

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA – CÂMPUS DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Cristiane Garcia Paulino

**“Análise da expressão dos fatores de crescimento FGF, VEGF e TGF associados ao reparo dérmico estimulado pelo látex natural (*Hevea brasiliensis*) e seu efeito na taxa de pulsação em *Lumbriculus variegatus*”**

Araraquara  
2022

CRISTIANE GARCIA PAULINO

**“Análise da expressão dos fatores de crescimento FGF, VEGF e TGF associados ao reparo dérmico estimulado pelo látex natural (*Hevea brasiliensis*) e seu efeito na taxa de pulsação em *Lumbriculus variegatus*”**

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano

Araraquara  
2022

P328a Paulino, Cristiane Garcia  
Análise da expressão dos fatores de crescimento FGF, VEGF e TGF associados ao reparo dérmico estimulado pelo látex natural (*Hevea brasiliensis*) e seu efeito na taxa de pulsação em *Lumbriculus variegatus* / Cristiane Garcia Paulino. -- Araraquara, 2022  
106 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara  
Orientador: Rondinelli Donizetti Herculano

1. Látex. 2. Cicatrização. 3. Citocinas. 4. Expressão gênica. 5. Oligochaeta. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: “Análise da expressão dos fatores de crescimento FGF, VEGF e TGF associados ao reparo dérmico estimulado pelo látex natural (*Hevea brasiliensis*) e seu efeito na taxa de pulsação em *Lumbriculus variegatus*”

**AUTORA: CRISTIANE GARCIA PAULINO**

**ORIENTADOR: RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. RICARDO JOSÉ MENDONÇA (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM – Uberaba

Dr. CASSAMO USSEMANE MUSSAGY (Participação Virtual)  
Pontifícia Universidade Católica - PUC - Valparaíso, Chile

Prof. Dr. CARLOS FREDERICO DE OLIVEIRA GRAEFF (Participação Virtual)  
Departamento de Física / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru

Profa. Dra. AMANDA DOS SANTOS OLIVEIRA (Participação Virtual)  
Unidade de Emergência / Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - HC-FMRP - Ribeirão Preto

Araraquara, 16 de dezembro de 2022

## DADOS CURRICULARES

**Cristiane Garcia Paulino**

---

**2018 – 2022 Doutorado em Biotecnologia**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Título: Análise da expressão dos fatores de crescimento FGF, VEGF e TGF associados ao reparo dérmico estimulado pelo látex natural (*Hevea brasiliensis*) e seu efeito na taxa de pulsação em *Lumbriculus variegatus*

Orientador: Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano

**2011 - 2013 Mestrado em Biotecnologia**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Título: Análise prospectiva do padrão de metilação nos genes associados a doenças cardíacas SCN5A e MTR para aplicação na genética forense

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Regina Maria Barreto Cicareli

**2007 - 2008 Técnico em Química**

Colégio Técnico Santa Giúlia, Taquaritinga, São Paulo, Brasil

**2002 - 2006 Graduação em Ciências Biológicas**

Universidade de Araraquara, Araraquara, São Paulo, Brasil

### Artigos publicados em periódicos

Cesar, M.B., Borges, F.A., Bilck, A.P., Yamashita, F., Paulino, C.G., Herculano, R.D. **Development and Characterization of Natural Rubber Latex and Polylactic Acid Membranes for Biomedical Application.** J Polym Environ 28, 220–230 (2020)

J.F. Floriano, V.S. Chao, L.F.C. Bolognesi, N.R. de Barros, M. C.R. Miranda, F.A. Borges, AL.D. Chagas, C.G. Paulino, B.C. Garms, M.Y. Marcelino, J.A.S. Pereira, A.G. dos Santos, A.M.Q. Norberto, C.F. O. Graeff, R.D. Herculano. **Physical, Chemical and Biological Characterization of Natural Rubber Latex Membranes Loaded with Cordia verbenacea DC. Extract.** Current Traditional Medicine, Volume 4(2), p. 140 – 154, 2018. DOI: 10.2174/2215083804666180427113645

## DEDICATÓRIA

Não poderia dedicar essa conquista a não ser para as pessoas que mais amo, respeito e admiro. Por isso, dedico...

Aos meus pais, José Carlos e Aparecida pelo amor, carinho, apoio e por tudo que sempre fizeram por mim em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão Leandro e minha cunhada Gedaique, pelo incentivo, paciência e dedicação, onde novamente o tempo era tão curto e minha expectativa tão grande.

dedico este trabalho de modo especial,  
aos meus filhos Lana e João Carlos por sempre  
incentivarem-me através de seus sorrisos e nunca  
me deixar desanimar. Agradeço ainda mais, por  
me compreenderem e por me ensinarem todos  
os dias a ser mais feliz, mais paciente, mais  
forte...mais Mãe.

Amo vocês

## **AGRADECIMENTOS**

Neste período, aprendi que uma tese ou qualquer outro trabalho é a extensão da vida do(a) autor(a). Então, para que algo de valor seja produzido, deve-se primeiro criar algo de valor em si. Por este motivo, agradeço sincera e profundamente a todas as pessoas que muito me encorajaram e me ajudaram a produzir algo de valor em minha vida.

A Deus, em sua onipresença, por me permitir explorar o mundo, me acolhendo, encorajando, enchendo-me de esperanças, colocando pessoas excepcionais em meu caminho e guiando meus passos até aqui.

Ao meu orientador, Professor Dr. Rondinelli Donizetti Herculano, pela dedicação, paciência, compreensão e por destinar seu tempo a inspirar os seus alunos a serem profissionais melhores.

Aos professores Dr. Guilherme Ferreira Caetano e Dr. Ricardo José Mendonça por toda a atenção e por aceitarem a participar da Banca de Qualificação, proporcionando discussões e sugestões que serviram para aprendizado, crescimento e incentivo à pesquisa.

Aos professores da Banca de Defesa, Prof. Dr. Ricardo José Mendonça, Prof. Dr. Cassamo Ussemane Mussagy, Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff e Profa. Dra. Amanda dos Santos Oliveira por toda atenção e pertinentes sugestões que agregaram muito conhecimento e foram essenciais para que este trabalho fosse concluído satisfatoriamente.

Aos meus amigos da pós-graduação, que sempre estiveram presentes. Obrigada por todas as novas amizades.

Em especial ao Felipe Borges, obrigada pelo tempo que se dedicou as minhas perguntas e me ensinou sobre a técnica de cultivo celular e a Giovana Pegorin,

por toda ajuda nos testes de atividade antioxidante, fenóis e plotagem dos gráficos no Origin. Mais uma vez, muito obrigada!

À secretaria de Pós-Graduação em Biotecnologia, em especial a Wennia, Robson e Ana Paula, por sempre me ajudarem prontamente.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

## RESUMO

Estudos recentes revelam a eficácia do uso do látex natural, extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*, como agente cicatrizante e como uma matriz carreadora de diversos produtos com efeitos farmacológicos. Por ser um evento sistêmico, a cicatrização abrange uma gama de fatores que precisam interagir entre si para que haja uma evolução de forma eficiente. Tendo em vista a capacidade angiogênica e cicatrizante do látex, esta pesquisa investigou através de análises moleculares a expressão dos fatores de crescimento FGF, VEGF e TGF presentes no látex, em cultura de fibroblastos 3T3. Dentre os fatores de crescimento que influenciam o crescimento dérmico, podemos destacar o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e o fator de crescimento fibroblástico (FGF), que estimulam a proliferação celular, a produção de colágeno e de outros elementos da matriz celular, favorecendo o processo de cicatrização. Conforme as análises de FTIR, os componentes identificados presentes na membrana de látex, na fração F1 e no soro foram identificados pertencentes ao isopreno, principal constituinte do látex, como para os grupos funcionais. A amostra do soro apresentou maior discrepância evidenciando que a parte proteica pode estar agindo como indutor de angiogênese. O ensaio hemolítico das amostras, fração F1, soro e a membrana de látex não apresentaram um alto grau de hemólise significativa no período observado, demonstrando assim ser um biomaterial hemocompatível. Nas condições experimentais utilizadas, evidenciou-se baixo teor de fenóis e capacidade antioxidante da fração F1, soro e membrana de látex. Os resultados obtidos nos ensaios com os Blackworms indicam que as frações F1, soro e membrana de látex, nas concentrações testadas, tiveram efeito no sistema circulatório alterando a taxa de pulsação dos Blackworms. A fração F1 e o soro do látex, na concentração de 0,01%, no cultivo de fibroblastos e macrófagos apresentaram melhor viabilidade celular no período de 72h de incubação. A membrana de látex apresentou viabilidade celular superior em todos os períodos de incubação quando comparados ao controle, porém seus resultados foram mais satisfatórios no intervalo de 72h. Os resultados encontrados da análise de expressão gênica confirmaram que houve aumento significativo nas expressões dos genes VEGF, FGF e TGF na membrana e nas frações F1 e soro do látex quando comparadas ao controle, evidenciando o potencial angiogênico dessas amostras. Este mecanismo de Engenharia Tecidual pode ser um dos procedimentos para regeneração dérmica no futuro.

**Palavras-chave:** Látex. Reparo dérmico. Fatores de crescimento. Expressão gênica. *Lumbriculus variegatus*.

## ABSTRACT

Studies prove the effectiveness of using natural latex, extracted from the rubber tree *Hevea brasiliensis*, as a healing agent and as a carrier matrix for various products with pharmacological effects. As it is a systemic event, healing encompasses a range of factors that need to interact with each other so that there is an efficient evolution. In view of the angiogenic and healing capacity of latex, the purpose of this research will be to investigate, through molecular analysis, the expression of growth factors FGF, VEGF and TGF present in latex, in culture of 3T3 fibroblasts. Among the growth factors that influence dermal growth, we can highlight the vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) and fibroblastic growth factor (FGF), which stimulate cell proliferation, the production of collagen and other elements of the cellular matrix, favoring the healing process. According to the FTIR analyses, the identified components present in the latex membrane, in the F1 fraction and in the serum were identified belonging to isoprene, the main constituent of latex, as for the functional groups. The serum sample showed greater discrepancy, showing that the protein part may be acting as an angiogenesis inducer. The hemolytic assay of the samples, F1 fraction, serum and the latex membrane did not show a significant high degree of hemolysis in the observed period, thus demonstrating that it is a hemocompatible biomaterial. Under the experimental conditions used, a low phenol content and antioxidant capacity were found in the F1 fraction, serum and latex membrane. The results obtained in the tests with the Blackworms indicate that the F1 fractions, serum and latex membrane, in the tested concentrations, had an effect on the circulatory system, altering the pulsation rate of the Blackworms. The F1 fraction and the latex serum, at a concentration of 0.01%, in the culture of fibroblasts and macrophages showed better cell viability in the period of 72 hours of incubation. The latex membrane showed superior cell viability in all incubation periods when compared to the control, but its results were more satisfactory in the 72h interval. The results found from the gene expression analysis confirmed that there was a significant increase in the expressions of the VEGF, FGF and TGF genes in the membrane and in the F1 fractions and latex serum when compared to the control, evidencing the angiogenic potential of these samples. This Tissue Engineering mechanism may be one of the procedures for dermal regeneration in the future.

**Keywords:** Latex. Dermal repair. Growth factors. Gene expression.  
*Lumbriculus variegatus*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Kits de cuidados médicos antigos: a-) Germoplast® (em destaque) e b-) seis curativos de primeiros socorros vintage. 18
- Figura 2-** Fracionamento do látex (*Hevea brasiliensis*) através da centrifugação de alta rotação F1 (fase superior, contendo partículas de borracha), F2 (fase intermediária, sendo o soro do látex) e F3 (fase de fundo, contendo os lutóides) 23
- Figura 3-** Evolução da cicatrização da úlcera através da aplicação da membrana de látex: 26  
A - Aspecto inicial da ferida apresentando grande quantidade de tecido fibroso necrosado;  
B - Aplicação da membrana de látex natural; C - Ferida apresentando redução do tecido fibroso necrosado; D - Ferida em estágio avançado de cicatrização
- Figura 4-** Defeitos ósseos preenchidos com coágulo de sangue autólogo (A), membrana de látex cobrindo o terço médio da tíbia (B), e radiografia do defeito ósseo na tíbia (C) 28
- Figura 5-** Aparência visual da avaliação da toxicidade de soro de látex em larvas de *G. mellonella* em três concentrações (3, 5 e 10 mg/kg) após 11 dias 31
- Figura 6-** Mecanismos de comunicação celular promovido por fatores de crescimento 33
- Figura 7-** Mecanismo do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na cicatrização de feridas 35
- Figura 8-** Detalhamento das fases de cicatrização, com fatores de crescimento e linhagens celulares. 44
- Figura 9-** Imagem de seção transversal lateral dos Blackworms para verificação das ondas de pulsações. 48
- Figura 10-** Reflexões de vôo dos Blackworms 49
- Figura 11-** Desenho experimental 52
- Figura 12-** Extração de Látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) para produção das membranas 53
- Figura 13-** Hemólise identificada em uma amostra de sangue centrifugada caracterizada através da intensidade da cor avermelhada do plasma. 55
- Figura 14-** Mudança da coloração do radical livre (DPPH) antes e depois da reação com um composto antioxidante (A-H). 58
- Figura 15-** Dosagem de fenóis totais empregando o reagente Folin 59
- Figura 16-** Taxa de pulsação do vaso sanguíneo dorsal de *Lumbriculus variegatus* em amostras de látex natural. A exposição a longo prazo das amostras, aumentaram a frequência de pulsação (B) 67

<b>Figura 17-</b> Pulso peristáltico do vaso sanguíneo dorsal indicado por uma seta preta	76
<b>Figura 18-</b> Ramificação dos vasos contráteis laterais indicado por uma seta preta	80
<b>Figura 19-</b> Viabilidade celular. Porcentagem de viabilidade de fibroblastos e macrófagos em cultura por 24 h, com membrana, fração F1 e soro de látex em concentrações de 0,01%, 0,1% e 1%. Valores representam médias de resultados em triplicata	81
<b>Figura 20-</b> Viabilidade celular. Porcentagem de viabilidade de fibroblastos em cultura por 48 horas, com membrana, fração F1 e soro de látex em concentrações de 0,01%, 0,1% e 1%. Valores representam médias de resultados em triplicata	82
<b>Figura 21-</b> Viabilidade celular. Porcentagem de viabilidade de fibroblastos em cultura por 72h, com membrana, fração F1 e soro de látex em concentrações de 0,01%, 0,1% e 1%. Valores representam médias de resultados em triplicata	83
<b>Figura 22-</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5% evidenciando a integridade do RNA total na concentração de 2µg. As amostras 1 a 3 correspondem a fração F1, soro e membrana do látex, respectivamente	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Reagentes e respectivos volumes utilizados na reação de transcrição reversa	63
<b>Tabela 2-</b> Primers desenhados para os genes de interesse	65
<b>Tabela 3-</b> Taxa de hemólise (média $\pm$ desvio padrão) em diferentes concentrações da fração F1 e soro (15%, 30% e 50%) e membrana de látex	71
<b>Tabela 4-</b> Dosagem de fenóis nas amostras F1 e Soro do látex em diferentes concentrações (média $\pm$ desvio padrão)	75
<b>Tabela 5-</b> Resultado obtido da reação “in sílico” dos genes VEGF, FGF e TGF, mostrando a localização e tamanho do fragmento amplificado pelos primers	85

## LISTA DE EQUAÇÃO

<b>Equação 1-</b> Fórmula para o cálculo da hemólise expresso em porcentagem	56
<b>Equação 2-</b> Fórmula para inibição do DPPH expresso em porcentagem	57
<b>Equação 3-</b> Expressão empregada na normalização dos dados obtidos nos ensaios de MTT	61
<b>Equação 4-</b> Fórmula para cálculo de eficiência da PCR	66

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-</b> Espectros de FTIR da membrana, fração F1 e soro do látex de <i>Hevea brasiliensis</i>	70
<b>Gráfico 2-</b> Valor médio da atividade antioxidante do Soro do látex	73
<b>Gráfico 3-</b> Valor médio da atividade antioxidante da fração F1 do látex	74
<b>Gráfico 4-</b> Resultados do tratamento com a membrana do látex e frações F1 e soro do látex no período de 15 minutos.	77
<b>Gráfico 5-</b> Resultados do tratamento com a membrana do látex e frações F1 e soro do látex no período de 30 minutos	78
<b>Gráfico 6-</b> Resultados do tratamento com a membrana do látex e frações F1 e soro do látex no período de 1 hora	79
<b>Gráfico 7-</b> Quantificação normalizada da expressão dos genes VEGF, FGF e TGF nos tratamentos com a membrana e nas frações F1 e Soro do látex de <i>Hevea brasiliensis</i>	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BML	Biomembrana de látex natural
DMSO-	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
FGF	Fator de crescimento de Fibroblasto
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
Hb	Hemoglobina
<i>H. brasiliensis</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>
HIF	Fator induzido por hipóxia
IgE	Imunoglobina E
LN	Látex Natural
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
TGF	Fator de crescimento transformador
UV	Radiação Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	20
2.1	Impacto financeiro das feridas nos sistemas de saúde	20
2.2	Definição e Tipos de Biomateriais	21
2.3	Látex Natural (LN)	22
2.4	Aplicações biomédicas do LN	25
2.5	Engenharia tecidual no reparo de lesões cutâneas	30
2.6	Angiogênese e Fatores de Crescimento	31
2.7	Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	34
2.8	Fator de Crescimento fibroblástico (FGF)	37
2.9	Fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) e fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ 1)	38
2.10	Fisiopatologia da reparação tecidual	39
2.10.1	Fase de inflamação	40
2.10.2	Fase de proliferação	41
2.10.3	Fase de maturação	43
2.11	Mecanismos Antioxidantes	44
2.12	Importância da avaliação da hemocompatibilidade e citocompatibilidade	45
2.13	PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR) para análise da expressão dos genes em estudo	46
2.14	Testagem de novos biomateriais em animais alternativos	46
2.15	Características gerais dos Blackworms ( <i>Lumbriculus variegatus</i> )	48
3	<b>OBJETIVOS</b>	51
3.1	Objetivos Gerais	51
3.2	Objetivos Específicos	51
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	52
4.1	Desenho Experimental	52
4.2	Preparação das Membranas de Látex Natural	52
4.3	Obtenção do Soro e Fração F1 do Látex Natural	53
4.4	Caracterização físico-química e biológica do material	54
4.4.1	Análise por Espectroscopia no infravermelho (FTIR)	54
4.4.2	Ensaio de hemólise	54
4.4.3	Ensaio de Atividade Antioxidante	56
4.4.3.1	Determinação da atividade Antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH)	56
4.4.3.2	Preparo das soluções de quercetina para obtenção da curva analítica	56
4.4.3.3	Preparo das amostras F1 e Soro do látex para avaliação da atividade antioxidante	57
4.4.4	Dosagem de fenóis	58
4.4.5	Cultura celular	59
4.4.6	Viabilidade celular	60
4.4.7	Avaliação da expressão gênica dos fibroblastos	61
4.4.7.1	Extração de RNA	61
4.4.7.2	Quantificação de RNA	62
4.4.7.3	Gel desnaturante para análise de RNA	62
4.4.7.4	Síntese de cDNA	63
4.4.7.5	Desenho de primers	64
4.4.7.6	Expressão gênica e Análise estatística	65
4.4.7.7	Curva de eficiência de ampliação das amostras e do gene referência	66
4.4.8	Influência da membrana e das frações F1 e Soro do látex nas taxas de pulsações em Blackworms ( <i>Lumbriculus variegatus</i> )	66
4.4.9	Análise estatística	68
5	<b>RESULTADOS e DISCUSSÃO</b>	69
5.1	Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	69
5.2	Ensaio de Hemólise	71
5.3	Ensaio de atividade antioxidante (AA)	72
5.4	Dosagem de fenóis	75

5.5	Taxas de pulsações em Blackworms ( <i>Lumbriculus variegatus</i> )	76
5.6	Viabilidade celular	81
5.7	Gel desnaturante para análise de RNA	84
5.8	Desenho de primers	85
5.9	Expressão gênica	85
6	<b>CONCLUSÕES</b>	88
7	<b>DIFICULDADES ENCONTRADAS</b>	89
8	<b>PERSPECTIVAS</b>	90
9	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	91

## 1. Introdução

Os seres humanos, assim como os demais animais, são compostos por tecidos celulares, muitos deles frágeis e com necessidade de restabelecimento, cura e/ou cicatrização quando traumatizados (Marques; Suzuki; Marques, 2017). O tratamento das feridas vem evoluindo desde 3.000 anos A.C., onde as feridas hemorrágicas eram tratadas com cauterização. O uso de torniquetes é descrito em 400 A.C. e a sutura é documentada desde o terceiro século A.C. (Guia de Feridas, 2011). Similarmente, Queen (2004) descreveu que o tratamento de feridas começou nos tempos egípcios, com bandagens de gaze embebidas em graxa – com pouca atenção ao tratamento de feridas. Entretanto, ao longo dos séculos, esses cuidados tornaram-se um pouco mais sofisticados (Figura 1). Da mesma forma, os curativos tiveram uma maior repercussão no século retrasado, devido os procedimentos de primeiros socorros iniciados em 1859 pelo suíço Jean Henry Dunant. Este projeto foi apoiado pelo Napoleão III de França, que tinha o intuito de instruir pessoas das comunidades locais, principalmente aquelas que viviam em estado de guerra (Soares, 2013).

**Figura 1.** Kits de cuidados médicos antigos: a-) Germoplast® (em destaque) e b-) seis curativos de primeiros socorros vintage.



Fonte: James, 1954

O cirurgião francês Ambroise Paré, em 1585 orientou o tratamento de feridas quanto à necessidade de desbridamento, aproximação das bordas e curativos. Lister, em 1884, introduziu o tratamento antisséptico. No século XX, vimos a evolução da terapêutica com o aparecimento da sulfa e da penicilina.

Nos últimos cem anos, o conhecimento a respeito do reparo das lesões tem evoluído significativamente devido principalmente às descobertas da ciência em relação a eventos fisiológicos e moleculares do organismo e desenvolvimento de novos produtos (Broughton; Janis; Attinger, 2006). Os avanços na pesquisa com células tronco (CT) e na engenharia de tecidos com o uso de substitutos da pele e outros fatores associados são exemplos desse progresso (Chua *et al.*, 2016; Marques; Suzuki; Marques, 2017).

Atualmente existem muitas opções para o tratamento das lesões, tais como curativos com vários tipos de cobertura existentes no mercado, desbridamento de tecidos desvitalizados, revascularização, aplicação local de fatores de crescimento, oxigenoterapia e derme humana (dermagraft) (Haddad, 2005).

Por fim, o anseio no desenvolvimento de novos tipos de curativos justifica-se devido principalmente ao custo elevado do tratamento hospitalar ou ambulatorial. Por exemplo, o gasto médio anual nos Estados Unidos dedicado ao tratamento do pé diabético é de US\$ 18,7 bilhões, devido a isso, muitos pesquisadores e Centros de Pesquisa buscam estratégias para acelerar a cicatrização de feridas, de uma forma viável, barata e sustentável (Barros *et al.*, 2021).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Impacto financeiro das feridas nos sistemas de saúde

O tratamento das feridas crônicas representa um grande gasto para a saúde pública. Considerando à necessidade de tratamento prolongado com utilização de produtos com preços significativos, os gastos apresentam muitas vezes uma barreira para adesão correta ao tratamento.

O desenvolvimento de novas alternativas para a saúde humana é importante, tais como *stents*, curativos, próteses, implantes etc. Por exemplo, somente nos EUA, as feridas dérmicas requerem cuidados intensivos e de longo prazo, resultando altos custos para os sistemas públicos de saúde, com um custo anual estimado de US\$ 28 bilhões e US\$ 32 bilhões em produtos para tratamento de feridas (Pegorin *et al.*, 2020). Trabalho recente no País de Gales usando um banco de dados integrado mostrou que 6% da população têm feridas crônicas e consomem quase £ 330 milhões por ano, o que equivale a 5,5% do orçamento do Serviço Nacional deste país (Philips *et al.*, 2016). No Reino Unido foi estimado que anualmente 412 mil pessoas desenvolvem uma nova úlcera de pressão (UP) e a variação do custo para cura foi de £1,064 (Categoria I) até £10,551 (Categoria IV)(Bennett *et al.*, 2004). Em Portugal, €9 milhões foram direcionados para tratamento das UP na Macronésia (Arquipélagos de Açores, Madeira, Canárias e Cabo Verde), no ano de 2006. Esse custo correspondeu a 4,5% da despesa pública da saúde dos Açores (Grupo Investigação Científica em Enfermagem, 2008). Outro estudo, realizado na Irlanda, para estimar o custo de UP categoria IV, mostrou que €119 mil são gastos ao longo de um período de cinco meses por paciente. Ainda nesse estudo os autores estimam que €250 milhões são gastos por ano para gerir as UP em todos os locais de atendimento da Irlanda (Gethin *et al.*, 2005). No Brasil, foram identificados estudos que estimaram o custo médio, por paciente, das UP com variação de R\$98,90 a R\$180,00 por dia com aumento proporcional ao aumento do grau de destruição tecidual (Lima, 2011). Outro estudo realizado em Minas Gerais, identificou gasto mensal que variou de R\$915,75 a R\$36.629,95. Os gastos anuais estimados foram de R\$445.664,38 desconsiderando gastos com recursos humanos (Costa *et al.*, 2015). Cortez *et al.*, 2019, avaliaram os custos do tratamento de lesões

cutâneas na atenção primária à saúde e concluíram que os custos do tratamento com coberturas avançadas foi, aproximadamente, sete vezes inferior quando comparado à modalidade com coberturas convencionais, representando uma economia de mais de R\$ 85.000,00, ressaltando que o tempo de tratamento na modalidade com coberturas avançadas foi menor que o curativo com coberturas convencionais e permitiu o retorno mais breve dos pacientes a suas atividades laborais. Essa opção terapêutica ainda proporcionou maior disponibilidade de tempo dos profissionais, visto que os curativos não são realizados diariamente. Os resultados desse estudo subsidiam a decisão da gestão municipal na adoção de práticas mais eficazes e menos dispendiosas no cuidado de pessoas com lesões cutâneas.

