

## NEOFORMAÇÃO TECIDUAL EM CAMUNDONGOS INDUZIDA PELA BIOMEMBRANA DE LÁTEX DA SERINGUEIRA *Hevea brasiliensis*.

Thiago Antônio Moretti de Andrade (tmoretti@usp.br)<sup>1</sup>, Saulo Nani Leite (sanale@sc.usp.br)<sup>2</sup>, Marco Andrey Cipriani Frade (mandrey@fmrp.usp.br)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Depto. Clínica Médica - Divisão de Dermatologia, Av Bandeirantes, 3900 Ribeirão Preto-SP.

<sup>2</sup>Interunidades em Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP) – Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), Av. Trabalhador São-carlense, 400, São Carlos-SP, Brasil.

**Abstract: Natural Latex Biomembrane (NLB) stimulates the healing by the presence of a proteic fraction. However, its mechanism of action is not clear. It was evaluated NLB activity comparing it to other implants (glove - denatured latex; ePTFE) and normal healing (sham). These biomaterials were subcutaneously implanted in 15 C57BL/6 mice per group, and after 2, 7 and 14 days 5 animals/group were biopsied and were analyzed the inflammatory infiltrate, angiogenesis and fibroplasia by HE histology; collagenesis by Gomori trichrome and finally myeloperoxidase assay. NLB stimulated the inflammatory phase of healing mainly by local neutrophilic recruitment, influencing the subsequent phases.**

**Palavras-chave: Biomateriais, *Hevea brasiliensis*, latex, wound, inflammation.**

### Introdução

Vários são os biomateriais utilizados como estimuladores da cicatrização. A biomembrana de látex natural (BLN) da seringueira *Hevea brasiliensis* é um biomaterial estimulador desse processo.

Estudos prévios com a BLN demonstraram seu favorecimento no reparo de defeitos parciais do esôfago de cães [1], biocompatibilidade [2], neoangiogênese de córneas em coelhos [3], cicatrização de queimaduras induzidas no dorso de porcos da raça Nilo [4], reconstrução da membrana timpânica em coelhos [5], dentre outros. Nos estudos em humanos, a BLN mostrou-se eficiente na cicatrização de úlceras diabéticas [6], venosas crônicas [7] e de pressão [8]. Entretanto, ainda é desconhecido seu real mecanismo de ação diante das diferentes etiologias e grau de evolução das úlceras.

São vários os biomateriais estudados como implantes subcutâneos, mostrando ser este um modelo adequado para avaliar as modificações teciduais decorrentes dos implantes de produtos descritos como estimuladores da cicatrização e suas modificações imunológicas resultantes [9], como as que ocorrem com a biomembrana de látex.

Assim, conhecida a composição glicoprotéica da BLN [1, 2] torna-se importante comparar a sua atividade com a da luva cirúrgica (látex desnaturado sem atividade protéica), a do ePTFE (PoliTetraFluorEtileno Expandido – implante sintético) e a da cicatrização normal (sham) nas diferentes fases

da cicatrização, utilizando a implantação subcutânea na região dorsal de camundongos, por 2, 7 e 14 dias de seguimento.

### Materiais e Métodos

#### Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos com 8 a 10 semanas. Os procedimentos experimentais estão de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (processo 055/2005).

#### Biomateriais

BLN: látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* polimerizado sob temperatura regulada a 60°C [2]; luva: tipo cirúrgica estéril, sem talco (Supermax, Curitiba, PR, Brasil), vulcanizada a temperaturas >110°C (látex desnaturado); ePTFE: PoliTetraFluorEtileno Expandido (Bionnovation Biomedical, Coral Gables, FL, USA).

#### Procedimento cirúrgico

Os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com tribromoetanol 2,5% e submetidos à incisão cutânea linear no dorso (0,5 cm) para o implante subcutâneo dos diferentes biomateriais. Os camundongos foram divididos em 4 grupos distintos pelo tipo de implante (1cm<sup>2</sup>): BLN, luva, ePTFE ou sem implante (sham), compostos de 5 animais cada (n=5), submetidos a posterior sutura da incisão em pontos simples por fio nylon 5-0.

#### Coleta do material para estudo

Cinco animais de cada grupo foram sacrificados sob anestesia em câmara com éter no 2º, 7º e 14º dias. A pele dorsal foi recortada incluindo o implante e a musculatura aderida, sendo coletados 2 fragmentos cilíndricos com *punch* 4 mm para estudos histológicos e para dosagem de mieloperoxidase.

