofenol).

A eletroforese de segunda dimensão foi realizada em um gel vertical homogêneo de 12 % de acrilamida (180 x 160 x 1,5 mm) conforme (Laemmli, 1970). Depois de equilibradas, tratadas com agentes redutores e alquilantes, as fitas foram inseridas sobre o gel de poliacrilamida e fixadas com uma solução pré-aquecida de 0,5 % p/v de agarose solubilizada em tampão de corrida (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 0,1 % p/v SDS). O marcador de massas moleculares (6H-Sigma com adição de lizozima) foi aplicado ao lado da fita em papel de filtro. A separação eletroforética das proteínas foi realizada à 10 °C, em uma cuba SE600 Ruby (GE-HealthCare) sob corrente de 20 mA por 5 horas. Após a eletroforese, os géis foram lavados rapidamente em água destilada e corados com solução de coloração Coomassie Brilliant Blue G250.

C- Detecção das proteínas

As proteínas separadas nos géis de poliacrilamida foram visualizadas através da coloração por Coomassie Brilliant Blue G250, realizada segundo o protocolo de (Neuhoff *et al.*, 1988) modificado. As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso, conforme descrito a seguir. Os géis foram submetidos por 60 minutos a uma solução fixadora (40 % v/v Etanol, 10 % v/v Ácido Acético); lavados duas vezes com água destilada deionizada por 10 minutos e mantidos por 12 horas em solução de coloração (0,1% p/v Coomassie Brilliant Blue G250, 10 % v/v Ácido Orto-Fosfórico, 10 % p/v Sulfato de Amônio, 20 % v/v Metanol). Depois de corados os géis foram lavados com 20% v/v Metanol até a eliminação completa do corante excedente.

Foi realizado, também, o “*western blot*” deste gel conforme descrito no **item III-7** com o objetivo de identificar as proteínas a serem analisadas em espectrômetro de massa.

D- Obtenção e análise das imagens

As imagens das proteínas separadas pela eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida e coradas com Coomassie Brilliant Blue G250 foram obtidas por meio de digitalização no Image Scanner (GE-HealthCare) . As análises dos géis foram realizadas pelo programa Image Master 2D versão 3.10 (GE-HealthCare). As

massas moleculares aparentes das proteínas foram determinadas utilizando-se padrões de massa molecular aplicados na segunda dimensão.

III.7- “Western blot” com anticorpo policlonal anti-FGFb e anti-VEGF₁₆₅:

A fração protéica FrHB1 obtida da cromatografia em DEAE-celulose do soro do látex natural da seringueira foi analisada em eletroforese de gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) conforme descrito no **item III.5** de materiais e métodos. Para tanto, confeccionou-se um gel de poliacrilamida a 15% e o gel de empilhamento em uma concentração fixa de 5 %. O padrão de massa molecular utilizado foi o SigmaMarker™ Low Range (P.M. 6.500 – 66.000) (Sigma – EUA). As massas moleculares definidas pelo fabricante são: Soroalbumina bovina (66 KDa); Ovoalbumina (45 KDa); Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho (36 kDa); Anidrase carbônica (29 KDa); Tripsinogênio (24 KDa); Inibidor de tripsina (20 KDa); α -Lactoalbumina (14,2 KDa) e Aprotinina (6,5 KDa).

Após separação eletroforética, as proteínas foram transferidas (*TransBlot Semi Dryer*, BIO-RAD laboratories, Richmond, CA) para membrana de nitrocelulose (*Transblot* 0,45 μ M, BIO-RAD laboratories, Richmond, CA) utilizando-se uma corrente de 10 mA/20 min, num meio contendo, 39 mM glicina, 48 mM Tris, 10% p/v de SDS e mistura água/metanol 1:5 (v/v). Após a transferência, a membrana foi corada com *Ponceau Red* e bloqueada com leite em pó desnatado a 10% p/v, em tampão TTBS (0,05 M Tris-HCl, pH=7,4; 0,5 M NaCl e 0,1% Tween 20), durante uma

hora. A seguir, os anticorpos primários policlonais (coelho) anti-FGFb (1:1500) (Sigma-Aldrich) e (camundongo) anti-VEGF₁₆₅ (1:1500) (Sigma-Aldrich) diluídos em tampão de bloqueio foram incubados com a membrana à 4 °C, sob leve agitação, durante toda a noite. Cada membrana foi lavada com tampão TTBS por 3 vezes de 5 minutos e então incubada com os anticorpos secundários IgG de carneiro anti-IgG de coelho ou IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase, diluídos em tampão de bloqueio, durante 30 min., à temperatura ambiente. Após extensivas lavagens com TTBS, a membrana foi revelada utilizando o método de quimiluminescência (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA).

III.8- Espectrometria de Massa:

A região do gel bidimensional, contendo as proteínas (*spot*) foi extraída com auxílio de um bisturi, cortadas em segmentos de aproximadamente 1 mm³, colocadas em tubos de ensaio, tipo eppendorf, e armazenadas à 4 °C. A digestão das proteínas em gel foi realizada conforme (Parker *et al.*, 1998) com modificações, conforme descrito abaixo:

Remoção do corante: Os segmentos de gel contendo as proteínas foram lavados em água deionizada, descorados por três vezes na solução contendo 50% v/v de acetonitrila (ACN) e 25 mM de bicarbonato de amônio (AMBIC) por 30 min., desidratados duas vezes em 100 % ACN por 10 min. A ACN foi removida e o resíduo remanescente do gel foi deixado para evaporar à temperatura ambiente.

Redução e alquilação: Os fragmentos de gel contendo as proteínas foram reidratados e reduzidos em DTT (20 mM DTT/ 50 mM AMBIC) à 60 °C por 40 min. e alquilados com iodoacetamida (IAA) (55 mM IAA / 50 mM AMBIC) no escuro por 30 min. O excesso de IAA foi removido e os fragmentos foram lavados em 25 mM AMBIC e, posteriormente, desidratados em 100 % de ACN. A ACN foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporar à temperatura ambiente.

Digestão das proteínas: Os fragmentos de gel contendo as proteínas de interesse foram então reidratados com 15 µL de solução contendo 150 ng de tripsina (Sigma-Aldrich) em 25 mM de AMBIC e mantidas à 37 °C por 12 h. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (50 % v/v ACN e 5 % v/v ácido fórmico).

Extração dos peptídeos: Os peptídeos foram eluídos da ACN com três lavagens de 15 min. com solução de eluição (60 % v/v metanol e 1 % v/v ácido fórmico) à 45 °C sob sonicação. O aparelho de sonicação usado foi o ULTRA-SOM (Thomton-INPEC Eletrônica LTDA) modelo G/T, tipo T7, com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida à secagem em um concentrador 5301 (Eppendorf, Alemanha) à temperatura ambiente, por 2-3 h. Os peptídeos foram ressuspensos em 1 % v/v ácido fórmico para o seqüenciamento por espectrometria de massa.

Seqüenciamento dos peptídeos: Os peptídeos foram seqüenciados em espectrômetro de massas MALDI-Q-TOF API (ESI-MS/MS *quadrupole/aceleração orthogonal time-of-flight*) da Waters – Micromass acoplado a um sistema *on-line* de HPLC capilar, CapIC (Waters®).

Os peptídeos ressuspendidos em 1% de ácido fórmico foram aplicados em um sistema de HPLC capilar de forma que a separação dos peptídeos foi realizada usando-se uma pré-coluna C18 (Sentry™ Guard Column C18 Waters®) seguida por uma coluna de fase reversa C18 (Symmetry® C18 5 µm 0,32 X 150 mm Waters®). Os peptídeos foram eluídos através da variação do gradiente do tampão A (95 % v/v ACN, 5 % v/v H₂O e 0,1 % v/v ácido fórmico). Durante a corrida o fluxo usado foi de 5 µL/min. nos primeiros 15 min., 2 µL/min, entre 15 e 40 min , de 5 µL/min. entre 40 e 45 min. A variação de gradiente do tampão B foi de 10 % (v/v) a 15 % (v/v) em 5 min., de 15 % (v/v) a 35 % (v/v) em 20 min., de 35 % (v/v) a 45 % (v/v) em 5 min., de 45 % (v/v) a 80 % (v/v) em 5 min., mantido por 5 min. em 80 % (v/v) e os últimos 5 minutos em 10 % (v/v).

A ionização das moléculas por “electrospray” foi realizada com uma voltagem fixa de 3000 V, temperatura de 90 °C sob 5 psi de nitrogênio. Os espectros foram adquiridos em modo MS/MS automaticamente com um limiar de 25 *counts*, dentro de uma amplitude de 50 a 2000 m/z. As aquisições foram realizadas simultaneamente com o peptídeo padrão GFP através do sistema Nanolock Spray da Micromass, para corrigir as variações de calibração que ocorrem ao longo do tempo.

Análise das informações: Os espectros de massas das amostras foram processados utilizando-se o programa Mascot Distiller e depois feito a busca no banco de dados MSDB, datado de 10 de Agosto de 2007 (contendo 3.239.079 seqüências) utilizando-se o programa Mascot.

III.9- Estudo do aumento da permeabilidade vascular:

Os ensaios de atividade em animais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, estando de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) apresentado no Protocolo 261/2005 (ANEXO 1).

A permeabilidade vascular foi determinada de acordo com o método descrito por (Miles & Miles, 1952); modificado por (Udaka *et al.*, 1970; Wedmore & Williams, 1981; Senger *et al.*, 1990).

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

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

Em quadrantes separados foram injetados de forma subcutânea 0,2; 0,1 e 0,05 mL de salina ou das soluções preparadas com os materiais a serem ensaiados que formaram os seguintes grupos de estudo:

- 1)** : FrHB1 dissolvido em salina (0.50 mg proteína/mL solução);
- 2)** : FrBH2 dissolvido em salina (3.50 mg proteína/mL solução);
- 3)** : FrHB3 dissolvido em salina (4.20 mg proteína/mL solução);
- 4)** : Salina (NaCl 0.9% p/v) – controle negativo.

Após 30 min. das injeções, os animais, ainda anestesiados, foram sacrificados por guilhotinamento e submetidos à remoção da pele do dorso. Esta pele é armazenada à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 horas de forma a facilitar o corte padronizado, de uma área circular ao redor do local de aplicação de cada amostra, utilizando-se de um *punch* com 2,5 cm de diâmetro. Os cortes removidos foram embebidos em 3 mL de formamida e após um período de 72 h de armazenamento, sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), o sobrenadante foi submetido à leitura espectrofotométrica em 620 nm, com auxílio de um espectrofotômetro Hitachi U-2000. O valor obtido foi comparado a uma curva padrão do corante obtida a partir do plasma do animal, coletado durante o sacrifício, e descrita a seguir.

III.10- Dosagem do corante (curva padrão):

Com o objetivo de se construir a curva padrão para quantificação do corante na corrente sanguínea para cada animal, foram coletadas amostras de sangue, no momento dos sacrifícios. O sangue foi centrifugado a 10000 rpm por 10 min., a fim de se obter o plasma.

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

O gráfico foi construído (curva padrão) pelo programa *Windows Excel 2000* de forma a relacionar volumes conhecidos do corante no plasma do animal, com

suas respectivas absorvâncias. Este processo permitiu a determinação do volume de plasma extravasado a partir do leito vascular, devido à atividade do material testado.

III.11- Teste de atividade angiogênica na membrana cório-alantóidea de embriões de galinha:

O material, previamente liofilizado, obtido a partir das cromatografias em DEAE – celulose (FrHB1, FrHB2 e FrHB3) e da cromatografia em HPLC (FrHB1.1, FrHB1.2 e FrHB1.3) foram dissolvidos em água destilada estéril na concentração de 2.5 µg/µL, homogeneizados, filtrados e esterilizados em Filtros Millex® 0,22 µm. Esta solução foi armazenada em recipientes estéreis à – 20 °C, até o momento de sua utilização.

Em um estudo piloto, foram testadas as atividades referentes aos volumes de 1,5 e 3 µL das soluções (2,5 µg/µL) preparadas a partir do soro, FrHB1, FrHB2 e FrHB3.

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

Utilizou-se de papel de filtro Whatmman nº 1, cortados na forma de discos circulares com 0,5 cm de diâmetro e esterilizados, como veículo na deposição do material de estudo.

Para se estudar a atividade angiogênica apresentada pelo material foi utilizado o teste na membrana cório-alantóidea (MCA) de embriões de galinha conforme descrito por (Wilting *et al.*, 1991; Wilting *et al.*, 1992).

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

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

Ao final do décimo terceiro dia de incubação, os discos de papel de filtro, veiculando 3 µL da solução a ser testada, ou água destilada (controle negativo), foram depositados diretamente sobre a membrana de forma cuidadosa e estéril. O ovo voltou à incubação até o décimo sexto dia, quando foram retirados da incubadora. Em seguida, as MCAs foram fixadas em solução de formol (3,7 % v/v) por 5 min. e retiradas do embrião. As MCAs, desta forma, foram fotografadas sobre um fundo branco, em tamanho 640X480 pixels e formato de RGB 24 bites, padronizados, com auxílio de uma câmera CCD-Iris Sony modelo DXC-107 A, adaptada a uma lupa de aumento máximo 10 X e conectada a um computador

equipado com uma placa de aquisição de imagens marca PIXEL VIEW, utilizando-se do software “Pixel View Station v4.29 TV” para captura da imagem.

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

Assim, foi obtido um padrão de comparação da atividade angiogênica do soro obtido do látex e do material cromatografado, com o controle negativo, onde foi colocado somente o papel de filtro.

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

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

III.12- Estudo de cicatrização no modelo de úlcera dérmica experimental em orelhas de coelhos:

Os materiais a serem testados (soro e fração FrHB1) encontravam-se liofilizados e por isso foram dissolvidos em solução fisiológica (NaCL 0,9% p/v) estéril. Esta solução foi incorporada em carboximetilcelulose (4% p/v) (Bayer), em forma de gel, nas concentrações finais de 0,01; 0,1 e 1 % p/v. Após o preparo dos géis, os mesmos eram acondicionados sob refrigeração (4 °C) até o momento de utilização. O gel controle foi preparado utilizando-se somente de solução fisiológica incorporada ao gel. Todo o procedimento de preparo e utilização dos reagentes foi realizado dentro de uma capela de fluxo laminar de forma a manter a assepsia final do produto.

O ensaio de atividade cicatrizante foi realizado no modelo descrito por (Mustoe *et al.*, 1991). Foram utilizados coelhos machos *New Zealand*, da linhagem Albino, pesando entre 2,0 e 2,5 kg distribuídos em 6 animais por grupos experimentais.

Os animais foram previamente anestesiados com Tiopental sódico (25 µg/mL i.v.). A região dorsal das orelhas foi depilada e desinfetada com solução de iodo (10 % p/v). Foram feitas 4 úlceras/orelha ao redor do centro da orelha, localizadas a 4,0 cm da extremidade superior, em cada animal. A orelha foi imobilizada e sob condições estéreis os tecidos foram removidos com um auxílio de um *punch* de 5 mm de diâmetro, inclusive o pericôndrio, de forma a expor a cartilagem. Todo o procedimento cirúrgico foi realizado com auxílio de uma lupa de aumento ótico de 7X para manter a uniformidade e precisão das úlceras. Após o procedimento

cirúrgico, escolheu-se a orelha esquerda de cada animal como controle, enquanto os testes de materiais seriam realizados na orelha direita.

Em cada úlcera foram aplicados topicamente 250 μL do material teste ou controle (solução fisiológica em carboximetilcelulose). As úlceras foram então cobertas com um filme de poliuretano (Tegaderme®, 3M) para se prevenir o ressecamento. Nos dias 1, 3, 6, 9 e 12 pós-ferimento, os animais foram colocados em caixas de contenção e sem anestésiar o animal, retirou-se o Tegaderme® para realização das capturas das imagens das úlceras. Após obtenção das imagens, as bordas de cada úlcera foram limpas com salina e, novamente, aplicados mais 250 μL do respectivo gel seguido pela cobertura com Tegaderme®. Este procedimento foi realizado de 3 em 3 dias até o décimo segundo dia pós-ferimento.

O processamento das imagens foi realizado com auxílio do software *ImageJ* v1.28, que permitiu a determinação da área das úlceras em seus variados estágios.

Análises histológicas: O tecido das úlceras, após terem sido fixados em formaldeído 3,7% (v/v), seguiu pelo processo de desidratação e inclusão em parafina. Este material foi seccionado em micrótomo Spencer a 6 μm de espessura. Em seguida, foi corado utilizando-se de Tricoma de Masson.

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

**III.13- Estudo de atividade proliferativa em células HEK-293T
(human embryonic kidney cells):**

A- Preparo de soluções

Para a cultura de células e ensaios de proliferação, foi necessário o preparo das seguintes soluções:

Preparo da amostra: As amostras a serem ensaiadas foram pesadas e dissolvidas em solução fisiológica (NaCl 0,9% p/v) em uma concentração de 0,1 mg/mL. A partir desta solução, outra concentração de 0,01 mg/mL foi preparada. Todo o preparo e manejo do material foram realizados de forma asséptica e a solução final foi filtrada em filtros esterilizantes de 0,22 µm de poro (Millex® - Millipore).

Solução de MTT: 25 mg do sal de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide] (MTT), (Sigma®), foi pesado em balança analítica e adicionados a 5 mL de solução salina de tampão fosfato (PBS), concentração final igual a 5 mg/mL.

Preparo dos meios de cultura: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - Gibco®) foi dissolvido em 5 litros de água destilada e adicionados 3,7 g/L de NaHCO₃. Usa-se HCl ou NaOH (1N) para correção do pH até 7,2.

Na suplementação do meio, para uso na cultura das células, adicionou-se 50 mL de soro fetal bovino em 500mL de meio e adicionou-se 100 µL de antibiótico gentamicina (em solução estoque de 50 mg/mL) para uma concentração final de 10 µg/mL.

Preparo da solução PBS estéril: O tampão fosfato salino (PBS) foi preparado dissolvendo-se 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄ e 0,24 g de KH₂PO₄ em 800 mL de água destilada. Ajustou-se o pH para 7,4 com solução de HCl. Completou-se o volume até 1 L com água. Estas soluções foram autoclavadas para esterilização.

B- Cultura de células:

A linhagem de célula *HEK-293T* (Human embryonic kidney) foi mantida em estufa a 37 °C com tensão de 5 % de CO₂ e 95 % de ar. As células *HEK-293T* foram cultivadas em garrafas de 75 cm² contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Como antibiótico foi usado a gentamicina. Esta linhagem celular foi escolhida para a realização dos testes de proliferação uma vez que corresponde a uma linhagem de células semelhantes aos fibroblastos primários, sendo amplamente estudada e descrita na literatura.

C- Ensaio de proliferação:

As células *HEK-293T* aderidas nas garrafas de cultura foram “soltas” por branda agitação. Após centrifugação (2000 rpm, 2 min.) foram ressuspensas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 48 poços (2x10⁴ células/poço). Ao completar 24 h. de

incubação, nas mesmas condições descritas anteriormente, as células foram expostas ao veículo ou composto por um período de 48 h. A cada um dos poços foram então adicionados 5 μ L de solução de MTT (5 mg/mL em PBS) e as células foram incubadas em estufa por mais 3 h. (Mosmann, 1983); (Rubinstein *et al.*, 1990). Em seguida o meio de cultura foi removido e aos poços foi adicionado um volume de 200 μ L da solução de isopropanol acidificado com HCL (0,04 M). A viabilidade celular foi determinada por absorbância a 570nm (Jasiulionis *et al.*, 2007).

III.14- Análises estatísticas:

Para os experimentos de avaliação de reparo tecidual e aumento da permeabilidade vascular, a análise estatística dos dados obtidos foi realizada de acordo com o teste *T Student*, considerando os valores de $p \leq 0,05$ ou $p \leq 0,01$ como significativos. Para os experimentos de angiogênese em MCA, a análise estatística paramétrica foi realizada de acordo com ANOVA de uma via, pelo método de múltiplas comparações versus grupo controle (método de Dunnett's) considerando os valores de $p \leq 0,05$ ou $p \leq 0,01$ como significativos. Os ensaios de proliferação de células HEK-293T tiveram seus dados analisados estatisticamente por ANOVA de uma via segundo o teste de Bonferroni e $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

IV-RESULTADOS:

IV.1- Caracterização do soro do látex natural da seringueira:

A caracterização biológica do soro bruto, obtido da coagulação do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* foi realizada por meio de ensaios de indução da permeabilidade vascular (teste de Miles), atividade angiogênica na membrana cório-alantóidea e aceleração do processo cicatricial no modelo de úlcera dérmica experimental em orelhas de coelhos.

IV.1.1- Atividade de aumento da permeabilidade vascular.

A figura 4 demonstra os resultados obtidos após a injeção subcutânea do soro, soro fervido por 1 h. a 100 °C e soro tratado com proteinaseK, na pele dorsal de coelhos. O material a ser testado foi preparado pesando-se 1,0 mg do soro obtido da coagulação do látex natural, após processamento de diálise e liofilização, seguido de completa dissolução em 1,0 mL de solução salina (NaCl 0,9% p/v). Como pode ser observado o soro, na concentração de 1 mg/mL aumenta significativamente a permeabilidade vascular do corante azul de Evans ligado às proteínas plasmáticas. O resultado é representado como volume de plasma extravasado $\mu\text{L}/\text{mg}$ de proteínas no soro.