Vale ressaltar que o Conselho Internacional de Enfermagem considerou que algumas tecnologias são capazes de reduzir os custos, frente ao aumento na eficiência e efetividade dos cuidados. Portanto, é importante investir no desenvolvimento de estudo de feridas como um campo interdisciplinar a fim de diminuir os gastos com esse tipo de tratamento, ajudar a gerenciar a saúde pública e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

## **2.2. Definição e Tipos de Biomateriais**

Park e Lakes, 2007 definem que biomaterial é qualquer material empregado na fabricação de dispositivos para substituir uma parte ou função do corpo de forma segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável. Trata-se de uma definição geral, mas clara e coerente. Já Hench (1980), definiu que biomateriais tinham a finalidade de atingir uma combinação adequada das propriedades físicas do material com a do tecido reimplantado, com mínima toxicidade ao hospedeiro. Por fim, Williams (2009) conceituou biomateriais como qualquer substância que tenha sido engenheirada de modo que, sozinha ou em sistemas complexos, seja empregada para conduzir, por meio do controle de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de determinada terapia ou diagnóstico médico.

Pires *et al* (2015) relata que há cerca de 300 mil produtos utilizados na área de saúde que são biomateriais nesta última década. Dentre eles, estão os curativos, dispositivos para a liberação de medicamentos (na forma de adesivos,

partículas ou transdérmicos), materiais implantáveis (como suturas, placas, substitutos ósseos, tendões, telas ou malhas, válvulas cardíacas, lentes, dentes), dispositivos biomédicos (como biossensores, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise), órgãos artificiais (como coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões, pele) e etc.

Os biomateriais podem ser classificados em quatro classes de acordo com a compatibilidade que apresentam com os tecidos adjacentes: biotoleráveis, bionertes, bioativos e bioreabsorvíveis. Enquanto à natureza, os biomateriais são classificados como: metálicos, poliméricos, cerâmicos e compósitos. Além disso, a biocompatibilidade, biofuncionalidade e bioadesão são fundamentais, quanto trata-se estes biomateriais como dispositivos médicos (Herculano, 2009).

Resumidamente, os biomateriais são produzidos de modo a facilitar a interface entre sistemas biológicos, buscando tratar ou substituir um órgão ou tecido lesionado. Estes podem ser empregados de diferentes formas, variando de acordo com o uso terapêutico, seja como scaffolds ou arcabouços, facilitadores do crescimento celular ou associados à compostos que promovam a liberação sustentada em um alvo específico, por exemplo.

### **2.3. Látex Natural (LN)**

Dentre as plantas produtoras de látex, a mais conhecida e explorada comercialmente é a seringueira (*Hevea brasiliensis*), uma planta originária da Amazônia brasileira, porém que vem sendo cultivada principalmente no sudeste Asiático (Blackley, 1997).

O LN da seringueira é composto por uma complexa mistura de diferentes componentes, incluindo macromoléculas. Um dos componentes majoritários do látex é o cis e/ou trans poli-isopreno. Outros constituintes presentes no látex relatados em estudos fitoquímicos são: polissacarídeos, flavonóides, lipídios, fosfolipídios e proteínas. Comprovou-se também a existência de alcanos, cetonas triterpênicas, triterpenóides, açúcares e ácidos graxos (Uzabakiliho *et al.*, 1987). Sabe-se que o poli-isopreno é um dos componentes de todas as espécies laticíferas, porém a elucidação dos outros constituintes necessita de estudos mais aprofundados (Nascimento, 2006). O látex amoniacal ao ser submetido a um processo de ultracentrifugação, se divide em três fases distintas

(Figura 2), com os percentuais aproximados, em massa/massa do látex e com a indicação dos principais constituintes em cada fase (Blackley, 1997):

- F1 – Fase superior, contendo as partículas de borracha (35 %): elastômero, fosfolipídios e proteínas;
- F2 – Fase intermediária, sendo o soro do látex (55 %): água, proteínas, componentes protoplasmáticos, não protoplasmáticos e eletrólitos;
- F3 – Fase de fundo, contendo lutóide (10 %): proteínas, lipídios, carotenos e íons metálicos.

**Figura 2.** Fracionamento do látex (*Hevea brasiliensis*) através da centrifugação de alta rotação F1 (fase superior, contendo partículas de borracha), F2 (fase intermediária, sendo o soro do látex) e F3 (fase de fundo, contendo os lutóides)



**Fonte:** Autoria própria

As partículas de borracha natural contêm centenas de moléculas de hidrocarbonetos que são envolvidas por um filme de proteínas e fosfolipídios, que lhe confere carga negativa promovendo estabilidade coloidal das partículas. O diâmetro das partículas de borracha pode variar de 5 nm até 3.000 nm, chegando em alguns casos até a 5.000 nm ou 6.000 nm (Wisniewski, 1983). Aproximadamente 27% do conteúdo total de proteínas no látex recém coletado estão adsorvidas na superfície das partículas de borracha e acredita-se que parte das proteínas estejam no interior das partículas (Rippel, 2005). Esta camada de proteínas adsorvidas confere estabilidade as partículas de látex estabilizado com amônia, devido a sua carga negativa.

A presença de longas cadeias de hidrocarbonetos nas moléculas de fosfolipídios faz com que tenha forte atividade de superfície, sendo fortemente adsorvidos na superfície das partículas de borracha: as cadeias de hidrocarbonetos ficam ancoradas na borracha e os grupos de cabeça polar na fase aquosa. Assim é possível explicar a forte adsorção de proteínas na superfície das partículas considerando que os fosfolipídios têm carga positiva, enquanto as proteínas têm carga negativa, levando a associação iônica entre dois tipos de moléculas (Rippel, 2005).

Os lutóides formam o segundo componente principal do látex de *Hevea brasiliensis*. Eles são constituídos de proteínas (solúveis e insolúveis), fosfolipídios e sais minerais, ligados ou circundados por membranas e são, na média, muito maiores em tamanho do que as partículas de borracha. Eles têm de 2.000 a 5.000 nm de diâmetro, ligados por uma membrana de cerca de 8 nm de espessura também com carga negativa (Blackley, 1997).

O conteúdo dos lutóides é chamado soro B, contém vários cátions, principalmente cálcio, magnésio, potássio, cobre e proteínas catiônicas que tem ação floculante muito rápida sobre partículas de borracha no látex, resultando na formação de microflocos. Os lutóides dissolvem quando o látex recém coletado é estabilizado com amônia, de tal forma que temos no látex amoniaco um sistema de duas fases, constituindo das partículas de borracha e do soro (Sethuraj e Mathew, 1992).

O soro do látex natural tem densidade de 1,020 g/cm<sup>3</sup> e contém diferentes espécies químicas como carboidratos, eletrólitos, proteínas e aminoácidos. (Blackley, 1997). Estes elementos são absorvidos do solo, transportados na seiva e participam de reações que envolvem a biossíntese do látex (Pierre e Jean-Luc, 2003).

O látex é fonte de matéria-prima para a fabricação de vários produtos incluindo luvas, bexigas, preservativos entre outros, e mesmo sendo uma borracha natural, o látex pode causar alergias graves. A alergia ao látex é uma reação do sistema imunológico, mediada por Imunoglobina E (IgE) às proteínas (Hev b 1 a 14) encontradas no látex de borracha natural (Pierre e Jean-Luc, 2003).

A partir do ponto em que se estabelece a relação entre as proteínas e os processos alérgicos, iniciam-se pesquisas por tratamentos de várias formas visando reduzir ou eliminar os efeitos alergênicos das proteínas do látex. As formas testadas utilizam tratamentos com enzimas proteolíticas que hidrolisam ou segmentam as proteínas em resíduos menores e, ao mudar a forma química e/ou a conformação estrutural da proteína, a inativam para suas reações específicas como os processos alérgicos. Também são realizados tratamentos químicos com surfactantes ou detergentes que lavam no todo ou em parte as proteínas do sistema, e com reagentes alcalinos para saponificar as proteínas, o que também pode ter efeito positivo para extinguir ou atenuar o efeito adverso das proteínas. Os processos físicos como a centrifugação, mencionada anteriormente, é realizada para reduzir as proteínas por arraste no soro aquoso.

Algumas manifestações alérgicas, não são causadas pelo látex, mas pelos aditivos químicos, como enxofre, tiurams, carbamatos, mercapto benzotiazoles, aminas e tiocarbonatos utilizados para fabricação de alguns materiais, como por exemplo, as luvas de procedimento comumente utilizadas na área da saúde (Raulf, 2014 e Gawchik, 2011). Estes aditivos não são utilizados na confecção das biomembranas para fins curativos, assim como as amostras desse estudo que foram preparadas com o látex de borracha natural não vulcanizado, apropriado para aplicação biológica.

#### **2.4 Aplicações biomédicas do LN**

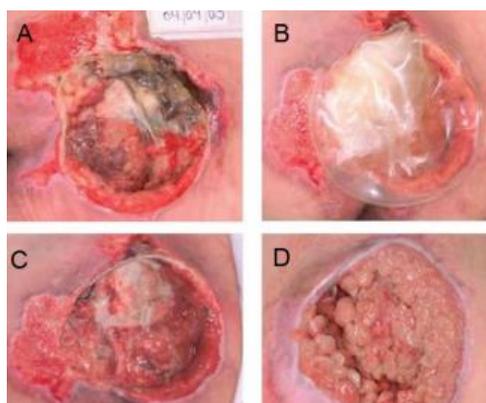
Desde sua descoberta como biomaterial, as membranas de borracha natural, tem sido objeto de vários estudos, sendo suas propriedades físicas e de biocompatibilidade determinadas inicialmente em modelos animais (Frade *et al.*, 2001). Atualmente algumas membranas com este material têm sido empregadas como próteses e enxertos médicos, devido às suas características de biocompatibilidade e estímulo natural à angiogênese (Guryanov *et al.*, 2016).

De acordo com a literatura, o látex da seringueira possui propriedades indutoras de regeneração tecidual, as quais foram constatadas em diferentes estudos, tais como: cicatrização de feridas em tecidos cutâneos (Frade, 2003), reconstituição de membrana timpânica, regeneração de ossos (Herculano *et al.*,

2009; Ereno *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2010) e substituição de alvéolo dental de ratos (Balabanian *et al.*, 2006).

O LN apresenta baixo custo, sem risco de transmissão de patógenos e de grande aplicabilidade clínico-social (Frade *et al.*, 2001). Tais propriedades elevam o potencial de reparação tecidual proporcionando considerável diminuição no tempo do tratamento e recuperação tecidual (Mrué, 2000; Mrué, 1996). Frade *et al.*, 2001, realizaram um estudo de grande impacto social utilizando membranas de látex natural como material indutor da cicatrização de úlceras diabéticas. A Figura 3 mostra uma ferida em estágio avançado de cicatrização após dois meses de uso contínuo da membrana de látex natural.

**Figura 3.** Evolução da cicatrização da úlcera através da aplicação da membrana de látex: A - Aspecto inicial da ferida apresentando grande quantidade de tecido fibroso necrosado; B - Aplicação da membrana de látex natural; C - Ferida apresentando redução do tecido fibroso necrosado; D - Ferida em estágio avançado de cicatrização



Fonte: Frade *et al.* (2001)

Frade *et al.* (2010) pesquisaram possíveis reações alérgicas ao látex e demonstraram que a biomembrana de látex é segura como curativo para úlceras cutâneas, uma vez que não foi observada a indução de reações de hipersensibilidade entre os voluntários de baixo e alto risco submetidos ao “patch test”, nem entre os pacientes ulcerados usuários da biomembrana. Herculano *et al.* (2009), Ereno *et al.* (2010) e Romeira *et al.* (2012), referem que o látex natural é um material biocompatível com inúmeras aplicações, além de apresentar alta resistência mecânica e baixo custo. Atrelado a estas vantagens Alves (2003), mostrou que o látex possui a propriedade de formação de novos vasos

(angiogênese). Embasada nessas razões, Romeira *et al.* (2012) consideram que o látex da *H. brasiliensis* é um excelente material a ser utilizado como matriz sólida para o sistema de liberação prolongada.

O efeito das membranas de látex natural foi avaliada por Spin (2018) sobre feridas em palato originadas da remoção de enxerto gengival em humanos, os resultados obtidos neste estudo não demonstraram diferenças estatística entre o grupo controle e o látex, porém no período de 3 dias pode se observar nas bordas das feridas do grupo látex, um halo esbranquiçado, o que caracteriza um processo comum em fechamento de feridas, onde existe proliferação epitelial na região da injúria, fato que pode estar relacionado com a capacidade angiogênica do látex.

Chagas (2020), estudou as propriedades cicatrizantes de dois biomateriais: o látex natural e o colágeno, criando uma biomembrana alternativa para o tratamento de úlceras por pé diabético e concluiu que as membranas de látex e látex com colágeno apresentaram características que definem um bom curativo e não causaram danos às células humanas.

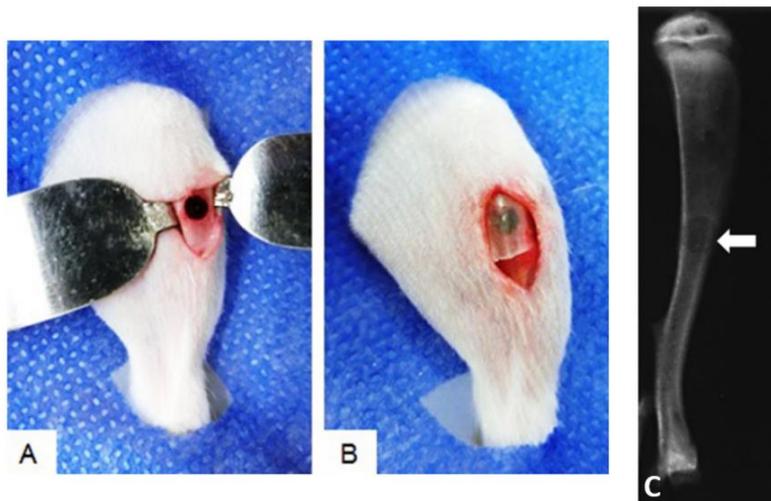
Almeida (2019), relatou que o hidrogel de gengibre amargo é utilizado para a cicatrização de úlceras por pé diabético, evitando a amputação, pois une propriedade anti-inflamatórias, analgésicas e vasodilatadoras.

Pesquisadores também desenvolveram membranas que uniram as propriedades cicatrizantes e antimicrobianas da nanocelulose com as propriedades de desbridamento da bromelina, uma protease encontrada no abacaxi (Ataide *et al.*, 2017).

Trabalhos científicos realizados com a biomembrana natural de látex com polilisina 0,1% em cães com defeito palatino, tornaram conhecidas suas propriedades de favorecimento e aceleração do processo cicatricial, de estimulação da neovascularização, de crescimento tecidual organizado em diferentes órgãos e tecidos e de biocompatibilidade. Silva e Maniscalco, 2013, avaliaram a aplicação da biomembrana de látex em cães com defeito provocado no palato e concluíram que a mesma foi um fator de aceleração do processo de reparo, visto que os animais do grupo controle demoraram mais tempo para ter o defeito totalmente fechado em relação ao grupo controle.

Em outro estudo Carlos, 2017, utilizou a membrana de látex sobre o defeito ósseo, envolvendo a tíbia e protegendo o coágulo sanguíneo autógeno (Figura 4) e concluiu que a utilização das membranas de látex aumentou o volume ósseo neoformado na região do defeito.

**Figura 4.** Defeitos ósseos preenchidos com coágulo de sangue autógeno (A), membrana de látex cobrindo o terço médio da tíbia (B), e radiografia do defeito ósseo na tíbia (C).



Fonte: Carlos, 2017

Ainda sobre a aplicação biomédica do LN estudos recentes têm demonstrado que este material, tornou-se alvo de grande interesse no estudo e desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de substâncias de interesse farmacológico, sendo possível ser empregado como em próteses e enxerto devido a suas características de compatibilidade biológica e ligado ao estímulo natural de promover angiogênese (Garms *et al.*, 2017). A incorporação de compostos terapêuticos nas matrizes de curativo pode proporcionar a liberação sustentada e localizada para a área da lesão (Guerra, *et al.*, 2021)

Herculano, 2011 e Murbach, *et al.* (2014) estudaram a utilização do látex natural como matriz sólida na liberação sustentada de metronidazol e ciprofloxacina, respectivamente.

Borges, *et al.* (2014) e Floriano *et al.* (2018) estudaram a liberação de extrato natural da *Casearia sylvestris* e do cetoprofeno incorporado à matriz de látex natural, respectivamente. Na literatura existem muitos estudos sobre o látex com resultados satisfatórios que permitem a avaliação do seu emprego

experimental em diferentes tecidos, devido as suas propriedades de indução da neovascularização. Existem evidências que sugerem o aumento da vascularização local e a reepitelização das feridas devido a presença de proteínas no látex, conforme relataram Frade *et al.* (2001).

O trabalho desenvolvido por Silva *et al.* (2014) ilustra o potencial da membrana de látex em aplicações de produtos inovadores. Neste trabalho eles desenvolveram uma membrana feita de látex e própolis, um conhecido agente com propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias (Banskota *et al.*, 2001). Os resultados mostraram que a incorporação de própolis nas membranas de látex conservou as características mecânicas compatíveis com os curativos, mostrando efetividade para aplicações biomédicas.

Miranda *et al.* (2018) avaliaram a incorporação e a liberação de peptídeos utilizando a membrana de látex natural. A análise da solução da liberação mostrou novos compostos, indicando a degradação do peptídeo por enzimas contidas no látex. Foi avaliado também a liberação de peptídeo com sequências menores e a degradação não foi observada. Os resultados encontrados indicaram que o uso da membrana natural de látex como matriz sólida de sistema de liberação de peptídeos são dependentes das sequências e devem ser avaliados para cada sequência.

Floriano *et al.* (2017), utilizaram membranas de látex para liberação de cetoprofeno, um analgésico com potente atividade anti-inflamatória. Os resultados constataram que houve liberação de 60% do cetoprofeno incorporado em 50h, concluindo ser um sistema promissor de liberação de medicamentos que pode ser utilizado para minimizar os efeitos colaterais adversos da alta dose da entrega de drogas sistêmicas.

O extrato de barbatimão foi testado por Borges *et al.* (2015), usando a membrana de látex como sistema de liberação, sendo possível concluir que a liberação dependeu da concentração final da solução do extrato.

Outro estudo realizado por Marcelino *et al.* (2018), elaboraram membranas de látex com fluconazol incorporado, afim de estudar sua interação, liberação e suscetibilidade antifúngica contra *Candida albicans*. Os resultados mostraram que a membrana foi capaz de liberar o fluconazol e inibir o crescimento de *C. albicans*.

Tanaka *et al.* (2021), desenvolveram um curativo a base de sulfadiazina de prata e látex natural. O curativo mostrou-se biocompatível, aumentando a proliferação celular e liberando 32,4% da sulfadiazina em 192 h.

Um adesivo natural de látex e glicerol foi desenvolvido por Barros *et al.* (2019), para a diminuição da dor e das fissuras no mamilo durante a lactação. O material desenvolvido apresentou alta capacidade de umidade e densidade de poros e biocompatibilidade nos testes realizados com cultura celulares.

Outro teste realizado por Borges *et al.* (2022) com potencial para reparo de feridas, demonstraram o uso do látex incorporado com o antibiótico metronidazol e nanopartícula de ouro, promissor para aplicações dérmicas.

## **2.5. Engenharia tecidual no reparo de lesões cutâneas**

A engenharia de tecidos é um dos campos da medicina regenerativa que utiliza métodos para promover o crescimento de células através da manipulação de biomateriais, artificiais ou naturais, que forneçam o suporte para o crescimento controlado em diferentes tipos de tecido. Fundamentalmente, os biomateriais devem fornecer um ambiente que favoreça a interação celular; corresponder a uma matriz permeável que permita difusão de nutrientes, gases e metabólitos; e ainda, suporte mecânico, para a reposição e regeneração do tecido (Serpooshan *et al.*, 2010).

Os biomateriais devem exibir características como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de formatação, nenhuma reação imunogênica e força estrutural adequada. Vários biomateriais vêm sendo empregados como alternativas para o reparo tecidual e nesta terapêutica estão os polímeros, os quais merecem destaque, os de origem naturais. Alguns exemplos de biomateriais naturais incluem os polipeptídios, hidroxiapatita, ácido hialurônico, glicosaminoglicanas, fibronectina, colágeno, gelatina, metacrilato de gelatina (GelMA), quitosana e alginato.

Esses materiais têm a vantagem de ser de baixa toxicidade e baixa resposta inflamatória e podem ser combinados em compósitos com outro material natural ou material sintético, podendo ser degradados naturalmente pelas enzimas (Chen *et al.*, 2004). Como já descrito, o látex e/ou suas frações vem sendo aplicado na medicina como constituinte de biomateriais para o uso

terapêutico e em 1998, a biomembrana de látex (BML) surgiu como elemento promissor, pois além do baixo custo de obtenção, a BML possui características físico-químicas que auxiliam na cicatrização. Especificamente, Pegorin *et al.* (2022) caracterizou o soro látex natural por técnicas físico-químicas e investigou a biocompatibilidade por ensaios toxicológicos e teste de segurança em larvas de *Galleria mellonella*. Além disso, os pesquisadores observaram um efeito proliferativo pronunciado em células de fibroblastos que pode ser explicado pela presença do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) como proteína revelada pelo teste de Western blot (Pegorin *et al.*, 2022). A Figura 5 mostra a aplicação do soro do látex em diferentes concentrações nos animais alternativos, em diferentes dias, onde esse aparato é interessante para triagem de novos biomateriais.

**Figura 5.** Aparência visual da avaliação da toxicidade de soro de látex em larvas de *G. mellonella* em três concentrações (3, 5 e 10 mg/kg) após 11 dias.



Fonte: Pegorin *et al.* (2022)

## 2.6. Angiogênese e Fatores de Crescimento

A formação de novos vasos se dá através da vasculogênese ou da angiogênese. Na primeira, a formação de novos vasos surge a partir de hemangioblastos, células precursoras das células endoteliais, a segunda decorre de vasos sanguíneos pré-existentes, ocorrendo por quatro mecanismos diferentes: brotação, intussuscepção (divisão de estrutura vascular pré-

existente), alongação/ampliação e por incorporação das células precursoras das células endoteliais nas paredes dos vasos sanguíneos. Sua regulação ocorre por meio de moléculas pró-angiogênicas e anti-angiogênicas (Chung, 2011). Como exemplo destas moléculas temos a angiopoetina (Angpt-1), através da interação com seu receptor (Tie-2), neutraliza a vaso dilatação enquanto a angiopoetina 2 (Angpt-2) desestabiliza a matriz extracelular através da degradação parcial, bem como a ativação proteolítica de fatores de crescimento (Carmeliet, 2000).

A indução da angiogênese se deve a fatores como hipóxia, pH ácido, estímulos hormonais entre outros, resultando na síntese de fatores de crescimento e citocinas que são liberados na matriz extracelular migrando em direção às células endoteliais (Chung, 2011).

