

Expressão diferencial de genes associados à angiogênese em membranas corioalantóides de galinha tratadas com látex de mangabeira

Patrícia Lima D'Abadia^{1(PG)*}, Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão^{1(PQ)}, Luciane Madureira de Almeida^{1(PQ)}.

¹Universidade Estadual de Goiás - CCET, Anápolis, GO, Brazil.

*email: patricialima.bio@gmail.com

Resumo: O látex de diversas plantas apresenta potencial biotecnológico para desenvolvimento de novos fármacos. A mangabeira (*Hancornia speciosa*), planta nativa do Cerrado, produz um látex biocompatível e com propriedades angiogênicas. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial angiogênico das frações desse látex; visando identificar qual dessas frações tem potencial para ser utilizado como biomaterial para aplicações médicas. Para avaliar o potencial angiogênico, foi realizado o ensaio utilizando membrana corioalantóide (MCA) de ovos de galinha e a análise molecular da expressão de genes relacionados à angiogênese. Os resultados morfométricos obtidos pelo ensaio da MCA demonstraram um aumento significativo da rede vascular nas membranas tratadas com as frações soro e F1 do látex de mangabeira, quando comparadas aos controles neutro e inibidor. As análises moleculares mostraram uma expressão aumentada dos genes *mmp2* e *vegf*, nas MCAs tratadas com a fração F1. De forma geral, os dados obtidos neste estudo revelaram que a fração F1 do látex de mangabeira representa um importante agente angiogênico e que este biomaterial possui potencial terapêutico para ser explorado pelas ciências médicas.

Palavras-chave: Angiogênese. Expressão gênica. *Hancornia speciosa*. Plantas do Cerrado.

Introdução

A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de dois bilhões de pessoas no mundo utilizam-se da medicina popular baseada na extração de princípios ativos das plantas, para o tratamento de doenças (SMITH-HALL et al., 2012). Um produto vegetal que tem despertado interesse e já é comumente empregado para o tratamento de inúmeras enfermidades é o látex de algumas plantas. Dentre as plantas produtoras de látex, a mais conhecida e explorada comercialmente é a seringueira (*Hevea brasilienses*). Em relação às potencialidades desse látex, destacam-se suas propriedades angiogênicas, indutoras de regeneração tecidual e cicatrização de feridas em tecidos cutâneos (FRADE et al., 2012); restituição de membrana timpânica (ARAÚJO et al., 2012); regeneração de ossos (FLORIANO et al., 2016); restituição da retina de coelho (SAMPAIO et al., 2010), dentre outras.

A partir da descoberta do potencial angiogênico do látex de seringueira foi criada em 2009 uma biomembrana na forma de bandagem, chamado Biocure[®]. Atualmente, o Biocure teve sua fabricação descontinuada e foi substituído por outra

formulação em gel-creme, chamada de Regederm®, a qual é utilizada no tratamento e cicatrização de feridas cutâneas (PELENOVA, 2017).

Apesar dos expressivos resultados obtidos no uso medicinal do látex de seringueira, existem muitos relatos sobre alergias a produtos a base desse látex (RAULF, 2014). A alergia a esse látex está associada a presença de proteínas (WU et al., 2016), e representa um dos principais motivos para se buscar outras espécies lactíferas produtoras de látex com menor potencial alergênico. A mangabeira (*Hancornia speciosa*), planta nativa do Cerrado e pouco explorada comercialmente, pode ser uma alternativa pois além de apresentar baixo conteúdo proteico (MALMONGE et al., 2009), apresenta alto potencial angiogênico, boa biocompatibilidade e baixa toxicidade em célula animais (ALMEIDA et al., 2014).