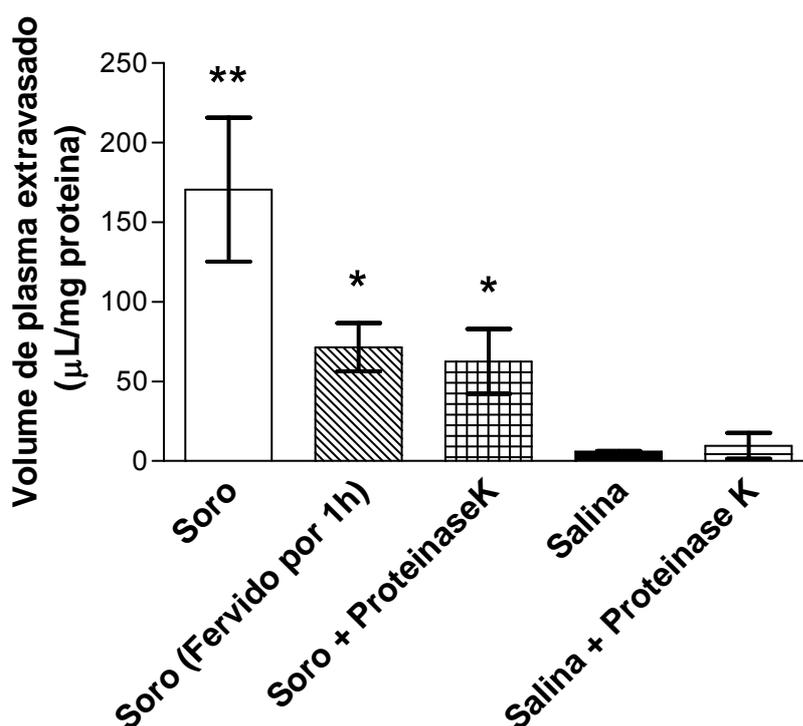


Figura 4: Atividade do soro do látex no teste de Miles. Pesou-se 1,0 mg de soro e dissolveu-se em solução salina (NaCl 0,9 % p/v). Esta solução foi fervida durante 1 h. (100 °C) e incubada à 37 °C durante uma noite com 2% v/v de uma solução de ProteinaseK (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,3 mg/mL. Os controles foram feitos com solução salina e salina incubada durante uma noite com 2% v/v da solução de ProteinaseK. Foram realizados 3 experimentos distintos em triplicata de três volumes diferentes (0,2; 0,1 e 0,05 mL de amostra ou controle). (**= $p < 0,01$ e *= $p < 0,05$).

No soro fervido, bem como no soro tratado com a enzima proteolítica proteinase K, ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do aumento da permeabilidade vascular em relação ao soro não tratado, apesar de ainda apresentar uma atividade indutora da permeabilidade vascular significativa ($p < 0,05$) em relação aos grupos controles (salina e salina contendo proteinase K). Este resultado indica uma forte atividade indutora da permeabilidade vascular apresentada pelo soro obtido do látex natural da seringueira. A redução desta atividade observada após a realização dos tratamentos proteolíticos sugere a presença de uma molécula com estrutura polipeptídica como a responsável por esta atividade.

IV.1.2- Atividade angiogênica do soro do látex na membrana cório-alantóidea de embriões de galinha.

A atividade angiogênica do soro do látex natural da seringueira foi observada em modelos da MCA e o resultado é demonstrado na figura 5. O material a ser testado foi preparado de modo asséptico, dissolvendo-se 0,3 mg do soro obtido da coagulação do látex natural da seringueira, dializado e liofilizado previamente, em 1 mL de água destilada. Esta solução foi submetida a uma filtração em filtros Milex® 0,22 µm como forma de garantir sua esterilidade.

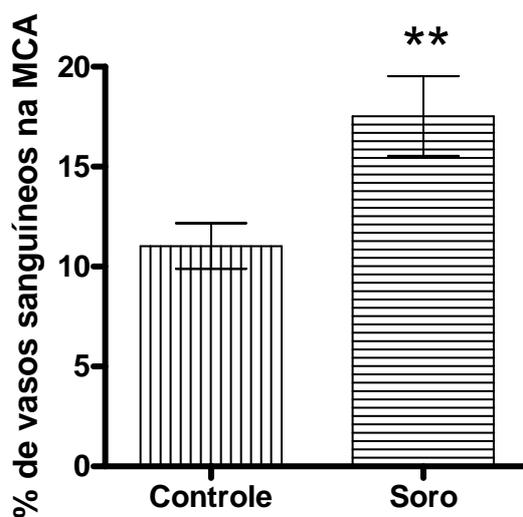


Figura 5: Quantificação da atividade angiogênica apresentada pelo soro obtido do látex natural da seringueira na MCA. Foram aplicados 3 µL de água destilada (controle) e de uma solução na concentração de 0,3 mg/mL de soro em água destilada (n=12 ovos/amostra; **=p<0,01).

Como pode ser observado na figura 5, o soro do látex estimulou significativamente (p<0,01) a neoformação de vasos na MCA. Este resultado indica a capacidade do soro obtido do látex natural da seringueira em induzir a proliferação e neoformação de vasos sanguíneos neste modelo de angiogênese. O resultado

apresentado é conseqüência de uma quantificação, por análises de imagens, da relação da área ocupada pelos vasos sanguíneos em comparação à área total presente na imagem capturada, em termos percentuais.

IV.1.3- Aceleração do processo de cicatrização de úlceras dérmicas experimentalmente provocadas em orelhas de coelhos pelo soro do látex natural.

Para uma melhor avaliação do soro obtido do látex natural da seringueira no processo cicatricial, utilizou-se o ensaio de úlceras dérmicas em orelhas de coelhos que apresenta-se como um modelo não contráctil e muito semelhante ao que ocorre na cicatrização de feridas crônicas dos membros inferiores do homem (Mustoe *et al.*, 1991; Pierce *et al.*, 1992).

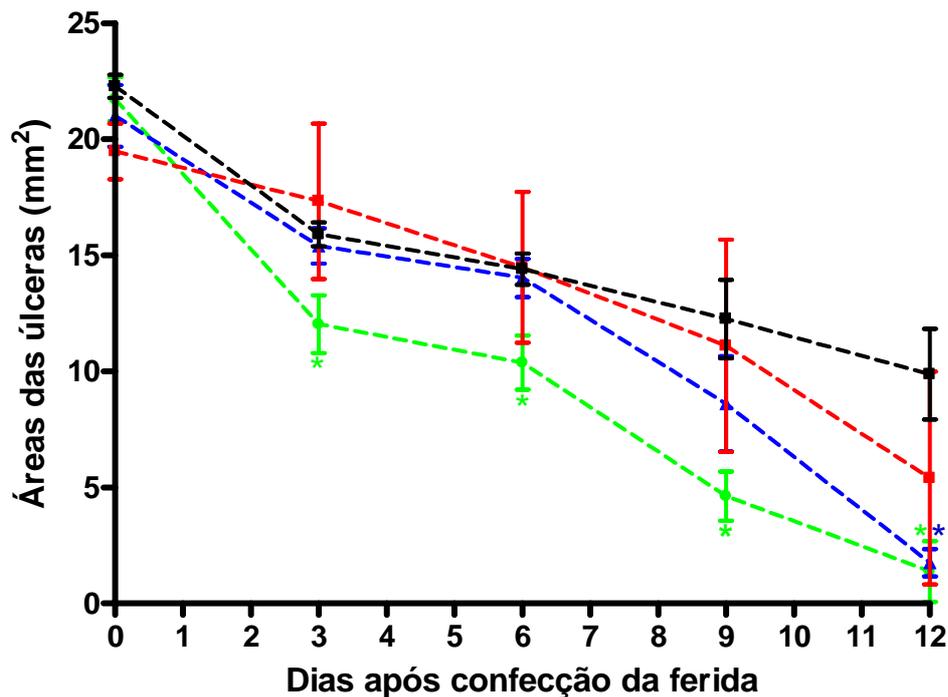


Figura 6: Quantificação das áreas das úlceras dérmicas em orelhas de coelhos. As úlceras foram tratadas com o soro nas concentrações de 1; 0,1 e 0,01 % p/v e com o controle (solução salina) ao longo do processo cicatricial. As análises foram feitas por meio de processamento de imagens, com auxílio do software *ImageJ*, obtidas nos dias 0, 3, 6, 9 e 12 pós ferimento. Foram feitos 3 animais distintos para cada concentração testada, sendo realizadas 4 úlceras em cada orelha (uma tratada com controle e outra com o soro) (■.....■ Soro 1 % p/v; ▲.....▲ Soro 0,1 % p/v; ●.....● Soro 0,01 % p/v e ■.....■ controle negativo NaCl 0,9% p/v; *= $p \leq 0,05$).

A figura 6 mostra uma redução significativa das áreas das úlceras tratadas com o soro no décimo segundo dia pós-ferimento em relação às úlceras não tratadas (grupo controle), principalmente para as concentrações 0,1 e 0,01% p/v. Isto indica uma aceleração do processo cicatricial como conseqüência da utilização do soro obtido do látex natural da seringueira em relação à utilização de produtos inertes como a solução salina. Observamos ainda que nas úlceras tratadas com o soro na concentração de 0,01% p/v, houve uma diminuição significativa das áreas das feridas a partir do terceiro dia de tratamento, indicando uma maior eficiência na aceleração do processo cicatricial por esta concentração do soro.

Estes resultados indicam fortemente a presença de uma molécula com estrutura polipeptídica, indutora do aumento da permeabilidade vascular (figura 4), apresenta atividade angiogênica (figura 5) e aceleradora do processo cicatricial (figura 6). Estas observações conduziram à necessidade de continuação do trabalho, no sentido de purificar e caracterizar a proteína angiogênica e com atividade cicatrizante presente no soro do látex natural.

IV.2-Purificação do soro do látex por cromatografia em coluna de DEAE-celulose:

Em uma primeira etapa de purificação do soro, material extraído do látex natural da seringueira pela coagulação da borracha, foi utilizado cromatografia em resina de DEAE-celulose. Esta resina possui a característica de comportar-se como uma trocadora aniônica com alta capacidade de processamento de material. Possui um baixo custo, ideal para uma purificação de extratos contendo altas quantidades de proteínas, assim como outros componentes: carboidratos, lipídeos, polifenóis e micelas de borracha, não removidas do soro pelo processo de coagulação do látex e filtração.

O soro extraído do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* (*in natura*), teve a determinação da dosagem de proteínas realizada pelo método do micro-biureto conforme descrito por (Itzhaki & Gill, 1964), apresentando a concentração média de 0,36 mg/mL ($\pm 0,05$), aplicando-se diretamente na coluna um total de 720 mg de proteína (2,0 L de soro) a cada ciclo de purificação.

Após a aplicação da amostra (2,0 L) estar completa, iniciava-se a eluição dos componentes do soro com o tampão de equilíbrio (bicarbonato de amônio 0,01 M, pH=9,0; 1,5 L) seguindo-se de um gradiente descontínuo de eluição tipo “step-wise” nas concentrações de 0,15 M; 0,25 M e 1,5 M de NaCl no mesmo tampão de bicarbonato de amônio (0,01 M, pH=9,0; 1,5 L). A figura 7 apresenta o perfil cromatográfico obtido nesta etapa de purificação.

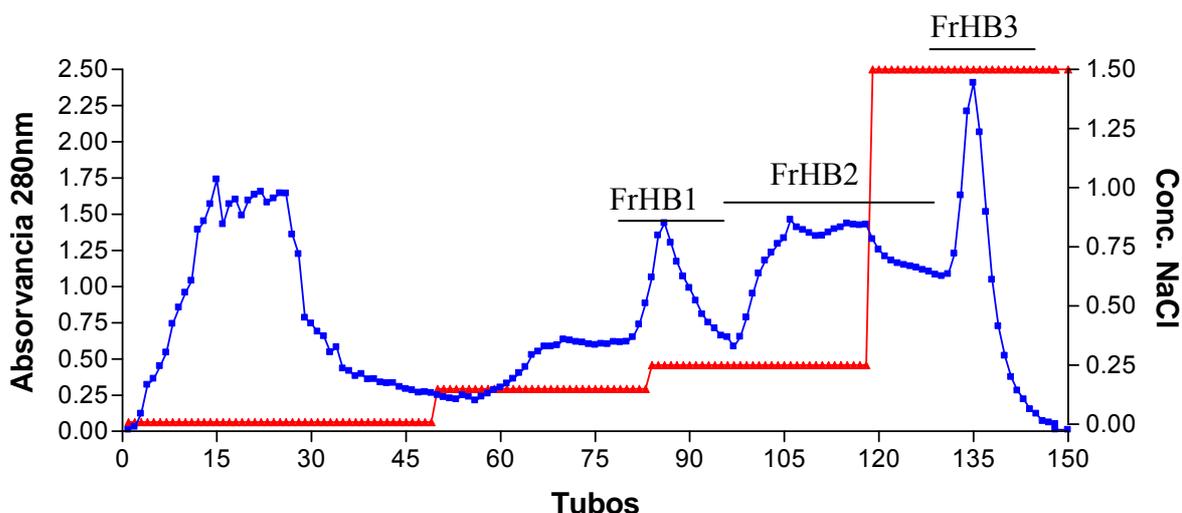


Figura 7: Cromatograma em DEAE-celulose. Perfil cromatográfico do soro do látex pH=9,0 em coluna DEAE-celulose (5,0 X 50,0cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01 M, pH=9,0. A eluição foi realizada em gradiente descontínuo e crescente de NaCl empregando-se um fluxo de 7 ml/min., coletando-se 30 mL/tubo. O eluato foi monitorado em $\lambda=280$ nm. As frações foram designadas de FrHB1, FrHB2 e FrHB3, dialisadas contra água destilada, liofilizadas e armazenadas à -20° C para posteriores análises de atividades.

Após a introdução do gradiente descontínuo de NaCl para eluição do material, obteve-se 3 picos acompanhados pela leitura espectrofotométrica em $\lambda=280$ nm e identificados como FrHB1, FrHB2 e FrHB3. Este material foi reunido, dialisado contra água destilada e liofilizado para posteriores testes de atividade.

IV.2.2-Atividades biológicas sobre a permeabilidade vascular, angiogênese, cicatrização e proliferação celular das frações obtidas na cromatografia em DEAE-celulose:

IV.2.2.1- Aumento da permeabilidade vascular no teste de Miles em coelhos:

As frações obtidas a partir da primeira etapa de purificação em DEAE-celulose, dialisadas e liofilizadas, foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9% p/v), na concentração de 5,0 mg/mL. Estas soluções tiveram seu conteúdo protéico determinado pelo método de (Lowry *et al.*, 1951) modificado por (Hartree, 1972).

O resultado deste estudo, apresentado na figura 8, é expresso em microlitros de plasma (corante ligado às proteínas plasmáticas) extravasado por miligramas de proteínas e para a análise estatística realizada foi utilizado ANOVA de uma via pelo método de múltiplas comparações *versus* grupo controle (Método de Dunnett's).

Pelo gráfico observa-se uma maior atividade de aumento da permeabilidade vascular na fração FrHB1, quando comparada às frações FrHB2 e FrHB3. Estas últimas, também demonstraram capacidade de aumentar a permeabilidade vascular, porém de forma não significativa ($p > 0,05$).

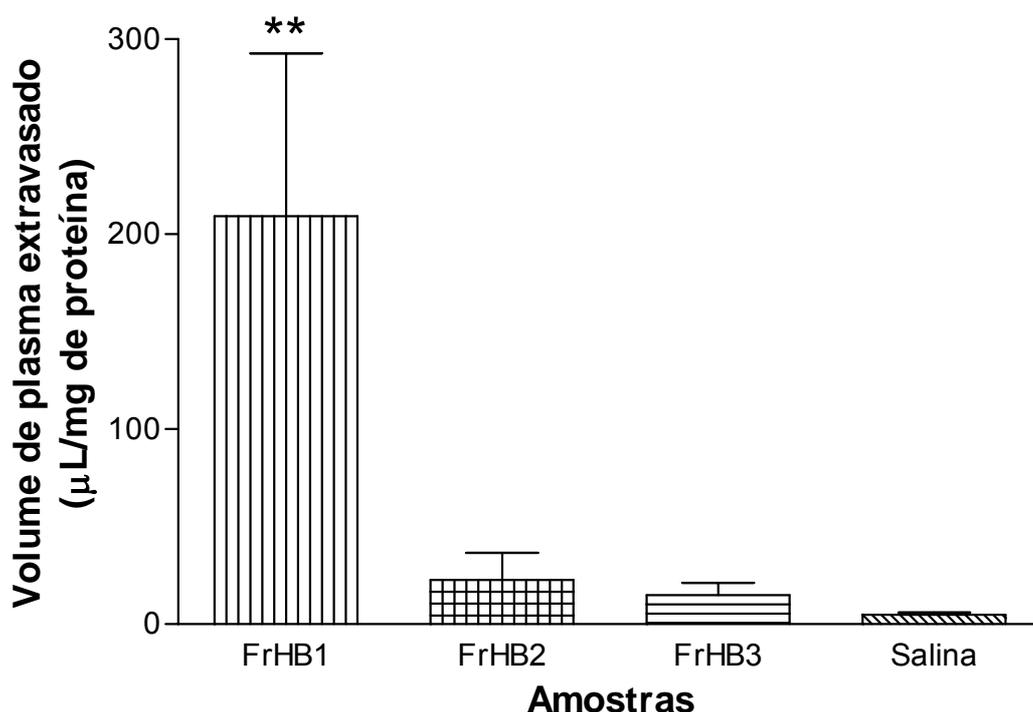


Figura 8: Estudo da atividade na permeabilidade vascular das frações obtidas da cromatografia em DEAE-celulose. As amostras correspondem à: 1) FrHB1 (0.535 mg de proteína/mL); 2) FrHB2 (3.53 mg de proteína/mL); 3) FrHB3 (4.17 mg de proteína/mL) e 4) Salina (NaCl 0,9% p/v). Foram realizados 3 experimentos distintos em triplicata de três volumes diferentes (0,2; 0,1 e 0,05 mL de amostra ou controle). (** = $p \leq 0,01$).

IV.2.2.2- Atividade angiogênica na membrana cório-alantóidea de ovos de galinha embrionados:

As frações obtidas a partir da cromatografia em DEAE-celulose foram dissolvidas na proporção de 2,5 mg/mL em água destilada, segundo descrito em materiais e métodos. Desta forma, 3 µL de cada solução apresentando as seguintes concentrações protéicas: 1) FrHB1= 0,1 mg/mL; 2) FrHB2= 0,5 mg/mL e 3) FrHB3= 0,5 mg/mL; foram aplicadas, através dos discos de papel, sobre a MCA, assim como o controle negativo (água destilada).

O resultado é apresentado na figura 9 onde, nas fotografias retiradas da MCA, observa-se um aumento na vascularização induzido pelas frações FrHB1, FrHB2 e FrHB3 em comparação com o controle (água destilada). Observa-se, também, uma maior atividade específica na angiogênese induzida pela fração FrHB1, quando comparada ao controle e às frações FrHB2 e FrHB3.

Para se quantificar este aumento, processou-se a imagem através do programa GIMP 1.2.4 de forma que a saturação, brilho e contraste permitissem uma melhor visualização dos vasos sanguíneos. A análise desta imagem foi realizada com auxílio do programa ImageJ versão 1.28u capaz de separar intervalos de níveis de intensidade e desta forma isolar e quantificar os pixels correspondentes aos vasos sanguíneos. A quantidade de pixels selecionados é proporcional ao nível de vascularização do campo de imagem capturada. Esta proporção é traduzida em porcentagem pela quantidade de pixels referentes à rede vascular em relação ao total de pixels da imagem analisada. Esta quantificação é apresentada na figura 10.