#### Imunohistologia

Os fragmentos de 5 µm embebidos em parafina foram corados com hematoxilina-eosina para análise da resposta inflamatória, angiogênica e fibroblástica; com tricrômio de Gomori para análise da colagênese e imunohistoquímica para VEGF (1:100).

#### Infiltrado inflamatório, angiogênese e fibroplasia

– As lâminas foram visibilizadas no microscópio óptico Leica® DM 4000B com câmera Leica® DFC 280 conectada ao computador com *software Leica Application Suite*. Antes da captura foi padronizada a área do campo visual relativa à região de interesse (*ROI-Region of Interest*) de 900 x 300 pixels no

aumento de 400x, sendo capturadas 10 imagens nessas dimensões [10]. Nessas imagens foi utilizado o *plugin "Cell Counter"* do software ImageJ 1.36 para contagem de células do infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos e fibroblastos. A diferenciação de cada célula foi feita pelo observador na imagem da lâmina, aplicado em 3 amostras diferentes (n=3) de cada tratamento em cada tempo, considerando como resultado final a média do número das células em questão encontradas na amostra.

**Colagênese** –Na análise histológica das lâminas coradas pelo tricrômio de Gomori, foram capturadas 10 imagens sob ROI de 320 x 40 pixels (2,64 x 0,33 µm) no aumento de 100x [10]. Foi utilizado o *plugin "Threshold color"* do ImageJ para determinar o limite dos tons de azul (colágeno) da imagem em % da área. Foi aplicado em 3 amostras diferentes (n=3) de cada tratamento em cada tempo, sendo o resultado final a % média de colágeno na amostra.

#### Dosagem de mieloperoxidase

O acúmulo de neutrófilos no tecido foi medido pelo método de dosagem de mieloperoxidase [11]. Após coleta, a amostra foi acondicionada em *eppendorf* com buffer gelado (NaCl 0,1 M, NaPO<sub>4</sub> 0,02 M, NaEDTA 0,015 M, pH 4,7). O tecido foi pesado e em seguida homogeneizado em Polytron® PT 3100 a 13000 rpm. No *pellet* foi feita lise hipotônica com solução de NaCl 0,2% e após 30s adição de NaCl 1,6% com glicose 5%. Após centrifugação, o *pellet* foi ressuscitado em buffer NaPO<sub>4</sub> 0,05 M (pH 5,4) contendo 0,5% *hexadecyltrimethylammonium bromide* e re-homogeneizado. Após centrifugação a 13000 rpm, 5 µL do sobrenadante foram utilizados para a dosagem em placas de 96 wells diluído em 45 µL de NaPO<sub>4</sub> 0,08 M. A atividade da mieloperoxidase no sobrenadante foi dosada usando *tetramethylbenzidine* (TMB) 1,6 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) e lida no leitor de placas de 96 wells à 450 nm. Os resultados foram expressos em número total de neutrófilos x 10<sup>3</sup>/mg de tecido comparando a densidade óptica (D.O.) do sobrenadante do tecido com a D.O. do neutrófilo peritoneal de rato (neutrófilos do peritônio do rato induzidos por injeção de 3 mL de caseína 5%) em uma curva padrão e processados da mesma maneira.

#### Análise dos resultados

Foi aplicado o teste estatístico One-Way ANOVA e Bonferroni. Os valores de p<0,05 mostram evidências estatísticas de que há diferença entre os dados em questão sob intervalo de confiança de 95%.

## Resultados

### Fase Inflamatória

O grupo BLN apresentou reação inflamatória mais acentuada que os demais grupos com intenso predomínio de neutrófilos no infiltrado inflamatório, confirmado principalmente pela dosagem de mieloperoxidase já no 2º dia de seguimento (p<0,01) (Figura 1). Quanto à contagem de células inflamatórias observou-se no 2º dia que a BLN estimulou o recrutamento em quantidade superior, estatisticamente,

ao ePTFE e ao sham (p<0,01), e o grupo luva foi superior ao sham (p<0,01) (Figura 2). No 7º dia a BLN apresentou diminuição significativa de sua atividade inflamatória, observada tanto pelo infiltrado quanto pela dosagem de MPO, entretanto esta foi semelhante aos outros implantes pela análise por MPO, sendo estatisticamente significativa em relação ao sham (p<0,01). No 14º dia observa-se persistência do estímulo inflamatório nos grupos BLN e luva respectivamente diferente do ePTFE (p<0,01 / p<0,02) e do sham (p<0,02 / p<0,05) (Figura 1).