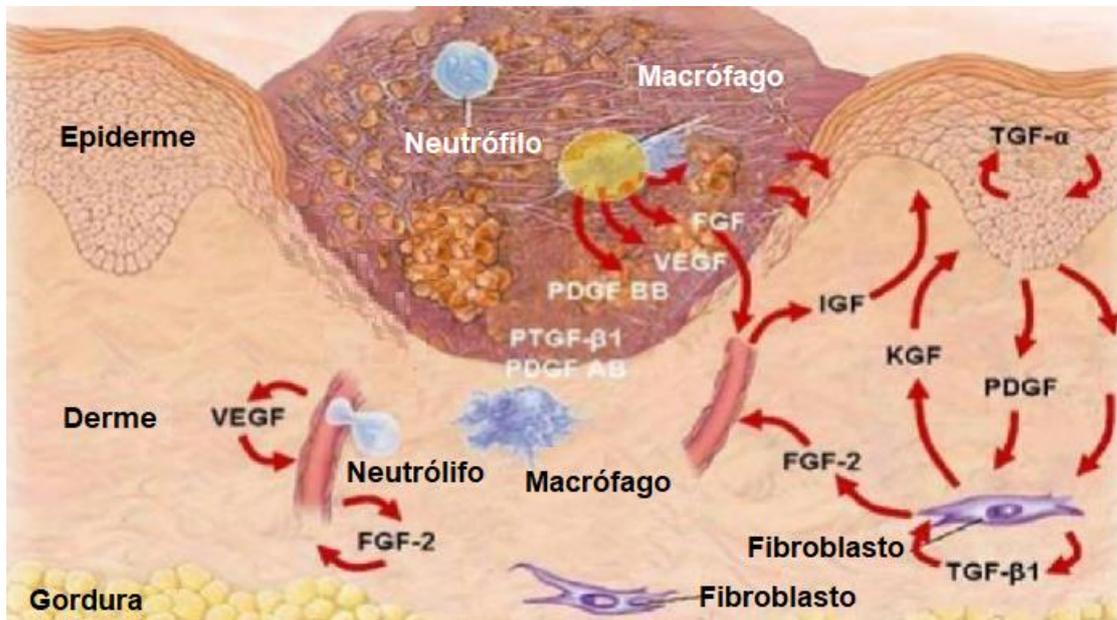
Fatores de crescimento são proteínas produzidas por células do tecido e são responsáveis pelo fenômeno conhecido por “Comunicação Celular” promovendo a proliferação, diferenciação e quimiotaxia, induzindo a migração de variadas células. Graças a esta “comunicação química” existente entre as células que o tecido desempenha a sua função.

Essas proteínas regulam direta e externamente o ciclo celular, ligando-se a receptores localizados na membrana plasmática de células epiteliais, tais como os macrófagos, fibroblastos e queratinócitos, provocando uma cascata bioquímica que além de produzirem os fatores de crescimento também são ativadas por eles, atuando assim de forma autócrina ou parácrina (Vermolena *et al.*, 2006; Balbino *et al.*, 2005).

Muitos fatores de crescimento existem em várias isoformas, com diversos tipos de receptores presentes nas feridas, o que aumenta a complexidade de suas funções. Os fatores de crescimento são capazes de induzir efeitos em múltiplos tipos de células e provocam uma série de funções biológicas em diversos tecidos.

O efeito sinérgico de diferentes fatores tem uma consequência positiva na cicatrização (Metha e Fitzpatrick, 2007). De acordo com Lorenz e Longaker (2006), o fator de crescimento (Figura 6), tem efeito benéfico no processo de cicatrização acelerando as taxas de cura em feridas normais ou, em alguns casos, em feridas de difícil cicatrização, como as feridas diabéticas (Man; Winland; Plosker, 2001).

**Figura 6.** Mecanismos de comunicação celular promovido por fatores de crescimento



Fonte: Cesaretti (1998)

Os fatores de crescimento se depositam na matriz extracelular de tecidos normais na forma latente. Quando ocorre a lesão e a matriz é destruída, os fatores são liberados na forma ativada e, assim, ajudam no início e na regulação do processo de reparo, portanto a importância, também, da matriz extracelular na regeneração das feridas (Marx, 2004).

Através do envelhecimento e por decorrência de algumas doenças, a produção de fatores de crescimento é diminuída e, com ela, a fisiologia do tecido.

Vários peptídeos com papel de fator de crescimento relacionados à angiogênese já foram purificados, entre eles o fator ácido de crescimento de fibroblastos (aFGF), o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), a angiogenina, o fator endotelial II derivado das plaquetas (PD-ECGF), o fator induzido por hipóxia (HIF-1), o fator de transformação do crescimento  $\alpha$  e  $\beta$  (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ), o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), o fator de crescimento epidérmico (EGF), a interleucina 1 (IL-1), a interleucina 2 (IL-2), o fator de cicatrização/fator de crescimento do hepatócito (SF/HGF) e o fator de permeabilidade vascular (VPF),

atualmente chamado de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Paques, 1997).

Um dos principais fatores responsáveis pela angiogênese, com importante ação na proliferação, sobrevivência e migração celular, além de mediar a permeabilidade vascular é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores (Pinho, 2005).

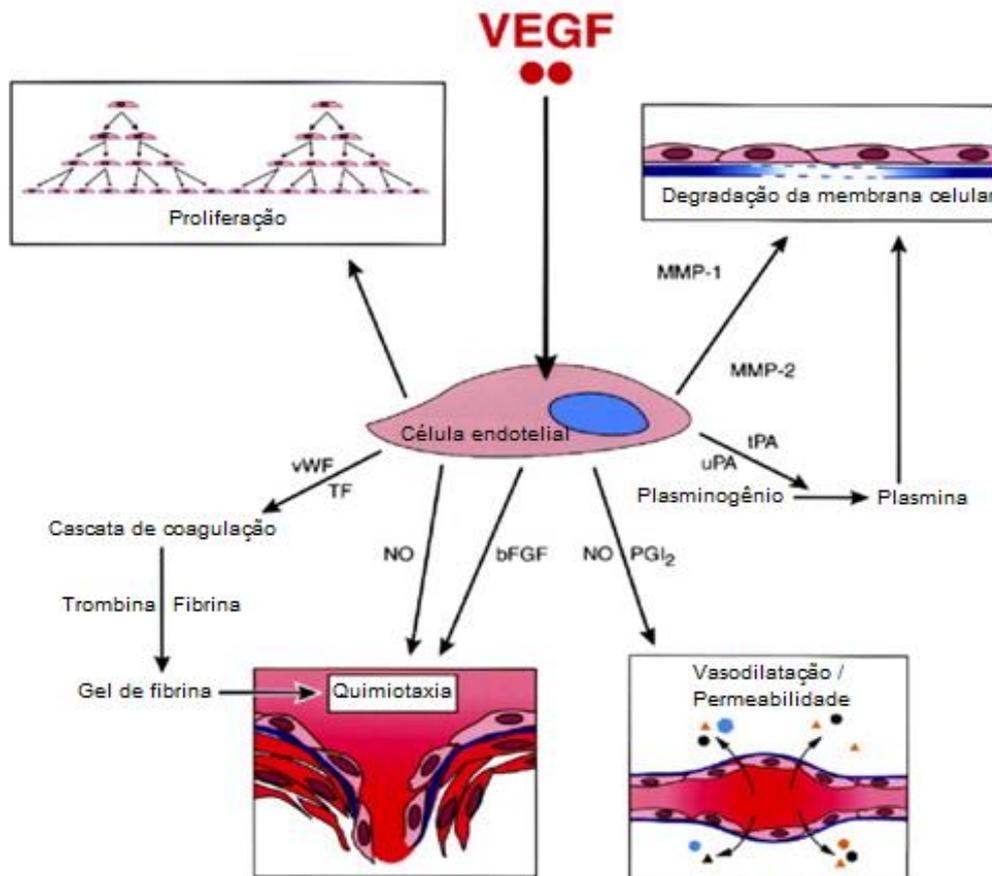
## **2.7. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)**

O VEGF foi um dos primeiros fatores angiogênicos a serem identificados e acredita-se ser o principal regulador da angiogênese, com ação específica para células endoteliais.

Em 1983, Harold Dvorak e colaboradores foram os primeiros a identificar esta glicoproteína por meio da purificação de células tumorais, ao perceberem que esta melhorava a permeabilidade celular, sendo chamada de fator de permeabilidade vascular (VPF). Posteriormente, em 1989, Ferrara e Henzel identificaram a mesma proteína da qual Ferrara já tinha purificado e sequenciado em meio condicionado com células pituitárias bovinas e relataram que ocorreu a proliferação das células endoteliais vasculares. Em 1990, ficou claro que as duas proteínas eram a mesma, passando a ser denominada fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Roskoski, 2007).

Como um potente fator de permeabilidade, o VEGF promove extravasamento do fibrinogênio plasmático, levando a formação de escadas de fibrina (Figura 7) que facilita a migração celular durante invasão. Como um fator de crescimento endotelial, o VEGF estimula a proliferação de células endoteliais, induzindo o brotamento de novos vasos sanguíneos (Kaseb, 2009).

**Figura 7.** Mecanismo do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na cicatrização de feridas



Fonte: Philip, 2009

A formação de novos vasos sanguíneos é iniciada por condições de hipóxia ou isquemia. Os baixos níveis de oxigênio levam ao acúmulo de Fatores Induzidos por Hipóxia (HIF-1) que estimulam a expressão de fatores de crescimento angiogênico (Lee *et al.*, 2001). A família VEGF é composta de sete glicoproteínas; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e o fator de crescimento placentário. São mediados por três receptores transmembrana tirosina quinase, conhecidos como VEGFR (receptor do fator de crescimento endotelial vascular) denominados: VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase 1 ou Flt1), VEGFR-2 (fetal liver kinase, Flk1 ou KDR), VEGFR-3 (fms-like tyrosine kinase 4 ou Flt4) (Ferrara, 2003). Os dois primeiros são expressos predominantemente em células endoteliais vasculares e o VEGFR-3 é expresso principalmente em células endoteliais linfáticas. As neutrofilinas 1 e 2 (NRP- 1 e 2) também agem como receptores para alguns membros da família do VEGF (Capp, 2009).

A função principal que ambos os receptores (VEGFR-1 e VEGFR-2) possuem no desenvolvimento do sistema vascular foi demonstrada em cobaias, em estudos desenvolvidos no Instituto Samuel Lunenfeld em Toronto, no ano de 1995. Através dessas pesquisas, pode-se observar que a eliminação dos genes relacionados a ambos os receptores Flt-1 ou Flk-1 em cobaias resultou em letalidade embrionária (Ferrara, 2002).

Os vários membros da família VEGF tem diferentes afinidades de ligação com cada receptor. O VEGF-A é o fator chave na indução da angiogênese, que através da ligação ao receptor VEGFR-2 leva ao aumento da permeabilidade vascular (Miyazawa, 2007).

O VEGF-B é expresso no coração e musculatura esquelética, acredita-se que seja importante no desenvolvimento cardíaco além de regular a biodisponibilidade do VEGF-A competindo pelo receptor VEGFR-1 e NRP-1, ao qual se liga (Roskoski, 2007).

O VEGF-C se liga com o VEGFR-3 e com o VEGFR-2, promovendo também a angiogênese (Miyazawa, 2007).

O VEGF-D também se liga ao receptor linfático VEGFR-3, induzindo a linfangiogênese. Além disto, promove a disseminação de células tumorais para os linfonodos (Young, 2008).

O VEGF-E conecta-se com o VEGFR-2, in vitro estimulando a quimiotaxia e mitose celular, in vivo induz a angiogênese e aumenta a permeabilidade vascular (Roskoski, 2007). O fator de crescimento mais recentemente descoberto é o VEGF-F, proveniente do veneno de cobra, este fator se liga somente com o VEGFR-2 e aumenta em até cinco vezes a permeabilidade vascular (Matsunaga, 2009).

O VEGF, como citado previamente, poder ser induzido por vários fatores, sendo a concentração celular de oxigênio um dos principais. Na vigência de hipóxia, ocorre o aumento da quantidade de VEGF, de glóbulos vermelhos e fornecimento de oxigênio (Roskoski, 2007). A hipóxia induz a síntese de VEGF através do fator indutor de hipóxia (HIF). HIFs são fatores de transcrição heterodimérico composto por duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ . A subunidade HIF-1 $\alpha$  é regulada pelos níveis teciduais de oxigênio, sendo mantido em baixa quantidade em condições normais (Chung, 2011).

A formação de vasos sanguíneos requer uma ativação coordenada de vários mediadores, no entanto a hiper expressão do VEGF-A resulta em vasos anormais, tortuosos, frágeis, com propensão a sangramento e exsudação (Bondke, 2011).

Além da hipóxia, vários fatores regulam a expressão do VEGF, entre eles, os fatores de crescimento PDGF (Muniz, 2009), o EGF (Raiser *et al.*, 2009), o TGF- $\beta$  e também prostaglandina E (Simo, 2008).

## **2.8. Fator de Crescimento fibroblástico (FGF)**

Os fatores de crescimento fibroblásticos (FGF – fibroblast growth factor) regulam uma infinidade de processos no desenvolvimento, incluindo o desenvolvimento embriológico, homeostase e processos regenerativos (Marie, 2003).

A família dos FGF é composta de 22 membros estruturalmente relacionados (Ornitz, Itoh, 2001). Os FGFs possuem como característica a interação destes com a heparina e proteoglicanos que os estabiliza da desnaturação térmica, proteolítica e limita a sua difusibilidade. Esta interação é ainda essencial para a sinalização de seus receptores (Ornitz, 2000).

Dentre todos os FGFs, aqueles que vem demonstrando maior potencialidade de participação no processo de reparo são FGF1, FGF2, FGF4, FGF7 e o FGF10 (Abraham, Klagsbrun, 1996). Em lesões por queimaduras em ratos, foi detectada a imunorreatividade na regeneração da epiderme para o FGF2, acompanhada de formação de tecido de granulação e renovação capilar (Kibe *et al.*, 2000). Este fator foi também detectado nas margens de queimaduras em humanos.

Diferentemente do VEGF, o FGF-2 tem ação pleiotrópica, estimulando o crescimento tanto de células endoteliais, como de células da musculatura lisa, fibroblastos e células tumorais (Folkman, 1992). Além de estimular o crescimento, esse fator pode degradar a membrana basal pela ativação de collagenases, gelatinases e proteases (Mignatti, 1989).

A demonstração da participação do FGF7 no processo de reparo foi feita por Guo *et al.* (1996). Posteriormente, foi verificado que seu RNAm era

predominantemente detectado em fibroblastos da derme e em tecido de granulação de humanos e de camundongos (Marchese *et al.*, 1995).

Os FGFs se ligam e ativam 4 tipos de receptores tirosino Kinase (Givol, Yayon, 1992), designados como receptores de alta afinidade ao FGF (FGFRs). O gene de cada um dos quatro FGFRs (FGFR 1 - 4) pode sofrer splicing alternativo, dando origem a uma série de possíveis isoformas de FGFRs, com afinidade variadas pelos vários FGFs.

## **2.9. Fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) e fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ 1)**

O fator de crescimento transformador alfa (TGF- $\alpha$ ) é secretado pelas plaquetas, macrófagos e células epidérmicas e é responsável pela angiogênese e epitelização (Campos, 2007). O fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) constitui a superfamília de mediadores locais que regulam a proliferação e as funções das células, sendo produzidos por plaquetas e macrófagos. O TGF- $\beta$  é responsável pela ativação dos fibroblastos a produzirem colágeno e a transformarem-se em miofibroblastos que promovem a contração da ferida (Abegão, 2014). Em mamíferos, a subfamília TGF- $\beta$  é composta por três isoformas, denominadas TGF-  $\beta$ 1, TGF-  $\beta$ 2 e TGF-  $\beta$ 3.

Dos fatores transformadores de crescimento, TGF-  $\beta$ 1 é o mais importante fator envolvido na reparação, pois é regulado pelas células recrutadas para o sítio da injúria. Juntamente com algumas citocinas antiinflamatórias, o TGF-  $\beta$ 1 estimula subunidades de integrinas que facilitam a migração das células que vão iniciar a diferenciação celular relacionadas com o reparo do tecido afetado (Bernabeu, 2009).

A importância do TGF-  $\beta$ 1 na manutenção da homeostasia tecidual foi demonstrada por D'Souza *et al.* (1990), em um estudo empregando camundongos knockout para este fator de crescimento. Uma vez adultos, pôde ser observada nos dentes destes animais a presença de inflamação e necrose difusas tanto em um tecido como em outro, além de um desgaste por atrição acentuado.

Todos os membros da família TGF-  $\beta$  se ligam a receptores de superfície celular tipo I e II (TBR1 e TBR2) que por sua vez formam complexos

heteroméricos na presença de ligantes dimerizadores. São descritos sete TBRI, também nomeados ALKs (activin-like receptor kinases), bem como cinco TBRII (Shi e Massague, 2003). Os ligantes solúveis se ligam primeiramente ao TBRII, que é constitutivamente ativo. Em seguida, ocorre a incorporação de TBRI com sua consequente fosforilação formando um complexo ligante-receptor ativado (Kang *et al.* 2009). Na sequência, o TBRI ativado fosforila moléculas efetoras downstream denominadas Smads. Esta família de proteínas é responsável pela sinalização intracelular de TGF-  $\beta$ . Os membros desta família são bem conservados e classificados em três grupos: (i) R-Smads (Smads associadas a Receptor), (ii) Co-Smads (Smads Cooperadoras) e (iii) I-Smads (Smads inibitórias) (Huminięcki *et al.*, 2009).

## **2.10 Fisiopatologia da reparação tecidual**

A reparação tecidual é um processo complexo, que envolve a organização de células, os sinais químicos e a matriz extracelular. Com o rompimento da integridade tecidual, logo se inicia o processo de reparo, que compreende uma sequência de eventos moleculares e celulares que objetivam restaurar o tecido lesado. Só durante a fase fetal o reparo de lesões se dá sem a formação de cicatriz, ocorrendo perfeita restauração do tecido pelo processo de neoformação tecidual. Após o nascimento, o organismo se torna limitado, e em algumas situações, desencadeia a formação da cicatriz após o reparo (Mendonça e Coutinho-Netto, 2009).

Os mecanismos da cicatrização em sequência ordenada de eventos foram descritos por Carrel em 1910, e divididos posteriormente em cinco elementos principais: inflamação, proliferação celular, formação do tecido de granulação, contração e remodelamento da ferida (Balbino & Pereira, 2005).

Há trabalhos que dividem as fases de cicatrização em três ou quatro fases. Recentemente, Clark reclassificou esse processo em três fases divididas, didaticamente, em: fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e fase de remodelamento ou de maturação (Campos *et al.*, 2007), descritas a seguir.

### **2.10.1 Fase de inflamação**

Após a ocorrência do ferimento, inicia-se a fase inflamatória, com o extravasamento sanguíneo que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas (Werner e Grose, 2003). As lesões capazes de atingir profundamente o tecido cutâneo desencadeiam um reflexo axônico que leva a vasoconstrição transitória com oclusão dos vasos injuriados. Passados alguns minutos, ocorre a vasodilatação e exsudação dos componentes plasmáticos não celulares através dos espaços entre as células endoteliais.

O principal componente desse fluido é a fibrina, que tem a função de preencher os espaços teciduais, formando um tampão na tentativa de controlar a hemorragia (Peacock, 1984) e formar uma barreira contra a invasão de microorganismos. O coágulo estabiliza as bordas da ferida e organiza uma matriz provisória necessária para a migração celular (Raiser, 2000; Werner e Grose, 2003). Essa matriz servirá também, como reservatório de citocinas e fatores de crescimento que serão liberados durante as fases seguintes do processo cicatricial (Werner e Grose, 2003).

A resposta inflamatória, que perdura cerca de três dias, na qual ocorre a migração sequencial das células para a ferida é facilitada por mediadores bioquímicos que aumentam a permeabilidade vascular, favorecendo a exsudação plasmática e a passagem de elementos celulares para a área da ferida. Os mediadores bioquímicos de ação curta são a histamina e serotonina e os mais duradouros são a leucotaxina, bradicinina e prostaglandina. A prostaglandina é um dos mediadores mais importantes no processo de cicatrização, pois além de favorecer a exsudação vascular, estimula a mitose celular e a quimiotaxia de leucócitos. Os primeiros elementos celulares a alcançar o local da ferida são os neutrófilos e os monócitos, com a função de desbridar as superfícies da ferida e fagocitar as partículas antigênicas e corpos estranhos. O pico de atividade dos polimorfonucleares ocorre nas primeiras 24-48 horas após o trauma, seguindo-se por maior aporte de macrófagos durante os dois a três dias seguintes.

O macrófago ativado é a principal célula efetora do processo de reparo tecidual, degradando e removendo componentes do tecido conjuntivo danificado,

como colágeno, elastina e proteoglicanas. Além desse papel na fagocitose de 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 (Emining *et al.*, 2007). Os macrófagos produzem vários fatores de crescimento, tais como o PDGF, o TGF- $\beta$ , 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 e ativam os elementos celulares das fases subsequentes da cicatrização tais como fibroblastos e células endoteliais (Mencia-Huerta, 1993).

### **2.10.2 Fase de proliferação**

A fase de proliferação e reparo é caracterizada pelo aumento de fibroblastos que migram para o interior do ferimento para sintetizar e depositar colágeno, elastina e proteoglicanos. Esta fase inicia-se por volta do 3º dia após a lesão, perdura por 2 a 3 semanas e é o marco inicial da formação da cicatriz. Compreende: reepitelização, que se inicia horas após a lesão, com a movimentação das células epiteliais oriundas tanto da margem como de apêndices epidérmicos localizados no centro da lesão; fibroplasia e angiogênese, que compõem o chamado tecido de granulação responsável pela ocupação do tecido lesionado. Os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular, enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (Singer, Clark, 1999).

A necessidade de oxigênio para movimentação, migração celular e síntese proteica é responsável pelo brotamento e crescimento neovascular da periferia para o centro da ferida (Raiser, 2000).

A rede vascular se mantém quiescente, porém com a capacidade de iniciar a angiogênese, principalmente durante a cicatrização (Li *et al.*, 1999). A angiogênese está presente em todo o processo de reparação, independente do tecido acometido pela injúria. É reconhecido como um fenômeno de grande importância para a reparação dos tecidos. Os principais fatores estimuladores

envolvidos são fatores de crescimento de células endoteliais e alguns fatores quimiotáticos (Mrué, 2000).

A indução da angiogênese foi inicialmente atribuída ao FGF (Fator de crescimento Fibroblástico) e subsequentemente, muitas outras moléculas foram identificadas como angiogênicas, incluindo o VEGF, o TGF- $\beta$ , a angiogenina, a angiotropina e a angiopoetina-1. Além disso, a baixa tensão de oxigênio e elevados níveis de ácido lático e aminas bioativas, ativam o macrófago para a produção de fatores de crescimento, estimulando a angiogênese. Estudos revelam que tecidos isquêmicos e acometidos pela hipoxemia arterial, ou seja, baixa concentração de O<sub>2</sub> no sangue apresentam atraso no processo de cicatrização. Dessa forma, a hipóxia tecidual controlada na superfície da ferida parece ser fundamental para a angiogênese e, conseqüentemente, para uma cicatrização efetiva. Muitos autores demonstraram que o fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1  $\alpha$ ), é um importante componente para a fechamento das feridas cutâneas. (Garret *et al.*, 1990)

Muitas proteínas parecem induzir a angiogênese de forma indireta, estimulando a produção de FGF e VEGF por macrófagos e células endoteliais, indutores diretos da angiogênese (Mendonça e Coutinho-Netto, 2009).

A nova rede vascular expande-se para o centro da lesão, dando à cavidade lesional uma aparência rosada, chamada de tecido de granulação. À medida que o fluxo sanguíneo e a oxigenação são restabelecidos, o principal fator desencadeador da angiogênese é reduzido e os vasos neoformados começam a diminuir (Neto, 2003).

O tecido de granulação consiste primariamente em vasos sanguíneos invasores, fibroblastos e produtos de fibroblastos, incluindo o colágeno fibrilar, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanos sulfatadas e não sulfatadas, e proteases. O tecido de granulação é produzido três a quatro dias após a lesão, como um passo intermediário entre o desenvolvimento da malha formada por fibrina e fibronectina e a síntese e reestruturação de colágeno.