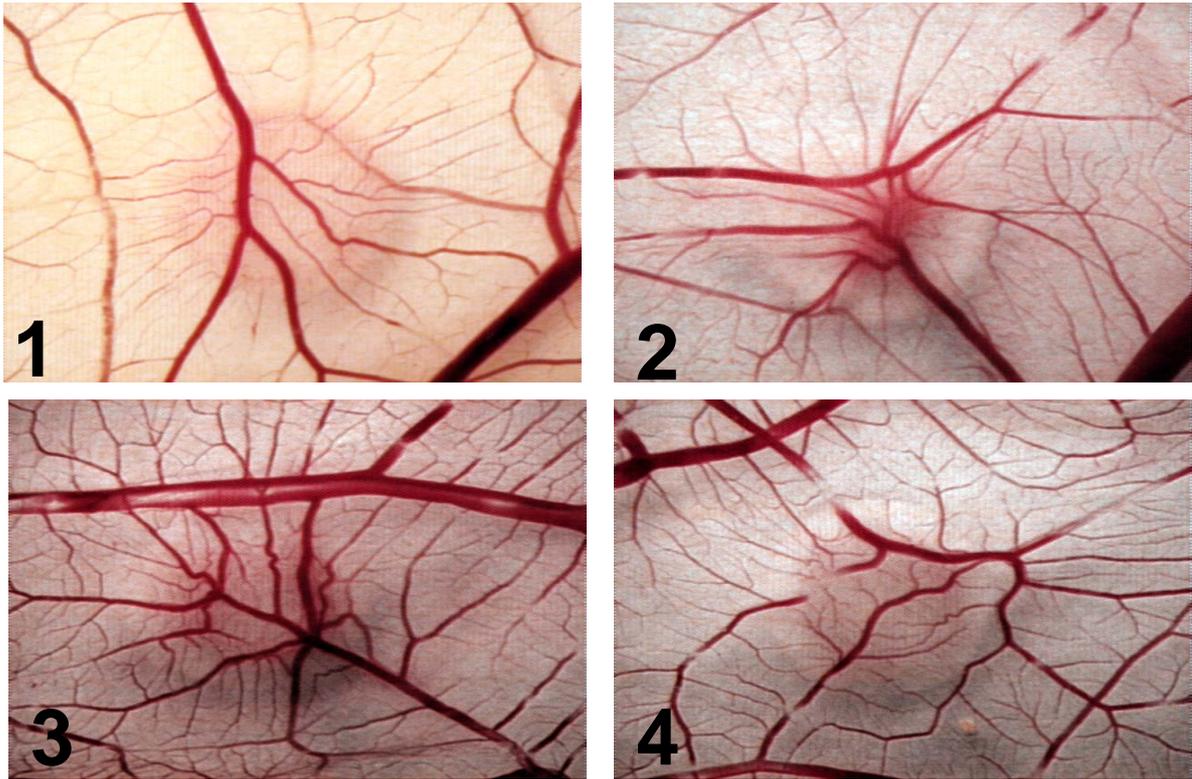


Figura 9: Atividade angiogênica na MCA. 1: Controle Negativo (água destilada); 2: FrHB1 (0,3 mg de proteína); 3: FrHB 2 (1,5 mg de proteína); 4: FrHB 3 (1,5 mg de proteína). Em cada ensaio, 3,0 μ L de uma solução (2,5 mg/mL) foram aplicados, utilizando-se de discos de papel de filtro (0,5 cm de diâmetro) como suporte.

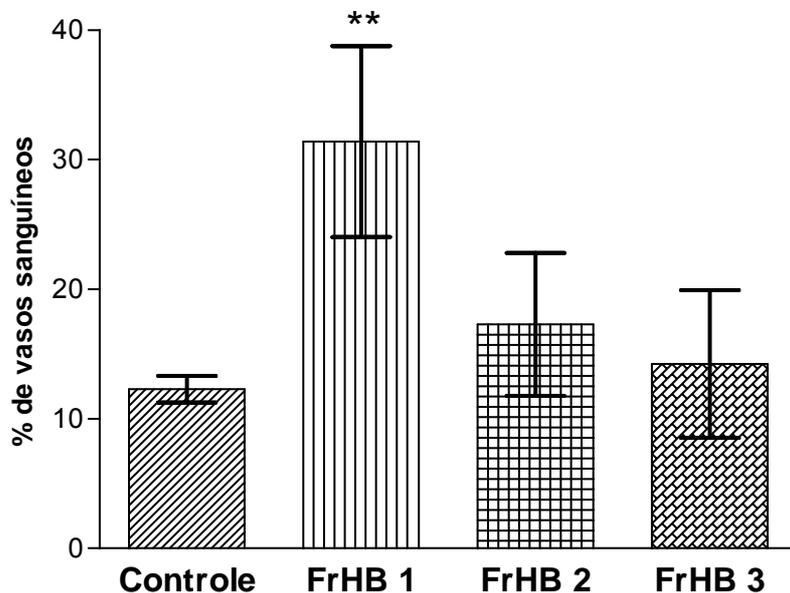


Figura 10: Quantificação da atividade angiogênica apresentada pelas frações obtidas da cromatografia em DEAE-celulose. As amostras ensaiadas são: Controle (água destilada); FrHB1 (0,3 mg de proteína); FrHB 2 (1,5 mg de proteína) e FrHB 3 (1,5 mg de proteína) (n=12 ovos/amostra; ** = $p \leq 0,01$).

Análises histológicas da MCA de ovos embrionados tratados com as frações FrHB1, FrHB2 e FrHB3:

A figura 11 demonstra o aspecto histológico das MCAs, quando submetidas ao efeito das frações FrHB1, FrHB2 e FrHB3, e sua conseqüente comparação ao controle (água destilada).

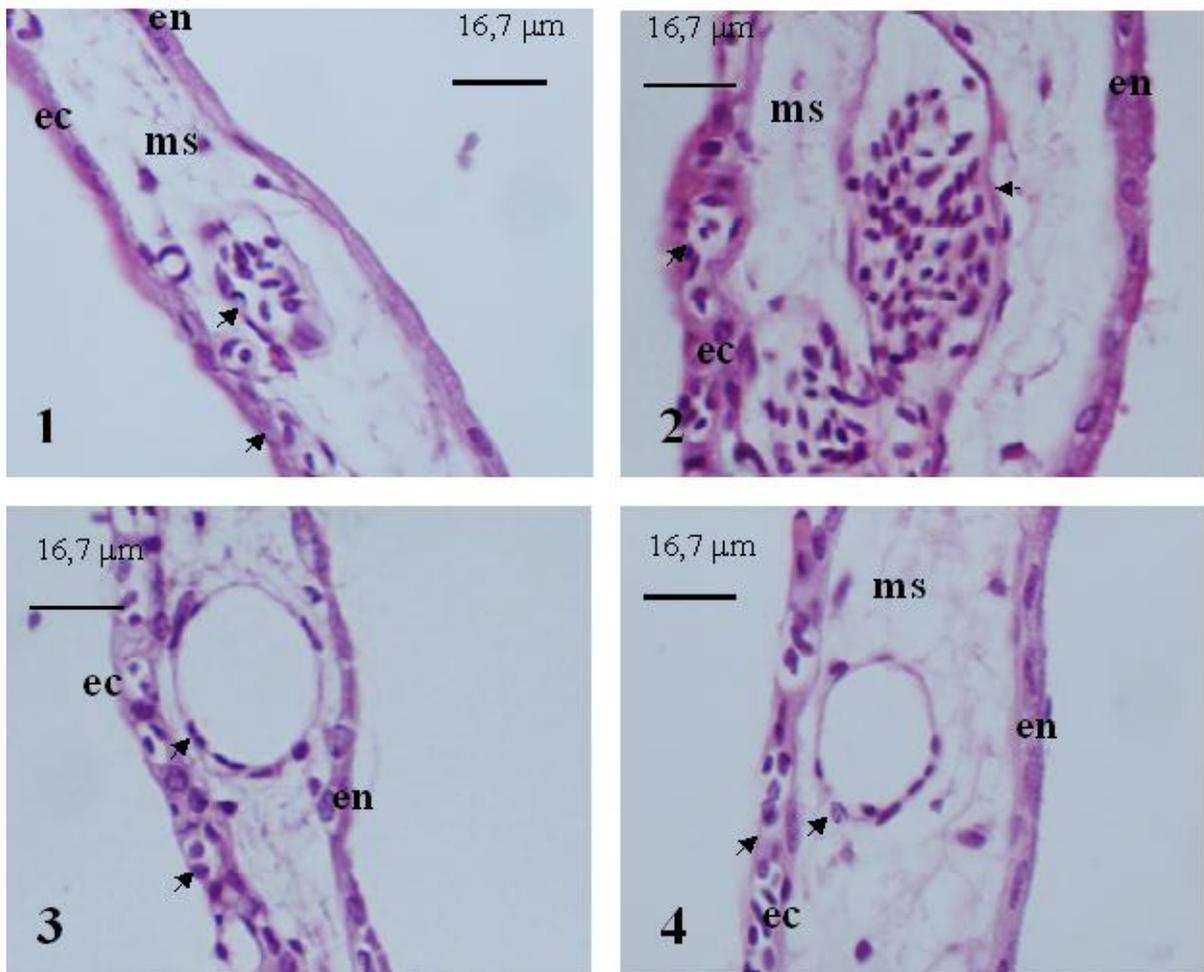


Figura 11: Cortes histológicas das MCAs tratadas com as frações obtidas da cromatografia em DEAE-celulose e coradas por HE. 1: Controle negativo (água destilada); 2: FrHB1 (0,3 mg de proteína); 3: FrHB2 (1,5 mg de proteína) e 4: FrHB3 (1,5 mg de proteína). Ec=ectoderma; ms=mesoderma; en=endoderma e as setas indicam vasos sanguíneos. Aumento de 40X.

Como pode ser observado, o tratamento com a fração FrHB1 (figura 11 – 2), aumenta significativamente o número de vasos próximos ao ectoderma enquanto no mesênquima, ocorre um significativo espessamento da MCA, bem como do calibre dos vasos, evidenciando um forte estímulo fibroblástico.

IV.2.2.3- Atividade cicatrizante da fração FrHB1 no modelo de úlcera dérmica experimentalmente induzida em orelhas de coelhos:

De acordo com os resultados apresentados nos ensaios de indução da permeabilidade vascular em coelhos e angiogênese na membrana cório-alantóidea de embriões de galinha, a fração FrHB1 demonstrou uma maior atividade específica em ambos os ensaios.

Desta forma, a fração FrBH1 foi escolhida para estudos de aceleração da cicatrização no modelo de úlceras em orelhas de coelhos. Utilizando-se de gel de carboximetilcelulose como veículo, foram preparadas 3 concentrações (1, 0,1 e 0,01% p/v) a serem testadas neste ensaio. Como controle negativo, o mesmo gel misturado com solução fisiológica (NaCl 0,9% p/v) em uma proporção de 1% v/v foi utilizado nas úlceras experimentais confeccionadas na orelha esquerda de cada animal.



Figura 12: Cicatrização no modelo de úlcera dérmica em orelhas de coelhos. Fotografias obtidas nos dias: 1 (I), 3 (II), 5 (III), 7 (IV) e 10 (v) após a realização das úlceras. O material FrHB 1 foi incorporado em gel de carboximetilcelulose (1.5% p/v) nas concentrações de 0,01% (D), 0.1% (C), 1.0% (B) e controle negativo (NaCl 0.9%) (A).

A figura 12 apresenta as imagens das fotografias das úlceras nos dias 1, 3, 5, 7 e 10 após a confecção das lesões, submetidas ao tratamento com o controle e com as diferentes concentrações da fração FrHB1. O resultado apresentado demonstra uma aceleração do processo cicatricial nas úlceras tratadas com a fração em comparação com as úlceras tratadas com o controle. A quantificação das áreas ulceradas em cada imagem permite uma melhor visualização do andamento do processo de cicatrização conforme demonstrado na figura 13. Esta quantificação foi realizada com auxílio do programa ImageJ versão 1,28u.

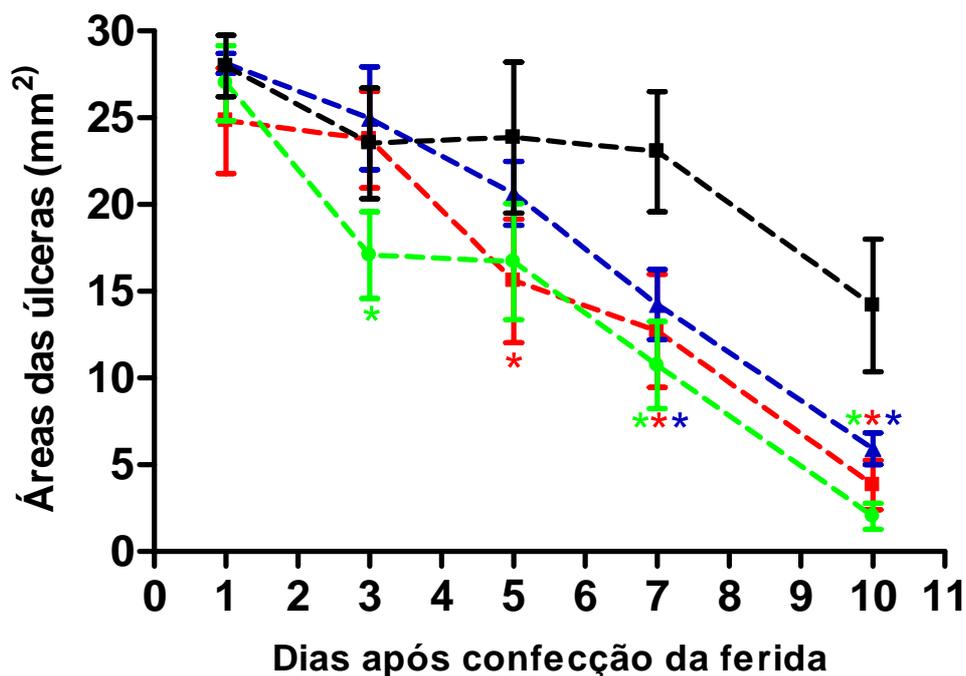


Figura 13: Quantificação das áreas das úlceras ao longo do processo cicatricial. As análises foram feitas por meio de processamento de imagens, com auxílio do software *ImageJ*, obtidas nos dias 1, 3, 5, 7 e 10 pós ferimento. Foram feitos 3 animais distintos para cada concentração testada, sendo realizadas 4 úlceras em cada orelha (uma tratada com controle e outra com o soro) (▲.....▲ FrHB1 1,0 % p/v; ■.....■ FrHB1 0,1% p/v; ●.....● FrHB1 0,01 % p/v e ■.....■ controle negativo NaCl 0,9% p/v; *= $p \leq 0,05$).

O gráfico apresentado na figura 13 mostra o efeito da fração FrHB1 no aceleração do processo cicatricial nas diferentes concentrações estudadas. Observa-se que a fração FrHB1, na concentração de 0,01% p/v, reduziu a área da lesão a partir do terceiro dia de tratamento em comparação ao grupo controle. Esta redução da área ulcerada continuou sendo observada até o décimo dia, apresentando desta forma, uma redução do tempo necessário para o término do processo cicatricial. A partir do sétimo dia de tratamento, não ocorreu diferença significativa na aceleração do processo cicatricial em relação às três concentrações da FrHB1 utilizadas, mas alteraram significativamente em relação ao controle ($p \leq 0,01$).

Análises histológicas das úlceras das orelhas de coelhos:

As úlceras dérmicas foram analisadas, de forma geral, comparando-se a reepitelização e a formação do tecido de granulação das úlceras tratadas com a fração FrHB1 e as tratadas com solução fisiológica (controle). Os cortes histológicos foram analisados nos dias experimentais 1, 3, 5, 7 e 10, sendo que até o terceiro dia, não houve reepitelização em ambos os grupos, enquanto que no décimo dia, todas as úlceras encontravam-se completamente reepitelizadas. Assim, nos dias 5 e 7 puderam ser observadas diferenças na velocidade do processo devido ao tratamento com a fração FrHB1 ou com o controle.

A figura 14 demonstra a evolução histológica do processo de cicatrização das úlceras tratadas com solução fisiológica e com a fração FrHB1, de forma comparativa. As imagens foram capturadas com o auxílio de um microscópio Leica DFC, conectado a um sistema de captura de imagens digitais.

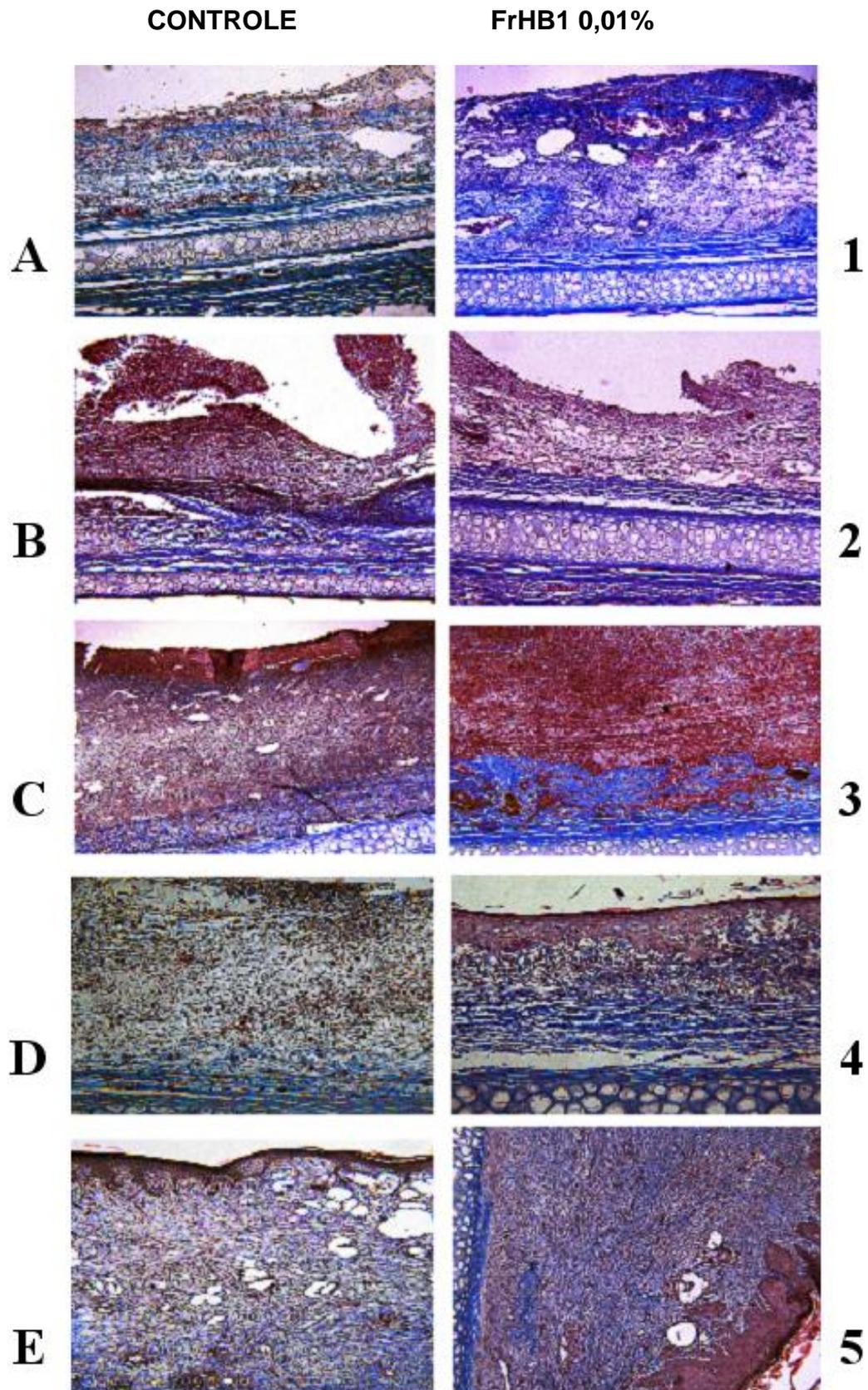


Figura 14: Análises histológicas das úlceras em orelhas de coelhos. As úlceras foram tratadas com controle (A, B, C, D e E) e com a fração FrHB1 0,01% p/v (1, 2, 3, 4 e 5). As imagens foram obtidas da região central das úlceras nos dias 1 (A e 1), 3 (B e 2), 5 (C e 3), 7 (D e 4) e 10 (E e 5). Coloração: Tricomo de Masson. Aumento de 40X.

IV.2.2.4- Atividade indutora da proliferação de fibroblastos (*HEK293T*) da fração FrHB1:

Com o resultado observado após estudo da atividade da fração FrHB1 na MCA, onde ficou evidente um acentuado espessamento desta membrana, conseqüência de um estímulo fibroplásico induzido pela FrHB1, procurou-se um modelo, *in vitro* capaz de determinar e quantificar a real atividade da fração FrHB1 na proliferação de fibroblastos.

A cultura de fibroblastos primários, devido às sérias dificuldades, principalmente relacionadas à contaminação, foi preterida pela utilização de culturas de células facilmente padronizadas e de fácil manejo. Assim, a linhagem *HEK293T* (human embryonic kidney), foi escolhida para os estudos de proliferação.

Tanto o soro quanto as três frações obtidas da cromatografia em DEAE-celulose foram testados em culturas de células *HEK293T* e avaliados pela suas capacidades de induzirem a proliferação celular *in vitro*. Os testes foram realizados de acordo com o procedimento apresentado no item **III-13** de materiais e métodos sendo o resultado demonstrado na figura 15.

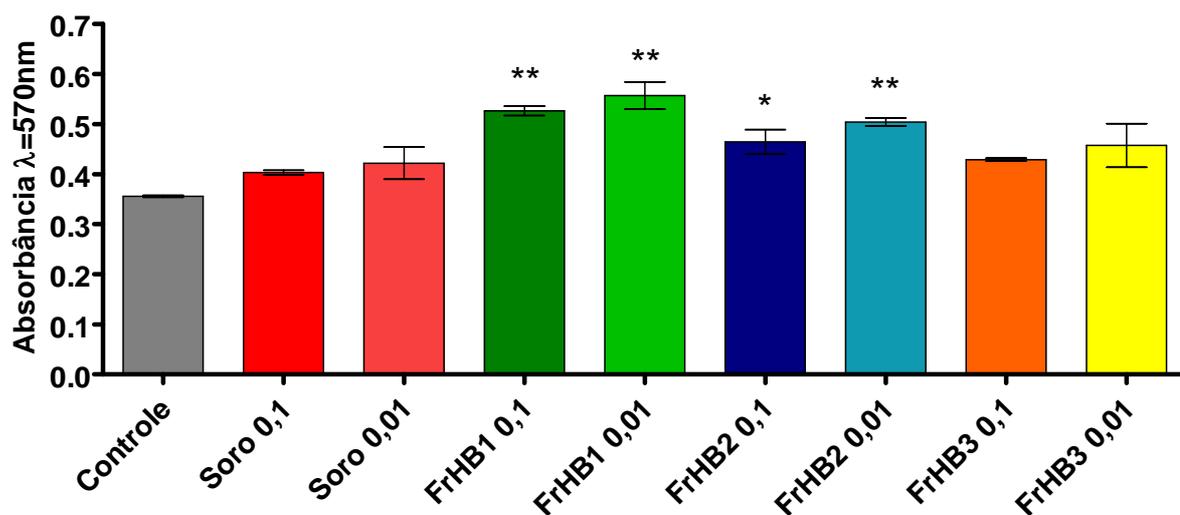


Figura 15: Atividade indutora da proliferação de células *HEK293T* em cultura. As amostras foram ensaiadas em duas concentrações protéicas (0,1 e 0,01 mg/mL). Nas placas, estas soluções ainda eram diluídas em uma razão de 1:100, sendo a concentração de atividade efetiva igual a 10^{-3} e 10^{-4} mg/mL. A viabilidade celular é apresentada por absorvância em 570nm. Foram feitos 3 experimentos individuais, em triplicata (** = $p \leq 0,01$ e * = $p \leq 0,05$).