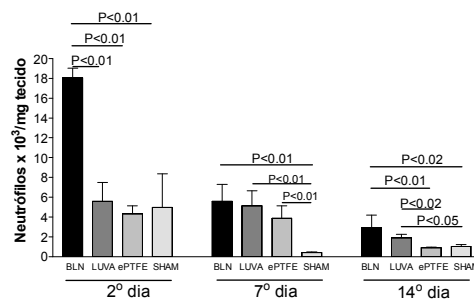


Figura 1: Dosagem de mieloperoxidase.

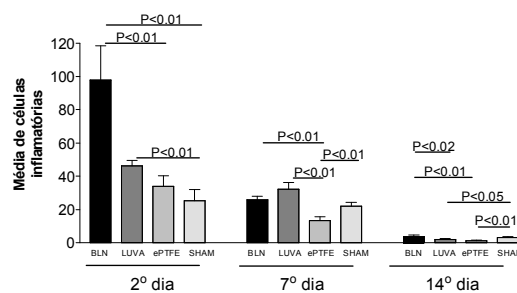


Figura 2: Contagem de células inflamatórias pelo ImageJ.

### Angiogênese

Os grupos BLN e luva apresentaram inúmeros vasos neoformados já no 7º dia, porém sem diferença estatística em relação ao ePTFE e sham. A formação de vasos nos grupos BLN e luva mantiveram-se estáveis no 14º dia em relação ao 7º. No entanto, no 14º dia estes grupos apresentaram formação vascular superior a do sham, sendo p<0,01 e p<0,05 respectivamente (Figura 3).

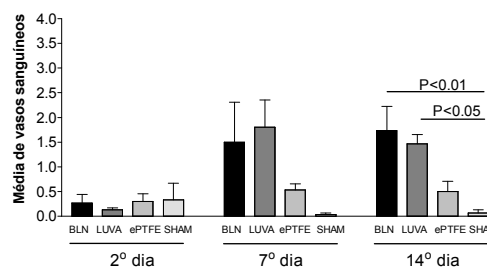


Figura 3: Contagem de vasos sanguíneos pelo ImageJ.

Em relação ao VEGF no 7º dia (Figura 4 A-D), todos os grupos apresentaram importante marcação a qual se manteve nos grupos BLN, ePTFE e sham, enquanto diminuiu no grupo luva com 14 dias (Figura 4 E – H).

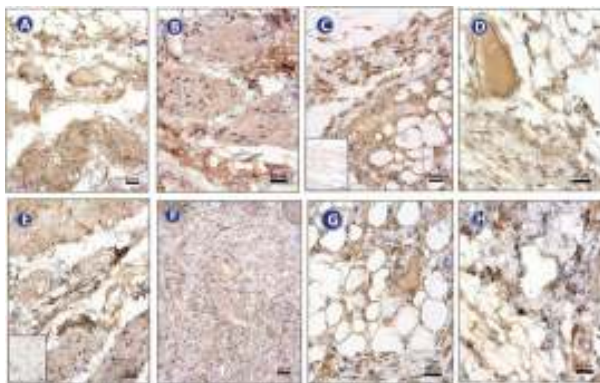


Figura 4: Imunohistoquímica para VEGF no 7º (A – D) e 14º (E – H) dias de implante. Grupos BLN (A / E), luva (B / F), ePTFE (C / G) e sham (D / H). [Detalhe: controle negativo].

### Fibroplasia

Os grupos BLN e luva no 7º dia apresentaram quantidade semelhante de fibroblastos, porém superiores em relação ao sham ( $p < 0,01$ ). Já o ePTFE apresentou maior número de fibroblastos diferente em relação aos demais tratamentos ( $p < 0,01$ ). Com 14 dias a BLN apresentou maior fibroplasia que o ePTFE ( $p < 0,01$ ) e sham ( $p < 0,04$ ) (Figura 5).