### 2.10.3 Fase de maturação

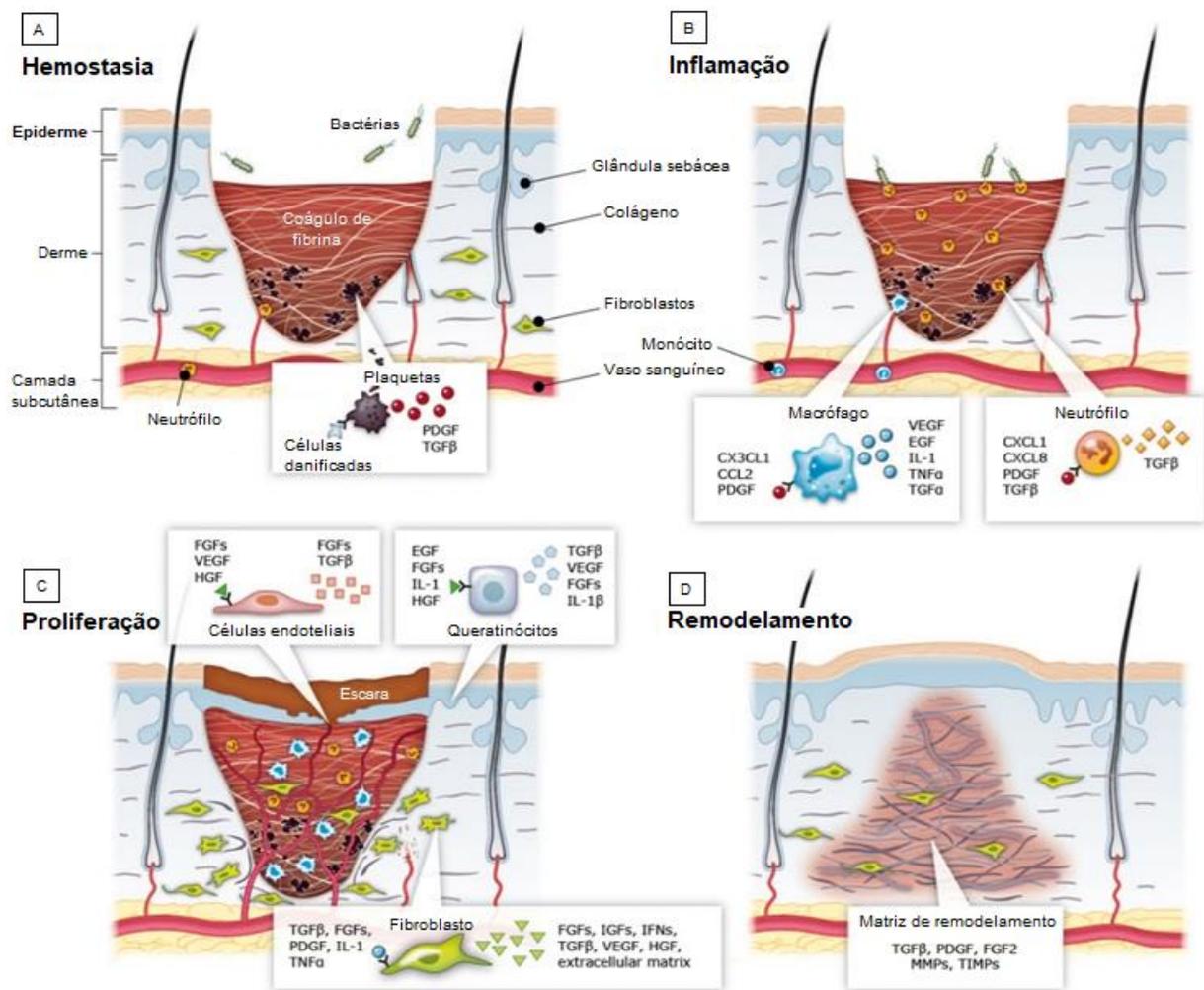
A última fase do processo cicatricial é a maturação que começa entre duas e três semanas após a lesão. Nela está envolvida uma série de fatores, como a contração da ferida e a remodelação da matriz de colágeno. Uma vez que a superfície provisória de células epiteliais é formada, a migração epitelial é interrompida devido à inibição por contato (Raiser, 2000).

O fechamento ocorre por contração das paredes que margeiam a lesão. Essa ação é realizada pelos fibroblastos ativados, os quais se diferenciam para miofibroblastos, que aproximam as margens da ferida, forçando as fibras de colágeno a se sobrepor e se entrelaçar e, desta maneira, conferem o suporte para a diminuição da lesão, que é influenciado pelo tamanho inicial da ferida, formato, espessura dos tecidos circunvizinhos e forças externas, como movimento (Bojrab, 1982). Caso, o volume ou integridade tecidual sejam reduzidos, a contração pode ser insuficiente para fechar a ferida, resultando em granulação exuberante ou em superfície epitelial prematura. Nesses casos, deve-se lançar mão do uso de enxertos ou implantes, para orientar as bordas da ferida e facilitar a cicatrização (Neto, 2003).

Muitas variáveis tanto de ordem geral como de ordem local também podem influenciar esse longo e complexo processo cicatricial. Dos fatores gerais, interferem a idade, o estado nutricional, alterações cardiovasculares e utilização de drogas sistêmicas. Dos fatores locais podem interferir: o ambiente mais ou menos contaminado no qual ocorre a ferida, infecção sistêmica concomitante, uso de drogas imunossupressoras tóxicas e ressecamento do leito da ferida (Mandelbaun *et al.*, 2003).

Por fim, Sun *et al.* (2014) descreveu os avanços na enxertia de pele e tratamento de feridas cutâneas, na qual relata que as fases de proliferação são divididas em quatro estágios: Hemóstase, inflamação, proliferação e modelagem. A Figura 8 mostra as fases da cicatrização, as linhagens celulares e os fatores de crescimento.

**Figura 8.** Detalhamento das fases de cicatrização, com fatores de crescimento e linhagens celulares.



Fonte: Sun *et al.* (2014)

## 2.11 Mecanismos Antioxidantes

Estudos para determinação da capacidade antioxidante são cruciais para avaliação de produtos naturais bem como para o entendimento das interações entre oxidantes e espécies reativas de oxigênio. Muitos estudos têm avaliado o potencial antioxidante de compostos fenólicos, os quais se destacam em relação a outras classes de produtos naturais por neutralizar os danos oxidativos. Os danos podem ocorrer quando há um desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e sua eliminação através dos sistemas antioxidantes. Esse desequilíbrio pode ocorrer quando ocorre a depleção dos sistemas antioxidantes

de defesa, resultando em lesões oxidativas a macromoléculas e diversas estruturas celulares que, se não forem reparadas, alteram a funcionalidade das células, tecidos e órgãos (Cotinguiba *et al.*, 2013).

As propriedades antioxidantes de substâncias de origem natural apresentam várias perspectivas relacionadas ao cuidado da saúde humana.

Embora não seja comum a utilização de plantas medicinais como antioxidantes, suas propriedades terapêuticas podem ser em parte devido a capacidade que elas apresentam de neutralizar as espécies reativas de oxigênio envolvidas no desenvolvimento de enfermidades para as quais as plantas são indicadas (Desmarchelier *et al.*, 1999).

Espécies vegetais podem apresentar uma ampla variedade de moléculas capazes de inativar radicais livres, tais com compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides, quinonas, cumarinas, taninos, etc), compostos nitrogenados (alcalóides, aminas), vitaminas (E, C), terpenóides (carotenóides), bem como muitos outros metabólitos endógenos que exercem ação antioxidante. Existe uma relação direta entre a atividade antioxidantes e o conteúdo de substâncias fenólicas em plantas (Velioglu *et al.*, 1998).

Heim *et al.* (2002), sugerem que a capacidade antioxidante de compostos fenólicos é induzida principalmente por causa da localização de radicais hidroxila e de ligações duplas.

## **2.12 Importância da avaliação da hemocompatibilidade e citocompatibilidade**

Os ensaios de citocompatibilidade e hemocompatibilidade são ferramentas essenciais na determinação da segurança associada ao uso de um determinado biomaterial em diferentes tecidos ou órgãos.

A integração com os tecidos e a capacidade de funcionalização com diferentes ambientes biológicos são características importantes para os dispositivos biomédicos, pois minimizam efeitos adversos. Avaliar as relações entre as propriedades dos materiais e as reações que elas induzem, podem ajudar a prever respostas precoces e efeitos a longo prazo. Com essa finalidade são realizados ensaios *in vitro* por meio de cultura celular utilizando os

biomateriais. Por meio da cultura celular é possível avaliar parâmetros como citocompatibilidade, toxicidade, adesão, proliferação celular, dentre outros. Ensaio com sangue (avaliação de hemocompatibilidade) e bactérias também ajudam a realizar uma melhor caracterização dos biomateriais, pois estão diretamente relacionados a outros efeitos indesejados como a formação de trombos e colonização de microrganismos na superfície desses materiais (Pulyala *et al.*, 2017).

### **2.13 PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR) para análise da expressão dos genes em estudo**

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) está sendo amplamente utilizada para investigação biológica, sendo extremamente útil na determinação da expressão gênica. Os crescentes estudos de análise de expressão gênica, em diversas espécies sob condições experimentais específicas, vêm propiciando o acúmulo de informações que permitem o melhor entendimento de processos celulares e fisiológicos. A qPCR distingue-se dos outros métodos disponíveis para a expressão do gene em termos de precisão, sensibilidade e resultados rápidos, sendo estabelecido como o padrão ouro para a análise de expressão gênica. Essa tecnologia pode ser aplicada para estudos além da expressão gênica, como: microRNAs, análise de SNPs, mutações pontuais relacionadas a doenças, mecanismos imunes e de processos metabólicos dos organismos em geral. Dessa forma as frações F1 e soro do látex, em estudo, foram avaliadas por meio de análise de expressão dos genes associados à angiogênese.

### **2.14 Testagem de novos biomateriais em animais alternativos**

Apesar de todos os esforços na busca de métodos alternativos ao uso de animais para experimentação, os testes *in vivo* ainda apresentam importância para determinar a segurança da aplicação de biomateriais, desde que executados respeitando os preceitos e normas vigentes para experimentação animal.

Dadas as discussões a respeito de diretrizes e da legislação sobre animais de experimentação, o Brasil aprovou a Lei no 11.794 de 8 de outubro de

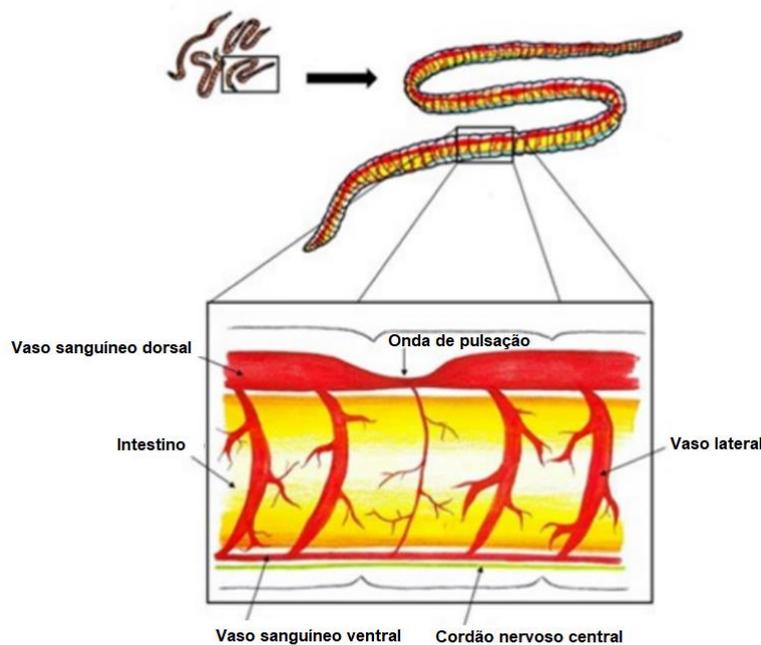
2008, conhecida como “Lei Arouca” que regulamenta o uso de animais em pesquisas científicas no país. Contudo, no Brasil como em outros lugares, um dos maiores desafios para os formuladores de políticas públicas é a harmonização das disposições legais, sem prejudicar a pesquisa (FILIPECKI *et al.*, 2011).

Desta forma, ratos (utilizados geralmente para se investigar o sistema imunológico), coelhos (submetidos a testes cutâneos e oculares, além de outros procedimentos), gatos (que servem sobretudo às experiências cerebrais), cães (normalmente destinados ao treinamento de cirurgias), rãs (usadas para testes de reação muscular e principalmente, na observação didática escolar), macacos (para análises comportamentais, dentre outras coisas), porcos (cuja pele frequentemente serve de modelo para o estudo da cicatrização), cavalos (muito utilizados no campo da sorologia), pombos e peixes (que se destinam, em regra, aos estudos toxicológicos), dentre outras várias espécies, são animais que servem como modelo experimental do homem. Outro organismo utilizado em testes para estudar o sistema circulatório e os efeitos colaterais das drogas, são os Blackworms (*Lumbriculus variegatus*), uma espécie de verme Oligoqueta.

Os oligoquetas aquáticos têm uma longa história de uso em bioensaios, pois provavelmente foram os organismos coletados por Aristóteles e os primeiros a serem utilizados, por ele, em testes de toxicidade, quando bioensaios rudimentares foram conduzidos para verificar o efeito da água salgada nesses organismos (Chapman, 2001). A utilização desse grupo em estudos de avaliação de impacto ambiental cresceu muito e já nas últimas décadas, com o aprimoramento da ecotoxicologia, esses animais passaram a ter grande potencial para serem utilizados como organismos testes.

Seeley *et al.* (2021) usaram *L. variegatus*: como um novo organismo de invertebrado (in vivo) para estudos farmacológicos, onde ensaios comportamentais foram realizados para medir o efeito de drogas sobre a capacidade de movimentação dos Blackworms. Adicionalmente, Ryan e Elwess (2017) também examinaram a influência de fármacos nas taxas de pulsações desses organismos em diferentes níveis de concentrações (Figura 9), além de duas novas formas de avaliar os Blackworms ao microscópio.

**Figura 9.** Imagem da seção transversal lateral dos Blackworms para verificação das ondas de pulsações



**Fonte:** Ryan, 2017

De acordo com Warren *et al.* (1998), Chironomidae e Oligoqueta são os táxons mais indicados para se avaliar os efeitos de contaminantes no ambiente, pois sua exposição a produtos químicos não se dá apenas pela coluna d'água, mas também pela ingestão do sedimento.

### **2.15 Características gerais dos Blackworms (*Lumbriculus variegatus*)**

Os Blackworms (*Lumbriculus variegatus*) são animais invertebrados pertencentes ao filo Annelida, subclasse Oligoqueta e família Lumbriculidae. Eles são encontrados na América do Norte, na Europa e norte da Ásia. A espécie também foi introduzida na África do Sul, Austrália e Nova Zelândia. Mais recentemente, foi encontrado na Patagônia, Argentina, onde diversas outras espécies exóticas se estabeleceram (Marchese *et al.*, 2015).

No Brasil, ela foi introduzida no estado de Minas Gerais. Entretanto, a sua introdução e estabelecimento nos locais brasileiros em que foram encontrados ainda não são totalmente compreendidos. A hipótese defendida por Marchese *et*

*al.* (2015), é de que sua introdução se deu a partir de lojas de peixes e aquários, uma vez que diversos oligoquetas são usados como alimento para peixes.

A espécie tem preferência por habitats rasos em margens de lagoas, lagos, riachos e rios. Seus microhabitats favoritos incluem folhas e troncos em decomposição, bem como sedimentos na base de vegetações emergentes e musgos (Marchese *et al.*, 2015). Em seu habitat, os Blackworms usam a cabeça para perfurar sedimentos e detritos moles, enquanto que a parte caudal é mantida próxima à superfície (Figura 10) formando um ângulo reto que quebra a tensão superficial da água, essa postura conhecida como reflexos de vôo, parece promover trocas gasosas mais intensas entre o ar e o vaso sanguíneo dorsal.

**Figura 10.** Reflexos de vôo de Blackworms



**Fonte:** Autoria própria

Os Blackworms apresentam reprodução sexuada (o que é extremamente raro) e assexuada por fragmentação com rápida capacidade de regeneração. A cabeça e a cauda são translúcidas, mas facilmente distinguíveis. Não possuem coração, o sangue é distribuído por contrações rítmicas do vaso sanguíneo dorsal que pulsa o sangue ao longo do corpo, segmento por segmento, da cauda até a cabeça. São animais triblásticos, possuem ectoderme, endoderme e mesoderme. Como outros anelídeos, os Blackworms têm sistema circulatório fechado e possuem dois grandes vasos sanguíneos, um dorsal e um ventral. A

maioria dos segmentos do corpo dos *Lumbriculus* possuem pares laterais de vasos pulsáteis, cuja pulsação é coordenada com a do vaso dorsal. Pulsações ao longo do vaso sanguíneo dorsal (DBV) impulsiona o sangue através do sistema circulatório. A parede do corpo do Blackworm é transparente, sendo possível visualizar a pulsação do DBV usando microscopia de luz (Lesiuk & Drews, 1999). Esses vermes não possuem olhos, mas as estruturas sensoriais presentes na parede corporal dos *Lumbriculus* incluem células fotossensíveis primitivas, capazes de detectar a passagem de uma sombra.

São excelentes organismos para estudar a regeneração, regulação das atividades reflexas, bioacumulação, ecotoxicidade, toxicidade de poluentes ambientais e regulamentação de pulsações dos vasos sanguíneos (Drewes e Fournier, 1990).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

Investigar a expressão e a ação biológica do látex sobre a atividade dos fatores de crescimento FGF, VEGF e TGF em cultura de fibroblastos 3T3 e sua biocompatibilidade em Blackworms (*Lumbriculus variegatus*).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Identificar a presença de grupos funcionais presentes nas amostras de látex utilizando a análise da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

- Avaliar a capacidade hemolítica da membrana de látex e das frações F1 e soro do látex em hemácias.

- Avaliar a capacidade antioxidante e o teor de fenóis totais da fração F1 e soro do látex.

- Avaliar a influência das frações F1 e soro e membrana do látex nas taxas de pulsações em *L. variegatus*.

- Avaliar a citotoxicidade da membrana de látex e das frações F1 e soro do látex em cultura de fibroblasto 3T3 e macrófagos J774.

- Desenhar as sequências de primers para serem utilizadas como iniciadores na amplificação espécie-específica por qPCR.

- Padronizar o método PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR) para análise da expressão dos genes em estudo.

- Avaliar os mecanismos envolvidos na cultura celular tratadas topicamente com o látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*.

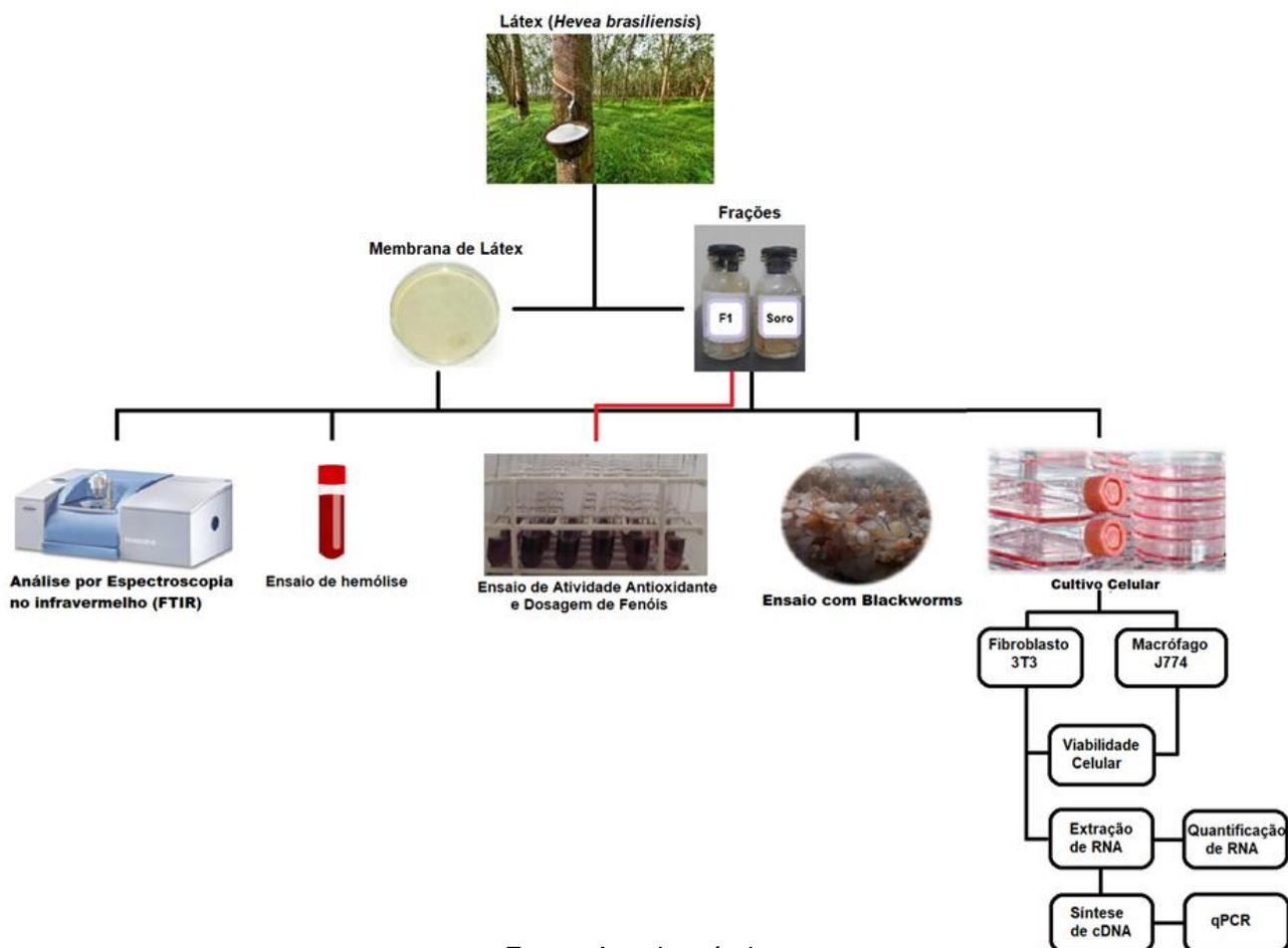
- Verificar a expressão de FGF, VEGF e TGF (importantes fatores de crescimento) durante a cultura de fibroblastos 3T3.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Desenho Experimental

O desenho experimental, apresentado na Figura 11, foi desenvolvido para fins de ilustrar as etapas do projeto e facilitar a compreensão das análises realizadas.

Figura 11. Desenho experimental



Fonte: Autoria própria

### 4.2 Preparação das Membranas de Látex Natural

O Látex Natural (LN) foi obtido da BDF Comércio de Produtos Agrícolas Ltda, Guarantã/SP e estabilizado com hidróxido de amônia 0,7% (v/v de borracha) para fornecer um pH 10, seguido de centrifugação a 8.000 rpm para fornecer uma solução de 60% (v/v) de borracha e reduzir as proteínas presentes no látex natural relacionadas à reação alérgica (Garms *et al.*, 2017).

As membranas de borracha natural foram preparadas a partir da solução líquida de látex natural estabilizada com hidróxido de amônio, conforme Figura 12. Na preparação das membranas foram utilizadas placas de Petri de 9,5 cm de diâmetro interno e de fundo reto, para obter filmes de espessura uniforme e controlada. Foi depositado 1mL da solução de látex sobre a placa de Petri e deixada em temperatura ambiente por 24 horas para completa coagulação (Tanaka *et al.*, 2021).

**Figura 12.** Extração de Látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) para produção das membranas



Fonte: Autoria própria

#### 4.3 Obtenção do Soro e Fração F1 do Látex Natural

O soro e a fração F1 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Ricardo José de Mendonça do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais (ICBN) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) seguindo o protocolo proposto por Mendonça (2008).

Basicamente, o soro do látex teve seu pH corrigido para 9,0 e 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), com o fluxo empregado de 7 mL/min e monitorado em espectrofotômetro a 280 nm.

Por fim, as amostras soro e fração F1 foram diluídas em água nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1% (v/v) e armazenadas em freezer - 20°C, para posterior utilização.

## **4.4 Caracterização físico-química e biológica do material**

### **4.4.1 Análise por Espectroscopia no infravermelho (FTIR)**

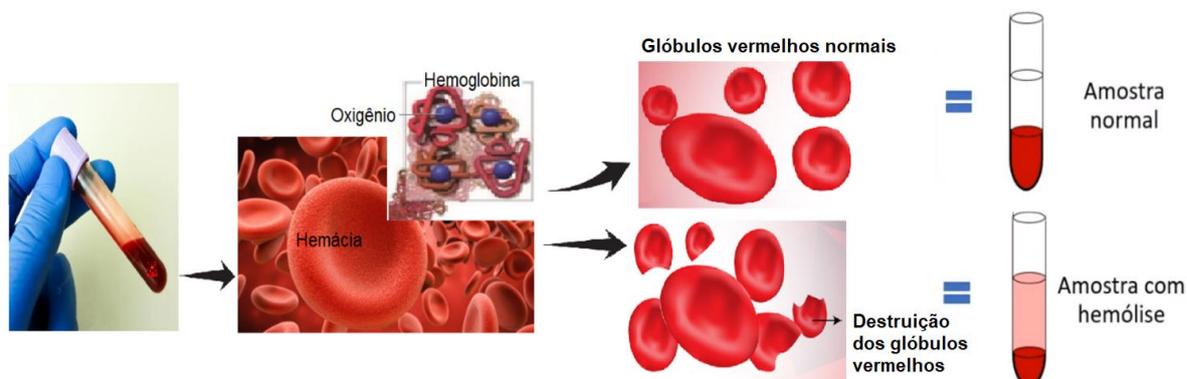
A caracterização da composição química da membrana, da fração F1 e Soro do látex foi realizada utilizando um equipamento de FTIR Bruker® Tensor 27 (Karlsruhe, Alemanha) operando na região entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , fonte de laser HeNe e detector DLaTGS com resolução 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 varreduras. Para as análises foi utilizado o método ATR, equipado com um cristal de diamante.