O resultado demonstra uma indução proliferativa exercida pela fração FrHB1, da ordem de até $56,5 \pm 4,6\%$ para a concentração de 0,01 mg/mL, enquanto que a fração FrHB2 apresentou uma atividade de $41,5 \pm 1,1\%$ na mesma concentração. Os demais materiais testados, soro e fração FrHB3, apesar de não demonstrarem diferença significativa em relação ao grupo controle, apresentaram atividade de indução proliferativa da ordem de $18,5 \pm 4,5\%$ e $28,5 \pm 6,1\%$, respectivamente, nas concentrações de 0,01 mg/mL. Isto demonstra um aumento da atividade específica de pelo menos 30% da fração purificada FrHB1 em relação ao soro, indicando um processo eficiente em termos de purificação do material ativo na indução de células *HEK293T*. A atividade apresentada pelas frações FrHB2 e FrHB3 pode ser devido à uma ligeira contaminação destas frações pelo composto ativo presente na FrHB1.

O estudo de proliferação celular por meio do MTT indica também, a ausência de citotoxicidade por parte do material ensaiado.

IV.2.3- Caracterização bioquímica da fração FrHB1 por análises em eletroforese SDS-PAGE, eletroforese bidimensional, “western-blot” com anticorpos anti-FGFb e anti-VEGF₁₆₅ e espectrometria de massa:

IV.2.3.1- Perfil da fração FrHB1 em SDS-PAGE:

Para estudo da composição e acompanhamento da eficiência do processo de purificação, além dos estudos de atividades biológicas utilizou-se da metodologia de eletroforese de proteínas nativas com SDS, com e sem a presença de agentes redutores (β -mercaptoetanol).

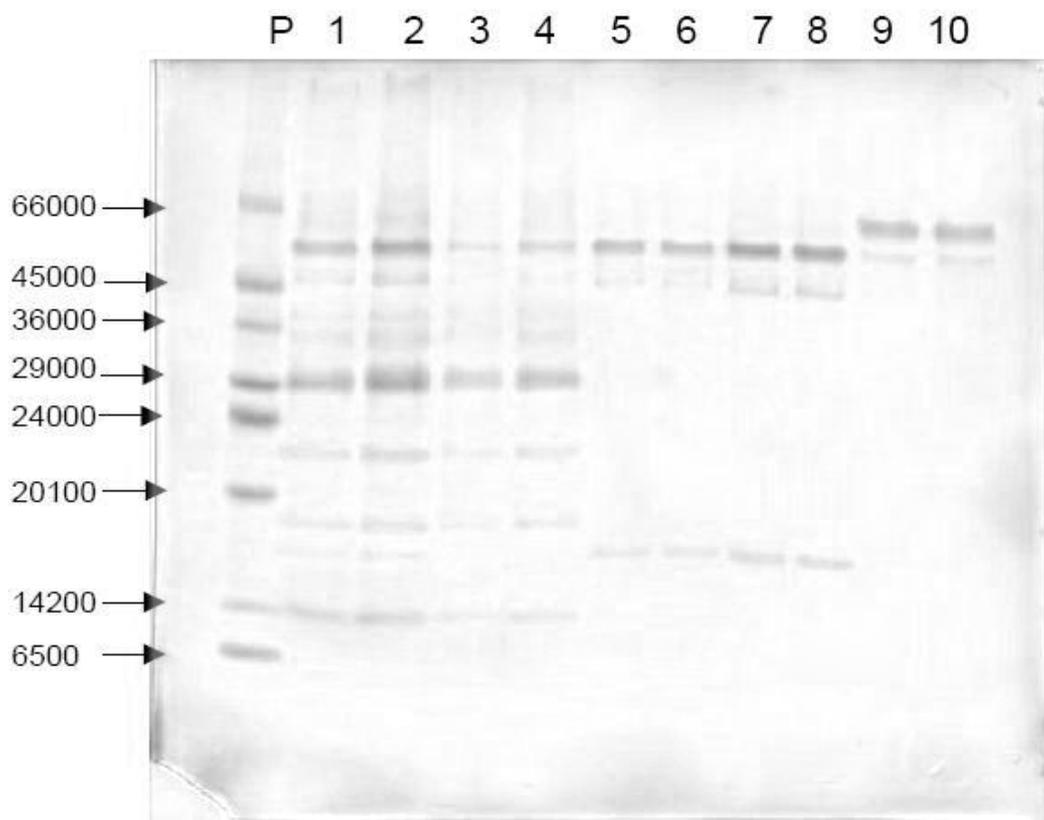


Figura 16: Perfil eletroforético em PAGE –SDS à 15%, do material extraído do látex natural da seringueira. P= padrões de pesos moleculares; 1 e 2 = Soro total em diferentes quantidades protéicas (5 e 10 µg de proteínas respectivamente); 3 e 4 = FrHB0 (material sem afinidade pela resina de DEAE-celulose, 5 e 10 µg respectivamente); 5, 6, 7 e 8 = FrHB1 (5, 5, 10 e 10 µg de proteínas respectivamente). Coloração com Comassie. Padrões de massa molecular: Soroalbumina bovina (66 KDa); Ovoalbumina (45 KDa); Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho (36 kDa); Anidrase carbônica (29 KDa); Tripsinogênio (24 KDa); Inibidor de tripsina (20 KDa); α-Lactoalbumina (14,2 KDa) e Aprotinina (6,5 KDa).

Por meio de análise e processamento da imagem obtemos a seguinte composição do soro e da fração FrHB1, conforme apresentado na tabela 1.

Bandas	~50 kDa	~46 kDa	~34 kDa	~30 kDa	~22 kDa	~20 kDa	~18 kDa	~14 kDa
% no SORO	~25	~5	~5	~35	~6	~3	~2	~13
% na FrHB1	~64	-13	--	--	--	--	~17	--

Tabela 1: Porcentagem das principais bandas protéicas na composição do soro (extrato bruto) em comparação com a composição da fração purificada FrHB1. A porcentagem são dados aproximativos obtidos por análise da imagem da eletroforese com a utilização do software ImageJ.

Análise de “western blot” da fração FrHB1 com anti-FGFb e anti-VEGF₁₆₅:

Conforme descrito no item **III-7** de materiais e métodos, a fração FrHB1 foi submetida a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida, transferida para membrana de nitrocelulose e incubada com anticorpos policlonais anti-VEGF₁₆₅ e anti-FGFb. O resultado é apresentado na figura 17. Nesta figura observa-se que a banda de proteína de PM~18 kDa da FrHB1 é a única reconhecida pelo anticorpo anti-FGFb enquanto nenhuma proteína presente no FrHB1 possui domínios de reconhecimento pelo anticorpo anti-VEGF. O reconhecimento do antígeno pelo anticorpo envolve ligações reversíveis não covalentes da fração variável do anticorpo com porções específicas da macromolécula antigênica, denominados epítomos (Abbas *et al.*, 2005). Desta forma, este resultado confirma a presença de um domínio da proteína que serve de epítomo para a interação com este anticorpo, específico anti-FGF.

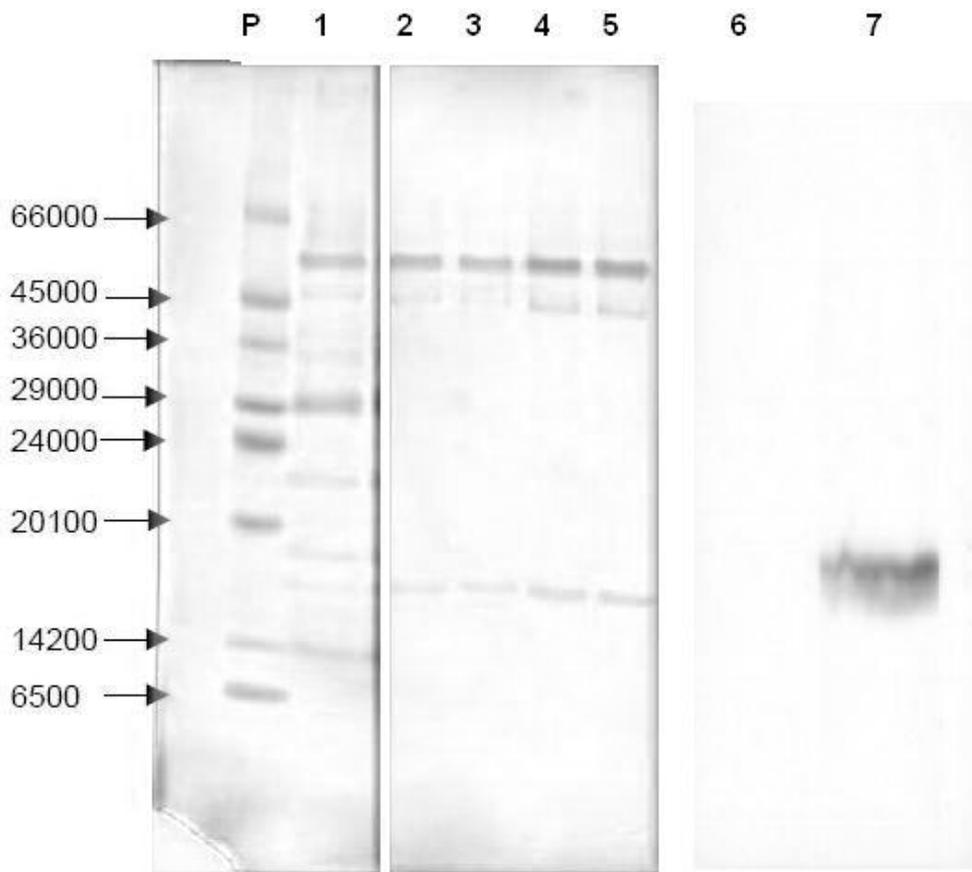


Figura 17: Resultado do “western blot” utilizando-se de anticorpos anti-VEGF₁₆₅ e anti-FGFb. P = padrões de pesos moleculares; 1 = Extrato bruto (soro); 2, 3, 4 e 5 = FrHB1; 6 = FrHB1 incubada com anticorpo anti-VEGF₁₆₅; 7 = FrHB1 incubada com anticorpo anti-FGFb. Padrões de massa molecular: Soroalbumina bovina (66 KDa); Ovoalbumina (45 KDa); Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho (36 kDa); Anidrase carbônica (29 KDa); Tripsinogênio (24 KDa); Inibidor de tripsina (20 KDa); α -Lactoalbumina (14,2 KDa) e Aprotinina (6,5 KDa).

Eletroforese bi-dimensional da fração FrHB1 e “western blot” do gel bi-dimensional com anticorpo anti-FGFb:

O estudo da identidade da proteína ativa, presente na fração FrHB1, capaz de induzir a angiogênese e fibroplasia, iniciou-se com a análise do material em gel de PAGE bi-dimensional de forma a obter-se a separação de proteínas de acordo com

suas propriedades de peso molecular e ponto isoelétrico. O perfil bi-dimensional da amostra FrHB1 obtido é mostrado na figura 18.

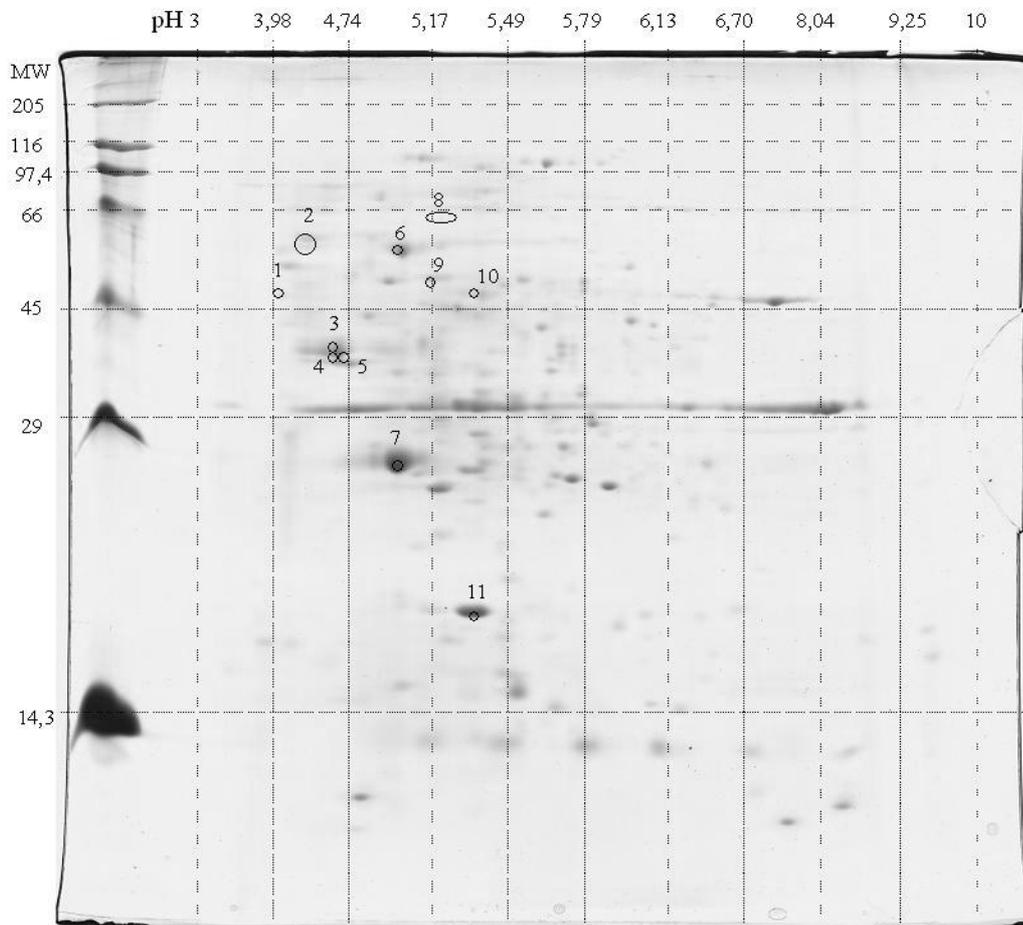


Figura 18: Perfil de eletroforese bi-dimensional obtido da fração FrHB1. A focalização isoelétrica foi realizada em um gradiente de pH linear de 3-10. Os “spots” circulado foram separados para estudos em espectrometria de massa MS e MS/MS. Coloração com coomassie brilhante blue G250.

O imunoblot obtido após a incubação com anticorpo anti-FGFb é mostrado na figura 19. Verifica-se que 8 bandas (“spots”) reagiram com o anticorpo. Na seleção destas proteínas, por dúvidas devido à proximidade de localização, foram separados mais 2 spots, além do spot 7 que demonstrou uma maior intensidade protéica. Desta forma, foram analisadas por espectrometria de massa, buscando a identidade protéica, 11 “spots” conforme demarcação apresentada na figura 18.

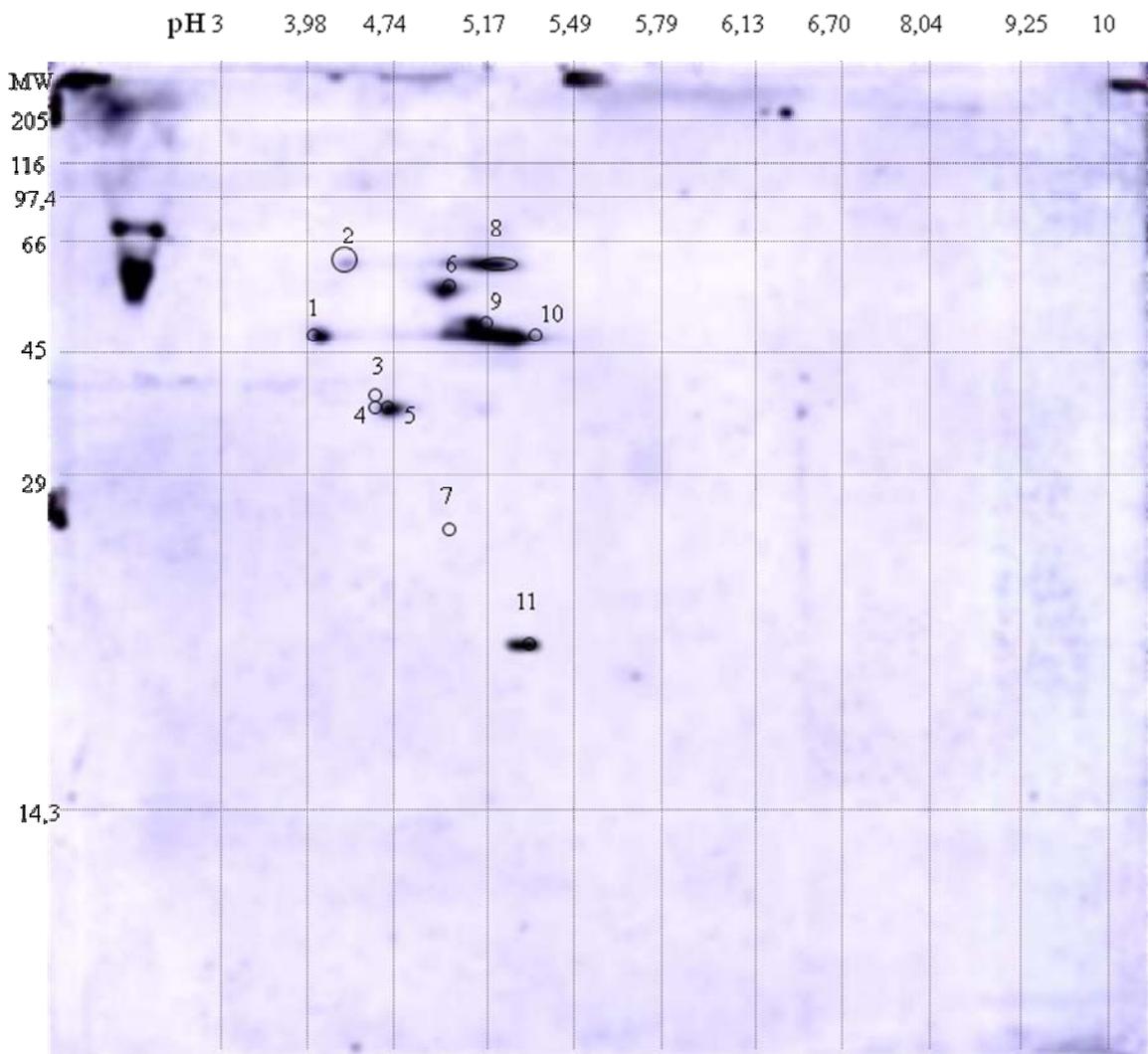


Figura 19: Western-blot realizado com o anticorpo anti-FGFb. A fração FrHB1, após ter sido submetida à corrida em eletroforese bi-dimensional, conforme demonstrado na figura 18. A membrana foi incubada com anticorpo anti-FGFb e os complexos antígenos-anticorpos formados foram detectados por anticorpos conjugados com peroxidase.

Análises por espectrometria de massa (MS e MS/MS) dos spots 1-11, obtidos da fração FrHB1 submetida à eletroforese bi-dimensional e “western-blot”:

Com o objetivo de identificar as proteínas detectadas pela reação de “western-blot” com o anticorpo anti-FGFb, os spots selecionados foram recortados e submetidos a processamento conforme descrito no item **III-8** de materiais e métodos.

Os espectros obtidos com os 11 spots selecionados estão apresentados nas figuras de 20 à 30.