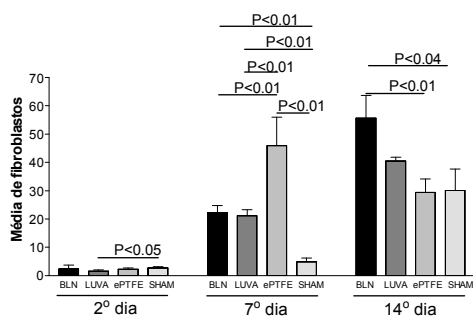


Figura 5: Contagem de fibroblastos pelo ImageJ

O grupo ePTFE no 14º dia apresentou maior porcentagem de colágeno, superior aos grupos BLN e luva ( $p < 0,01$ ). Da mesma forma, o grupo sham também foi superior à BLN com  $p < 0,03$  e ao grupo luva com  $p < 0,02$ . Com 2 e 7 dias de seguimento, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 6).

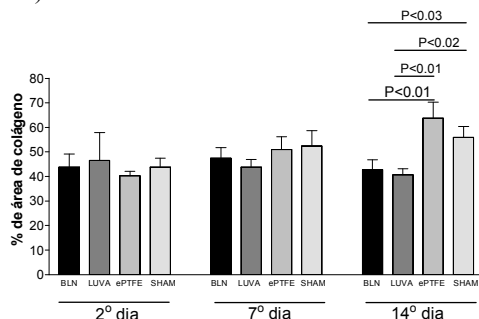


Figura 6: Determinação da % de área de colágeno pelo ImageJ

### Discussão

O modelo de implantes subcutâneos mostrou-se apropriado para avaliar a indução de neoformação tecidual nos seus aspectos imunohistológicos.

Kyriakides et al., (2001) relataram que o método de implantação subcutânea é preferido para avaliação das propriedades inerentes aos implantes, desconsiderando a influência de fatores adicionais como, por exemplo, microorganismos em modelos de úlcera aberta, que de alguma forma modificariam o processo cicatricial. Dessa forma, optou-se por utilizar o método de implantação subcutânea (modelo de úlcera fechada) para estudo da indução de neoformação tecidual estimulada pela BLN.

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

No 2º dia de seguimento, importante para avaliação da fase inflamatória da cicatrização, os leucócitos são recrutados até o local da lesão para o desbridamento local, fagocitose de bactérias e tecidos necróticos [12].

Foi observado que a BLN estimulou ativamente a fase inflamatória no 2º dia após o implante, como demonstrado pelo número médio das células inflamatórias significativamente maior que nos demais grupos ( $p < 0,01$ ), principalmente às custas do intenso número de neutrófilos, atingindo até camadas mais profundas da pele, achados corroborados pela concentração de MPO (Figuras 1 e 2). Esses resultados parecem confirmar os achados clínicos de Frade et al., (2004) e Frade et al., (2006) os quais relataram a importância da atividade desbridante da BLN no seguimento das úlceras diabéticas e de pressão respectivamente. Tal feito não foi observado no grupo luva confirmando a importância da atividade da(s) proteína(s) nativa(s) do látex no processo cicatricial como descrito por Mrué, 1996; Pinho et al., 2004.

A importância da angiogênese está relacionada com a implementação de nutrientes e oxigênio para o local [13]. Foi observado que os implantes BLN e luva estimularam a neoformação de vasos, evidentes já no sétimo dia de seguimento, superior ao sham (Figura 3). Foi observado na imunohistoquímica que apenas o grupo luva apresentou diminuição da expressão do VEGF do 7º para o 14º dia, sendo sua distribuição difusa na matriz extracelular, não limitada às células endoteliais, enquanto, nos outros grupos a expressão foi similar entre os dias e com marcação intracelular (Figura 4). O aumento do número de vasos nos grupos BLN e luva no 7º e 14º dias e a não modificação na expressão do VEGF nesses grupos e tempos, sugerem que a angiogênese possa estar relacionada à intensa atividade inflamatória prévia, desencadeada pela participação de neutrófilos e/ou macrófagos. Como proposto por Sisco et al., (2007), a formação do tecido de granulação é particularmente dependente da função macrofágica que desempenha um papel de orquestrador da migração e proliferação fibroblástica, deposição de matriz e angiogênese.

Na avaliação da fibroplasia o ePTFE mostrou-se mais estimulador no 7º dia, diferente estatisticamente da BLN, luva e sham. Quanto à produção colagênica, destaca-se que os implantes não estimularam diferenças

na produção durante o 2º e 7º dias de seguimento. Apenas os grupos ePTFE e sham aumentaram a produção colagênica em relação à luva e à BLN no 14º dia, apesar de apresentarem menor número de fibroblastos em relação à BLN (Figuras 5 e 6).