A capacidade de regenerar tecidos está associada ao potencial angiogênico. Angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular pré-existente, mediante a proliferação, migração, regulação e diferenciação de células vasculares (FOLKMAN, 2003). A regulação do processo de angiogênese esta associada a expressão de alguns fatores, dentre esses o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e as metaloproteases (MMPs) recebem destaque. O VEGF é responsável pela proliferação de células endoteliais e migração dessas células até locais onde haverá a formação de novos tubos capilares (NICOSIA, 1998; VALIATTI et al., 2011). Já MMPs regulam o processo de proteólise da matriz extracelular sendo responsável pelo remodelamento da matriz durante o processo angiogênico (STETLER-STEVENSON, 1999; LIU et al., 2017). Assim o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial angiogênico das diferentes frações do látex de mangabeira, em membranas corioalantóide de galinhas, usando como indicadores a expressão dos genes *vegf* e *mmps*.

Material e Métodos

As metodologias adotadas neste trabalho foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Goiás – CEUA/UEG, sob o protocolo de aprovação nº. 007/2016

A) Coleta e fracionamento do látex

As amostras de látex de *H. speciosa* foram coletadas em árvores da coleção de mangabeiras da Universidade Estadual de Goiás, no município de Ipameri/Goiás.

As frações foram separadas do látex por meio de centrifugações (Thermo scientific modelo Heraeus Megafuge 16R). Após esse procedimento obteve-se três fases: a de menor densidade composta por partículas de borracha (isopreno); a fração aquosa intermediária composta pelo soro e a fração de fundo ou precipitado.

B) Teste da membrana corioalantóide (MCA) em ovos de galinha fertilizados

O teste da MCA em ovos de galinha (*Gallus domesticus*) fertilizados, foi realizado de acordo com a metodologia descrita no trabalho de Melo-Reis et al. (2010). Foram utilizados 120 ovos distribuídos igualmente entre seis grupos experimentais: 1. Água (controle neutro); 2. Dexametasona (controle inibidor), composto inibidor de angiogênese; 3. Regederm® (controle indutor); 4. Fração borracha do látex de mangabeira; 5. Fração soro do látex de mangabeira; e 6. Fração F1 do látex de mangabeira, composta pelo precipitado contendo pouco de fração soro.

Os ovos foram incubados a 37 °C em uma câmara umidificada e no quinto dia de incubação, foi feito com o auxílio de micro retífica, um orifício circular na extremidade maior da casca do ovo, local no qual se encontra a câmara de ar. A seguir, a membrana branca presente abaixo da casca foi removida e o orifício do ovo lacrado com fita adesiva. No décimo terceiro dia de incubação foram administrados os tratamentos sobre as membranas, por meio de discos de papel de filtro contendo 3 µL de cada solução teste. A resposta angiogênica foi avaliada 72 h após os tratamentos.

Através de estereoscópio trinocular com câmera acoplada, foram tiradas fotos das MCAs, no aumento de 30X. A análise e quantificação da rede vascular neoformada se deu por meio das imagens capturadas, as quais foram processadas nos *softwares* Gimp e Image J, versão 1.28. A porcentagem da área vascularizada das MCAs foram comparadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, com um nível de significância de $p \leq 0,05$.

As membranas utilizadas para a análise da expressão gênica foram obtidas através do resfriamento rápido dos ovos, imergindo os mesmos em nitrogênio líquido. Após a eutanásia dos embriões em nitrogênio líquido, as MCAs foram removidas com tesouras e mantidas em Trizol (Tri-Reagent, Sigma Aldrich®), à -80 °C, até a etapa de extração do RNA.

C) Avaliação da expressão de genes associados à angiogênese

A atividade angiogênica das frações do látex de *H. speciosa* também foi avaliada por meio da análise da expressão diferencial dos genes *mmp-2*, *mmp-9* e *vegf*, nas membranas submetidas aos diferentes tratamentos. Desta forma, primeiramente foi feita a extração dos RNAs totais das membranas tratadas, utilizando o método de Trizol (Tri-Reagent, Sigma Aldrich®), conforme Mangieri e colaboradores (2008), com modificações.