### **4.4.2 Ensaio de hemólise**

A hemólise é definida como o rompimento da membrana da hemácia, causando a liberação da hemoglobina (Hb) e de outros componentes intracelulares para o plasma (Figura 13). A Hb livre, por exemplo, apresenta alta absorvância em comprimentos de onda que variam entre 415 nm e 570 nm. Dessa forma, a sua liberação como resultado da ocorrência de lise dos eritrócitos provoca elevação aparente na concentração dos analitos medidos nessa escala de comprimento de onda, devido ao aumento da absorvância medida dessas amostras (Burns e Yoshikawa, 2002; Ismail e cols., 2005; Lippi e cols., 2005; Rother e cols., 2005).

A Hb contém outros componentes que também podem interagir ou competir com os reagentes do ensaio, bem como elevar a quantidade do analito dosado, tais como proteínas estruturais, enzimas, lipídios e carboidratos presentes no plasma ou soro analisado (Lippi e cols., 2005).

**Figura 13.** Hemólise identificada em uma amostra de sangue centrifugada caracterizada através da intensidade da cor avermelhada do plasma.



**Fonte:** Autoria própria

A interação da membrana, da fração F1 e do soro do látex com as hemácias foram estudadas por meio de ensaios hemolíticos, de acordo com Borges *et al.* (2015) e Cesar *et al.* (2019), com algumas modificações. Neste experimento, 3 mL de células sanguíneas de ovelha (NEW PROV<sup>®</sup>, código: 1189, Paraná, Brasil) foram usados com 3,8% (m/v) de citrato de sódio (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA) como anticoagulante (na proporção de 9:1, sangue: citrato). A mistura foi lavada duas vezes com solução salina 0,9% (p/v) e centrifugada a 1000 rpm por 10 min, descartando-se o sobrenadante.

As amostras da fração F1 e soro foram preparadas em três concentrações (50%, 30% e 15%) a partir da solução estoque a 1% (v/v), em seguida 500 µL das amostras e 500 µL da solução de eritrócitos a 5% (v/v) em solução salina 0,9% (p/v) foram incubados a 37°C por 24 h. Membranas de 5mm de diâmetro foram incubadas em contato direto com 1mL de solução 5% eritrócitos. As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 min e alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram pipetadas em microplacas de 96 poços.

O controle negativo foi determinado com 500 µL de solução salina 0,9% (hemólise 0%), enquanto o controle positivo foi usado com 500 µL de Triton X-100 1% (v/v) em solução salina 0,9% (hemólise 100%).

A análise foi medida em leitor de microplacas (PowerWave Epoch2, BioTek Instruments<sup>®</sup>, EUA) a 540 nm. Valores menor que 5% de hemólise, foram

considerados não tóxicos nos experimentos. O experimento foi realizado em triplicata e a taxa de hemólise (%) foi calculada usando a Equação 1.

**Equação 1-** Fórmula para o cálculo da hemólise expresso em porcentagem

$$\text{Taxa de hemólise (\%)} = \frac{(ABS_{amostra} - ABS_{nc})}{(ABS_{pc} - ABS_{nc})} \times 100$$

onde ABS é a absorbância das amostras, ABS<sub>nc</sub> é a absorbância do controle negativo e ABS<sub>pc</sub> é a absorbância do controle positivo.

#### **4.4.3. Ensaio de Atividade Antioxidante**

##### **4.4.3.1 Determinação da atividade Antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH)**

Para determinação da atividade antioxidante foi utilizado o método de captura do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila, DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995). Para o preparo da solução de DPPH foi dissolvido 7,8 mg de DPPH em 100 mL de metanol absoluto, que foi homogeneizado e transferido para um frasco mantido sob refrigeração e protegido da luz.

##### **4.4.3.2 Preparo das soluções de quercetina para obtenção da curva analítica**

A determinação da curva da quercetina foi realizada a partir do preparo da solução estoque onde foi solubilizado 10,00 mg de quercetina em 10 mL de metanol. Em seguida foram preparadas diluições seriadas, em triplicatas, nas concentrações de 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,25 µg/mL, 0,625 µg/mL e 0,3125 µg/mL, utilizando balões volumétricos de 5 mL. A curva de calibração foi construída a partir dos valores de absorbância a 517 nm de todas as soluções, utilizando como "branco" 1mL de metanol.

#### 4.4.3.3 Preparo das amostras F1 e Soro do látex para avaliação da atividade antioxidante

As amostras F1 e soro foram preparadas em triplicatas a partir da solução estoque 1% (m/v) e diluídas para as concentrações de 0,03 µg/mL, 0,06 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,25 µg/mL e 0,5 µg/mL. 500µL das amostras foram adicionados em tubos de ensaio juntamente com 500µL da solução de DPPH, cobertas com papel alumínio e deixadas no escuro à temperatura ambiente. Após 30 minutos, foi medida a absorvância a 517 nm em espectrofotômetro de UV-VIS. Para cada amostra foi realizado um teste “branco” consistindo do volume da amostra (500 µL) e metanol (500 µL). O controle negativo, contendo 500 µL de metanol e 500 µL de DPPH, foram medidos após o mesmo período de incubação no escuro (30 minutos). O percentual de inibição do DPPH (ou a % da atividade antioxidante) foi calculado utilizando a equação 2 (Burda; Oleszek, 2001).

**Equação 2-** Fórmula para inibição do DPPH expresso em porcentagem

$$\% \text{ de inibição do DPPH} = \frac{A_{cn} - A_a}{A_{cn}} \times 100$$

onde  $A_{cn}$  é a absorvância do controle negativo e  $A_a$  é a absorvância da amostra/padrão.

A Figura 14 mostra a estrutura do DPPH antes e depois da reação com um composto antioxidante (A-H).

**Figura 14.** Mudança da coloração do radical livre (DPPH) antes e depois da reação com um composto antioxidante (A-H).



**Fonte:** Rufino (2007); Rezende(2010).

#### 4.4.4 Dosagem de fenóis

A quantificação de compostos fenólicos por espectrofotometria presentes nas amostras envolve a redução do reagente Folin-Ciocalteu com formação de complexo azul. Tal coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, como pode ser visto na Figura 15.

As concentrações para a determinação de fenóis totais foram realizadas a partir da adição de 100  $\mu\text{L}$  das amostras que foram inicialmente preparadas através de uma diluição seriada, obedecendo a uma ordem decrescente das concentrações (0,5, 0,25, 0,125, 0,06 e 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo posteriormente adicionados 500  $\mu\text{L}$  do reagente Folin - Ciocalteu a 10% e 6 mL de água deionizada. A solução foi homogeneizada e após 3 minutos, 1,5 mL de carbonato de sódio a 20% (p/v) foi adicionado e o volume completando 10 mL com água destilada. As amostras permaneceram incubadas (120 minutos) a temperatura ambiente e sem a presença de luminosidade. Após esse período as absorbâncias das amostras foram lidas a 765 nm utilizando como branco água deionizada. Como padrão para o teste foi utilizado o ácido gálico (AG) a fim de

que seus valores sirvam de comparação para a determinação dos compostos fenólicos presentes nas soluções, expressos a partir da quantidade de AG presentes em cada miligrama da amostra em estudo (Singleton *et al.*, 1999). A média das leituras dos testes foram obtidas através dos resultados expressos em microgramas de AG por miligramas da amostra.

**Figura 15.** Dosagem de fenóis totais empregando o reagente Folin



**Fonte:** Autoria própria

#### 4.4.5 Cultura celular

Foram selecionadas duas linhagens para realização da cultura celular: fibroblastos (3T3, *Mus musculus*) e macrófagos (J774, *Mus musculus*) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ/UFRJ.

Sob condições estéreis, as linhagens 3T3 e J774 foram descongeladas em banho-maria à 37 °C e as células foram ressuspensas em 9mL do meio DMEM incompleto em Falcon de 15 mL para retirada do DMSO do meio de congelamento. O tubo foi centrifugado a 1200 rpm por 7min e o sobrenadante foi descartado, vertendo o tubo, e o pellet foi ressuspenso em 10 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de solução de antibiótico/antimicótico (penicilina 10.000 U, estreptomicina 10.000 µg e 25 µg de anfotericina B) (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos). Em seguida as células foram transferidas para a garrafa de cultivo celular de 75cm<sup>2</sup>. As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após atingir 80% de confluência, a monocamada foi ressuspensa em solução de tripsina (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos), incubada a 37°C durante 2 minutos, seguida pela paralisação da reação pela adição de DMEM completo. O volume da garrafa foi plaqueado novamente, representando a segunda

passagem, para continuação do cultivo celular. Após a tripsinização, as células foram contadas em Câmara de Neubauer para utilização nos testes de viabilidade celular.

#### **4.4.6 Viabilidade celular**

O teste de viabilidade celular foi realizado por contato direto com as linhagens 3T3 (fibroblastos) e J774 (macrófagos). Essas linhagens foram plaqueadas em microplacas de 24 poços, aproximadamente na densidade de  $4 \times 10^3$  células/poço, com volume de 400  $\mu$ L de meio de cultura completo, em triplicata. As placas foram incubadas à 37°C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, permanecendo por 24 horas para aderência e crescimento confluyente (Tanaka *et al*, 2021).

Após esse período observou-se a aderência das células e então, foi retirado todo o volume do meio de cultura e adicionou-se 400  $\mu$ L das soluções teste, contendo a fração F1 e o soro do látex nas seguintes concentrações: 0,01%, 0,1% e 1% (v/v). A membrana também foi utilizada para os testes de citotoxicidade celular por contato direto. Foram utilizados um controle positivo contendo células e meio de cultivo DMEM e para controle negativo ao meio de cultura foi acrescido 50% de DMSO.

As placas foram incubadas à 37°C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante o período de 24, 48 e 72 horas. As membranas de 6 mm de diâmetro foram esterilizadas por luz ultravioleta por 20 minutos de cada lado e colocadas sobre a cultura pelo mesmo período de contato, 24, 48 e 72 horas em meio completo. Após cada intervalo de tempo de incubação as amostras foram retiradas, e em seguida os poços foram lavados com 300  $\mu$ L de solução tampão PBS, e colocou-se 200  $\mu$ L de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina], na concentração final de 0,5 mg/mL, deixando-as incubadas sob as mesmas condições anteriores por um período de 1h.

Após esta etapa retirou-se o MTT, adicionou-se 400 microlitros do solvente DMSO e incubou-se por 15 minutos as amostras no escuro para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância, diretamente proporcional a quantidade de células viáveis, foi realizada utilizando o leitor de microplaca (PowerWave Epoch 2, BioTeK Instruments, EUA, com programa

versão 2.09.1) no comprimento de onda de 570nm. Os dados foram normalizados utilizando o porcentual relativo ao controle positivo de células (Equação 3), para posterior extração do RNA (Pegorin *et al*, 2021).

**Equação 3.** Expressão empregada na normalização dos dados obtidos nos ensaios de MTT

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{ABS - \text{Absorbância do branco}}{ABS_{pc} - \text{Absorbância do branco}} \times 100$$

onde ABS é a absorbância das amostras e ABS<sub>pc</sub> é a absorbância do controle positivo.

#### **4.4.7 Avaliação da expressão gênica dos fibroblastos**

##### **4.4.7.1. Extração de RNA**

A extração do RNA total das amostras de fibroblastos foi realizada utilizando o reagente Trizol<sup>®</sup> (Sigma), de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Após o tratamento das culturas de fibroblastos com a fração F1, o soro e a membrana do látex, o meio de cultura foi removido das placas e estas foram lavadas três vezes com 5 mL de PBS. Posteriormente foram adicionados 3 mL do reagente Trizol<sup>®</sup> em cada placa de Petri, e ressuspensão várias vezes até a perda da viscosidade. Em seguida as células foram transferidas para 3 microtubos de 1,5 mL.

Para essas células recolhidas foram acrescentados 250 µL de clorofórmio, e a mistura foi agitada em vórtex por 15 segundos e posteriormente incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este período os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Após este processo, a mistura foi separada em três fases: a fase fenólica (inferior) de cor avermelhada são as proteínas, uma interface em fina camada de cor branca sendo o DNA, e uma fase aquosa superior, onde encontra-se o RNA. A fase superior foi transferida para um microtubo identificado, onde foi adicionado 500 µL de isopropanol para promover a precipitação do RNA.

As amostras foram agitadas manualmente e incubadas em gelo por 10 minutos. Após este período foi realizada uma centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O pellet, observado no fundo, foi lavado com 1mL de álcool etílico 75% gelado e as amostras foram novamente centrifugadas a 9000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os microtubos foram mais uma vez centrifugados a 9000 rpm por 1 minuto a 4°C para a retirada do restante de álcool etílico 75%. Os pellets foram ressuspensos em 30 µL de água tratada com inibidor de RNase, dietilpírocarbonato (DEPC) a 0,1%, seguido da quantificação do RNA. As amostras foram armazenadas em freezer -80 °C.

#### **4.4.7.2 Quantificação de RNA**

A concentração e pureza do RNA total extraído foram avaliadas com auxílio do leitor de microplaca (PowerWave Epoch 2, BioTeK Instruments, EUA, com programa versão 2.09.1). A quantificação foi realizada por medida das absorbâncias das amostras obtidas nos comprimentos de onda de 260 nm, específico para quantificação de ácidos ribonucleicos, e 280 nm, específico para quantificação de proteínas, e a contaminação das amostras por proteína foi avaliada através da razão das absorbâncias a 260 nm e 280 nm (A260/A280).

As amostras foram consideradas apropriadas quando o valor obtido para a razão A260/A280 estava entre 1,7 e 2,2.

#### **4.4.7.3 Gel desnaturante para análise de RNA**

Após a extração e quantificação, a qualidade (integridade) do RNA foi analisada por eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,5% (m/v) contendo tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x, solução de hipoclorito 2,0% e corado com solução de brometo de etídeo. Foi aplicado no gel 1,0 µL do RNA extraído com 4 µL de H<sub>2</sub>O DEPC e 1,0 µL de azul de bromofenol.

A corrida em gel de eletroforese para migração do RNA ocorreu sob tensão de 120 V durante 30 minutos. Ao término da eletroforese, as bandas 28S e 18S do RNA ribossômico foram visualizadas em transiluminador sob luz UV (Sambrook, 2001).

#### 4.4.7.4 Síntese de cDNA

Após a confirmação da integridade das amostras de RNA, o cDNA foi sintetizado a partir do RNA total usando o kit de transcrição reversa de alta capacidade (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit), de acordo com os volumes apresentados na Tabela 1. Uma alíquota equivalente a 2µg de RNA total de cada amostra foi usada na reação, conforme as instruções do fabricante. O volume foi ajustado para 10 µL com água tratada com DEPC.

**Tabela 1-** Reagentes e respectivos volumes utilizados na reação de transcrição reversa

<b>Componente</b>	<b>Volume</b>
10X RT Buffer	2.0 µL
25X dNTP Mix (100mM)	0.8 µL
10X RT Random Primers	2.0 µL
Nuclease-free H2O	4.2 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0 µL
<b>Total da reação</b>	<b>10.0 µL</b>

Seguiu-se o seguinte protocolo experimental, recomendado pelo fabricante do Kit: Em microtubos de 0,2 mL foram pipetadas 10 µL do mix e 10 µL de RNA total, completando o volume final do tubo para 20µL. A reação foi incubada a 25 °C por 10 minutos e 37 °C por 2 horas, após essa ciclagem a enzima foi inativada a 85°C por 5 segundos e finalmente as amostras foram armazenadas em freezer à temperatura de -80°C aguardando o início da reação de qPCR.

#### 4.4.7.5 Desenho de primers

As sequências alvo das proteínas FGF, TGF e VEGF foram obtidas na base de dados do NCBI (National Center For Biotechnology Information). Através do programa Blast (Basic Local Alignment Search Tool), diferentes sequências foram alinhadas e comparadas para que fosse possível reconhecer a região de maior similaridade entre a espécie pesquisada. Uma vez reconhecida a região que guarda maior semelhança entre as espécies (região conservada) pode-se, então, utilizá-la para o desenho dos primers.

Os primers foram desenhados no programa PerlPrimer observando alguns parâmetros como critérios de inclusão ou exclusão. A região escolhida deveria apresentar cerca de 20 nucleotídeos e a porcentagem ideal de GC deveria estar entre 40% e 60%. O limite mínimo de 40% permite que o primer se ligue ao alvo com maior estabilidade e o limite máximo de 60% evita a elevação da temperatura de anelamento. Preferencialmente, uma base C ou G deve compor a extremidade 3' do primer, por ser esta a extremidade na qual a enzima polimerase inicia a extensão do primer. O pareamento C-G é mais estável em relação ao pareamento A-T, portanto, espera-se que a polimerase inicie o processo de síntese mais eficientemente neste caso. As regiões com muitas adeninas e timinas foram evitadas para não haver a diminuição da temperatura de dissociação (Wang; Seed, 2003).

A validação final foi feita com o uso do programa GeneRunner verificando a possível formação de self dímeros, hetero-dímeros e harpin. Na análise de dímeros, os primers não poderiam apresentar energia livre de Gibbs abaixo de -9 Kcal/mol<sup>-1</sup>, ou muitas bases complementares. Na análise de Harpin, além dos valores de  $\Delta G$ , foi verificada a temperatura de melting que possibilitasse o auto anelamento, sendo recomendado valores inferiores a 50 °C (Sambrook, 2001).

A temperatura de melting foi calculada estimando-se que os valores entre cada par de primers fossem próximos, visando posteriormente estabelecer uma média na padronização da PCR. As temperaturas não poderiam ser tão divergentes, sendo que no caso de alta variação, foram excluídas ou acrescentadas algumas bases na sequência do primer, até se obter um resultado satisfatório. Após o desenho dos primers descritos na Tabela 2, foi realizado a

análise in silico dos diferentes primers para verificar a confiabilidade e sensibilidade dos mesmos.

**Tabela 2-** Primers desenhados para os genes de interesse

Localização	Gene	Sequência	Tamanho	Tm °C
Chr 17	VEGF (F)	CTCGCGCTCCCTCTCCGGCTC	21	57,6
Chr 17	VEGF (R)	GCGCGCGGCTGGAGCACTG	19	57,6
Chr 5	FGF (F)	GCTCAACCAGAGGAAGACCGCCC	23	55,7
Chr 5	FGF (R)	TCCCGAGTTCCCCACAAGATACATTTTC	27	55,7
Chr 7	TGF (F)	GGCCTCCGCATCCCACCTTTG	21	55,7
Chr 7	TGF (R)	AGCGCATCGAAGCCATCCGTG	21	55,2

**Fonte:** Autoria própria

#### **4.4.7.6 Expressão Gênica e Análise estatística**

As reações foram realizadas no equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems), instalados no Núcleo de Genômica funcional da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP. O método qPCR requer uma série de padronizações para que os experimentos a serem realizados ocorram com alta eficiência, uma delas é a eficiência de ampliação dos primers, descrita no próximo tópico.

As reações foram realizadas em triplicatas para cada amostra e a normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak; Schmittgen, 2001). Dessa forma, os dados são representados como diferença na expressão gênica relativa a GAPDH (gene referência) para os genes VEGF, FGF e TGF, que foram normalizados, baseados na eficiência dos primers e na análise estatística realizada com os valores do ciclo threshold (Ct). Os dados obtidos foram analisados pelo teste T de Student, sendo considerados resultados estatisticamente significativos os valores de  $p \leq 0,05$ .

#### **4.4.7.7 Curva de eficiência de amplificação das amostras e do gene referência**

Para obter a curva de eficiência de amplificação da reação de PCR quantitativa foram realizadas para cada gene, tanto para o gene-alvo como para o gene referência, reações utilizando um pool de cDNA das amostras (F1, soro e membrana) em 3 diluições, nas concentrações de 2,5 ng, 5 ng e 10 ng. As reações foram realizadas em triplicatas e os ciclos de amplificação foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 1 minuto a 60°C para anelamento e extensão. Após a qPCR, de posse dos Cts médio calculados a partir das tréplicas, procedeu-se a análise de regressão dos valores de Ct em função das concentrações do cDNA para obtenção do slope da equação. O valor do slope foi utilizado para calcular a eficiência de amplificação da reação, conforme equação 4:

**Equação 4.** Fórmula para cálculo da eficiência da PCR

$$E = \frac{10^{-1}}{\text{slope}-1} \times 100$$

A curva padrão foi obtida pela regressão linear do valor do ciclo de amplificação Ct sobre o log da quantidade inicial de cDNA. O coeficiente angular da curva padrão de -3,32 indica uma reação com 100% de eficiência. Foram consideradas eficientes as reações em que as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene referência sejam muito próximas, com tolerância de  $\pm 10\%$  de variação (Livak, 2001).

Conforme o valor do slope encontrado para cada amostra, a concentração de 10ng/microlitros do cDNA e 100 ng/microlitros da concentração dos primers apresentaram melhor eficiência e foram escolhidas como padrão para todas as corridas de qPCR.

#### **4.4.8 Influência da membrana e das frações F1 e Soro do látex nas taxas de pulsações em Blackworms (*Lumbriculus variegatus*)**

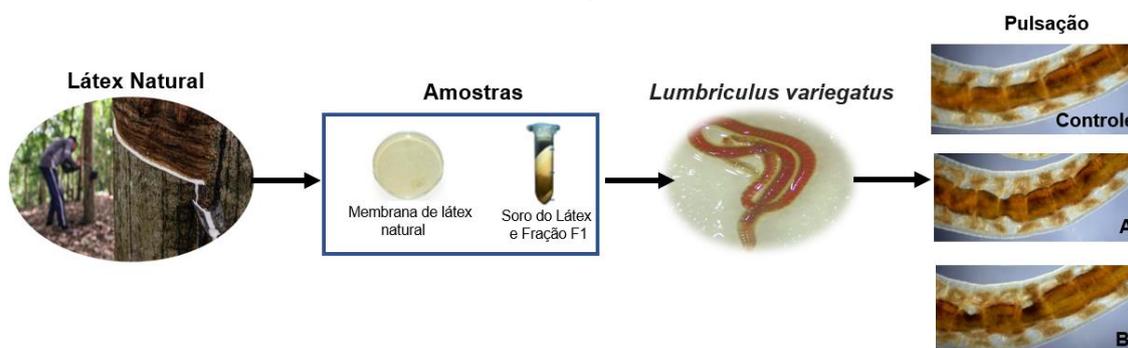
Para a realização desse ensaio foi determinado a taxa de pulsação basal dos Blackworms antes da realização dos testes. Os Blackworms foram

selecionados conforme o tamanho, 4 cm, e transferidos para os béquers com o auxílio de uma pipeta Pasteur. A membrana natural de látex e duas concentrações diferentes foram utilizadas, 0,01% e 0,1% (v/v) das frações F1 e soro do látex para determinar a influência na taxa de pulsação.

Foram testados em 50 mL de solução expondo 3 organismos por tréplica e após o período de incubação de 15 minutos, 30 minutos e 1h, foi avaliada a pulsação basal (Figura 16).

Para observação do vaso sanguíneo dorsal, os Blackworms foram transferidos para uma lâmina e levemente comprimido sob uma lamínula para restringir o movimento. Evitou-se tentativas mais agressivas de imobilização dos Blackworms, pois são propensos a autotomia (Lesiuk e Drewes, 1999) e o seu manuseio prolongado em ambientes secos levam à diminuição da taxa de pulsação do vaso sanguíneo. Portanto, as observações foram restringidas até os dois primeiros minutos e os Blackworms foram descartados após observação. Esse teste enfatiza como várias substâncias podem afetar a taxa de pulsação nos Blackworms em diferentes níveis de concentrações.

**Figura 16.** Taxa de pulsação do vaso sanguíneo dorsal de *Lumbriculus variegatus* em amostras de látex natural. A exposição a longo prazo das amostras, aumentaram a frequência de pulsação (B)



**Fonte:** Autoria própria

Os ensaios foram realizados em local com pouca luminosidade, mantendo-se a temperatura entre 22 e 24 °C e pH constante entre 6,9 e 7,1. Sabe-se que a temperatura influencia a toxicidade das substâncias, sendo um fator de extrema importância para os ensaios, além de influenciar a biologia reprodutiva e crescimento da espécie.

#### **4.4.9 Análise estatística**

A partir dos dados obtidos nos ensaios de MTT das células de fibroblastos e macrófagos, foram realizadas análises estatísticas para comparar estatisticamente o comportamento do controle positivo com as células que estiveram em contato com a membrana de látex e as frações F1 e soro do látex. As análises estatísticas foram realizadas com o Software PAST (versão 4.07). As variações estatísticas entre os grupos foram determinadas com a análise one-way Anova (variância para múltiplas comparações), seguida por teste Tukey. Os resultados que representaram diferença estatística adotaram valores mínimos de  $p < 0,05$ .