### Conclusão

Os resultados mostraram que a biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* estimula ativamente as fases da cicatrização, principalmente a fase inflamatória constatada pelo intenso recrutamento de leucócitos para o local da lesão, aumento de mieloperoxidase em relação ao látex desnaturado (luva), fatores estes que parecem estar relacionados à maior angiogênese (independente de VEGF) e fibroplasia estimulados pela BLN em relação ao ePTFE e sham na fase de proliferação tecidual.

### Agradecimentos

Aos suportes financeiros CAPES, CNPq e FAEPA e à técnica de imunohistologia Marilena Heredia.

### Referências

- [1] Mrué, F. (1996), *Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex. Estudo experimental em cães*, Dissertação de Mestrado, Departamento de Clínica Cirúrgica, FMRP/USP, Ribeirão Preto, 114 p., dez.
- [2] Mrué, F., Coutinho-Netto, J., Coneviva, R., Lachat, J.J., Thomazini, J.A., Tambelini, H. (2004) "Evaluation of the biocompatibility of new biomembrane" *Materials research*, v. 7, n. 2, p. 277-283.
- [3] Pinho, E.C.C.M., Sousa, S.J.F., Schaud, F., Lachat, J.J., Coutinho-Netto, J. (2004) "Experimental use of latex biomembrane in conjunctival reconstruction" *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 67, p. 27-32.
- [4] Armani, A., Coutinho-Netto, J. (2001) "Aceleração do reparo tissular em modelo experimental de úlcera dérmica induzida por biomembrana de látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*", In: *Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (9º SIICUSP)*, Ribeirão Preto, CD-ROM.
- [5] Oliveira, J.A.A., Hyppolito, M.A., Coutinho-Netto, J., Mrué, F. (2003) "Miringoplasia com a utilização de um novo material biossintético" *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 69, n. 5, p. 649-655.
- [6] Frade, M.A.C., Cursi, I.B., Andrade, F.F., Coutinho-Netto, J., Barbeta, F.M., Foss, N.T. (2004) "Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane". *Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana*, v. 32, n. 4, p.157-162.
- [7] Frade, M.A.C. (2003) *Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico da cicatrização na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis**. Tese de Doutorado. Departamento de Clínica Médica, FMRP/USP, Ribeirão Preto-SP, 164 p., fev.
- [8] Frade, M.A.C., Salathiel, A.M., Mazzucato, E.L., Coutinho-Netto, J., Foss, N.T. (2006) "A natural biomembrane as a new proposal for the treatment of pressure ulcers" *Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana*, v. 34, n. 3, p. 133-138.
- [9] Kyriakides, T.R., Zhu, Y.H., Yang, Z., Huynh, G., Bornstein, P. (2001) "Altered extracellular matrix remodeling and angiogenesis in sponge granulomas of thrombospondin 2-null mice" *American Journal of Pathology*, v. 159, n. 4, p. 1255-1262.
- [10] Carvalho, P.T., Mazzer, N., Dos-Reis, F.A., Belchior, A.C., Silva, I.S. (2006) "Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats" *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 21, n. 3, p. 177-183.
- [11] Souza, D.G., Cassali, G.D., Poole, S., Teixeira, M.M. (2001) "Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury" *British Journal of Pharmacology*, v. 134, n. 5, p. 985-994.
- [12] Sherwood, E.R., Toliver-Kinsky, T. (2004) "Mechanisms of the inflammatory response" *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, v. 18, n. 3, p. 385-405.
- [13] Bates, D., Harper, S. (2003) "Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factor" *Vascular Pharmacology*, v. 39, p. 225-237.
- [14] Sisco, M., Chao, J.D., Kim, I., Mogford, J.E., Mayadas, T.N., Mustoe, T.A. (2007) "Delayed wound healing in Mac-1-deficient mice is associated with normal monocyte recruitment" *Wound Repair and Regeneration*, v. 15, n. 4, p. 566-571.
- [15] Stadelmann, W.K., Digenis, A.G., Tobin, G.R. (1998) "Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds" *American Journal of Surgery*, v. 176, n. 2A, p. 26S-38S.
- [16] Cheng, B., Fu, X., Sheng, Z., Gu, X., Sun, T., Sun, X. (2002) "The effect of basic fibroblast growth factor on myofibroblasts and its significance on wound healing" *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, v. 82, n. 17, p. 1187-1191.