Após verificação de suas qualidades e concentrações, os RNAs totais extraídos foram tratados com a endonuclease DNase I (1U/μL) da Sigma-Aldrich®, a fim de eliminar qualquer DNA genômico contaminante das amostras. Em seguida, sintetizou-se os cDNAs utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme orientações do fabricante. Por fim, a análise da expressão diferencial dos cDNAs sintetizados foi realizada no sistema *Applied Biosystems Step One Plus real-time PCR* (Applied Biosystems Inc.). Para isso, utilizou-se o kit GoTaq® qPCR Master Mix da Promega. Como controle endógeno, foi utilizado o transcrito codificante para 18S rRNA de *Gallus gallus* (GenBank: M59389.1). As reações foram realizadas em triplicata para cada amostra de cDNA e os níveis de expressão relativa dos cDNAs analisados foram calculados utilizando-se o método de curva padrão para a quantificação relativa (BOOKOUT et al., 2006). A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o Teste t de Student, sendo considerados resultados estatisticamente significativos os valores de $p \leq 0,05$.

Resultados e Discussão

As porcentagens de vascularização medidas a partir da análise morfométrica das imagens das MCAs submetidas aos tratamentos, estão apresentadas na Tabela 1. As frações soro e F1 administradas sobre as MCAs geraram aumento significativo na rede vascular neoformada, quando comparadas a água, dexametasona e fração borracha ($p \leq 0,05$), o que sugere o seu alto potencial angiogênico. Além disso, o fato de não ter sido observada diferença estatística entre as frações soro e F1 com o grupo tratado com Regederm® sugere que essas frações possuem potencial angiogênico semelhante ao controle indutor, o qual é considerado atualmente, um composto referência na indução de angiogênese e cicatrização de feridas. Por outro lado, sugere-se que a fração borracha do látex de *H. speciosa* possui ação

antiangiogênica, uma vez que, sua média de vascularização não diferiu estatisticamente do inibidor (dexametasona).

Tabela 1: Porcentagem de vascularização das membranas corioalantóides, obtidas com os tratamentos das frações de látex de mangabeira e diferentes controles.

	Porcentagem de vascularização					
	Água	Dexametasona	Regederm®	Borracha	F1	Soro
Média	14,004	9,8646*	29,849*	9,5573*	28,165*	29,348*
Desvio padrão	4,2552	3,0024	4,0816	2,6491	4,9747	5,3025
Teste de Tukey**	A	B	C	B	C	C

*Teste Anova one way (nível de significância: $p \leq 0,05$) e **Teste de Tukey, onde letras iguais significam que a diferença entre os grupos não foi significativa ($p > 0,05$) e letras diferentes determinam entre quais grupos houve diferença significativa ($p \leq 0,05$).

O estímulo da angiogênese por fármacos vem atraindo a atenção da comunidade científica nos últimos anos (ARAUJO et al., 2016). Tais substâncias 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). Além disso, substâncias angiogênicas possuem grande variedade de aplicações clínicas, dentre elas: aumento da vascularização miocárdica após a ocorrência de um infarto, reparo do sistema nervoso central após algum trauma ou isquemia, além da cicatrização de feridas de diferentes origens (CARNEIRO et al., 2016). O fato da fração F1 e o soro do látex de mangabeira terem demonstrado ser um agente angiogênico representa uma alternativa para os estudos que buscam outras fontes de compostos bioativos para serem utilizados no processo de cicatrização tecidual.

A avaliação da expressão de genes associados ao processo de angiogênese nas MCAs submetidas aos diferentes tratamentos está apresentada na Figura 1. Os resultados demonstram que houve aumento significativo na expressão do gene *mmp2* e *vegf* nas membranas tratadas com a fração F1 do látex de mangabeira, quando comparadas com o grupo controle (água). Ainda para o gene *vegf* observou-se um aumento em sua expressão nos grupos tratados com o controle indutor (Regederm®). Já para as membranas tratadas com dexametasona, observa-se que ocorreu diminuição da expressão dos genes *mmp2* e *mmp9*, o que é esperado, uma vez que, a análise morfológica mostrou que essa substância possui potencial inibidor

do processo de angiogênese. Em contrapartida, na expressão do gene *mmp9*, observa-se que nas membranas tratadas com a fração borracha e fração F1 do látex de *H. speciosa* ocorreu diminuição significativa na expressão desse gene, quando comparadas as membranas tratadas com água.