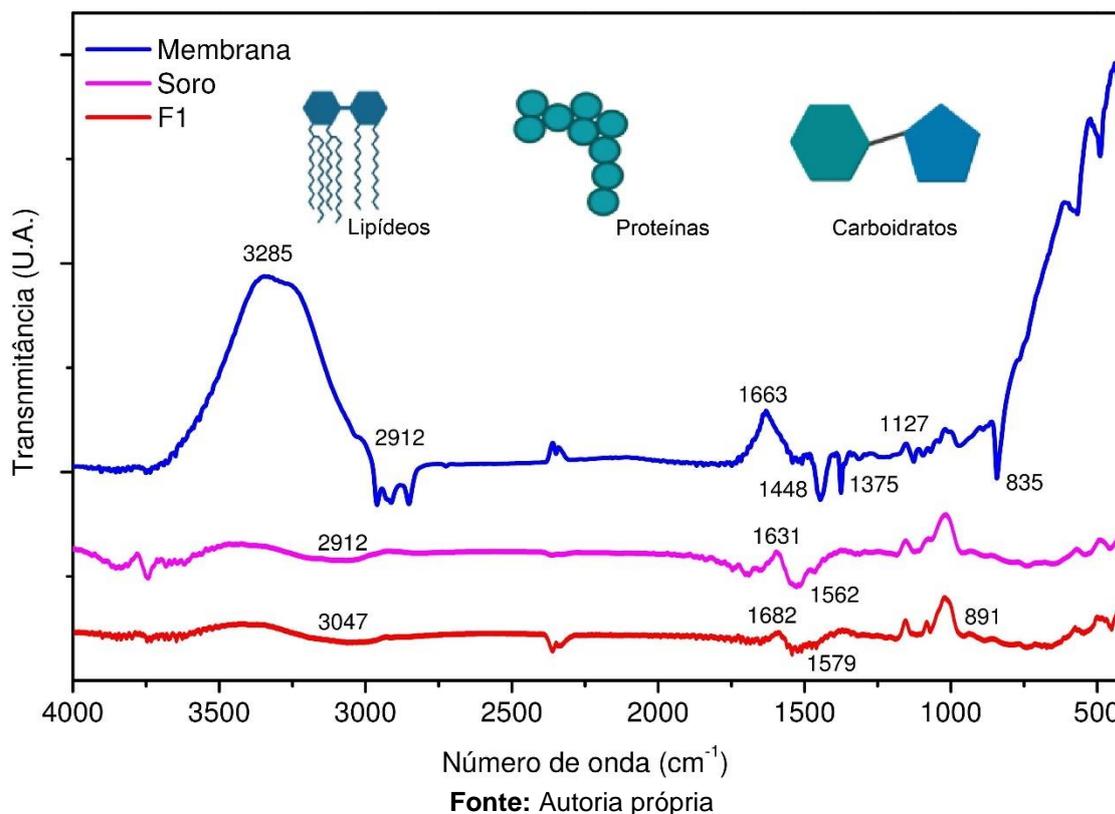
## 5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 5.1 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma ferramenta analítica universal para avaliação de uma ampla gama de materiais (Dole, 2011), sendo uma técnica fundamental para caracterização de materiais poliméricos e biopolímeros (Barrios *et al.*, 2012) e tem sido amplamente utilizada para caracterização de materiais (por exemplo, látex, silicone, poliuretano) submetidos a diferentes tratamentos físico-químicos quanto a hemocompatibilidade e biocompatibilidade. O gráfico 1 apresenta as bandas de absorção para o espectro de FTIR da membrana de látex, soro e fração F1. As bandas encontradas são semelhantes às encontradas na literatura para o *cis*-1,4-poliisopreno: 835, 1127, 1375, 1448, 1663 e 2912  $\text{cm}^{-1}$  (Galiani, 2010). A transmitância na região de 3285  $\text{cm}^{-1}$  é característica de pontes de hidrogênio em proteínas.

As bandas de absorção encontradas de 1631  $\text{cm}^{-1}$ , 1562  $\text{cm}^{-1}$  são bandas relacionadas com a estrutura das proteínas, como as bandas de amida, amida I em torno de 1620 a 1700  $\text{cm}^{-1}$  e amida II em torno de 1520 a 1580  $\text{cm}^{-1}$  (Rolere *et al.*, 2015), que se referem ao alongamento C = O (amina I) e alongamento C-N e dobra N-H (amina II). Esses resultados estão de acordo com os relatados por vários autores, que identificaram bandas características das amidas I e II no soro do látex de *Hevea brasiliensis* (Gemeinder *et al.*, 2021). Trabalhos anteriores sobre o soro de látex mostraram que uma banda larga intensa entre 3200 e 3500  $\text{cm}^{-1}$  indica a sobreposição dos grupos OH e N-H descendentes do grupo amina (Kerche-Silva *et al.*, 2018; Kong; Yu, 2007).

**Gráfico 1.** Espectros de FTIR da membrana, fração F1 e soro do látex de *Hevea brasiliensis*



Comparando as bandas encontradas no soro de látex e na membrana, pode-se notar que o soro possui as bandas características de proteínas que compõe o conteúdo proteico do látex natural, mas estão presentes em uma concentração mais baixa (diluído) devido à presença de outras substâncias (como carboidratos, lipídios e componentes da borracha, poli-isopreno).

A região entre  $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  apresentou-se muito semelhante entre o Soro e Fração F1. No espectro da fração F1 foi detectada uma banda em  $891\text{ cm}^{-1}$  que é atribuída ao grupo metil, ausente no soro. Nota-se no espectro do soro a ausência de vários picos referentes ao isopreno, pois no processo de centrifugação as partículas de borracha migram para o topo, deixando a fração do soro extremamente límpida contendo diferentes espécies químicas como carboidratos, eletrólitos, proteínas e aminoácidos. A região do espectro, de  $1800$  a  $600\text{ cm}^{-1}$  é de maior interesse, pois contém bandas características que permitem avaliar a presença de grupos funcionais devido a grupos carbonílicos

como ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e amidas (Borges *et al*, 2015).

## 5.2 Ensaio de Hemólise

O ensaio de hemólise é considerado um importante teste de triagem que investiga as propriedades hemolíticas *in vitro* de biomateriais. Os resultados obtidos nos ensaios hemolíticos estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3-** Taxa de hemólise (média  $\pm$  desvio padrão) em diferentes concentrações da fração F1 e soro (15%, 30% e 50%) e membrana de látex

Amostras	Concentrações e Taxa de hemólise		
	15%	30%	50%
Fração F1	0.18 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.2 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Soro	0.2 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Membrana	0.57 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>		

Letras iguais indicam similaridade estatística entre as amostras ( $p > 0,05$ )

**Fonte:** Autoria própria

As amostras testadas, fração F1 e soro nas concentrações de 50% e 30% e 15% (v/v) e membrana de látex apresentaram taxa de hemólise inferior a 1% e os controles negativo (NC) e positivo (PC) apresentaram valores de 0,00% e 100,00%.

Todas as amostras do soro foram estatisticamente semelhantes entre si e em relação ao grupo NC. Esse resultado sugere que as amostras não foram capazes de danificar a membrana dos glóbulos vermelhos, liberando hemoglobina. Assim, o soro do látex, a fração F1 e a membrana, podem ser considerados um biomaterial atóxico e seguro no período e concentrações analisadas. Alguns autores avaliaram a hemocompatibilidade da membrana de látex pura e também incorporada com compostos bioativos, como fármacos (voriconazol, ibuprofeno, gentamicina), fosfato de cálcio, glicerol e peptídeos

(desmopressina, oxitocina) (Silva *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2021; Gemeinder *et al.*, 2021; Borges *et al.*, 2015; Barros *et al.*, 2019).

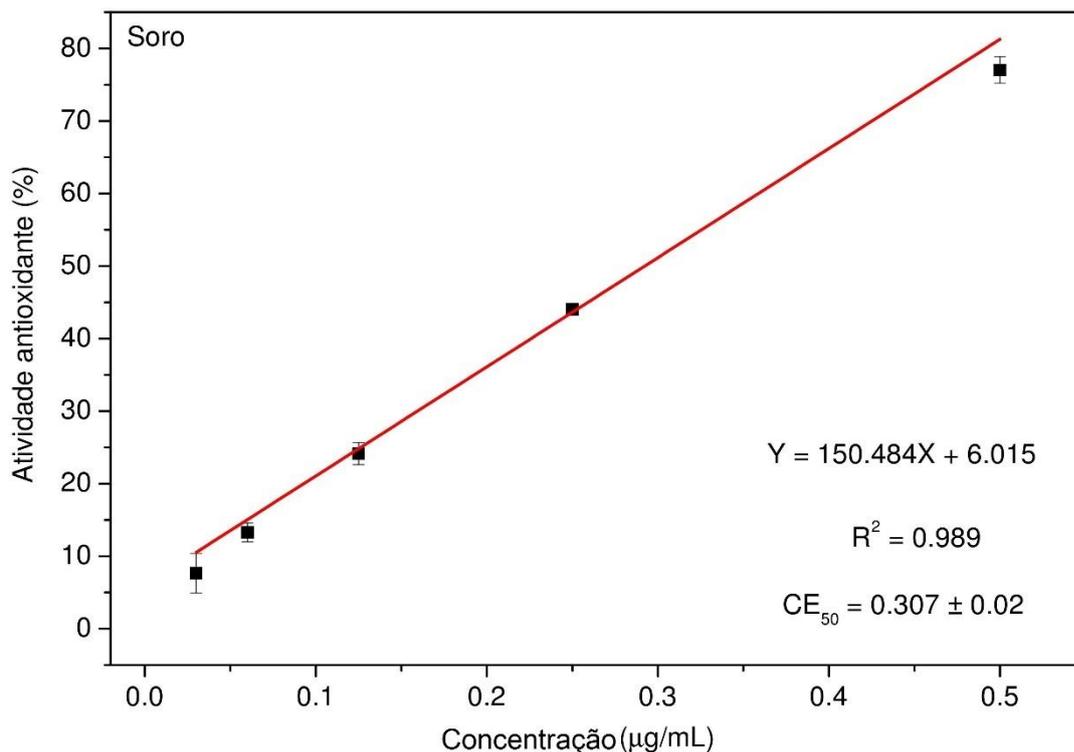
As taxas hemolíticas acima de 5% não foram verificadas em nenhum dos trabalhos relatados, confirmando que o látex não causou distúrbio detectável nas membranas das hemácias e, portanto, é seguro e não hemolítico na concentração utilizada. Os resultados obtidos nesse estudo foram semelhantes aos resultados de outros trabalhos encontrados na literatura que avaliaram a hemocompatibilidade da membrana de látex, confirmando que a mesma não apresenta toxicidade às hemácias.

### **5.3 Ensaio de Atividade Antioxidante (AA)**

Para determinação da atividade antioxidante do extrato ou do composto isolado, existem várias metodologias de análise utilizadas, sendo que cada uma se baseia em uma reação de oxirredução diferente. Desta forma, os resultados de diferentes metodologias de determinação de atividade antioxidantes não podem ser comparados. Nesse estudo a atividade antioxidante foi testada pelo método de redução do DPPH. Os valores de DPPH do meio, após a reação com as amostras, foram calculadas substituindo-se os valores das leituras obtidas para a absorbância na equação da curva analítica. A partir dos valores de % de inibição de DPPH (Equação 2) calculou-se a concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE<sub>50</sub>)

Os resultados obtidos na atividade antioxidante estão apresentados nos gráficos 2 e 3 e referem-se respectivamente as amostras soro do látex e fração F1.

**Gráfico 2.** Valor médio da atividade antioxidante do Soro do látex



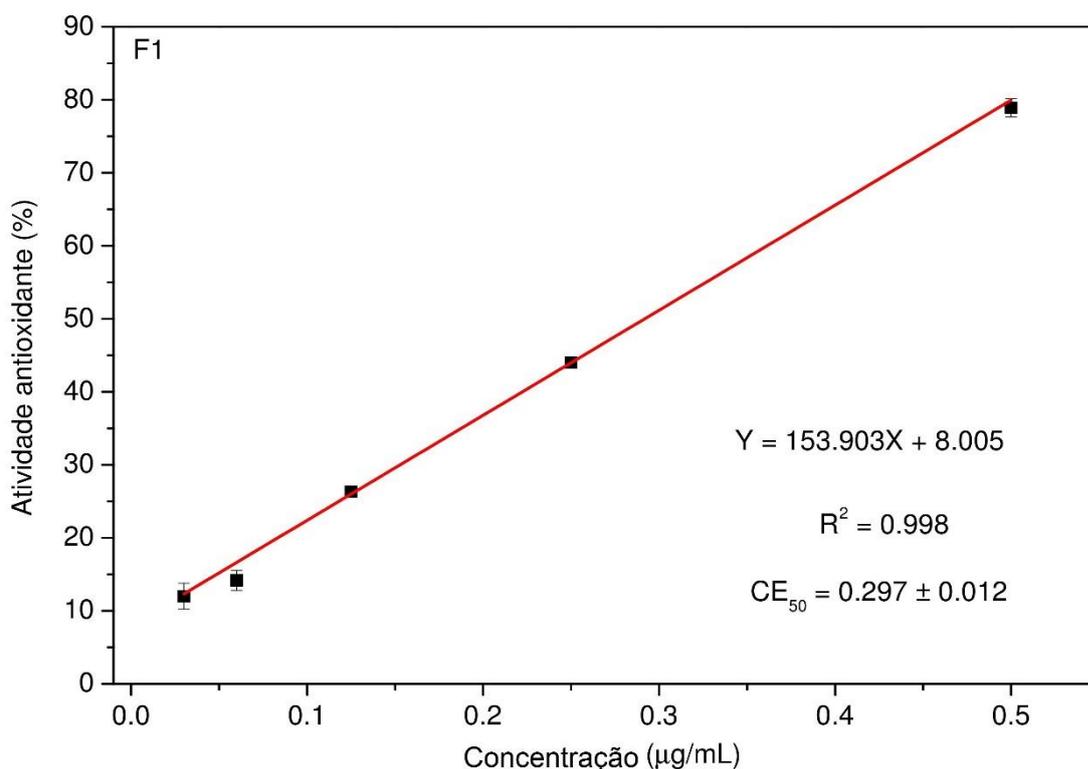
Fonte: Autoria própria

Observando os resultados da atividade antioxidante do soro do látex de *H. brasiliensis*, no gráfico 2, é possível verificar que diferentes concentrações mostraram atividade antioxidante diferentes. A amostra soro apresentou maior atividade antioxidante na concentração de 0,5 µg/mL após 30 minutos de incubação. Substâncias que possuem atividade antioxidante são extremamente importantes, pois ajudam a prevenir ou remover danos oxidativos causados por espécies reativas, que podem causar injúria celular (Gupta *et al.*, 2015)

Poucas pesquisas foram feitas tentando elucidar a capacidade antioxidante do látex de *H. brasiliensis*. Menos pesquisas ainda foram feitas estudando a atividade antioxidante da fração F1 obtida do látex desta espécie.

Como mostra o gráfico 3, as diferentes concentrações da fração F1 do látex obteve a máxima atividade antioxidante na concentração de 0,5 µg/mL após 30 minutos de incubação.

**Gráfico 3.** Valor médio da atividade antioxidante da fração F1 do látex



Fonte: Autoria própria

As amostras apresentaram capacidade de consumo de DPPH, visto que as absorbâncias após reação de DPPH com as diferentes concentrações das amostras testadas foram menores quando comparadas com as absorbâncias obtidas para o controle negativo (metanol e DPPH).

Considerando a atividade antioxidante das amostras, o presente estudo constatou que a amostra F1 obteve 78,9% na concentração de 0,5 µg/mL e na mesma concentração a atividade antioxidante do Soro foi de 77%. Frente a esses resultados, pode-se observar que apesar da capacidade da fração F1 e soro do látex de capturar radicais DPPH ser menor que a do controle, a fração F1 e soro foram capazes de sequestrar esses radicais, exibindo atividade antioxidante, a qual tem extrema importância para o processo de regeneração de tecidos.

A atividade antioxidante pode ser de grande utilidade no tratamento de lesões teciduais, uma vez que essas substâncias podem auxiliar na defesa contribuindo para a neutralização de espécies reativas de oxigênio, as quais podem causar um estresse oxidativo no tecido e culminar no retardamento da

cicatrização tecidual. Durante o processo cicatricial, as enzimas antioxidantes têm sua expressão aumentada, porém a atividade enzimática é prejudicada devido ao ambiente altamente oxidante (Lodhi; Singhai, 2013).

Soysuwan (2009) descreve que a fração C do látex de *H. brasiliensis* é rica em compostos contendo tiol e aminoácidos, e que esta fração possui atividade antioxidante testada pelo método de DPPH. Amnuait e Boonme (2014) também avaliaram a fração C do látex de *H. brasiliensis* pelo método de redução do DPPH e encontraram atividade antioxidante para a mesma. Siritwong e colaboradores (2015) detectaram a presença de conteúdos fenólicos na fração não-borracha do látex de *H. brasiliensis* e observaram uma evidente capacidade antioxidante desta fração através dos ensaios de DPPH também.

#### 5.4 Dosagem de fenóis

A determinação de fenóis totais foi realizada a partir da curva de calibração, utilizando como padrão o ácido gálico. Os resultados obtidos na determinação pelo método Folin-Ciocalteu expressos como equivalentes de ácido gálico em  $\mu\text{g/mL}$  de amostra, estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Dosagem de fenóis nas amostras F1 e Soro do látex em diferentes concentrações (média  $\pm$  desvio padrão)

Amostra	Concentração 0,25 $\mu\text{g/mL}$	Concentração 0,5 $\mu\text{g/mL}$
F1	88,04 $\pm$ 0.10	95,62 $\pm$ 0.10
Soro	80,86 $\pm$ 0.17	92,15 $\pm$ 0.10

Valores médios e respectivos desvios-padrão (n=3)

**Fonte:** Autoria própria

A quantidade de fenóis na amostra F1 foi de 95,62  $\mu\text{g/mg}$  e 92,15  $\mu\text{g/mg}$  para a amostra do soro, nas concentrações de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . A dosagem de fenol confirmou as metodologias de DPPH uma vez que a atividade antioxidante foi baixa. Esse resultado está relacionado ao baixo percentual de fenol na amostra, que é um dos indicativos de atividade antioxidante. Lucetti *et al.* (2010), utilizando

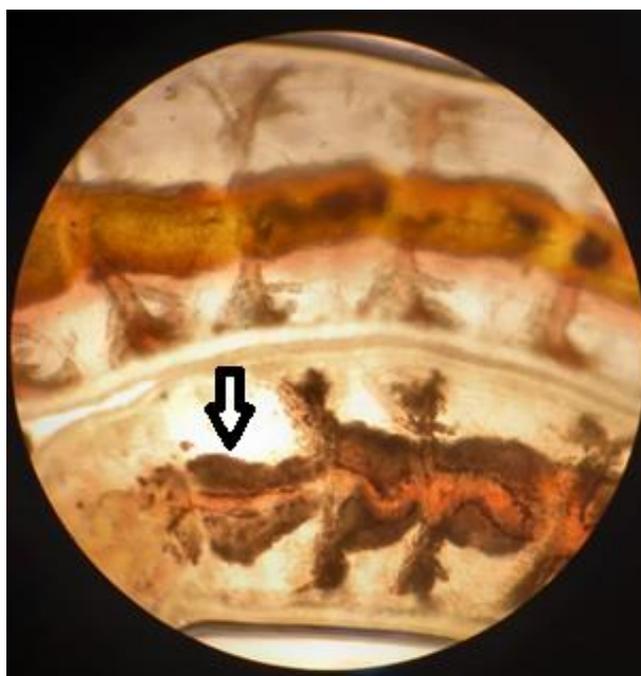
menores concentrações do látex de *H. drasticus* registraram a ausência de atividade captadora de radicais livres. Segundo Podsedek (2007) essa evidência pode ser explicada pelo baixo percentual de fenol no látex.

### 5.5 Taxas de pulsações em Blackworms (*Lumbriculus variegatus*)

As contrações do vaso sanguíneo dorsal dos blackworms foram monitoradas para avaliar a toxicidade de amostras do látex natural com concentrações diferentes.

A pulsação foi caracterizada por uma diminuição transitória do diâmetro do vaso sanguíneo dorsal, visto na Figura 17.

**Figura 17.** Pulso peristáltico do vaso sanguíneo dorsal indicado por uma seta preta



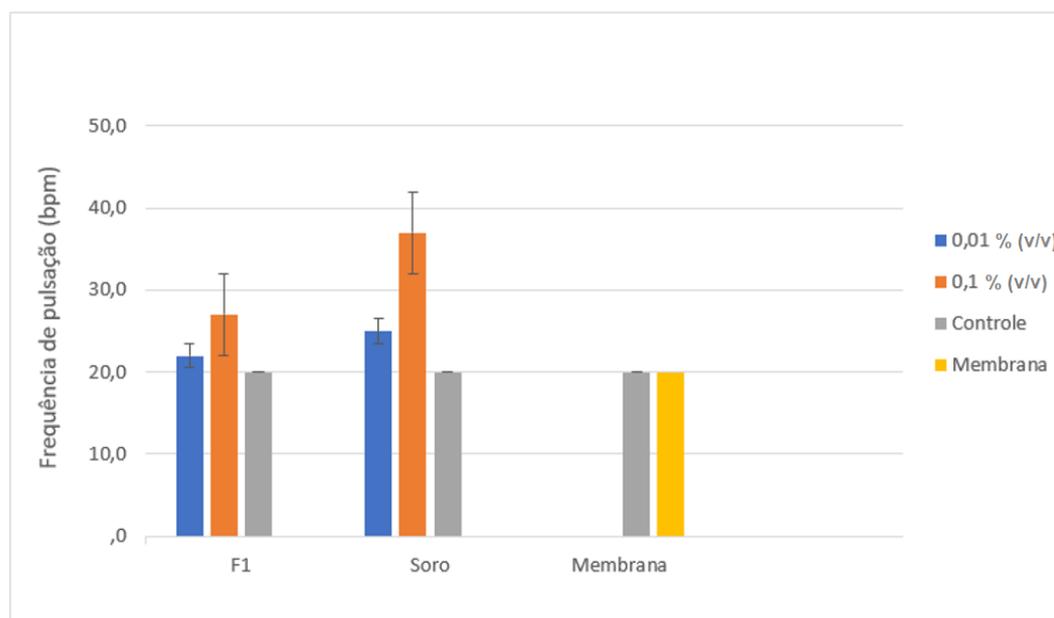
**Fonte:** Autoria própria

Atualmente, não é bem compreendido como o peristaltismo no vaso sanguíneo dorsal nos blackworms é gerado ou como a taxa de pulsação é controlada (Lesiuk e Drewes, 1999). Lesiuk e Drewes mostraram em 1999 que a frequência dos pulsos é afetada por vários agentes farmacológicos, por exemplo, fortemente acelerado pela cafeína e nicotina. A maioria dos segmentos do corpo de um *Lumbriculus* também existem pares laterais de vasos

pulsáteis (bifurcações do vaso sanguíneo dorsal), cuja pulsação é coordenada com a do vaso dorsal. Stempeson em 1930 propôs a hipótese de que poderia ser uma função auxiliar de bombeamento.

O gráfico 4 apresenta os dados observados após o período de 15 minutos de incubação com as amostras do látex de *H. brasiliensis*.

**Gráfico 4.** Resultados do tratamento com a membrana do látex e frações F1 e soro do látex no período de 15 minutos.



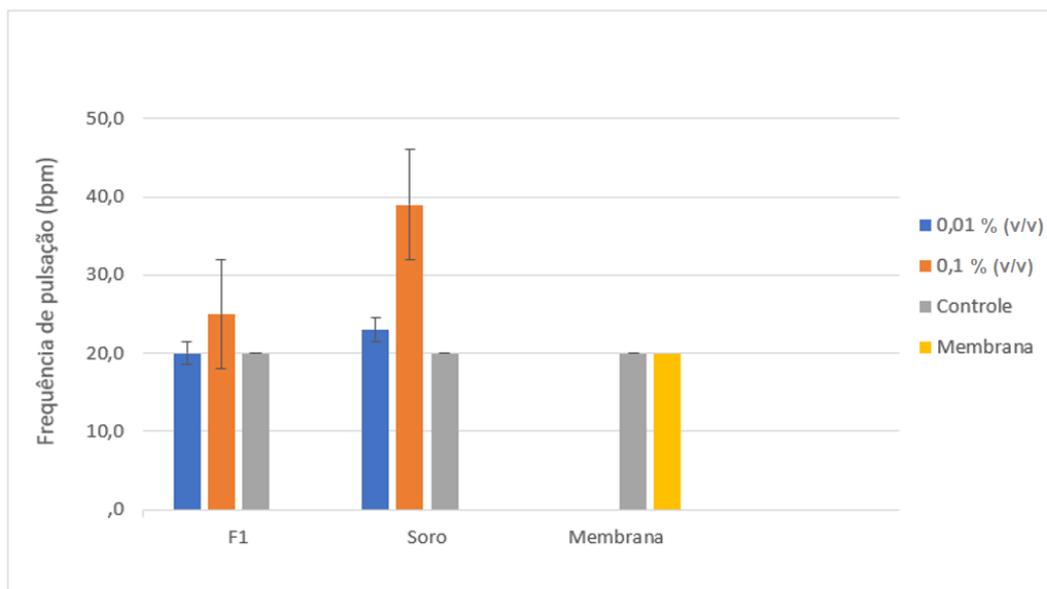
**Fonte:** Autoria própria

Houve uma diferença significativa nas concentrações de 0,1% e 0,01% (v/v) do soro e da fração F1, conforme o gráfico 4. Essas condições experimentais estimularam o aumento da pulsação do vaso sanguíneo dorsal em relação ao controle. Os resultados encontrados nas amostras F1 e soro do látex, podem ser causados devido a reação às proteínas contidas no látex, que em contato direto com a pele pode atravessar a barreira epidérmica mesmo estando a pele íntegra. Os alérgenos do látex estimulam as células do sistema imunológico a produzirem anticorpos. Os anticorpos ao reagir com os antígenos provocam a liberação de histaminas e outros mediadores apresentando

diferentes sintomas, entre eles a dilatação dos vasos sanguíneos e o aumento dos batimentos cardíacos.