Amostra 1:

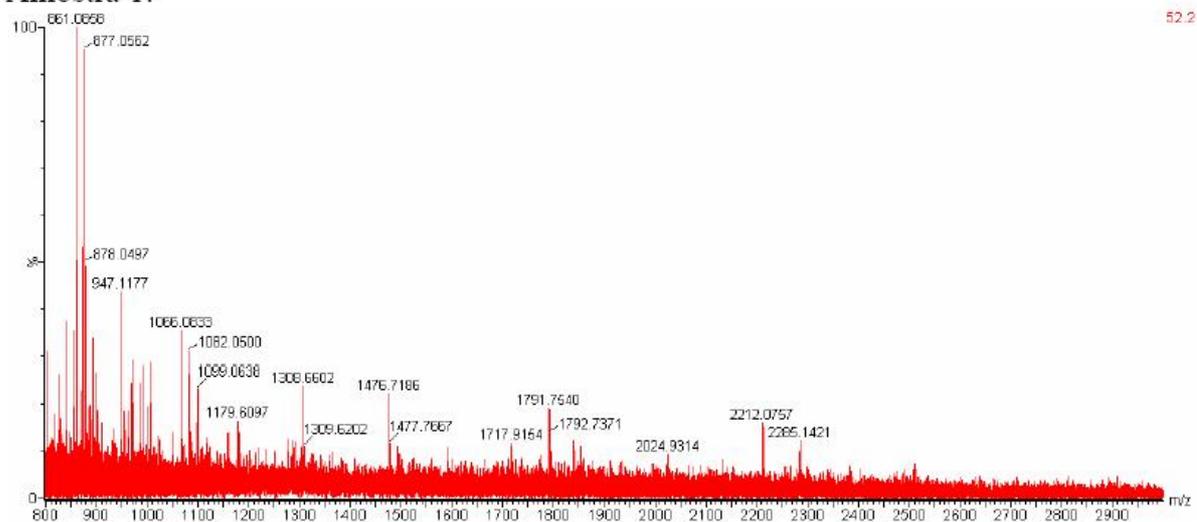


Figura 20: Espectro de massa referente ao *spot 1* obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1

Amostra 2:

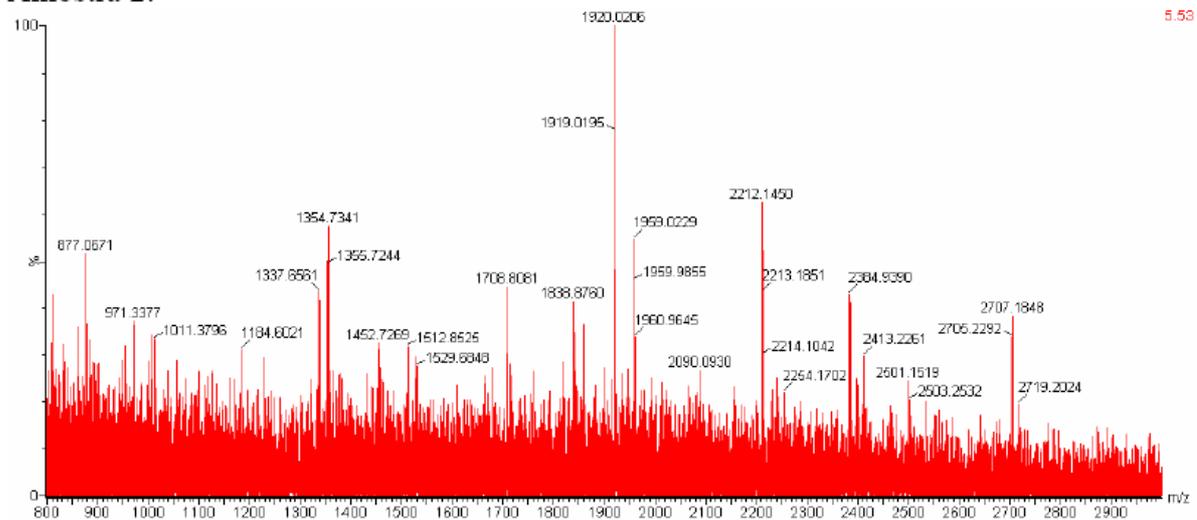


Figura 21: Espectro de massa referente ao *spot 2* obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.

Amostra 3:

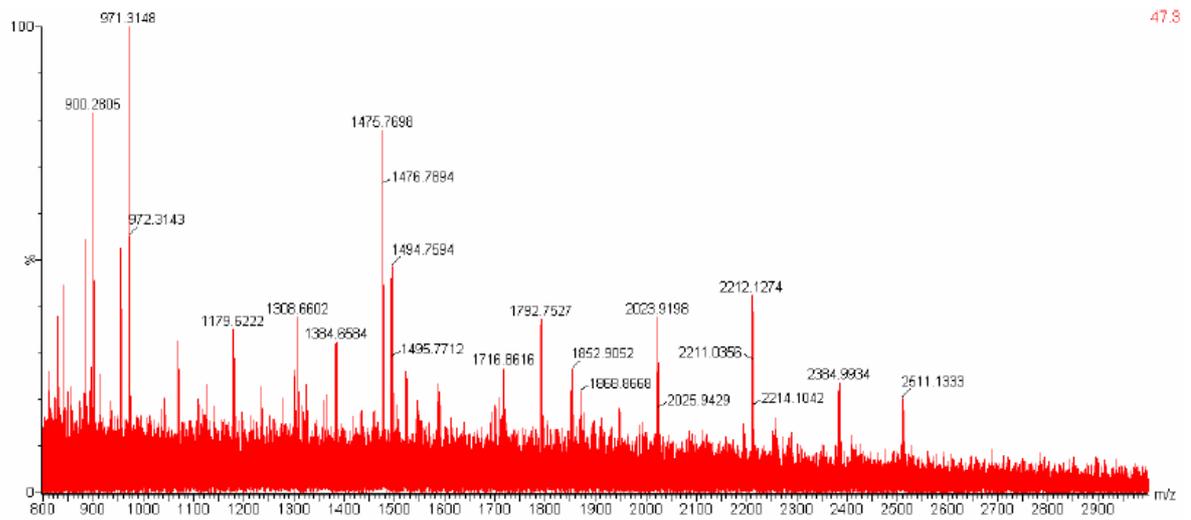


Figura 22: Espectro de massa referente ao *spot 3* obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.

Amostra 4:

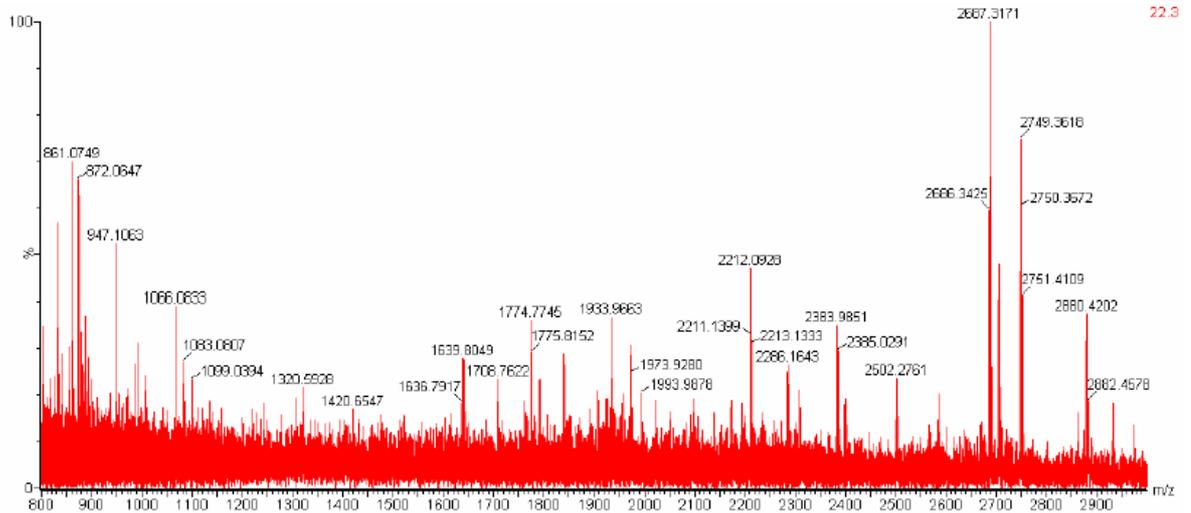


Figura 23: Espectro de massa referente ao *spot 4* obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.

Amostra 5:

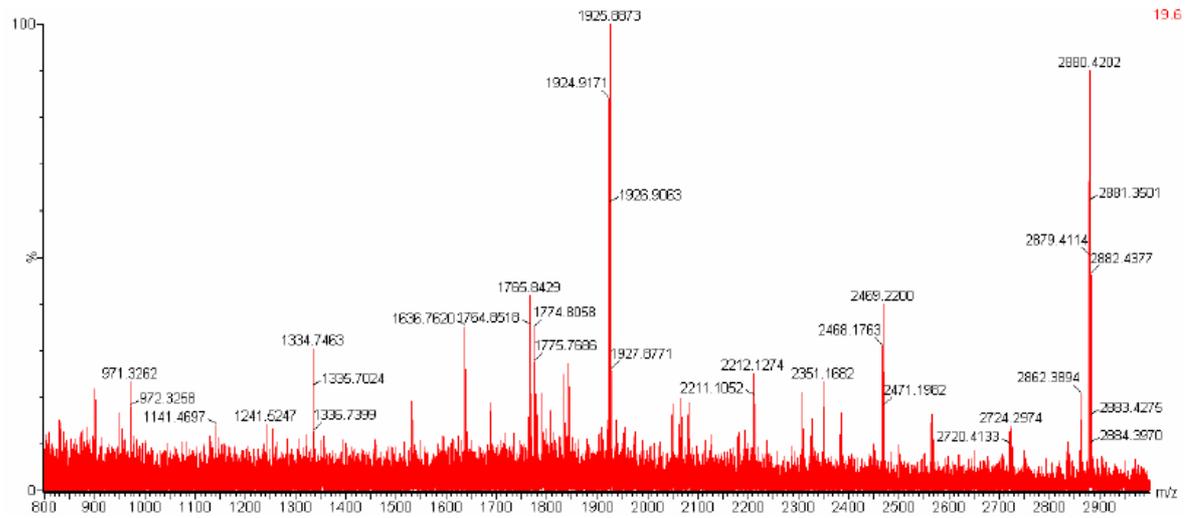


Figura 24: Espectro de massa referente ao *spot5* obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.

Amostra 6:

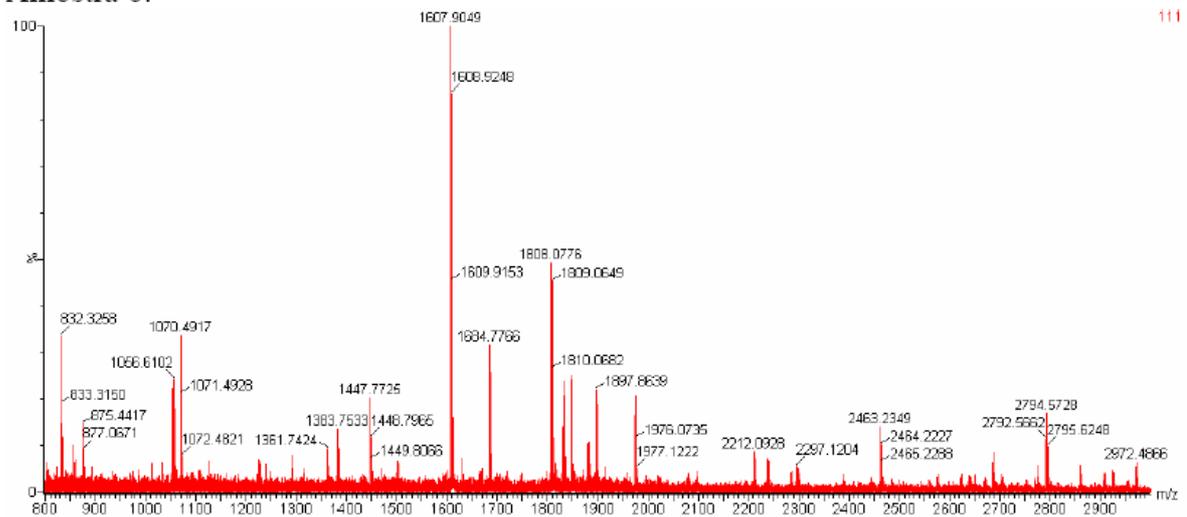


Figura 25: Espectro de massa referente ao *spot6* obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.

Amostra 7

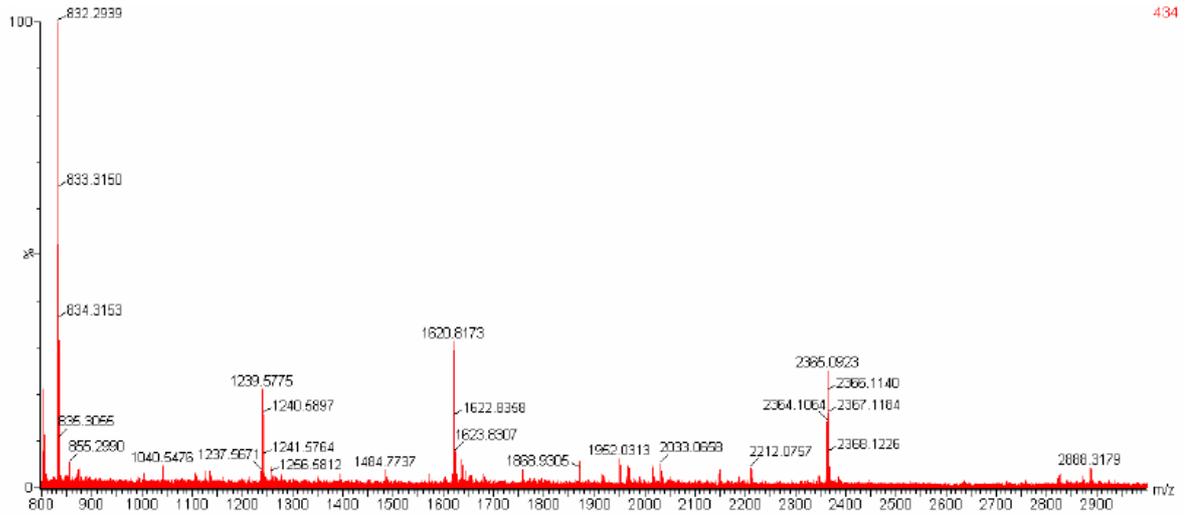


Figura 26: Espectro de massa referente ao *spot7* obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.

Amostra 8:

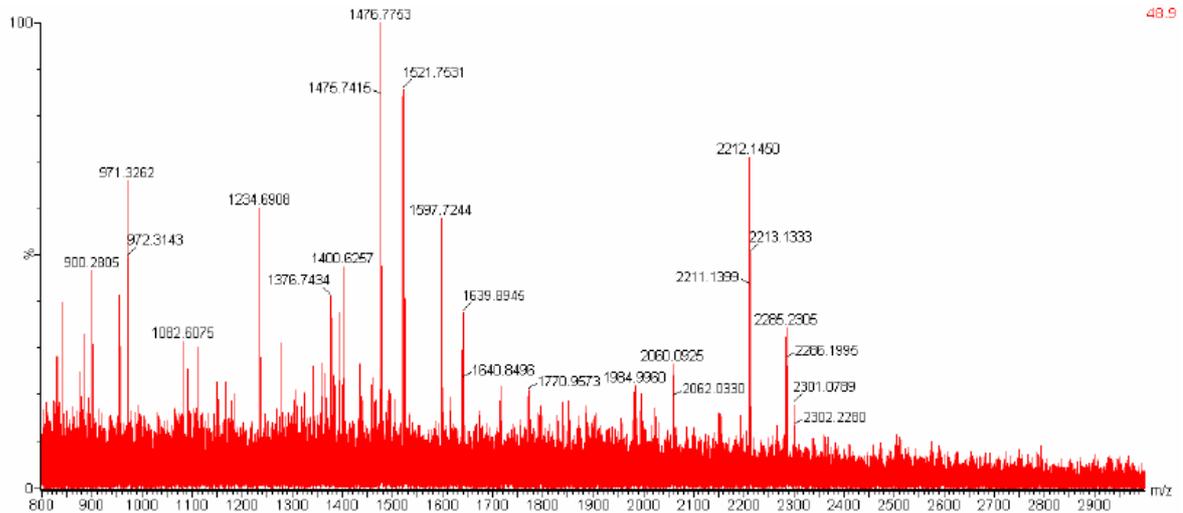


Figura 27: Espectro de massa referente ao *spot8* obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.

Amostra 9:

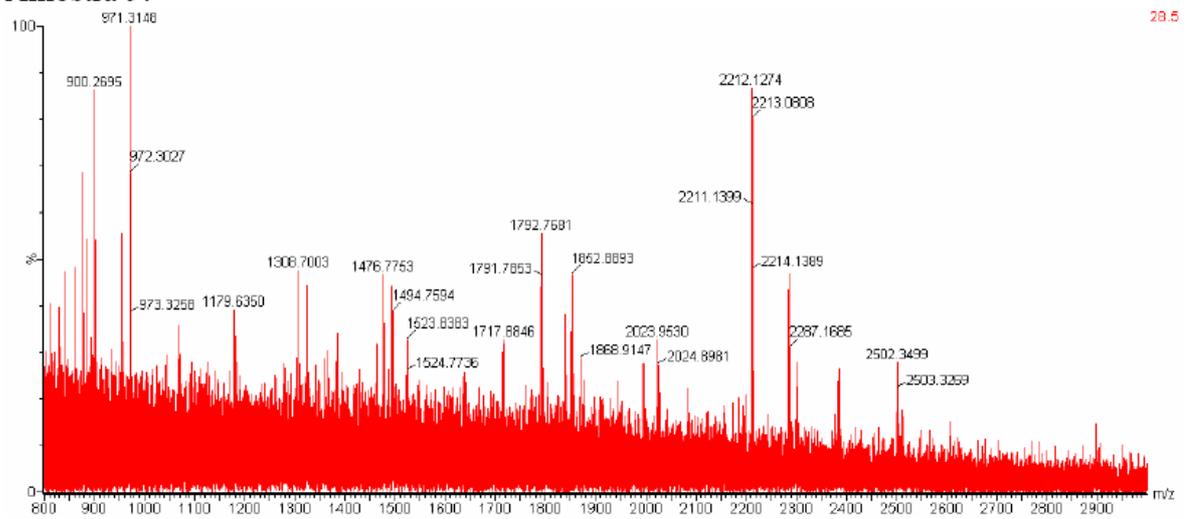


Figura 28: Espectro de massa referente ao *spot9* obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.

Amostra 10:

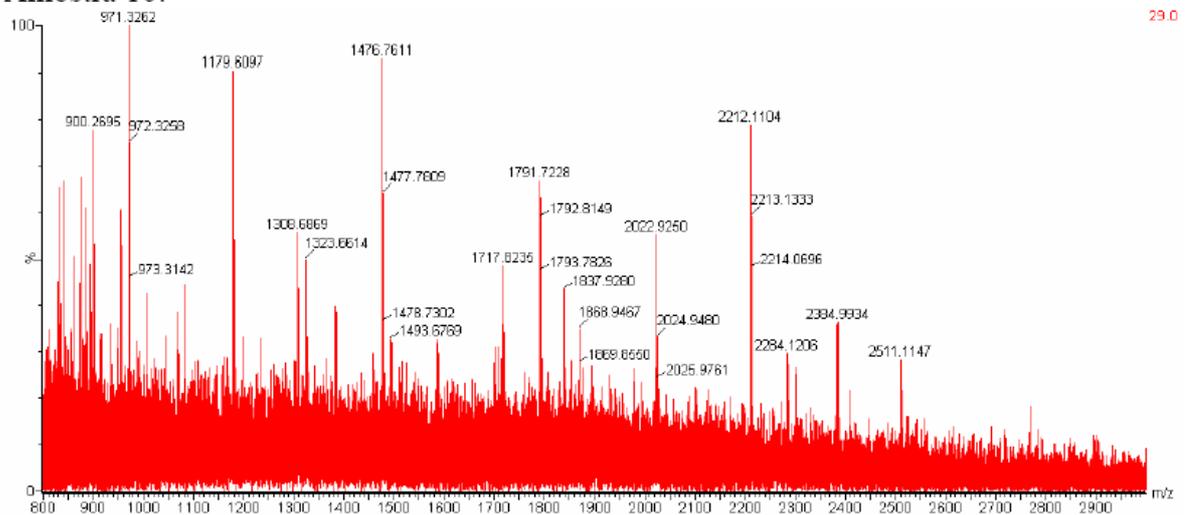


Figura 29: Espectro de massa referente ao *spot10* obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.

Amostra 11:

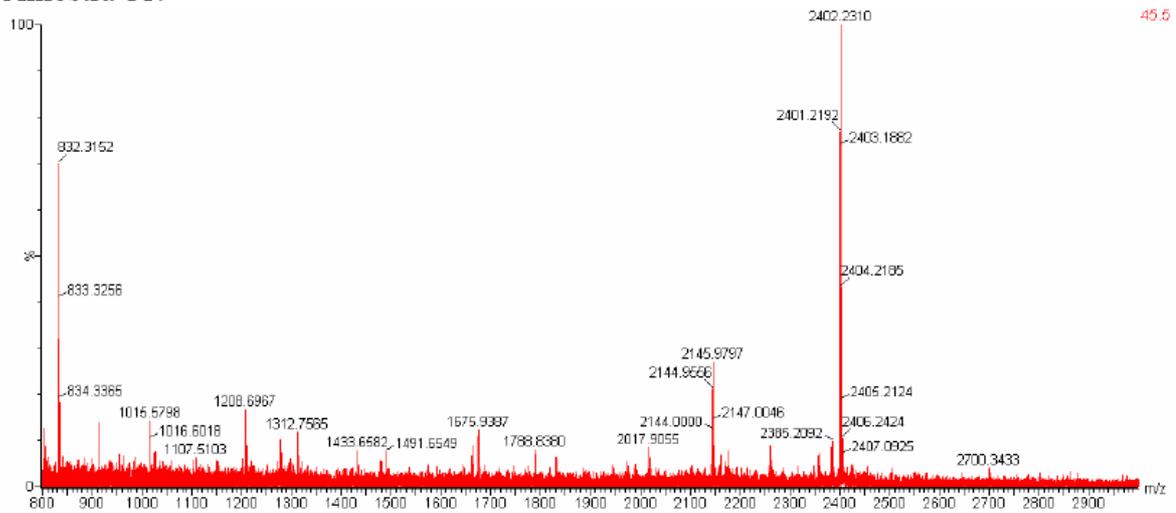


Figura 30: Espectro de massa referente ao *spot11* obtido na eletroforese bidimensional da fração FrHB1.