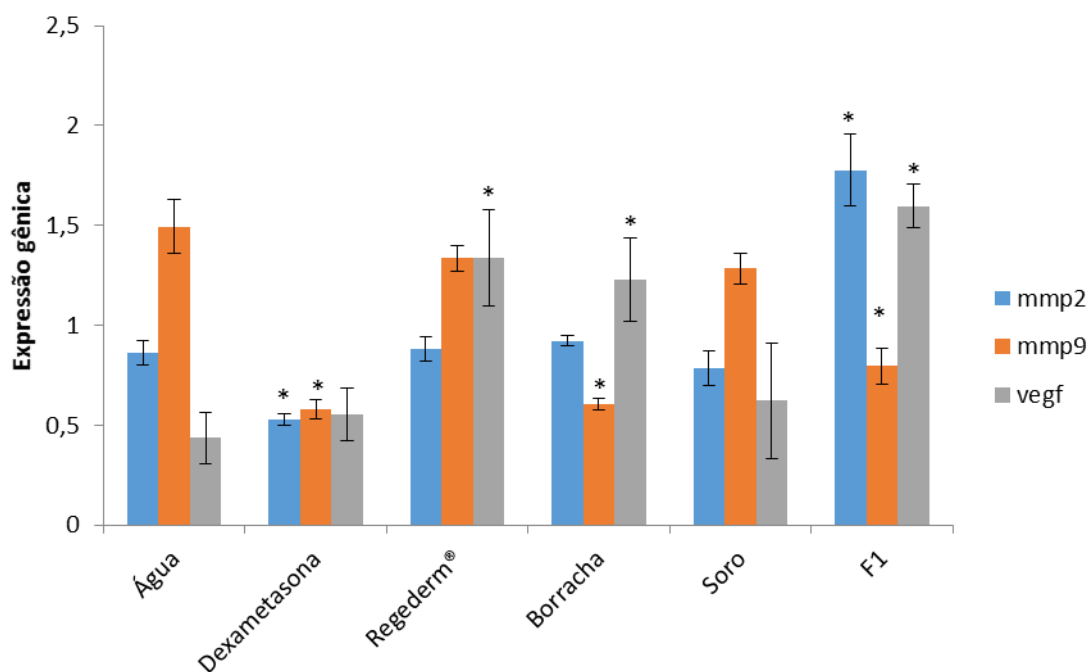


Figura 1: Quantificação normalizada da expressão dos genes *mmp-2*, *mmp-9* e *vegf* em cada tratamento. O asterisco está marcando os grupos que diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$) do grupo controle (água).

A expressão aumentada dos genes *mmp2* e *vegf* em membranas tratadas com a fração F1 do látex de *H. speciosa* evidencia o potencial angiogênico dessa fração. 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). Além disso, a proteólise e remodelamento da matriz extracelular, que fica a cargo das metaloproteinases, representa uma fase indispensável na formação de novos vasos sanguíneos (LIU et al., 2017). Portanto, os resultados obtidos na presente pesquisa mostram a hiper ativação de genes associados a angiogenese após o tratamento com a fração F1 de látex de mangabeira, mostrando que esse material tem a capacidade de estimular a ocorrência de eventos cruciais da angiogênese.

Considerações Finais

Nesse trabalho foi realizado o fracionamento do látex de mangabeira e os dados obtidos nas análises morfológicas e moleculares, demonstraram que a fração F1 do látex de *H. speciosa* apresentou uma significativa atividade angiogênica nas membranas corioalantóides de ovos embrionados de galinha. A utilização dessa fração como um biomaterial em aplicações médicas, representa uma área bastante promissora, em especial, devido a sua capacidade de estimulação natural da angiogênese e por apresentar biocompatibilidade com sistemas vivos.