O gráfico 5 apresenta os dados observados após o período de 30 minutos de incubação com as amostras do látex de *H. brasiliensis*.

**Gráfico 5.** Resultados do tratamento com a membrana do látex e frações F1 e soro do látex no período de 30 minutos.



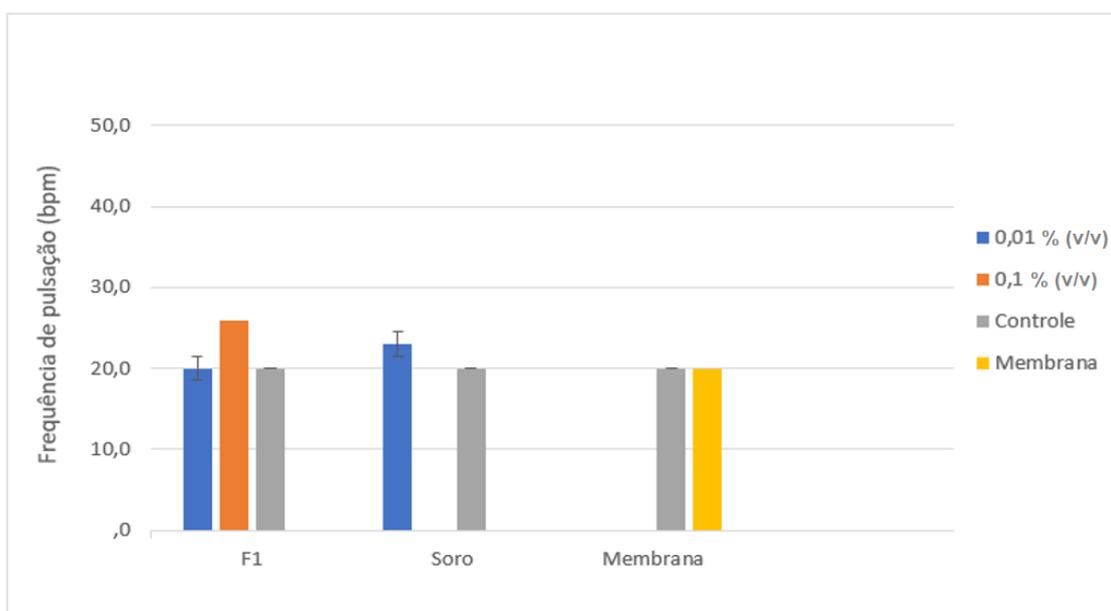
**Fonte:** Autoria própria

No período de 30 minutos houve aumento da frequência de pulsação dos vasos sanguíneos na concentração de 0,1% (v/v) na amostra soro. Nas concentrações 0,1% e 0,01% (v/v) da amostra F1 e 0,01% (v/v) da amostra soro (gráfico 5) houve diminuição da frequência de pulsação comparado ao período anterior de incubação. O resultado deste período de incubação supostamente mostra que concentrações menores tiveram menor influência na pulsação do vaso sanguíneo dos Blackworms. Uma hipótese é que o aumento da pulsação na amostra soro, na concentração de 0,1% v/v em comparação com a amostra F1 de igual concentração, pode estar relacionado ao processo de cromatografia das amostras, onde devido ao processo de purificação a fração F1 acaba removendo componentes alergênicos. Desta forma, é importante frisar que não há estudos relacionados a biocompatibilidade do látex e/ou derivados em minhocas, sendo essa Tese de Doutorado é o primeiro trabalho. Assim, a

separação dos compostos alergênicos da amostra F1 deve ter influenciado no resultado.

O gráfico 6 apresenta os dados observados após o período de 1h de incubação com as amostras do látex de *H. brasiliensis*.

**Gráfico 6.** Resultados do tratamento com a membrana do látex e frações F1 e soro do látex no período de 1 hora.



Fonte: Autoria própria

No período de 1h, na concentração de 0,1% (v/v) da amostra soro foi observada a morte do Blackworm e para as demais concentrações não houve alterações nas frequências das pulsações em relação ao período de incubação anterior. A frequência da pulsação na amostra membrana manteve-se igual ao controle nos diferentes períodos de incubação. Nos segmentos, ao longo dos Blackwoms, os vasos sanguíneos se ramificam em vasos contráteis laterais, como observado na Figura 18, que terminam cegamente e não se conectam com o vaso central (Lesiuk e Drewes, 1999).

**Figura 18.** Ramificação dos vasos contráteis laterais indicado por uma seta preta



**Fonte:** Aatoria própria

Os resultados deste experimento indicam que as frações F1, soro e membrana de látex, nas concentrações testadas, tiveram efeito no sistema circulatório dos Blackworms. Outros estudos avaliaram o efeito da nicotina (Lee *et al.*, 2008) e da cafeína (Lesiuk and Drewes, 1999) na frequência de pulsações dos Blackworms constatando aumento da frequência de pulsações com o aumento da concentração das drogas. Em comparação, o efeito do álcool teve resposta semelhante ao da nicotina e da cafeína, no entanto, quando a dose de álcool foi aumentada para 1 mM, a frequência cardíaca caiu (Lesiuk and Drewes, 1999).

Um exame mais aprofundado, realizado por Boher (2006), do efeito da nicotina sobre os Blackworms indicou que, à medida que a dosagem de nicotina aumentava, a frequência cardíaca dos vermes também aumentava. Esse resultado se aproxima dos achados de Roth e Shick, 1958. Roth e Shick, usaram o balistocardiograma para medir a frequência cardíaca dos homens em resposta à nicotina. O resultado produziu um aumento da frequência cardíaca quando a nicotina foi induzida (Roth e Shick 1958).

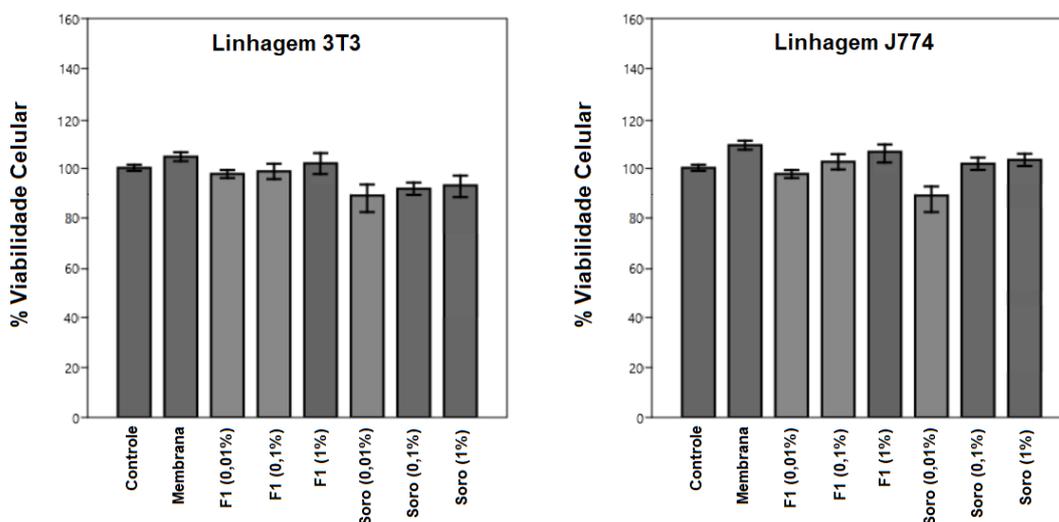
O efeito da cafeína também foi testado em Blackworms com resposta semelhante ao da nicotina (Lesiuk and Drewes, 1999). O resultado indicou que quando a dosagem de cafeína foi aumentada a frequência de pulsação dos vasos sanguíneos também acompanhou concomitantemente. Este resultado é apoiado pela descoberta de Corti *et al.*, 2002, que demonstrou que quando a cafeína foi induzida em seres humanos a pressão arterial, frequência cardíaca e

atividade nervosa simpática aumentaram. A cafeína é um estimulante do sistema nervoso central que imita os efeitos da epinefrina. Semelhante aos efeitos da nicotina, a epinefrina estimula a frequência cardíaca, a pressão arterial e a respiração.

## 5.6 Viabilidade celular

Inicialmente, a viabilidade celular das amostras foi avaliada pelo método colorimétrico de MTT com as linhagens de fibroblastos 3T3 e macrófagos J774. Ambas as linhagens são células de crescimento aderentes em monocamadas e representam importantes modelos experimentais para diferentes estudos. Após 24 horas de incubação, os fibroblastos apresentaram porcentagens de viabilidade de 103% e 105% para a concentração de 1% da fração F1 e membrana. Os macrófagos no mesmo período de observação apresentaram aumento da viabilidade na concentração de 0,1% de 102% e 101% na fração F1 e soro e na concentração de 1% a viabilidade foi de 107% e 103% para as mesmas amostras, enquanto a membrana apresentou 105% de células viáveis após a exposição no mesmo período, conforme Figura 19.

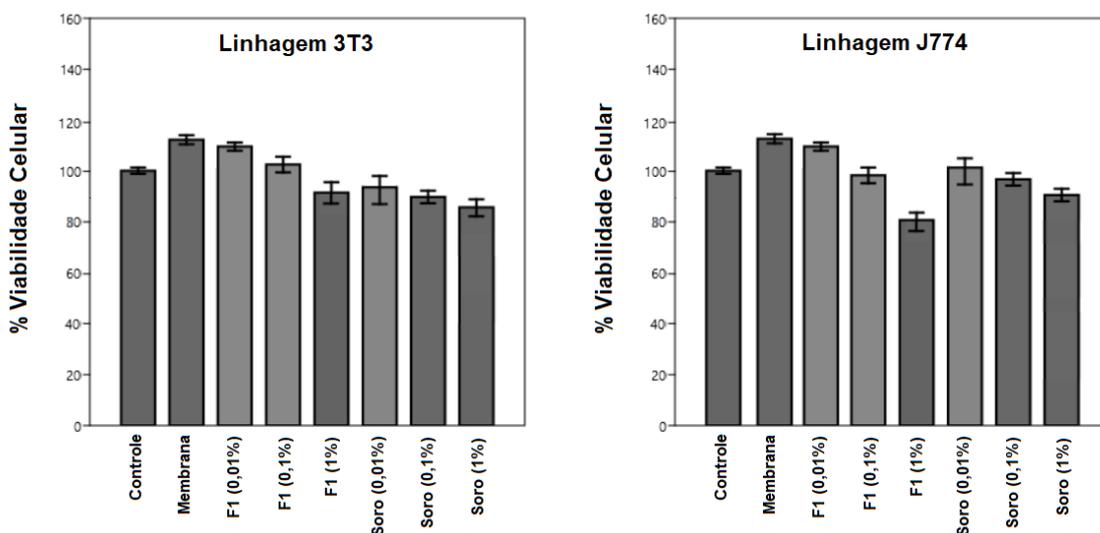
**Figura 19-** Viabilidade celular. Porcentagem de viabilidade de fibroblastos e macrófagos em cultura por 24 h, com membrana, fração F1 e soro de látex em concentrações de 0,01%, 0,1% e 1%. Valores representam médias de resultados em triplicata



Fonte: Autoria própria

Após 48 h de incubação, os fibroblastos mostraram porcentagens de viabilidade de 111% para a concentração de 0,01% e 103% para a concentração 0,1% da fração F1 (Figura 20), já para a fração do soro a viabilidade foi de 103% na concentração de 0,1%, enquanto a membrana apresentou 115% de células viáveis após a exposição no mesmo período.

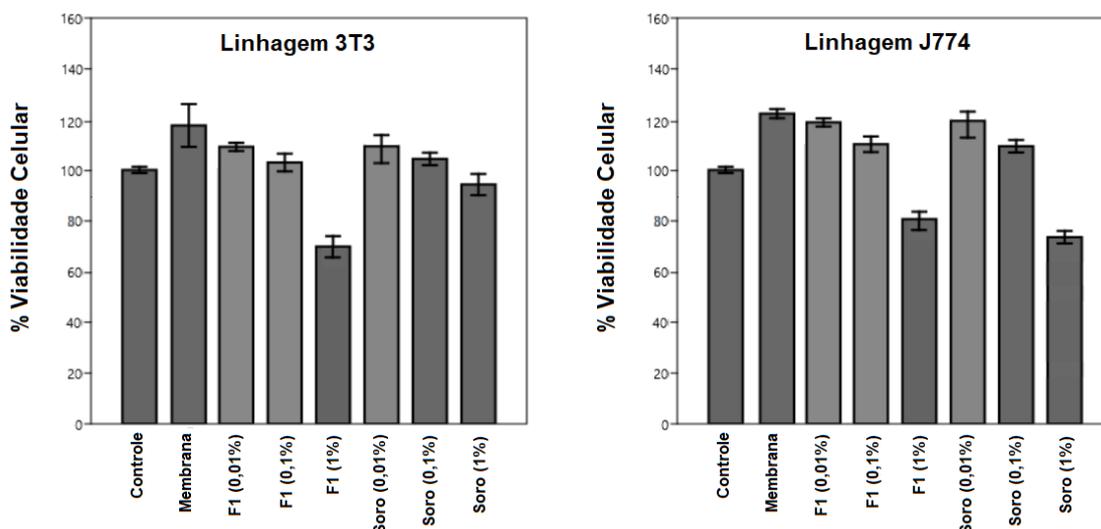
**Figura 20-** Viabilidade celular. Porcentagem de viabilidade de fibroblastos em cultura por 48 horas, com membrana, fração F1 e soro de látex em concentrações de 0,01%, 0,1% e 1%. Valores representam médias de resultados em triplicata



Fonte: Autoria própria

No tempo de 72h (Figura 21), houve diminuição significativa da viabilidade celular, de 70% e 95% na concentração de 1% na fração F1 e soro respectivamente, enquanto a membrana apresentou 119% de células viáveis, a fração F1 nas concentrações de 0,01% e 0,1% foi de 110% e 102% e o soro, a viabilidade foi de 115% e 105% nas concentrações de 0,01% e 0,1%, após a exposição no mesmo período.

**Figura 21.** Viabilidade celular. Porcentagem de viabilidade de fibroblastos em cultura por 72h, com membrana, fração F1 e soro de látex em concentrações de 0,01%, 0,1% e 1%. Valores representam médias de resultados em triplicata



Fonte: Autoria própria

Leite *et al.* (2020) avaliou a citotoxicidade do soro do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* nas concentrações de 0,1% e 1% em linhagens de fibroblastos 3T3 nos tempos de 24 e 48h, apresentando resultados semelhantes ao encontrados neste trabalho. No intervalo de 72h a maior viabilidade dos fibroblastos ocorreu na fração do soro do látex na concentração de 1% e na membrana, que manteve a viabilidade celular superior ao controle nos períodos de 24h, 48h e 72h.

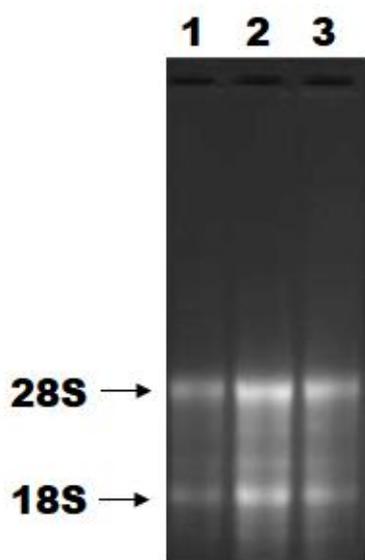
Considerando as diferentes concentrações pode ser que o efeito hormético traduza em um benefício quanto a proliferação das células de fibroblastos e macrófagos, apresentando ação bifásica para doses diferentes. Segundo esse conceito, uma substância que tem efeito nocivo em uma determinada dose, pode ter uma ação positiva no tratamento em uma dose mais baixa.

Para Saremi *et al.* (2008), a hormese como princípio geral é concebível apenas para os fatores que estão presentes no ambiente, revelando uma adaptação forçada do metabolismo dos animais expostos a determinada substâncias.

## 5.7 Gel desnaturante para análise de RNA

A qualidade (integridade) do RNA foi analisada por eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,5% (m/v) contendo tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x, solução de hipoclorito 2,0% e corado com solução de brometo de etídeo. Devido a interações intramoleculares, as moléculas de RNA podem dobrar-se, alterando a estrutura secundária e afetando a migração das moléculas no gel. O gel sob condições desnaturantes, rompem as ligações de hidrogênio permitindo avaliar com acurácia a qualidade de RNA. Foi aplicado no gel 1,0  $\mu\text{L}$  do RNA extraído com 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC e 1,0  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol. A corrida em gel de eletroforese, para migração do RNA, ocorreu sob tensão de 120 V durante 30 minutos. Ao término da eletroforese, as bandas 28S e 18S do RNA ribossômico foram visualizadas em transiluminador sob luz UV, conforme a Figura 22.

**Figura 22.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% evidenciando a integridade do RNA total na concentração de 2 $\mu\text{g}$ . As amostras 1 a 3 correspondem a fração F1, soro e membrana do látex, respectivamente.



Fonte: Autoria própria

A técnica de eletroforese capilar apresentou RNA íntegro em todas as amostras, as duas bandas correspondem às unidades ribossomais do RNA, 18S e 28S, sendo possível inferir que não houve degradação e nem contaminação por DNA genômico. Além disso, a banda 28S apresentou maior intensidade em

relação a banda 18S. Segundo Mueller (2004), para um bom resultado da expressão gênica, é preciso estabelecer a integridade dos materiais a serem utilizados, visto que a degradação do RNA é progressiva e diminui a relação da banda 18s, com a banda 28s.

### 5.8 Desenho de primers

Os iniciadores para os genes VEGF, FGF e TGF, desenhados neste trabalho, ao serem submetidos à análise de especificidade in silico, utilizando o programa UCSC In-Silico PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>), demonstraram ampliação específica, conforme os resultados descritos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Resultado obtido da reação “in silico” dos genes VEGF, FGF e TGF, mostrando a localização e tamanho do fragmento amplificado pelos primers

Gene	Primers (F: Forward, R:Reverse)	Localização da ampliação	Tamanho do amplicon (pares de base)
VEGF	F: CTCGCGCTCCCTCTCCGGCTC	Chr 17: 46031388 - 46031513	126
	R: CAGTGCTCCAGCCGCGCGC		
FGF	F: GCTCAACCAGAGGAAGACCGCCC	Chr 5: 43979105 - 43979289	185
	R: GAAATGTATCTTGTGGGGAAGCTCGGGA		
TGF	F: GGCCTCCGCATCCACCTTTG	Chr 7: 25687802 - 25688019	218
	R: CACGGATGGCTTCGATGCGCT		

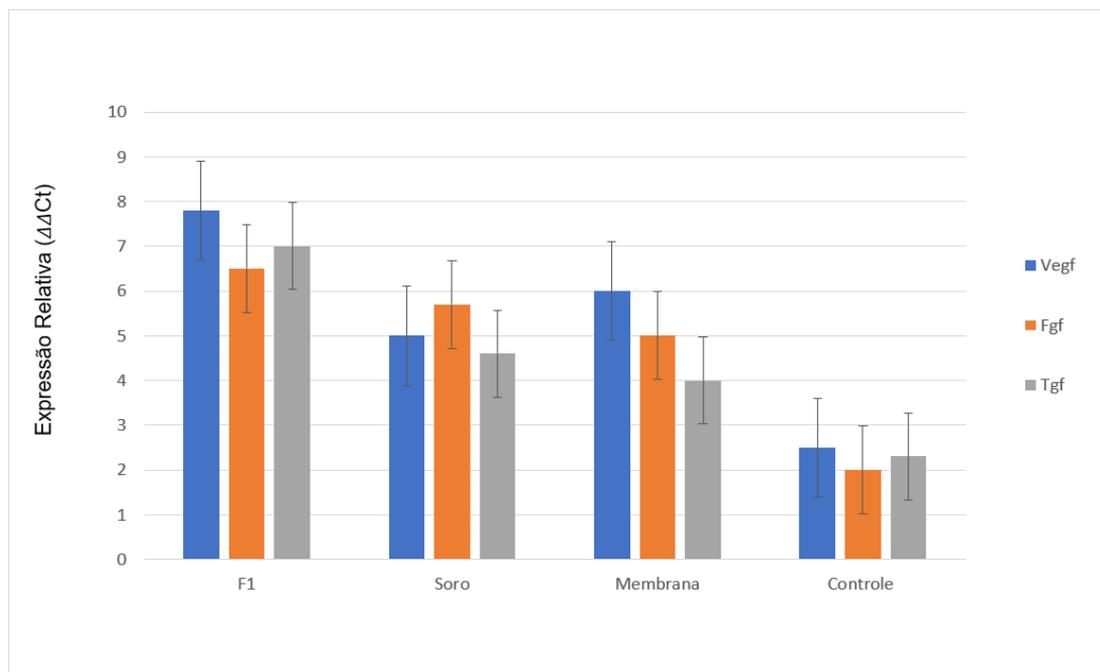
**Fonte:** Autoria própria

### 5.9 Expressão genica

A análise da expressão gênica é bastante útil para diversas aplicações, pois fornece informações importantes sobre as funções da célula, uma vez que as mudanças na fisiologia de um organismo são acompanhadas por mudanças nos padrões da expressão de seus genes.

A avaliação da expressão dos genes VEGF, FGF e TGF, submetidos aos diferentes tratamentos, está apresentado no gráfico 7. Os resultados demonstram que houve aumento significativo nas expressões dos genes VEGF, FGF e TGF na membrana e nas frações F1 e soro do látex quando comparadas ao controle ( $p \leq 0,05$ ).

**Gráfico 7.** Quantificação normalizada da expressão dos genes VEGF, FGF e TGF nos tratamentos com a membrana e nas frações F1 e Soro do látex de *Hevea brasiliensis*



**Fonte:** Autoria própria

Para os genes VEGF, FGF e TGF observou-se um aumento em sua expressão nas amostras tratadas com a fração F1 em relação aos demais tratamentos e grupo controle. Já para as amostras tratadas com o soro, observa-se que ocorreu diminuição da expressão do gene VEGF quando comparada a membrana. Em contrapartida, no grupo das membranas ocorreu diminuição na expressão dos genes FGF e TGF comparadas ao tratamento com o soro.

A expressão aumentada dos genes em amostras tratadas com a membrana e as frações F1 e soro do látex de *H. brasiliensis* evidência o potencial angiogênico dessas frações e sugere fortemente uma conexão do cultivo de macrófagos com os altos níveis de expressão do gene VEGF. Tais amostras podem ser utilizadas não somente para acelerar o processo de cicatrização, mas também para o reparo de tecidos, pelo fato de serem capazes de promover o crescimento e surgimento de vasos sanguíneos no tecido danificado (Chaves *et al.*, 2016).

Durante a neovascularização, é crucial a ocorrência de eventos como a proliferação e migração de células endoteliais e o aumento da permeabilidade celular, papel esse que é desempenhado pelo VEGF (Valiatti *et al.*, 2011).

Vários são os trabalhos que mostraram o potencial inflamatório do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* no desbridamento de feridas pelo recrutamento de células que auxiliam na resposta inflamatória, como fibroblastos e macrófagos. Mendonça *et al.* (2010) utilizaram o soro do látex veiculado em carboximetilcelulose para tratar úlceras em orelhas de coelhos na concentração de 0,01% do soro do látex. Andrade (2012) utilizou a fração F1 do soro do látex da seringueira *H. brasiliensis* na concentração de 0,01% também veiculado a carboximetilcelulose, para tratar úlceras cutâneas em ratos diabéticos. Moraes (2017) avaliou o efeito do soro total na concentração de 0,01% e da fração F1 nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1% obtidas do látex na cicatrização de feridas em camundongos. Nos trabalhos mencionados foi observado o poder cicatrizante do látex. Os resultados do presente estudo sugerem que o aumento da expressão dos genes em amostras tratadas com o soro, a fração F1 e a membrana de látex da seringueira *Hevea brasiliensis* apresentam uma significativa atividade angiogênica, o que acelera a reepitelização das lesões. A utilização das frações (F1 e soro) e a membrana de látex natural de *Hevea brasiliensis* como biomaterial, representa uma área bastante promissora, devido a sua capacidade angiogênica e por apresentar biocompatibilidade com sistemas vivos.