Todos os *spots* (proteínas) foram selecionados de acordo com a detecção pelo anticorpo anti-FGFb, exceto os *spots* 3, 4 e 5, que apresentaram dúvida de localização e proximidade, e o *spot* 7, que apesar de não ter sido reconhecido pelo anticorpo, foi selecionado por apresentar-se como uma banda característica de maior densidade e por isso, possivelmente, presente em maior quantidade na fração FrHB1. O processamento e busca em banco de dados desses espectros identificou o *spot6* como uma chaperonina de 60kDa. As outras amostras não apresentaram identidade com nenhuma das proteínas presentes no banco de dados MSDB, datado de 10 de Agosto de 2007, pela análise realizada com o programa Mascot..

O não reconhecimento dos outros “*spots*” pode ser devido ao baixo número de proteínas de origem vegetal depositados nos atuais bancos de dados públicos de seqüências. Atualmente, em todos os bancos de dados de proteínas públicos disponíveis, em relação à *Hevea brasiliensis*, foram depositados não mais do que

200 proteínas, compreendendo, principalmente enzimas da classe das poliprenases (polimerases) e proteínas alergênicas (www.expasy.org em 22/02/08).

IV.3-Cromatografia em HPLC da fração FrHB1:

Devido à ausência de resultados conclusivos a respeito da caracterização das proteínas referente aos *spots* reagentes com o anticorpo anti-FGFb, optamos por um novo procedimento de purificação da componente ativo, utilizando-se de *HPLC* (Cromatografia Líquida à Alta Pressão) que apresenta alta eficiência de separação.

Após os estudos de atividade referentes às três frações obtidas da etapa de purificação em DEAE celulose, a fração de maior atividade, a FrHB1 foi ressuspensa em tampão fosfato 0,01 M (pH=7,8) e aplicada no HPLC.

Nesta segunda etapa do processo de purificação foi utilizada uma coluna analítica (Asahipak ES 502-NP). O material FrHB1, na concentração de 5 mg/mL dissolvido em tampão fosfato (0,01M pH=7,8) foi aplicado na coluna e eluído com gradiente apresentado pela seguinte programação: 100% de tampão A (Fosfato 0,01M, pH= 7,8) por 10 min., de 0 a 100% do tampão B (Fosfato 0,01 M, NaCl 1 M, pH=7,8) em 45 min. e 100% tampão B por 10 min., fluxo de 6,0 mL/min.). As frações obtidas foram denominadas FrHB 1.1, FrHB 1.2 e FrHB 1.3, dialisadas, liofilizadas e analisadas em SDS-PAGE, conforme estão demonstrados nas figuras 31 e 32. A atividade angiogênica destas frações é demonstrada na figura 33.

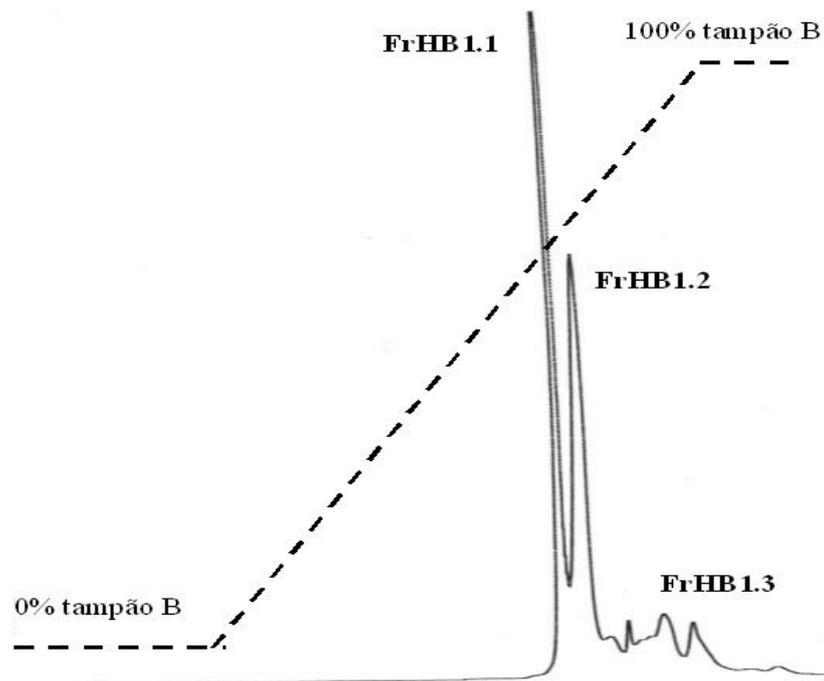


Figura 31: Perfil cromatográfico obtido em HPLC no segundo passo de purificação da proteína angiogênica. O tempo de eluição da FrHB1.1 é 51 min. correspondendo a 59 % de tampão B, enquanto o da FrHB1.2 é 53 min. (63 % de tampão B). FrHB1.3 coincide com o pool de proteínas restantes.

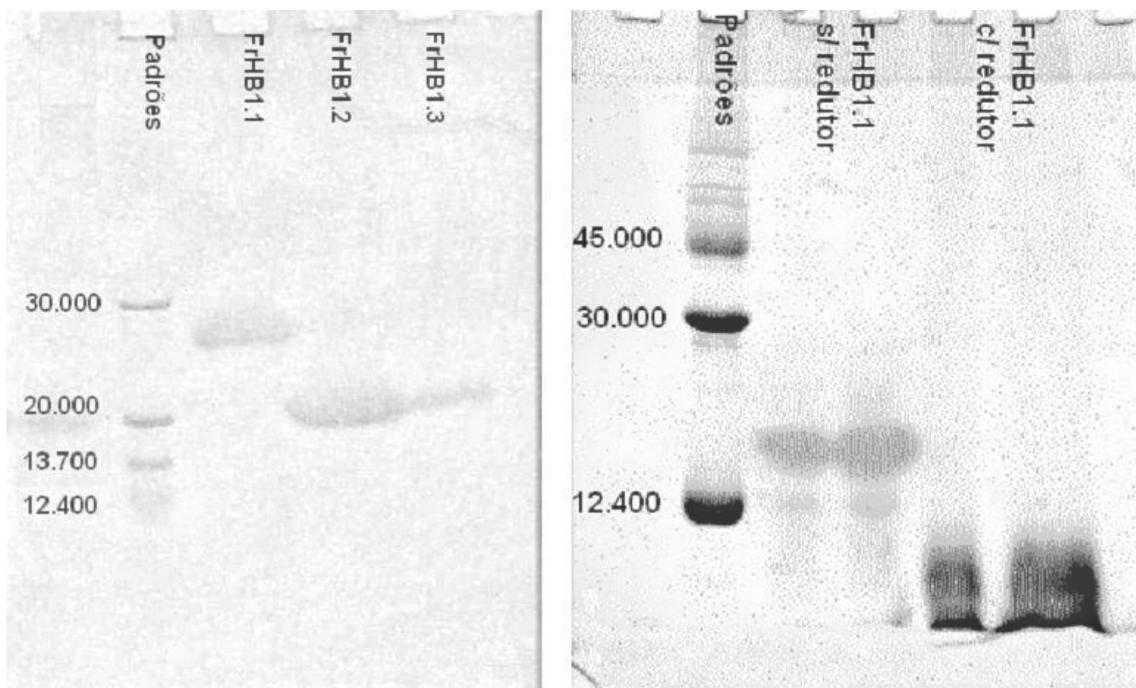


Figura 32: Perfil eletroforético em SDS-PAGE. As frações obtidas da cromatografia em HPLC foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE 15% em condições não desnaturantes (A) e tratadas com β -Mercaptoetanol (B), comparadas com padrões de peso molecular. Padrões de massa molecular: Ovoalbumina, PM = 45.000; Anidrase Carbônica, PM = 30.000; Inibidor de tripsina, PM = 20.000; RNase, PM = 13,700 e Citocromo C, PM = 12.400.

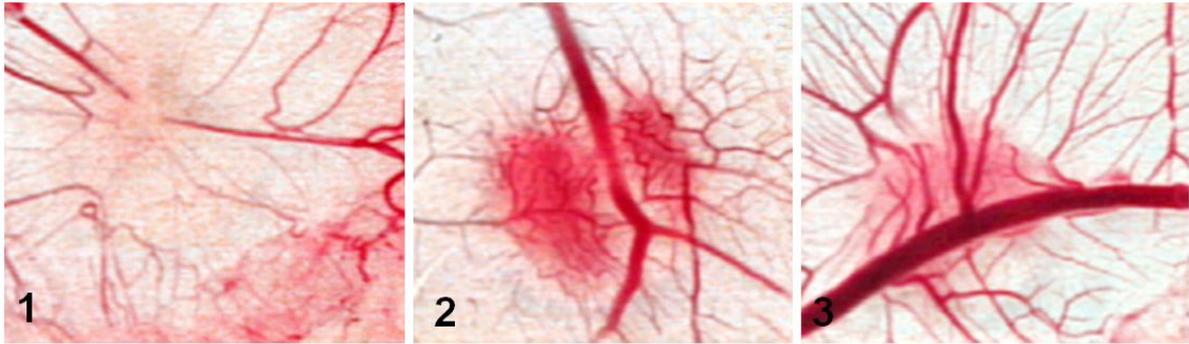


Figura 33: Atividade angiogênica na MCA. 1: FrHB1.1 (3 μ L da solução 2,5 mg/mL); 2: FrHB1.2 (3 μ L da solução 2,5 mg/mL); 3: FrHB 1.3 (3 μ L da solução 2,5 mg/mL). Foi utilizado discos de papel de filtro (0,5 mm de diâmetro) como veículo.

Os resultados demonstram uma maior atividade apresentada pela proteína FrHb1.2. De acordo com os géis de eletroforese, esta proteína apresenta-se homogênea, composta por uma banda única de aproximadamente 20.000 Da de massa molecular. Esta proteína se decompõe em uma banda única e homogênea de aproximadamente 10.000 Da com a presença do redutor β -mercaptoetanol, que reduz as ligações covalentes S-S (pontes dissulfeto), que mantêm cadeias polipeptídicas unidas. Isto pode predizer a presença de uma estrutura homodimérica, ou seja, uma proteína composta de duas cadeias polipeptídicas idênticas. Estes dados excluem a possibilidade de identificação cruzada com a proteína alergênica pro-heveína (20 kDa, PI=5,6) e seus fragmentos proteolíticos, heveín (4,7 kDa e PI=4,9) e fragmento c-terminal (14,9 kDa, PI=6,4) que são polipetídeos de cadeia única (Posch *et al.*, 1997).

O material obtido da cromatografia em HPLC foi liofilizado e ressuspenso em água destilada, na concentração de 2,5 mg/mL, para estudos de atividade angiogênica na membrana cório-alantóidea de embriões de galinha. Os resultados destes estudos são demonstrados na figura 33 e sua quantificação na figura 34.

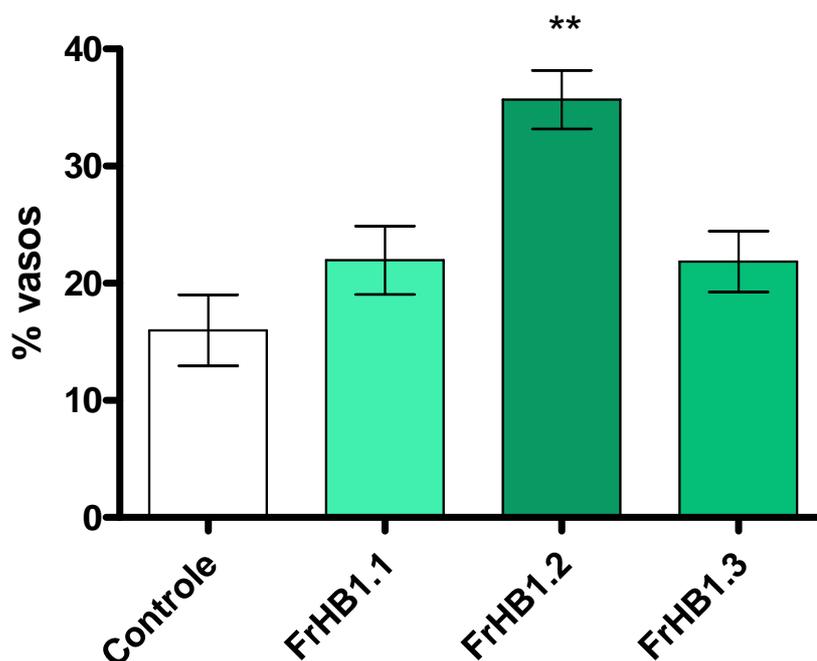


Figura 34: Quantificação da atividade angiogênica das frações obtidas em HPLC após processamento e análises de imagens. Foram aplicados 3 μL de cada amostra previamente preparada numa concentração de 2,5 mg/mL e esterilizada em filtros Milex[®] 0,22 μm . (** = $p < 0,01$; $n = 08$ testes/grupo).

Somente a fração FrHB1.2 apresentou atividade angiogênica significativa em relação ao grupo controle. Estes resultados indicam a proteína FrHB1.2 como responsável pela atividade angiogênica do material e possivelmente pela atividade fibroplásica. Indicam ainda que esta mesma proteína apresenta-se constituída de duas cadeias polipeptídicas de PM ~ 10 kDa, possivelmente homodiméricas, PI $\sim 5,3$.

DISCUSSÃO

V- DISCUSSÃO:

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

Como o látex natural polimerizado na forma de biomembrana mostrava-se possuidor de propriedades angiogênicas e cicatrizantes, sendo utilizadas como curativos bioativos indutores da cicatrização (biocure®), o objetivo, neste trabalho, foi o isolamento e a caracterização bioquímica da proteína responsável pela atividade angiogênica e proliferativa apresentada pelo látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* (Frade *et al.*, 2001; Frade, 2003).

Num primeiro instante, foi necessária a determinação da natureza química do material ativo extraído do látex natural da seringueira. Estudos preliminares realizados com a biomembrana confeccionada a partir do látex natural, por (Mrué, 2000), demonstraram que este material perdia a atividade angiogênica quando era aquecido a 110 °C por uma hora e após incubação com a enzima proteinaseK, sugerindo que a atividade angiogênica poderia ser mediada por uma proteína (Frade *et al.*, 2001; Frade, 2003). Através de observações “*in vivo*”, relatou-se a perda da atividade cicatrizante deste material, quando o mesmo era exposto a altas temperaturas de secagem (>100 °C). Estas observações sugeriam uma natureza

protéica do componente ativo, presente no material. Os estudos referentes à caracterização química e a atividade angiogênica do extrato bruto do látex natural da seringueira, é parte deste trabalho bem como a purificação e identificação química, através de procedimentos adequados, da proteína responsável pela ação aceleradora do processo de cicatrização presente no material.

Ensaio *in vivo* para estudos da indução da permeabilidade vascular (teste de Miles) no dorso de coelho, realizado com o extrato bruto (soro), obtido da coagulação do látex natural e conseqüente separação das fases sólida (borracha) e líquida (extrato protéico) identificaram uma atividade significativa por parte deste material. Esta atividade, em concordância com as observações supra-citadas, ficava reduzida quando o material era submetido a procedimentos desnaturantes como aquecimento à 100 °C por uma hora e incubação com enzima proteolítica (ProteinaseK). Estes resultados apresentados na figura 4 demonstram um caráter protéico do componente ativo, presente no látex natural, capaz de aumentar a permeabilidade vascular sendo um possível interferente no processo cicatricial (Mendonça, 2004).

O mesmo material, soro, foi testado quanto à sua capacidade angiogênica na MCA e de acelerar o processo cicatricial no modelo de ulcera dérmica nas orelhas de coelhos. Em ambos os ensaios os resultados foram positivos conforme pode ser observado nas figuras 5 e 6. Na figura 5, há um estímulo de aproximadamente 50% referentes a uma quantidade de 0,9 µg de soro liofilizado, enquanto no modelo das úlceras, a cicatrização total tem seu tempo reduzido em cerca de 3 dias para a concentração de 0,01 % p/v (apresentado na figura 6).

Com a comprovação destas atividades, por parte do extrato bruto (soro) obtido do látex natural da seringueira, deu-se início as etapas de purificação e

caracterização do componente responsável pelas atividades descritas e interferente com o processo cicatricial.

Segundo (Alfenas, 1998) um dos problemas encontrados na extração e purificação de proteínas de origem vegetal é a presença de compostos fenólicos liberados durante a maceração do tecido ou, no caso, durante a ruptura do tecido lenhoso para obtenção do látex natural. Com a utilização da DEAE-celulose, objetivava-se a resolução deste problema, eliminando-se os polifenóis já na primeira etapa de purificação.

Para análise de atividade das frações obtidas, assim como para acompanhamento do processo de purificação do material, foram escolhidas, da mesma forma que para o soro, as atividades de aumento da permeabilidade vascular (teste de Miles), indução da angiogênese na MCA e aceleração do processo de cicatrização no modelo de úlcera dérmica nas orelhas de coelho. Com os resultados obtidos no estudo da angiogênese na MCA, onde foi observado, nos estudos histológicos, um espessamento da membrana cório-alantóidea, induzido pela fração FrHB1 (figura 11), indicando estímulo à proliferação de fibroblastos, optou-se pela utilização de ensaios *in vitro* de avaliação desta atividade em células *HEK-293T*.

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

De uma forma geral, no teste de Miles, o corante azul de Evans liga-se, de forma não covalente, às proteínas plasmáticas e seu extravasamento do leito dos

vasos, ligado à proteínas plasmáticas, pode ser quantificado, após algum tempo, no tecido, onde foi realizado o teste. (Nagy *et al.*, 2008).

Este método tem a desvantagem de não distinguir as proteínas ligadas ao corante realmente extravasadas pelo aumento da permeabilidade vascular (Mrué, 2000) daquele presente dentro do lúmen vascular na região do tecido analisado, bem como o retorno das moléculas extravasadas ao leito vascular ou linfático, durante o período de tempo de estudo (30 minutos). Apesar disto, o teste de Miles é de grande valia no estudo de moléculas que aumentam a permeabilidade vascular na fase inflamatória do processo de cicatrização. Nesta fase, principalmente, fibrinogênio, membros da cascata de coagulação, fatores de crescimento e quimioatrativos, necessitam da indução da hipermeabilidade vascular para alcançar o tecido lesado onde agirão (Dvorak *et al.*, 1981; Nagy *et al.*, 2008).

O mecanismo pelo qual as principais substâncias indutoras do aumento da permeabilidade vascular atuam ainda é desconhecido e alvo de muitos estudos. Alguns pesquisadores propõem que as células endoteliais teriam sua contração induzidas pelos agentes permeabilizantes, formando espaços (*gaps*) intercelulares, de tamanho suficiente para permitir o extravasamento de proteínas plasmáticas (Majno *et al.*, 1969; Nagy *et al.*, 2008). Mais recentemente, a descoberta de uma estrutura no endotélio venoso, a organela vesículo-vacuolar, ofereceu uma via trans-endotelial alternativa para o extravasamento de proteínas plasmáticas em resposta a fatores de permeabilidade (Dvorak *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 2000; Nagy *et al.*, 2008).

Assim, os resultados apresentados na figura 8 demonstram que a fração FrHB1 é capaz de aumentar, significativamente, a permeabilidade vascular de forma semelhante ao que é observado, principalmente, em estudos do VEGF (Senger *et al.*, 1990; Dvorak, 2002).

O ensaio da membrana cório-alantóidea em ovos de galinha já vem sendo usado há muito tempo, como um ensaio de atividade angiogênica *in vivo*. Investigações prévias têm demonstrado que o método é sensível, de baixo custo e fácil execução, mas devem ser realizados com determinados cuidados experimentais, de forma a se evitar reações inflamatórias inespecíficas (Jakob *et al.*, 1978). Por exemplo, fragmentos de casca do ovo ocasionalmente podem produzir uma reação inflamatória, levando a um resultado “falso positivo” na MCA (Folkman, 1985).

No ensaio da MCA, a densa rede vascular da membrana respiratória do embrião da galinha é usada como uma região sensível aos estímulos angiogênicos e anti-angiogênicos. A MCA consiste de três camadas: a *camada ectodérmica*, mais externa e que exibe um denso plexo de capilares sanguíneos, estável a partir do décimo segundo dia de desenvolvimento (sem mitoses); a *camada mesenquimal*, intermediária, onde estão as grandes veias, vasos linfáticos e artériolas; e uma *camada endodérmica* mais interna, ausente de vasos sanguíneos (Ausprunk *et al.*, 1974; Olivo *et al.*, 1992).