Agradecimentos

Agradecemos o suporte financeiro fornecido pelas agências de fomento: CAPES e UEG.

Referências

- ALMEIDA, L.M. et al. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 25, p. 2153-62, 2014.
- ARAUJO, L.A. et al. Physicochemical/photophysical characterization and angiogenic properties of *Curcuma longa* essential oil. **An. Acad. Bras. Cienc.** (Online), v. 1, p. 1-9, 2016.
- ARAÚJO, M.M.; MASSUDA, E.T.; HYPPOLITO, M.A. Anatomical and functional evaluation of tympanoplasty using a transitory natural latex biomembrane implant from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Acta Cir. Bras.**, v. 27, n. 8, p. 566–71, 2012.
- BOOKOUT, A. L. et al. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. **Curr. Protoc. Mol. Biol.**, Feb. 2006. doi:10.1002/0471142727.mb1508s73.
- CARNEIRO, C.C. et al. Chemopreventive effect and angiogenic activity of punicalagin isolated from leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.310, p.1-8, 2016.
- CHAVES, D.A. et al. Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.2, p.524-530, 2016.

- FLORIANO, J.F. et al. Comparative study of bone tissue accelerated regeneration by latex membranes from *Hevea brasiliensis* and *Hancornia speciosa*. **Biomed. Phys. Eng. Express**, v.2, n.4, 2016.
- FOLKMAN, J. Fundamental concepts of the angiogenic process. **Curr. Mol. Med.**, v.3, n.7, p.643-651, 2003.
- FRADE, M.A.C. et al. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **An. Bras. Dermatol.**, v.87, n.1, p.45-51, 2012.
- LIU, C.-T. et al. Davallia bilabiata exhibits anti-angiogenic effect with modified MMP-2/ TIMP-2 secretion and inhibited VEGF ligand/receptors expression in vascular endothelial cells. **J. Ethnopharmacol.**, v.196, p.213–224, 2017.
- MALMONGE, J.A. et al. Comparative study on technological properties of latex and natural rubber from *Harconia speciosa* Gomes and *Hevea brasiliensis*. **J. Appl. Polym. Sci.**, v.111, p.2986–2991, 2009.
- MANGIERI, D. et al. Angiogenic activity of multiple myeloma endothelial cells in vivo in the chick embryo chorioallantoic membrane assay is associated to a down-regulation in the expression of endogenous endostatin. **J. Cell. Mol. Med.**, v.12, n.3, p.1023-1028, 2008.
- MELO-REIS et al. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. **Braz. J. Biol.**, v.70, n.1, p.189-194, 2010.
- NICOSIA, R. What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? **Am J Pathol**, v.153, p.11-16, 1998.
- PELENOVA. Regedem® e Biocure, Pele Nova Tecnologia S.A. Disponível na internet: **[Http://www.pelenova.com.br/site](http://www.pelenova.com.br/site)**. Acesso em 02 de junho de 2016.
- RAULF, M. The latex story. **Chem. Immunol. Allergy**, v.100, p.248-255, 2014.
- SAMPAIO, R.B. et al. Rabbit retinal neovascularization induced by latex angiogenic-derived fraction: an experimental model. **Curr. Eye Res.**, London, v.35, n.1, p.56-62, 2010.
- SMITH-HALL, C.; LARSEN, H.O.; POULIOT, M. People, plants and health: a conceptual framework for plant consumption. **J. Ethnobiol. Ethnomed.**, v.8, p.43, 2012.
- STETLER-STEVENSON, W.G. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. **J. Clin. Investig.**, v.103, p.1237–1241, 1999.

VALIATTI, F. B. et al. Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v.55, n. 2, p.106-113, 2011.

WU, M.; MCINTOSH, J.; LIU, J. Current prevalence rate of latex allergy: Why it remains a problem? **J. Occup. Health**, v.58, n.2, p.138-144, 2016.