## 6 CONCLUSÕES

- Os espectros de FTIR identificaram os componentes presentes na membrana de látex, na fração F1 e no soro, pertencentes ao isopreno, principal constituinte do látex. A amostra do soro apresentou maior discrepância com a amostra da membrana de látex, o que evidencia que a parte proteica pode estar agindo como indutor de angiogênese.

- O ensaio hemolítico mostrou que a fração F1, o soro e a membrana de látex não apresentaram um alto grau de hemólise significativa no período observado, demonstrando assim ser um biomaterial hemocompatível.

- Nas condições experimentais utilizadas, evidenciou-se baixo teor de fenóis e capacidade antioxidante da fração F1, soro e membrana de látex.

- Os resultados obtidos nos ensaios com os Blackworms indicam que as frações F1, soro e membrana de látex, nas concentrações testadas, tiveram efeito no sistema circulatório alterando a taxa de pulsação dos Blackworms.

- A fração F1 e o soro do látex, na concentração de 0,01%, no cultivo de fibroblastos e macrófagos apresentaram melhor viabilidade celular no período de 72h de incubação. A membrana de látex apresentou viabilidade celular superior em todos os períodos de incubação quando comparados ao controle, porém seus resultados foram mais satisfatórios no intervalo de 72h.

- A revelação do gel desnaturante apresentou resultado satisfatório quanto a qualidade das amostras de RNA.

- A análise *in silico* dos primers mostrou-se satisfatória para posterior teste de quantificação da expressão gênica.

- Os resultados demonstram que houve aumento significativo nas expressões dos genes VEGF, FGF e TGF na membrana e nas frações F1 e soro do látex quando comparadas ao controle, evidenciando o potencial angiogênico dessas frações.

## **7 DIFICULDADES ENCONTRADAS**

A pandemia causada pelo novo Coronavírus foi um complicador comum para os cientistas brasileiros e do mundo, trazendo limitação física, ansiedade, além das dilatações de prazos de projetos de pesquisa. Adicionalmente, trouxe uma realidade bastante diferente, apresentando novos desafios. Desta forma, foi necessário reavaliar as questões de programação de pesquisa e adiar por alguns meses o desenvolvimento experimental do meu trabalho, como por exemplo as análises de qPCR e o cultivo celular. Porém todos os obstáculos, foram considerados como novos desafios motivando-me a aprender e superar as dificuldades encontradas.

## **8 PERSPECTIVAS**

Como proposta para estudos futuros, seria interessante a realização de outras análises a fim de complementar os resultados obtidos, tais como:

- Verificar a atividade de cicatrização em membranas de látex natural suplementadas com as frações F1 e soro a fim de avaliar se essas frações ficam retidas na membrana ou ocorre liberação.

- Comparar o tempo de regeneração dos blackworms quando colocados em meio de cultivo contendo as amostras: membrana, frações F1 e soro de látex natural.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEGÃO, K. G. B. **Efeitos do gel de plasma rico em plaquetas heterólogo na cicatrização de feridas dérmicas padronizadas em coelhos.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Presidente Prudente. Universidade do Oeste Paulista.

ABRAHAM, J. A.; KLAGSBRUN, M. Modulation of wound repair by members of the fibroblast growth factor family. **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair.** 2. ed., p.195-248, New York: Plenum, 1996.

AGOSTINI, D. L. S. **Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese.** 2009. 87 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2009.

BALABANIAN, C. A. *et al.* Biocompatibility of natural látex implanted into dental alveolus of rats. **J. Oral Sci.**, v. 48, p. 201–205, 2006.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 41(1): 27-51, 2005

BARRIOS, V. A. E.; MENDEZ, J. R. R.; AGUILAR, N. V. P.; ESPINOSA, G. A.; RODRÍGUEZ, J. L. D. FTIR — Uma Técnica Essencial de Caracterização para Materiais Polimédicos. In: **Theophanides T.**, editor. *Ciência de Materiais, Engenharia e Tecnologia.* Intechopen; Londres, Reino Unido: 2012.

BARROS, N. R. *et al.* Oxytocin Sustained Release Using Natural Rubber Latex Membranes. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 22, n. 4, 2016.

BARROS, N. R. *et al.* Natural latex-glycerol dressing to reduce nipple pain and healing the skin in breastfeeding women. **Skin research and technology: official journal of International Society for Bioengineering and the Skin**

**(ISBS)** [and] **International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS)**, v. 25, n. 4, p. 461-468, jul. 2019.

BARROS, N.R. *et al.* Highly absorptive dressing composed of natural latex loaded with alginate for exudate control and healing of diabetic wounds. **Materials Science and Engineering**, v. 119, 2021.

BENNETT, G.; DEALEY, C.; POSNETT, J. The cost of pressure ulcers in the UK. **J. Woundcare**, p. 230-235, 2004.

BERNABEU, C. *et al.* The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. **Biochim Biophys Acta.**, v.1792, n.10, p. 954-973, out. 2009.

BLACKLEY, D. C. Polymers Latices. **Chapman & Hall: Glasgow**, v. 2, p. 138, 1997.

BOHRER, K.E. Effects of drugs on pulsation rate of *Lumbriculus variegatus*. **Tested Studies for Laboratory Teaching**, v.27, p.127-146, 2006.

BOJRAB, M. J. Large-segment tracheal resection and interannular anastomosis with a tension-release technique in the dog. **Am J. Vet. Res.**, v. 43, p.217-223, fev. 1982.

BONDKE, P. Vascular Growth in Health and Disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 4, 2014.

BORGES, F.A. *et al.* Natural Rubber Latex: Study of a novel carrier for *Casearia sylvestris* Swartz delivery. **ISRN Polymer Science**, v. 2014, p. 1-5, 2014.

BORGES, F. A. *et al.* Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application. **Journal of Biomaterials Science**, v. 26, n. 17, p. 1256–1268, 22 nov. 2015.

BOSNARDO, C. A. F. Treatment of venous stasis ulcer, through cell therapy with keratinocyte autograft in patients users of micronized diosmin hesperidin. In: 19th European Chapter Meeting of the International Union of Angiology, 2010, Paris. **Anais do evento**, 2010. v.1. p. 56-56.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. A brief history of wound care. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7, p. 6–11, 2006.

CAMPOS, A. C. L, BORGES-BANCO, A. Cicatrização de feridas. **Arq. Bras. Cir. Dig.**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature Medicine**, v. 6, 2000.

CAPP, C., *et al.* Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. **Revista HCPA**, v. 29, n.1, 2009.

CESAR, M. B. *et al.* Development and Characterization of Natural Rubber Latex and Polylactic Acid Membranes for Biomedical Application. **Journal Of Polymers And The Environment**, v. 28, n. 1, p. 220-230, 31 out. 2019.

CHEN, G.; SATO, O. T.; OOHGUSHI, H.; TSTEISHI, T.; TANAKA, J. Culturing of skin fibroblasts in a thin PLGA-collagen hybrid mesh. **Biomaterials**, v. 26, p. 2559-2566, 2004.

CHAVES, D. A. *et al.* Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 18, n. 2, p. 524-530, 2016.

CHOUKROUN, J.; DISS, A., SIMONPIERI, A. *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, p. 299-303, 2006.

CHUA, A. W. C. *et al.* Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications. **Burns & Trauma**, v. 4, n. 1, p. 3, 2016.

CHUNG, A. S.; FERRARA, N. Developmental and Pathological Angiogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 1, p. 27, 2011.

CLARK, R. A. F. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 13, p. 701-725, 1985.

CORTEZ, D. N.; MORAES, J. T.; FERREIRA, I. R.; SILVA, E. L.; LANZA, F. M. Custos do tratamento de lesões cutâneas na Atenção Primária à Saúde. **Braz. J. Enterostomal**, p. 4-6, 2019.

COSTA, A. M.; MATOZINHOS, A. C. S.; TRIGUEIRO, P. S.; CUNHA, R. C. G.; MOREIRA, L. R. Custos do tratamento de úlceras por pressão em unidade de cuidados prolongados em uma instituição hospitalar de Minas Gerais. **Enferm. Rev.** v.18, n.1, 2015.

COTINGUIBA, G. G. *et al.* Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n.3, p. 231-237, 2013.

DOLE, M. N.; PATEL, P. A.; SAWANT, S. D.; SHEDPURE, P. S. Advance Applications of Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Int. J. Pharm. Sci. Rev.**, v. 7, p. 159-166, 2011.

DREWES, C. D.; FOURTNER, C. R. Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Organization of escape reflexes in regenerating body fragments. **Developmental Biology**, v. 138, p. 94-103, 1990.

D'SOUZA, R. N.; HAPPONEN, R. P.; RITTER, N. M.; BUTLER, W. T. Temporal and spatial patterns of transforming growth factor-beta 1 expression in developing rat molars. **Arch Oral Biol.**, v. 35, n. 12, p. 957-965, 1990.

EMINING, S. A.; WERNER, S.; BUGNON, P.; WICKENHAUSER, C.; SIEWE, L.; UTERMOHLEN, O. Accelerated wound closure in mice deficient for interleukin-10. **Am. J. Pathol.**, v. 170, p. 188-202, 2007.

ERENO, C. *et al.* Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 95, p. 932-939, 2010.

FERRARA, N; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat. Med.**, v. 9, n. 6, p. 669-676, June 2003.

FERRARA, N. VEGF and Quest for Tumor Angiogenesis Factos. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 10, p. 795-803, Oct. 2002.

FLORIANO, J. F. *et al.* Ketoprofen loaded in Natural rubber latex transdermal patch for tendinitis treatment. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, p. 2281-2289, 2018.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 10931-10934, 1992.

FRADE, M. A. C.; VALVERDE, R. V.; ASSIS, R. V. C.; COUTINHO-NETO, J. Chronic phlepathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **Intern J. Derm**, v. 40, p. 237-240, 2001.

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

GALIANI, P. D. **Evaluation and characterization of natural rubber from different clones of *Hevea brasiliensis* cultivated in mato grosso and bahia states.** 2010. 183 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

GARMS, B. C. *et al.* Characterization and Microbiological Application of Ciprofloxacin Loaded in Natural Rubber Latex Membranes. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2017.

GARRET, I. R. *et al.* Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. **J. Clin. Invest.**, v. 85, n. 3, p. 632-639, 1990.

GEMEINDER, J. L. P. *et al.* Gentamicin encapsulated within a biopolymer for the treatment of Staphylococcus aureus and Escherichia coli infected skin ulcers. **Journal Of Biomaterials Science, Polymer Edition**, p. 1-19, set. 2021.

GETHIN, G.; JORDAN-O'BRIEN, J.; MOORE, Z. Estimating costs of pressure area management based on a survey of ulcer care in one Irish hospital. **J. Wound Care**, v. 14, n. 4, p. 162-165, 2005.

GIVOL, D.; YAYON, A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. **FASEB J.**, v. 6, n. 15, p. 3362-3369, 1992.

Grupo Investigação Científica em Enfermagem. **Enfermagem e úlceras por pressão: da reflexão sobre a disciplina às evidências nos cuidados: coletânea** [Internet]. Angra do Heroísmo, PT; 2008

GUERRA, N. B. *et al.* Biomedical applications of natural rubber latex from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 126, p. 112-126, 2021.

**Guia de feridas.** Disponível em: <http://www.uniara.com.br/arquivos/file/cursos/graduacao/farmacia/guias-de-medicamentos/guia-feridas.pdf>. 2011.

GUO, L.; DEGENSTEIN, L.; FUCHS, E. Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. **Genes Dev.**, v. 10, p. 165-175, 1996.

GUPTA, J.; GUPTA, A.; GUPTA, A. K. Extraction and identification of flavonoid natural antioxidant in the leaves of *Rauwolfia serpentina*. **International Journal of Chemical Studies**, v. 3, n. 1, p. 35-37. 2015.

GURYANOV, I.; FIORUCCI, S.; TENNIKOVA, T. Receptor-ligand interactions : Advanced biomedical applications. **Materials Science & Engineering C.**, v. 68, p. 890-903, 2016.

HADDAD, M. C. L.; ALMEIDA, H. G. G.; GUARIENTE, M. H. D. M.; KARINO, M. E.; BARCELOS, M. R. Avaliação sistemática do pé diabético. **Diabetes Clín.**, v. 9, n. 3, p. 187-192, 2005.

HERCULANO, R. D. **Desenvolvimento de membranas de látex natural para aplicações médicas**, 2009. Tese (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

HERCULANO, R. D. *et al.* Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR). **Mater. Res.**, v. 12, n. 2, p. 253–256, 2009.

HERCULANO, R. D. On the release of metronidazole from natural rubber latex membranes. **Materials Science and Engineering**, v. 31, p. 272-275, 2011.

HERCULANO, R. D.; QUEIROZ, A. A. A.; KINOSHITA, A.; OLIVEIRA, O.N.; GRAEFF, C. F. O. On the release of metronidazole from natural rubber latex membranes. **Mat. Sci. Eng.**, v. 31, n. 2, p. 272-275, 2011.

HUMINIECKI, L.; GOLDOVSKY, S.; FREILICH, A.; MOUSTAKAS, C. Emergence, development and diversification of the TGF- $\beta$  signalling pathway within the animal kingdom. **BMC Evol. Biol.**, v. 9, n. 1, p. 28, 2009.

JAMIESON, B. G. M. **The ultrastructure of the oligochaeta**. London, Academic Press., 1981. 462p.

KANG, J. S.; DERYNCK, R. New regulatory mechanisms of TGF- $\beta$  receptor function. **Trends Cell Biol.**, v. 19, n. 8, p. 385-394, ago. 2009.

KASEB, A. O.; HANBALI, A.; COTANT, M.; HASSAN, M. M.; WOLLNER, I. Vascular endothelial growth factor in the management of hepatocellular carcinoma: a review of literature. **ACS Journals**, v.115, n. 21, 2009.

KERCHE-SILVA, L. E.; CAVALCANTE, D. G. S. M.; JOB, A. E. Natural Rubber Latex Biomaterials in Bone Regenerative Medicine. **Biomaterials In Regenerative Medicine**, p.302-317, 2018.

KIBE, Y.; TAKENAKA, H.; KISHIMOTO, S. Spatial and temporal expression of basic fibroblast growth factor protein during wound healing of rat skin. **Br. J. Dermatol.**, v. 143, p. 720-727, 2000.

KONG, J.; Yu, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, p. 549-559, 2007.

LEE, E. H.; KAO, W. W.; SCHWARZ, R.I. Cell density regulates prolyl 4-hydroxylase activity independent of mRNA levels. **Matrix Biol.**, v. 19, n. 8, p. 779-782, 2011.

LEITE, M. N.; LEITE, S.N.; CAETANO, G. F.; ANDRADE, T. A. M.; FRONZA, M. Healing effects of natural latex serum 1% from *Hevea brasiliensis* in an experimental skin abrasion wound model. **An Bras Dermatol.**, v. 95, p. 418-27, 2020.

LESIUK, N. M.; DREWES, C. D. Blackworms, Blood Vessel Pulsations & Drug Effects. **The American Biology Teacher**, v. 61, n. 1, p. 48-53, 1999.

LI, J.; FOITZIK, K.; CALAUTTI, E.; BADEN, H.; DOETSCHMAN, T.; DOTTO, G. P. TGF-beta3, but not TGF-beta1, protects keratinocytes against 12-O-tetradecanoylphorbol13-acetate-induced cell death in vitro and in vivo. **J. Biol. Chem.** v. 9, p. 4213-4219, 1999.

LIMA, A. C. B.; GUERRA, D. M. Avaliação do custo do tratamento de úlceras por pressão em pacientes hospitalizados usando curativos industrializados. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 16, n. 1, p. 267-277, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, p.402-408, 2001.

LORENZ, H. P.; LONGAKER, M. T. Wound Biology, Pathology and Management. In: **Essential Practice of Surgery**. Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/0-387-22744-X\\_7](https://doi.org/10.1007/0-387-22744-X_7)

MALDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MALDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte II. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 5, p. 525-40, 2003.

MAN, D., PLOSKER H., WINLAND-BROWN, J. E. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. **Plast Reconstr Surg.**, v. 107, n. 1, p. 229-37, 2001.

MARCHESE, C.; CHEDID, M.; DIRSCH, O. R.; CSAKY, K. G.; SANTANELLI, F.; LATINI, C.; LAROCHELLE, W. J.; TORRISI, M. R.; AARONSON, S. A. Modulation of keratinocyte growth factor and its receptor in reepithelialising human skin. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 1369-1376, 1995.

MARIE, P. J. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. **Gene**, p.316-332, 2003.

MARQUES, C. M. G.; SUZUKI, D. O. H.; MARQUES, J. L. B. Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Skin Wound Healing: What Has Been Done Recently - A Mini Review. **Advances in Tissue Engineering & Regenerative Medicine**, v. 2, n. 4, p. 9-11, 2017.

MARTINS, R. *et al.* Comparative study of bone response guided tissue regeneration technique-macroscopic evaluation, Part 1. **Full Dent. Sci.**, v.1, n. 3, p. 224-230, 2010.

MARX, R. E. **Platelet-rich plasma: evidence to support its use. Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v. 62, p. 489-496, 2004.

MATSUNAGA, Y. *et al.* VEGF-A and VEGF-F evoke distinct changes in vascular ultrastructure. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 379 n. 4, p. 872-875, 2009.

MENCIA-HUERTA, J. M. Rôle des mastocytes et des polynucléaires basophiles et éosinophiles dans les phénomènes. **Veterinary Research Communication, Bologna**, v. 24, p. 358-359, 1993.

MENDONÇA, R. J. **Purificação e caracterização de uma proteína angiogênica, indutora de fibroplasia e cicatrizante presente no Látex Natural da seringueira *Hevea brasiliensis***. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (Tese de Doutorado) p.145. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de Paulo, Ribeirão Preto, 2008

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An. Bras. Dermatol.**, v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.

METHA, R.C.; FITZPATRICK, R. E. Endogenous growth factors as cosmeceuticals. **Dermatologic Therapy**, v. 20, p. 350-359, 2007.

MIYAZAWA, M., **Efeito da inibição dos receptores de fator de crescimento endotelial vascular na angiogênese tumoral em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço.** 2007. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo: Bauru, 2007.

MIGNATTI, P.; TSUBOI, R.; ROBBINS, E.; RIFKIN, D. B. In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: Requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. **J. Cell. Biol.**, v. 108, n. 2, p. 671-682, 1989.

MRUÉ, F. **Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães.** 2000. 112f. Tese (Doutorado em Clínica Médica), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

MRUÉ, F. **Substituição do esôfago cervical por prótese bio sintética de látex. Estudo experimental em cães.** 1996. 86f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

MUELLER, O.; LIGHTFOOT, S.; SCHROEDER, A. RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control. Tech. Rep. 5989-1165EN, **Agilent Technologies, Application Note**, 2004.

MUNIZ, J. J.; IZIDORO-TOLEDO, T.C.; METZGER, I. F.; SANDRIM, V. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Interethnic differences in the distribution of clinically relevant vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms. **DNA Cell Biol.**, v. 28, n. 11, p. 567-572, 2009.

MURBACH, H. D.; OGAWA, G. J.; BORGES, F.A.; MIRANDA, M. C. R.; LOPES, R.; BARROS, N. R.; MAZALLI, A. V. G.; SILVIA, R. G.; CINMAN, J. L. F.; DRAGO, B. C.; HERCULANO, R. D. Ciprofloxacin release using natural rubber latex membranes as carrier. **Int J Biomater**, 2014. doi:10.1155/2014/157952

NASCIMENTO, A. M. R.; **Estudo do látex e fruto da sorva pela espectroscopia de ressonância magnética nuclear.** Tese (Doutor em Ciências, em Ciência e Tecnologia de Polímeros), Universidade Federal do Rio de Janeiro - IMA/UFRJ - Rio de Janeiro – RJ, 2006.

Neto, J. C. L. **Considerações sobre a cicatrização e o tratamento de feridas cutâneas em equinos.** Merial Brasil, 2003. Disponível em: [http://www.merial.com.br/veterinaries/equinos/biblioteca/equinos\\_documentoLis t](http://www.merial.com.br/veterinaries/equinos/biblioteca/equinos_documentoLis t).

PAQUES, M. M. P.; GAUDRIC, A. Growth factors and diabetic retinopathy. **Diabetes Metab.**, v. 23, n. 2, p. 125-130, 1997.

ORNITZ, D. M. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. **Bioessays**, v. 22, n. 2, p.108-112, 2000.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol.**, v. 2, n. 3, p. 1-12, 2001.

PEACOCK, E. E. **Wound repair.** Philadelphia: W.B. Saunders, 1984. p. 263-278.

PEGORIN, G. S. et al. Physico-chemical characterization and tissue healing changes by *Hancornia speciosa* Gomes latex biomembrane. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 109, n. 7, p. 938-948, 2021.

PEGORIN, G. S. *et al.* Natural latex serum: characterization and biocompatibility assessment using *Galleria mellonella* as an alternative *in vivo* model. **Journal of Biomaterials Science**, v. 33, n. 6, p. 705-726, 2022.

PHILIP, M. D. *et al.* The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. **Journal of Surgical Research**, v.153, p.347-358, 2009.

PIERRE R.; JEAN-LUC, C. **Vulcanizable rubber composition for the manufacture of a tire, and a tire, the tread of which comprises such a composition.** Michelin Rech. Tech. 2003.

PINHO, M. D. S. L. Angiogênese: o gatilho proliferativo. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 25, n. 4, p. 396-402, 2005.

PIRES, A. L. *et al.* Biomaterials: Types, Applications and Market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, 2015.

RAISER, A. G. **Regeneração tecidual.** Patologia Cirúrgica Veterinária. 1. ed. Santa Maria, 2000, cap. 5, p. 83-95.

RASIER, R.; ARTUNAY, O.; YUZBASIOGLU, E.; BAHCECIOGLU, H. The effect of intravitreal bevacizumab (avastin) administration on systemic hypertension. **Eye** (London,England), v. 23, n. 8, p. 1714-1718, 2008.

RIPPEL, M.M. **Caracterização microestrutural de filmes e partículas de látex de borracha natural.** Tese (Doutorado em Ciências na área de Físico-química) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química UNICAMP – Campinas, SP (2005).

ROLERE, Sébastien, *et al.* Investigating natural rubber composition with Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid and non-destructive method to determine both protein and lipid contents simultaneously. **Polymer Testing**, v. 43, p. 83-93, 2015.

ROSKOSKI, J. R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 62, n. 3, p. 179-213, 2007.

Ryan, A. B.; ELWESS, N. L. A New Approach in Examining the Influence of Drugs on Pulsation Rates in Blackworms (*Lumbriculus variegatus*). **Journal of College Biology Teaching**, v. 43, n. 2, 2017.

SAMBROOK, D. W. R. "**Molecular Cloning – A Laboratory Manual**," 3 ed., vol. 2, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, p. 8.04 – 8.102.

SAREMI, A.; ARORA, R. The cardiovascular implications of alcohol and red wine. **Am Ther.**, v. 15, p. 265-77, 2008.

SERPOOSHAN, V. *et al.* Reduced hydraulic permeability of threedimensional collagen scaffolds attenuates gel contraction and promotes the growth and differentiation of mesenchymal stem cells. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 10, p. 3978-3987, 2010.

SETHURAJ, M. R.; MATHEW, N. M. Natural Rubber. Biology, Cultivation and Technology. **Elsevier Science**, Netherlands, 1992.

SHI, Y.; MASSAGUE, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell.**, v. 113, n. 6, p. 685-700, jun. 2003.

SILVA, T. V. *et al.* Voriconazole-natural latex dressings for treating infected *Candida* spp. skin ulcers. **Future Microbiol.**, Araraquara, v. 15, n. 15, p. 1-15, nov. 2020.

SIMO, R.; HERNANDEZ, C. Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia*, v. 51, n. 9, p. 1574-1580, 2008.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N. Engl. J. Med.**, p. 738-46, 1999.

SOARES, F. **Primeiros socorros**. Instituto Formação Cursos Técnicos, 2013.

SUN, B. K.; SIPRASHVILI, Z.; KHAVARI, P.A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. **Science**, v. 21, n. 346, p. 941-945, 2014.

TANAKA, J. L. *et al.* Natural rubber dressing loaded with silver sulfadiazine for the treatment of burn wounds infected with *Candida* spp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 189, p. 597-606, 2021.

UZABAKILIHU, B.; LARGEAU, C.; CASADEVALL, E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*. **Journal Phytochemistry**, v. 26, n. 11, p. 3041-3045, 1987.

VERMOLENA, F. J.; BAARENA, V. E.; ADAMB, J.A. A simplified model for growth factor induced healing of wounds. **Mathematical and Computer Modelling**, v. 44, p. 887-898, 2006.

WANG, X.; SEED, B. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 24, p. 154, 2003.

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

WISNIEWSKI, A. **Látex e Borracha**. Faculdade de Ciências Agrárias do Pará. Belém: FCAP, 1983. 171 p.

YOUNG, L. R.; INOUE, Y.; MCCORMACK, F. X. Diagnostic Potential of Serum VEGF-D for Lymphangiomyomatosis. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 2, p. 199-200, 2008.