Na utilização dos ensaios angiogênicos na MCA a principal dificuldade encontra-se na distinção entre os capilares neo-formados, induzidos pela atividade da substância teste e os já presentes na rede capilar da própria MCA. Além disso, devido à alta sensibilidade à tensão de oxigênio faz-se necessário um eficiente processo de vedação da janela de manipulação no ovo com fita adesiva (Auerbach *et al.*, 2000; Staton *et al.*, 2004).

O grau de angiogênese neste ensaio pode ser expresso pelos termos “fortemente positivo”, “fracamente positivo” e negativo. Porém, o processo de quantificação por análise de imagem da rede vascular é possível, eliminando a

subjetividade da análise. Neste método, o número de vasos é quantificado através do número de pixels, na imagem analisada, correspondentes aos vasos sanguíneos (Jakob & Voss, 1984; Voss *et al.*, 1984).

Os resultados apresentados nas figuras 9 e 10 demonstram uma maior atividade angiogênica da fração FrHB1 formando uma rede vascular de forma radial a partir do local onde foi aplicado o material. A quantificação desta atividade foi feita pela análise dos pixels/vasos conforme demonstrada na figura 10. Muitas substâncias já foram identificadas como indutores do aumento da permeabilidade vascular e angiogênica, incluindo o VEGF, TGF- β , angiogenina, angiotropina e angiopoetina-1 (Dvorak *et al.*, 1995; Folkman & D'amore, 1996; Ferrara, 2001). A maioria destas substâncias apresenta identidade protéica, constituindo-se de polipeptídeos diversos.

A angiogenese é um processo que requer várias etapas, dentre elas, a divisão e migração das células endoteliais, degradação da membrana basal original e síntese de uma nova membrana basal, organização do lúmen vascular (formação do tubo) e aquisição dos pericitos, além de outros passos ainda não identificados (Dvorak, 2005). Após a degradação proteolítica da matriz extracelular segue-se a migração quimiotática e proliferação das células endoteliais, formação do lúmen e maturação funcional do endotélio. Quase todos os fatores angiogênicos conhecidos induzem uma ou mais destas etapas, em estudos com células endoteliais *in vitro*, mas ainda é incerto como agem *in vivo* (Risau, 1997).

A importância da angiogênese e conseqüente formação do tecido de granulação no processo de cicatrização são inquestionáveis, mas sua coordenação com muitos outros eventos durante as fases de inflamação, proliferação e

remodelagem é condição essencial para o sucesso e conclusão do processo (Arnold & West, 1991).

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

De acordo com os resultados apresentados nos ensaios de indução da permeabilidade vascular em coelhos e angiogênese na membrana cório-alantóidea de embriões de galinha, a fração FrHB1 demonstrou uma maior atividade específica em ambos os ensaios.

Assim o ensaio de cicatrização de úlceras dérmicas em orelhas de coelhos apresentado nas figuras 12 e 13 demonstram que a fração FrHB1 apresenta uma capacidade de acelerar o processo de cicatrização de feridas nestes modelos, principalmente na concentração de 0,01% p/v.

O modelo de úlcera dérmica experimental em orelhas de coelhos permite uma precisa, reprodutível e compreensível análise de cada um dos processos referentes

ao reparo (reepitelização, angiogênese e deposição de matriz). Possui ainda a vantagem de ser um modelo não contrátil, muito próximo do que ocorre durante o processo de cicatrização de feridas crônicas dos membros inferiores do homem (Mustoe *et al.*, 1991; Pierce *et al.*, 1992). O acompanhamento histológico do processo acrescenta informações importantes a despeito da atividade dos compostos estudados.

As análises histológicas das MCAs demonstram um efeito indutor de fibroplasia apresentado, principalmente, pela fração FrHB1, responsável pelo espessamento mesenquimal, principalmente, na região de contato direto com o veículo. Além disso, o estímulo angiogênico foi evidenciado pela presença de numerosos vasos sanguíneos, principalmente junto ao ectoderma. O espessamento dos vasos presentes no mesoderma, também foi observado. Com um menor grau de fibroplasia, as demais frações FrHB2 e FrHB3 também apresentaram aumento do número de vasos sanguíneos no ectoderma em comparação com o grupo controle, porém, com uma densidade vascular menor que a observada na fração FrHB1.

Neste estudo, o aumento do número de vasos é semelhante ao que ocorre quando da aplicação do VEGF₁₆₅ na MCA, diferindo no fato de que o VEGF₁₆₅ não provoca o espessamento mesenquimal, com o aumento do depósito de matriz extracelular na MCA (Wilting *et al.*, 1992).

O tratamento da MCA com a fração FrHB1, induziu a proliferação dos fibroblastos no espaço mesenquimal (figura 11-2), que contrasta com os resultados obtidos nos ensaios do VEGF₁₆₅. Alguns fatores de crescimento, como o FGF- β e PDGF, apesar de não apresentarem atividade no aumento do número de vasos sanguíneos na MCA, mostram-se capazes de aumentar a espessura da membrana,

por estimulação do aumento de deposição da matriz extracelular e/ou indução da proliferação de fibroblastos (Wilting *et al.*, 1991; Wilting *et al.*, 1992).

A indução de numerosos capilares sanguíneos pela FrHB1, ocorreu, principalmente, na membrana ectodérmica e no tecido mesenquimal vizinho enquanto os maiores vasos sanguíneos se encerram no estroma mesenquimal (figura 11-2).

Outra alteração observada nas MCAs submetidas à atividade da fração FrHB1, foi o espessamento da parede endotelial dos grandes vasos sanguíneos. Este processo está intimamente ligado à angiogênese, na formação da estrutura tubular dos novos vasos sanguíneos (Ferrara, 1995).

As histologias das úlceras dérmicas, por sua vez, foram analisadas, de forma geral, comparando-se a reepitelização e a formação do tecido de granulação das úlceras tratadas com a fração FrHB1 e as tratadas com solução fisiológica (controle) (figura 14). Os cortes histológicos foram analisados nos dias experimentais 1, 3, 5, 7 e 10, sendo que até o terceiro dia, não houve reepitelização em ambos os grupos, enquanto que no décimo dia, todas as úlceras tratadas com a fração FrHB1 encontravam-se completamente reepitelizadas. Assim, nos dias 5 e 7 puderam ser observadas diferenças significativas na velocidade do processo devido ao tratamento com a fração FrHB1 em relação ao controle.

No primeiro dia de experimento, pode-se observar nos estudos histológicos, uma grande quantidade de polimorfonucleares e hemácias na região central da úlcera, dentro da rede de fibrina. Esta característica é apresentada de forma similar pelos grupos tratados tanto com a solução fisiológica quanto com a fração FrHB1. A diferença encontra-se no fato da rede de fibrina apresentar-se de forma mais organizada no grupo tratado com a fração FrHB1 em comparação ao grupo controle.

No terceiro dia de experimento, as úlceras tratadas com o controle apresentam uma menor quantidade de polimorfonucleares, presentes, principalmente, na região superficial da lesão. No fundo da úlcera ainda encontra-se um número elevado de hemácias. Também é observada uma maior organização da rede de fibrina com uma invasão de fibroblastos e apreciável número de vasos sanguíneos dirigindo-se para a região da lesão. Por outro lado, além de uma maior organização na rede de fibrina apresentada pelo grupo tratado com a fração FrHB1, pode-se observar uma maior quantidade de fibras colágenas.

No quinto dia de experimento, as úlceras controle tratadas com salina, apresentaram uma crosta de células mortas, abaixo da qual, a rede de fibrina mostra-se bem estruturada, com a presença de polimorfonucleares e outras células sanguíneas. Passa a ser notada a presença de fibras colágenas no fundo da lesão e o epitélio normal apresenta crescimento pelas bordas laterais em direção ao fundo da úlcera. Vasos sanguíneos são praticamente inexistentes assemelhando-se ao terceiro dia das úlceras tratadas com a fração FrHB1. Estas por sua vez, no quinto dia de experimento, apresentam a rede de fibrina que recobria a úlcera, organizada em lâminas que partem do fundo até a superfície da lesão. A quantidade de vasos sanguíneos e espessura da rede de fibras conjuntivas no fundo da úlcera se acentuam em relação ao terceiro dia de experimento. Além disso, o epitélio nativo ultrapassa a borda e cresce em direção ao fundo da úlcera sob a camada conjuntiva neo-formada, o que não é observado nas úlceras tratadas com o controle.

No sétimo dia, nas úlceras tratadas com o controle, observa-se que o epitélio está se refazendo sob a crosta da lesão apresentando muitos vasos sanguíneos. A substituição da rede de fibrina pelo tecido conjuntivo apresenta-se em estágio avançado, porém não há uma recomposição do tecido conjuntivo sob o epitélio da

área ulcerada. Nas úlceras tratadas com a fração FrHB1, o epitélio encontra-se totalmente refeito sob a crosta de fibrina, que se apresenta muito contraída e com a formação de papilas de forma semelhante às existentes no epitélio nativo. Todo o espaço ulcerado encontra-se preenchido por fibras colágenas com uma grande profusão de vasos neo-formados em seu interior.

No décimo dia, nas úlceras controle, o epitélio apresenta-se totalmente refeito, cobrindo toda a região ulcerada com aspecto similar ao nativo, com papilas e folículos pilosos. As presenças de vasos sanguíneos e fibras conjuntivas são nítidas, porém o tecido conjuntivo neo-formado ainda não se iguala àquele sob o epitélio original. No caso das úlceras tratadas com a fração FrHB1 o tecido apresenta-se totalmente refeito, com um epitélio muito similar ao original, com característica de maior espessura e apresentando papilas, folículos pilosos e glândulas sebáceas. O tecido conjuntivo sub-epitelial mostra-se muito similar ao nativo e, assim como o controle, uma região regenerada mais elevada que o normal era observado.

Após a realização das análises histológicas das MCA que demonstraram um acentuado espessamento, conseqüência da fibroplasia nas membranas submetidas à ação angiogênica da FrHB1, procurou-se um modelo, *in vitro* capaz de determinar e quantificar a atividade da fração FrHB1 na proliferação de fibroblastos.

Os resultados apresentados na figura 15 demonstram uma capacidade indutora de proliferação de células *HEK293T* apresentada, principalmente, pela fração FrHB1 da ordem de aproximadamente 60%. A fração FrHB2 também mostrou-se indutora da proliferação, porém com uma atividade de cerca de 35%. O soro, por sua vez, apresentou certa tendência à proliferação, não significativa pelas análises estatísticas realizadas.

É interessante salientar que, em todas as frações analisadas, assim como no soro, o resultado designou como concentração mais efetiva da proliferação celular a de 1 µg/mL em comparação com a 10 µg/mL (concentração final no poço) também ensaiada. Estes resultados podem ser devido à presença de inibidores presentes na fração visto que nenhuma das frações ensaiadas em culturas, apresentou efeito citotóxico.

O FGF é um potente fator angiogênico e mitogênico de células mesênquimais. Age diretamente sobre os receptores tirosina quinase presentes na membrana plasmática das células endoteliais induzindo a proliferação destas e conseqüentemente, a angiogênese. Em fibroblastos, este fator estimula a proliferação e produção de colágeno (Zittermann & Issekutz, 2006). Como a fração FrHB1 é angiogênica, mostrou-se fibroblástica na MCA e estimula, significativamente, a proliferação de células *HEK293T*, semelhantes à fibroblastos, procuramos, através da metodologia de “western-blot”, verificar a possibilidade da existência de algum epitopo na molécula da FrHB1 que reconhecesse os anticorpos anti-FGFb e/ou anti-VEGF₁₆₅. Conforme pode ser visto na figura 17, o “western-blot” levou ao reconhecimento de uma banda única na região de 18 kDa pelo anti-FGFb e nenhum reconhecimento pelo anti-VEGF₁₆₅.

A técnica da eletroforese bidimensional foi primeiramente descrita por (O'farrell, 1975). Através da combinação da focalização isoeletrica e da eletroforese em gel de poliacrilamida, a técnica permite a separação, detecção e quantificação de milhares de proteínas simultaneamente presentes em uma amostra complexa, além de revelar modificações pós-traducionais. Estas características permitiram a detecção de um número maior de proteínas na fração FrHB1 que o previsto inicialmente (figura 18).

O “*western blot*”, por sua vez, permitiu selecionar um número reduzido de possíveis proteínas a serem analisadas por análises de espectrometria de massa, buscando suas identificações e homologias. O resultado do “*western blot*” é apresentado na figura 19. Com esta ferramenta, foi possível a seleção de 11 proteínas (*spots*) que foram analisadas por espectrometria de massa com o objetivo de buscar suas identidades. Novamente, a marcação de uma banda, bem delineada de PM ~20 kDa e PI ~ 5,3 chamou a atenção, além das demais proteínas que também apresentaram reatividade com o anticorpo anti-FGF.

As análises por espectrometria de massa e busca do resultado em bancos de dados de proteínas, identificou o “*spot*” 6 como uma chaperonina de 60 kDa. As chaperoninas são uma família de proteínas de seqüências moleculares relacionadas às chaperonas, essenciais para o enovelamento tridimensional de outras proteínas sob condições normais ou de stress celular. Porém, outras funções, como por exemplo, sinalizadores moleculares, têm sido relatadas. Este é o caso da Chaperonina 60 do microorganismo *Mycobacterium tuberculosis* (também conhecida como Hsp65) que além de ser conhecida como a principal proteína imunogênica em pacientes com tuberculose, tem a capacidade de estimular monócitos humanos a secretarem, durante a inflamação aguda, citocinas pró-inflamatórias, interleucina-1 β (IL-1 β), e fator de necrose tumoral – α (TNF- α) (Friedland *et al.*, 1993; Maguire *et al.*, 2002). Desta forma, esta proteína de PM=60 kDa, deve ser melhor purificada e ensaiada para os testes de angiogenêse e cicatrização.

As figuras 20 a 30 apresentam os espectros obtidos de cada uma das amostras submetidas à digestão tríplica, separação dos peptídeos e detecção dos peptídeos. Os perfis permitem identificar a presença de peptídeos resultantes da

digestão o que comprova eficiência metodológica utilizada, limitada somente em termos de identificação.

A espectrometria de massa foi escolhida para estas análises por ser, provavelmente, a mais versátil e abrangente técnica analítica disponível à química e bioquímica. Ela mede, rapidamente, com grande precisão e sensibilidade, a massa molecular de átomos ou moléculas em Dalton (Da), a partir da razão entre a massa e a carga de moléculas ionizadas (m/z) (Dass, 2001). O sucesso dos métodos de ionização, MALDI e ESI, e o desenvolvimento de analisadores de massa em seqüência (*tandem*), levaram a um grande aumento na resolução e sensibilidade do método, tornando-o uma ferramenta obrigatória nas análises estruturais e químicas de peptídeos e proteínas. Os espectrômetros de massa atuais permitem selecionar uma só molécula ionizada, fragmentá-la (colisão com um gás inerte) e através de análise das massas dos fragmentos, conhecer a estrutura da molécula original. Isto permite, por exemplo, determinar a seqüência de aminoácidos de um peptídeo ou uma alteração química específica em algum resíduo de aminoácido (Patterson & Aebersold, 2003; Steen & Mann, 2004).

Outro resultado interessante apresentado na figura 16 que em conjunto com a tabela 1 demonstra que a fração FrHB1 apresenta-se impura, sendo constituída de, principalmente, 3 bandas de distintos pesos moleculares: ~50 kDa (64%); ~46 kDa (13%) e ~18 kDa (17%). A banda na região de 18 kDa apresenta especial interesse, visto que no látex natural da seringueira é descrita a existência de uma proteína alergênica de massa molecular 20kDa, chamada de pró-heveína. Esta proteína apresenta-se descrita na literatura como composta por uma cadeia polipeptídica única de 19,6 kDa, PI = 5,6, a qual, após uma clivagem proteolítica, dá origem a duas outras proteínas alergênicas denominadas heveína (PM = 4,7 kDa e PI = 4,9) e

a porção C-terminal desta clivagem (PM= 14,9 kDa e PI = 6,4) (Posch *et al.*, 1997; Yeang *et al.*, 2002).

Devido ao insucesso na identificação da proteína angiogênica, o prosseguimento do processo de purificação utilizou-se de cromatografia de troca iônica com eficiência maximizada pela metodologia HPLC de onde se obteve três novas frações protéicas. Estas frações foram analisadas em eletroforese e sua atividade determinada em ensaios de angiogênese na MCA.

Os resultados apresentados nas figuras 33 e 34 indicam a proteína FrHB1.2 como responsável pela atividade angiogênica do material e, possivelmente, também pela atividade fibroplásica. Indicam ainda que esta mesma proteína apresenta-se constituída de duas cadeias polipeptídicas de PM~10 kDa, possivelmente homodiméricas, conforme demonstrado na figura 32.

CONCLUSÕES

VI- CONCLUSÕES:

- O primeiro passo de purificação da proteína angiogênica do látex natural em DEAE-celulose apresentou alta eficiência de separação protéica, excelente reprodutibilidade e baixo custo, o que permite uma possível utilização para produção em larga escala.
- Dentre as frações obtidas pela cromatografia em DEAE-celulose, a fração FrHB1 apresentou maior atividade indutora do aumento da permeabilidade vascular, angiogênese, aceleradora do processo cicatricial e indutora de proliferação de células *Hek293T*.
- Os ensaios de atividade utilizados para caracterização da proteína mostraram-se eficazes, reprodutíveis e abrangentes a todo o processo de cicatrização.
- A separação de proteínas presentes na fração FrHB1 pela metodologia de eletroforese bidimensional, em conjunto com a detecção da reatividade ao anticorpo anti-FGF, permitiu a seleção de 10 proteínas reativas ao anticorpo.
- As análises espectrométricas identificou no spot6 a presença de uma chaperonina de 60 kDa que apresenta funções no processo inflamatório digna de maiores estudos de purificação e mecanismos de ação.
- A ausência de bancos de dados específicos para vegetais, principalmente, para a *Hevea brasiliensis*, limitou a identificação da estrutura primária das proteínas reativas ao anticorpo.
- O segundo passo de purificação em HPLC demonstrou alta eficiência de separação, boa reprodutibilidade.

- Identificação uma proteína angiogênica no modelo da MCA, homodimérica, que apresenta PM~20kDa, PI~5,3, e constituída de duas cadeias polipeptídicas de PM ~10 kDa.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abbas, A. K., A. H. Lichtman e J. Pober. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005

Adamson, R. H., J. F. Lenz, X. Zhang, G. N. Adamson, S. Weinbaum e F. E. Curry. Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. J Physiol, v.557, n.Pt 3, Jun 15, p.889-907. 2004.

Alfenas, A. C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afns: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV. 1998. 574 p.

Arnold, F. e D. C. West. Angiogenesis in wound healing. Pharmacol Ther, v.52, n.3, Dec, p.407-22. 1991.

Auerbach, R., N. Akhtar, R. L. Lewis e B. L. Shinnars. Angiogenesis assays: problems and pitfalls. Cancer Metastasis Rev, v.19, n.1-2, p.167-72. 2000.

Ausprunk, D. H., D. R. Knighton e J. Folkman. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. Dev Biol, v.38, n.2, Jun, p.237-48. 1974.

- Baird, A. Fibroblast growth factors: what's in a name? Endocrinology, v.132, n.2, Feb, p.487-8. 1993.
- Baird, A., P. Mormede e P. Bohlen. Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage-derived growth factor. Biochem Biophys Res Commun, v.126, n.1, Jan 16, p.358-64. 1985.
- Balabanian, C. A., J. Coutinho-Netto, T. L. Lamano-Carvalho, S. A. Lacerda e L. G. Brentegani. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. J Oral Sci, v.48, n.4, Dec, p.201-5. 2006.
- Bates, D. O. e F. E. Curry. Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca(2+)-dependent pathway. Am J Physiol, v.273, n.2 Pt 2, Aug, p.H687-94. 1997.
- Bates, D. O. e S. J. Harper. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. Vascul Pharmacol, v.39, n.4-5, Nov, p.225-37. 2002.
- Bates, D. O., D. Lodwick e B. Williams. Vascular endothelial growth factor and microvascular permeability. Microcirculation, v.6, n.2, Jun, p.83-96. 1999.
- Beezhold, D. H. e C. Personius. Fibronectin fragments stimulate tumor necrosis factor secretion by human monocytes. J Leukoc Biol, v.51, n.1, Jan, p.59-64. 1992.

- Berse, B., L. F. Brown, L. Van De Water, H. F. Dvorak e D. R. Senger. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. Mol Biol Cell, v.3, n.2, Feb, p.211-20. 1992.
- Brod, M. Quality of life issues in patients with diabetes and lower extremity ulcers: patients and care givers. Qual Life Res, v.7, n.4, May, p.365-72. 1998.
- Brooks, P. C., R. A. Clark e D. A. Cheresh. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. Science, v.264, n.5158, Apr 22, p.569-71. 1994.
- Brown, L. F., K. T. Yeo, B. Berse, T. K. Yeo, D. R. Senger, H. F. Dvorak e L. Van De Water. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. J Exp Med, v.176, n.5, Nov 1, p.1375-9. 1992.
- Clark, R. A. The molecular and cellular biology wound repair. New York: Plenum Press. 1996. 617 p.
- Conn, G., M. L. Bayne, D. D. Soderman, P. W. Kwok, K. A. Sullivan, T. M. Palisi, D. A. Hope e K. A. Thomas. Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.7, Apr, p.2628-32. 1990.

- Cyr, D. R. Natural Rubber. In: (Ed.). Encyclopedia of Chemical Technology: Kirk-Othmer, v.20, 1991. Natural Rubber, p.468-491
- Dass, C. Introduction to mass spectrometry. In: (Ed.). Principles and practice of biological mass spectrometry. Amsterdam: Wiley, 2001. Introduction to mass spectrometry, p.1-9
- Dermargos, A. FGF-2: estrutura e função. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química - USP, São Paulo, 2007. 156 f. p.
- Detmar, M., L. F. Brown, B. Berse, R. W. Jackman, B. M. Elicker, H. F. Dvorak e K. P. Claffey. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. J Invest Dermatol, v.108, n.3, Mar, p.263-8. 1997.
- Dvorak, A. M., S. Kohn, E. S. Morgan, P. Fox, J. A. Nagy e H. F. Dvorak. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. J Leukoc Biol, v.59, n.1, Jan, p.100-15. 1996.
- Dvorak, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. J Clin Oncol, v.20, n.21, Nov 1, p.4368-80. 2002.

Dvorak, H. F. Angiogenesis: update 2005. J Thromb Haemost, v.3, n.8, Aug, p.1835-42. 2005.

Dvorak, H. F., M. Detmar, K. P. Claffey, J. A. Nagy, L. Van De Water e D. R. Senger. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. Int Arch Allergy Immunol, v.107, n.1-3, May-Jun, p.233-5. 1995.

Dvorak, H. F., J. A. Nagy, D. Feng, L. F. Brown e A. M. Dvorak. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. Curr Top Microbiol Immunol, v.237, p.97-132. 1999.

Dvorak, H. F., S. C. Quay, N. S. Orenstein, A. M. Dvorak, P. Hahn, A. M. Bitzer e A. C. Carvalho. Tumor shedding and coagulation. Science, v.212, n.4497, May 22, p.923-4. 1981.

Eming, S. A., T. Krieg e J. M. Davidson. Gene therapy and wound healing. Clin Dermatol, v.25, n.1, Jan-Feb, p.79-92. 2007.

Eming, S. A., S. Werner, P. Bugnon, C. Wickenhauser, L. Siewe, O. Utermohlen, J. M. Davidson, T. Krieg e A. Roers. Accelerated wound closure in mice deficient for interleukin-10. Am J Pathol, v.170, n.1, Jan, p.188-202. 2007.

- Esser, S., K. Wolburg, H. Wolburg, G. Breier, T. Kurzchalia e W. Risau. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. J Cell Biol, v.140, n.4, Feb 23, p.947-59. 1998.
- Fan, T. P., J. C. Yeh, K. W. Leung, P. Y. Yue e R. N. Wong. Angiogenesis: from plants to blood vessels. Trends Pharmacol Sci, v.27, n.6, Jun, p.297-309. 2006.
- Feng, D., J. A. Nagy, A. M. Dvorak e H. F. Dvorak. Different pathways of macromolecule extravasation from hyperpermeable tumor vessels. Microvasc Res, v.59, n.1, Jan, p.24-37. 2000.
- Ferrara, N. The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. Breast Cancer Res Treat, v.36, n.2, p.127-37. 1995.
- Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. Am J Physiol Cell Physiol, v.280, n.6, Jun, p.C1358-66. 2001.
- Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev, v.25, n.4, Aug, p.581-611. 2004.
- Ferrara, N. e W. J. Henzel. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun, v.161, n.2, Jun 15, p.851-8. 1989.

Folkman, J. Toward an understanding of angiogenesis: search and discovery. Perspect. Biol. Med., v.29, n.1, p.10-36. 1985.

Folkman, J. Angiogenesis. In: V. De Vita, S. Hellman, *et al* (Ed.). Biologic therapy of cancer. Philadelphia: J. B. Lippincott Co., 1991. Angiogenesis, p.743-753

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

Folkman, J., M. Klagsbrun, J. Sasse, M. Wadzinski, D. Ingber e I. Vlodavsky. A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane. Am J Pathol, v.130, n.2, Feb, p.393-400. 1988.

Folkman, J. e Y. Shing. Angiogenesis. J Biol Chem, v.267, n.16, Jun 5, p.10931-4. 1992.

Frade, M. A. Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico do reparo tecidual na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. Tese (Doutorado em Medicina; Área: Dermatologia), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP., Ribeirão Preto, 2003. 164 f. p.

Frade, M. A., R. V. Valverde, R. V. De Assis, J. Coutinho-Netto e N. T. Foss. Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. Int J Dermatol, v.40, n.3, Mar, p.238-40. 2001.

- Frank, S., G. Hubner, G. Breier, M. T. Longaker, D. G. Greenhalgh e S. Werner. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. J Biol Chem, v.270, n.21, May 26, p.12607-13. 1995.
- Friedland, J. S., R. Shattock, D. G. Remick e G. E. Griffin. Mycobacterial 65-kD heat shock protein induces release of proinflammatory cytokines from human monocytic cells. Clin Exp Immunol, v.91, n.1, Jan, p.58-62. 1993.
- Gabbiani, G., B. J. Hirschel, G. B. Ryan, P. R. Statkov e G. Majno. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. J Exp Med, v.135, n.4, Apr 1, p.719-34. 1972.
- Gale, N. W. e G. D. Yancopoulos. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. Genes Dev, v.13, n.9, May 1, p.1055-66. 1999.
- Gebhardt, R. In vitro screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: Novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. Planta medica, v.66, n.2, p.99-105. 2000.
- Gerber, H. P., A. McMurtrey, J. Kowalski, M. Yan, B. A. Keyt, V. Dixit e N. Ferrara. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. J Biol Chem, v.273, n.46, Nov 13, p.30336-43. 1998.

- Glass, C. A., S. J. Harper e D. O. Bates. The anti-angiogenic VEGF isoform VEGF165b transiently increases hydraulic conductivity, probably through VEGF receptor 1 in vivo. J Physiol, v.572, n.Pt 1, Apr 1, p.243-57. 2006.
- 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.
- Hamburger, M. e K. Hostettmann. Analytical aspects of drugs of natural origin. J Pharm Biomed Anal, v.7, n.12, p.1337-49. 1989.
- Hartree, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem, v.48, n.2, Aug, p.422-7. 1972.
- Hebda, P. A., C. K. Klingbeil, J. A. Abraham e J. C. Fiddes. Basic fibroblast growth factor stimulation of epidermal wound healing in pigs. J Invest Dermatol, v.95, n.6, Dec, p.626-31. 1990.
- Howdieshell, T. R., D. Callaway, W. L. Webb, M. D. Gaines, C. D. Procter, Jr., Sathyanarayana, J. S. Pollock, T. L. Brock e P. L. Mcneil. Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. J Surg Res, v.96, n.2, Apr, p.173-82. 2001.

Itzhaki, R. F. e D. M. Gill. A Micro-Biuret Method for Estimating Proteins. Anal Biochem, v.9, Dec, p.401-10. 1964.

Jakob, W., K. D. Jentzsch, B. Mauersberger e G. Heder. The chick embryo choriallantoic membrane as a bioassay for angiogenesis factors: reactions induced by carrier materials. Exp Pathol (Jena), v.15, n.5, p.241-9. 1978.

Jakob, W. e K. Voss. Utilization of image analysis for the quantification of vascular responses in the chick chorioallantoic membrane. Exp Pathol, v.26, n.2, p.93-9. 1984.

Jasiulionis, M. G., A. D. Luchessi, A. G. Moreira, P. P. Souza, A. P. Suenaga, M. Correa, C. A. Costa, R. Curi e C. M. Costa-Neto. Inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) hypusination impairs melanoma growth. Cell Biochem Funct, v.25, n.1, Jan-Feb, p.109-14. 2007.

Jingjing, L., Y. Xue, N. Agarwal e R. S. Roque. Human Muller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.40, n.3, Mar, p.752-9. 1999.

Kanda, S., E. Landgren, M. Ljungstrom e L. Claesson-Welsh. Fibroblast growth factor receptor 1-induced differentiation of endothelial cell line established from tsA58 large T transgenic mice. Cell Growth Differ, v.7, n.3, Mar, p.383-95. 1996.

- Kandel, J., E. Bossy-Wetzel, F. Radvanyi, M. Klagsbrun, J. Folkman e D. Hanahan. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. Cell, v.66, n.6, Sep 20, p.1095-104. 1991.
- Karukonda, S. R., T. C. Flynn, E. E. Boh, E. I. Mcburney, G. G. Russo e L. E. Millikan. The effects of drugs on wound healing--part II. Specific classes of drugs and their effect on healing wounds. Int J Dermatol, v.39, n.5, May, p.321-33. 2000.
- Keck, P. J., S. D. Hauser, G. Krivi, K. Sanzo, T. Warren, J. Feder e D. T. Connolly. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. Science, v.246, n.4935, Dec 8, p.1309-12. 1989.
- Kukk, E., A. Lymboussaki, S. Taira, A. Kaipainen, M. Jeltsch, V. Joukov e K. Alitalo. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. Development, v.122, n.12, Dec, p.3829-37. 1996.
- Kush, A., E. Goyvaerts, M. L. Chye e N. H. Chua. Laticifer-specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.5, Mar, p.1787-90. 1990.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

- Levick, J. R. Capillary filtration-absorption balance reconsidered in light of dynamic extravascular factors. Exp Physiol, v.76, n.6, Nov, p.825-57. 1991.
- Li, J., K. Foitzik, E. Calautti, H. Baden, T. Doetschman e G. P. Dotto. TGF-beta3, but not TGF-beta1, protects keratinocytes against 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced cell death in vitro and in vivo. J Biol Chem, v.274, n.7, Feb 12, p.4213-9. 1999.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr e R. J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, v.193, n.1, Nov, p.265-75. 1951.
- Maciel, M. A. M., A. C. Pinto, V. F. V. Jr., N. F. Grynberg e A. Echevarria. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Química Nova, v.25, n.3, p.429-438. 2002.
- Maguire, M., A. R. Coates e B. Henderson. Chaperonin 60 unfolds its secrets of cellular communication. Cell Stress Chaperones, v.7, n.4, Oct, p.317-29. 2002.
- Majno, G., S. M. Shea e M. Leventhal. Endothelial contraction induced by histamine-type mediators: an electron microscopic study. J Cell Biol, v.42, n.3, Sep, p.647-72. 1969.
- Martin, P. e S. J. Leibovich. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. Trends Cell Biol, v.15, n.11, Nov, p.599-607. 2005.

- Mccallion, R. L. e Ferguson. Fetal wound healing and development of antiscarring therapies for adult wound healing. In: R. A. Clark (Ed.). The molecular and cellular biology of wound repair.. New York: Plenum Press, 1996. Fetal wound healing and development of antiscarring therapies for adult wound healing, p.561-590
- Mccolm, J. R., P. Geisen e M. E. Hartnett. VEGF isoforms and their expression after a single episode of hypoxia or repeated fluctuations between hyperoxia and hypoxia: relevance to clinical ROP. Mol Vis, v.10, Jul 21, p.512-20. 2004.
- Mendonça, R. J. Caracterização biológica de uma fração angiogênica do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. (dissertação de Mestrado em Ciências) - Depto de Bioquímica e Imunologia - FMRP., USP, Ribeirão Preto, 2004. 85f. p.
- Michel, D. [The biophysiology of the cardiovascular system and its therapeutic implications]. Internist (Berl), v.25, n.8, Aug, p.478-84. 1984.
- Miles, A. A. e E. M. Miles. Vascular reactions to histamine, histamine-liberator and leukotaxine in the skin of guinea-pigs. J Physiol, v.118, n.2, Oct, p.228-57. 1952.
- Ministériosaúde. Avaliação do plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao diabetes mellitus no Brasil. O. P.-A. D. Saúde: Editora MS: 63 p. 2004.

- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, v.65, n.1-2, Dec 16, p.55-63. 1983.
- Mrué, F. Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães. Tese (Doutorado em Medicina; Área : Cirurgia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, 2000. 111 f p.
- Mrué, F., J. Coutinho-Netto, R. Ceneviva, J. J. Lachat, J. A. Thomazini e H. Tambelini. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. Materials Research, v.7, n.2, p.277-283. 2004.
- Mustoe, T. A., G. F. Pierce, C. Morishima e T. F. Deuel. Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model. J Clin Invest, v.87, n.2, Feb, p.694-703. 1991.
- Nagy, J. A., L. Benjamin, H. Zeng, A. M. Dvorak e H. F. Dvorak. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. Angiogenesis, Feb 22. 2008.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube e W. Ehrhardt. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis, v.9, n.6, Jun, p.255-62. 1988.

- O'farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem, v.250, n.10, May 25, p.4007-21. 1975.
- Olivo, M., R. Bhardwaj, K. Schulze-Osthoff, C. Sorg, H. J. Jacob e I. Flamme. A comparative study on the effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), human angiogenic factor (h-AF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. Anat Rec, v.234, n.1, Sep, p.105-15. 1992.
- Ornitz, D. M. e N. Itoh. Fibroblast growth factors. Genome Biol, v.2, n.3, p.REVIEWS3005. 2001.
- Park, J. E. e A. Barbul. Understanding the role of immune regulation in wound healing. Am J Surg, v.187, n.5A, May, p.11S-16S. 2004.
- Park, J. E., G. A. Keller e N. Ferrara. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. Mol Biol Cell, v.4, n.12, Dec, p.1317-26. 1993.
- Parker, K. C., J. I. Garrels, W. Hines, E. M. Butler, A. H. Mckee, D. Patterson e S. Martin. Identification of yeast proteins from two-dimensional gels: working out spot cross-contamination. Electrophoresis, v.19, n.11, Aug, p.1920-32. 1998.

Patterson, S. D. e R. H. Aebersold. Proteomics: the first decade and beyond. Nat Genet, v.33 Suppl, Mar, p.311-23. 2003.

Pierce, G. F., J. E. Tarpley, R. M. Allman, P. S. Goode, C. M. Serdar, B. Morris, T. A. Mustoe e J. Vande Berg. Tissue repair processes in healing chronic pressure ulcers treated with recombinant platelet-derived growth factor BB. Am J Pathol, v.145, n.6, Dec, p.1399-410. 1994.

Pierce, G. F., J. E. Tarpley, D. Yanagihara, T. A. Mustoe, G. M. Fox e A. Thomason. Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. Am J Pathol, v.140, n.6, Jun, p.1375-88. 1992.

Posch, A., Z. Chen, C. Wheeler, M. J. Dunn, M. Raulf-Heimsoth e X. Baur. Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. J Allergy Clin Immunol, v.99, n.3, Mar, p.385-95. 1997.

Reddy, S. Latex allergy. Am Fam Physician, v.57, n.1, Jan 1, p.93-102. 1998.

Remensnyder, J. P. e G. Majno. Oxygen gradients in healing wounds. Am J Pathol, v.52, n.2, Feb, p.301-23. 1968.

- Rippel, M. M. Caracterização microestrutural de filmes e partículas de látex de borracha natural. Tese (Doutorado em química), Instituto de Química - UNICAMP, Campinas, 2005.
- Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. Nature, v.386, n.6626, Apr 17, p.671-4. 1997.
- Roberts, A. B. Molecular and cell biology of TGF-beta. Miner Electrolyte Metab, v.24, n.2-3, p.111-9. 1998.
- Roth, D., M. Piekarek, M. Paulsson, H. Christ, W. Bloch, T. Krieg, J. M. Davidson e S. A. Eming. Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. Am J Pathol, v.168, n.2, Feb, p.670-84. 2006.
- Rubinstein, L. V., R. H. Shoemaker, K. D. Paull, R. M. Simon, S. Tosini, P. Skehan, D. A. Scudiero, A. Monks e M. R. Boyd. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. J Natl Cancer Inst, v.82, n.13, Jul 4, p.1113-8. 1990.
- Ruoslahti, E. e Y. Yamaguchi. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. Cell, v.64, n.5, Mar 8, p.867-9. 1991.

- Sakdapipanich, J. T. Structural characterization of natural rubber based on recent evidence from selective enzymatic treatments. J Biosci Bioeng, v.103, n.4, Apr, p.287-92. 2007.
- Santoro, M. M. e G. Gaudino. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. Exp Cell Res, v.304, n.1, Mar 10, p.274-86. 2005.
- Santos, G. R. e C. G. Mothé. Prospecção e perspectivas da borracha natural, *Hevea brasiliensis*. Revista Analytica, v.26, Janeiro de 2007, p.32-40. 2007.
- Schweigerer, L., G. Neufeld, J. Friedman, J. A. Abraham, J. C. Fiddes e D. Gospodarowicz. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. Nature, v.325, n.6101, Jan 15-21, p.257-9. 1987.
- Senger, D. R., D. T. Connolly, L. Van De Water, J. Feder e H. F. Dvorak. Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. Cancer Res, v.50, n.6, Mar 15, p.1774-8. 1990.
- Senger, D. R., S. R. Ledbetter, K. P. Claffey, A. Papadopoulos-Sergiou, C. A. Peruzzi e M. Detmar. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. Am J Pathol, v.149, n.1, Jul, p.293-305. 1996.

- Sepp, N. T., L. J. Li, K. H. Lee, E. J. Brown, S. W. Caughman, T. J. Lawley e R. A. Swerlick. Basic fibroblast growth factor increases expression of the alpha v beta 3 integrin complex on human microvascular endothelial cells. J Invest Dermatol, v.103, n.3, Sep, p.295-9. 1994.
- Simpson, D. M. e R. Ross. The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. J Clin Invest, v.51, n.8, Aug, p.2009-23. 1972.
- Singer, A. J. e R. A. Clark. Cutaneous wound healing. N Engl J Med, v.341, n.10, Sep 2, p.738-46. 1999.
- Soares, S. C., I. B. Cursi, F. F. Andrade, E. M. Campos, M. T. F. Carvalho, J. Coutinho-Netto, N. T. Foos e M. A. Frade. 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.
- Staton, C. A., S. M. Stribbling, S. Tazzyman, R. Hughes, N. J. Brown e C. E. Lewis. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. Int J Exp Pathol, v.85, n.5, Oct, p.233-48. 2004.
- Steed, D. L. Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. Clin Plast Surg, v.25, n.3, Jul, p.397-405. 1998.

- Steen, H. e M. Mann. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. Nat Rev Mol Cell Biol, v.5, n.9, Sep, p.699-711. 2004.
- Streit, M., P. Velasco, L. Riccardi, L. Spencer, L. F. Brown, L. Janes, B. Lange-Asschenfeldt, K. Yano, T. Hawighorst, L. Iruela-Arispe e M. Detmar. Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice. Embo J, v.19, n.13, Jul 3, p.3272-82. 2000.
- Sussman, G. L., D. H. Beezhold e V. P. Kurup. Allergens and natural rubber proteins. J Allergy Clin Immunol, v.110, n.2 Suppl, Aug, p.S33-9. 2002.
- Tischer, E., R. Mitchell, T. Hartman, M. Silva, D. Gospodarowicz, J. C. Fiddes e J. A. Abraham. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. J Biol Chem, v.266, n.18, Jun 25, p.11947-54. 1991.
- Udaka, K., Y. Takeuchi e H. Z. Movat. Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability. Proc Soc Exp Biol Med, v.133, n.4, Apr, p.1384-7. 1970.
- Vaquero, J., M. Zurita, C. Morales, R. Cincu e S. Oya. Expression of vascular permeability factor in glioblastoma specimens: correlation with tumor vascular endothelial surface and peritumoral edema. J Neurooncol, v.49, n.1, Aug, p.49-55. 2000.

- Voss, K., W. Jacob e K. Roth. A new image analysis method for the quantification of neovascularization. Exp Pathol, v.26, n.3, p.155-61. 1984.
- Wagner, S. e H. Breiteneder. Hevea brasiliensis latex allergens: current panel and clinical relevance. Int Arch Allergy Immunol, v.136, n.1, Jan, p.90-7. 2005.
- Waltenberger, J., U. Mayr, S. Pentz e V. Hombach. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. Circulation, v.94, n.7, Oct 1, p.1647-54. 1996.
- Wedmore, C. V. e T. J. Williams. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. Nature, v.289, n.5799, Feb 19, p.646-50. 1981.
- Werner, S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. Cytokine Growth Factor Rev, v.9, n.2, Jun, p.153-65. 1998.
- Werner, S. e R. Grose. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiol Rev, v.83, n.3, Jul, p.835-70. 2003.
- Wilting, J., B. Christ e M. Bokeloh. A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors. Studies on the effects of carriers, PBS, angiogenin, and bFGF. Anat Embryol (Berl), v.183, n.3, p.259-71. 1991.

Wilting, J., B. Christ e H. A. Weich. The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of VEGF165 and PDGF-BB. Anat Embryol (Berl), v.186, n.3, Aug, p.251-7. 1992.

Yeang, H. Y., S. A. Arif, F. Yusof e E. Sunderasan. Allergenic proteins of natural rubber latex. Methods, v.27, n.1, May, p.32-45. 2002.

Zachary, I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. Am J Physiol Cell Physiol, v.280, n.6, Jun, p.C1375-86. 2001.

Zittermann, S. I. e A. C. Issekutz. Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) potentiates leukocyte recruitment to inflammation by enhancing endothelial adhesion molecule expression. Am J Pathol, v.168, n.3, Mar, p.835-46. 2006.

ANEXO 1

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)