

FATORES DE CRESCIMENTO NA CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS DIABÉTICAS

GROWTH FACTORS IN HEALING DIABETIC ULCERS

Maria Cristina Travi-Carneiro¹, Maria Isabel Carneiro-Travi², Patricia Martins Bock³

¹Graduada em Farmácia pelo Centro Universitário Metodista do IPA – Porto Alegre (RS), Brasil.

²Mestre em Saúde e Desenvolvimento pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Campo Grande (MS), Brasil.

³Doutoranda em Ciências Biológicas – Fisiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre (RS), Brasil.

Data de entrada do artigo: 21/02/2013

Data de aceite do artigo: 02/07/2013

RESUMO

Introdução: A neuropatia diabética é a complicação crônica mais prevalente do *diabetes mellitus* e é relacionada com elevado risco de úlceras e amputações, retardo da cicatrização e maior risco de infecções. O tratamento convencional das úlceras diabéticas é um desafio médico, e muitos pacientes não atingem o processo de cura; dessa forma, o uso tópico dos fatores de crescimento (GF) pode representar importante elemento coadjuvante no tratamento de úlceras diabéticas por suas propriedades angiogênica e mitogênica. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi realizar revisão bibliográfica de trabalhos experimentais e ensaios clínicos que utilizassem topicamente os fatores de crescimento derivado de plaquetas, insulínico, epidermal, fibroblástico básico e endotelial vascular. **Metodologia:** Foi realizado um estudo de revisão bibliográfica mediante a busca de artigos científicos em diferentes bases de dados, publicados entre 1995 e 2013. **Resultados:** Os resultados apresentados foram promissores na aceleração da cicatrização de úlceras diabéticas e na prevenção de amputações, principalmente quando foram utilizados em associação ou em veículos de tecnologia avançada, como géis tridimensionais de colágeno, hidrogéis ou colágeno hidrolizado, colágeno reticulado, esponja de colágeno gelatinosa, proteínas de fusão (vitronectina), microesferas de gelatina, encapsulamento em nanopartículas e derme artificial. **Conclusões:** Há indícios de maior eficácia do uso tópico dos GF associados, humanos recombinantes, e do uso desses GF em curativos de tecnologia avançada, porém novos estudos prospectivos com uso dos GF necessitam ser realizados para que estes sejam aceitos como ferramenta terapêutica eficaz no tratamento das úlceras de pacientes diabéticos.

Palavras-chave: fator de crescimento epidérmico; fator de crescimento de fibroblastos; fator de crescimento derivado de plaquetas; fator de crescimento endotelial vascular.

ABSTRACT

Introduction: Diabetic neuropathy is the most prevalent chronic complication of *diabetes mellitus* related to high risk of ulcers and amputations, delayed wound healing and increased risk of infections. Conventional treatment of diabetic ulcers is a medical challenge, and many patients do not reach the curing process, thereby topical application of growth factors (GF) could be an important element in the adjuvant treatment of diabetic ulcers by its mitogenic and angiogenic properties. **Objective:** This study conducted a literature review of experimental studies and clinical trials that have used the GF topically as PDGF (platelet-derived), IGF (insulin), EGF (epidermal), FGFb (fibroblastic basic), VEGF (vascular endothelial). **Methods:** We conducted a literature review by searching scientific articles in different databases, published between 1995 and 2013. **Results:** The results shown were promising in accelerating the healing of diabetic ulcers and prevention of amputation, mainly as associated with or with curative advanced technology vehicles such as three-dimensional collagen gels, hydrogels or hydrolyzed collagen, crosslinked collagen, collagen sponge, gelatinous fusion proteins (vitronectin), micro gelatin beads, encapsulation in nanoparticle and artificial dermis. **Conclusions:** There is evidence of greater efficacy of topical administration of GF associated, human recombinant, and the use of these dressings GF in advanced technology, but further prospective studies with use of GF need to be made so that they are accepted as effective therapeutic tool in the treatment of ulcers in diabetic patients.

Keywords: epidermal growth factor; fibroblast growth factor; platelet-derived growth factor; vascular endothelial growth factor.

1. INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM) é uma doença metabólica que se caracteriza por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina, acarretando um processo de hiperglicemia crônica. Como consequências de longo prazo, encontram-se alterações microvasculares, como a neuropatia diabética, relacionada com o elevado risco de úlceras e amputações¹. Tais complicações de longo prazo do DM são decorrentes da glicosilação de proteínas e lipídios e do estresse oxidativo, bem como da disfunção endotelial e dos processos inflamatórios vasculares, que levam ao comprometimento da microvasculatura, disfunção tecidual com prejuízo em componentes da cicatrização de feridas e alterações da permeabilidade vascular, favorecendo a formação de trombos²⁻⁴. Em virtude da neuropatia, da doença vascular periférica e da cicatrização deficientes, as úlceras nos pés de pacientes com DM atingem prevalência de 15% ao longo da vida⁵.

As úlceras diabéticas crônicas são responsáveis por elevados custos médicos e por afetarem significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Uma vez desenvolvida, a ulceração crônica pode desencadear limitações de mobilidade, dor e amputações⁶. Essas lesões são decorrentes do processo ineficiente de cura das feridas em indivíduos diabéticos, já que tal processo é complexo e envolve várias etapas, incluindo coagulação, inflamação, proliferação, reepitelização e remodelamento. Tais etapas envolvem a participação de fatores de crescimento e citocinas, porém pacientes diabéticos apresentam prejuízos na expressão de uma série de fatores de crescimento e angiogênicos⁷.

O tratamento dessas feridas é um desafio médico, principalmente daquelas infectadas e profundas, com alto risco de amputação. O risco é maior para pacientes com elevação de proteína C reativa, alta contagem de glóbulos brancos e elevação de creatinina sérica⁸. A abordagem terapêutica tradicional consiste no desbridamento das lesões, antibioticoterapia, e, em casos mais graves, cirurgias de revascularização. Vários algoritmos de tratamento têm sido desenvolvidos, mas, apesar da implementação de apropriados padrões de cuidados, muitos pacientes não atingem o processo de cura, o que pode aumentar o risco de infecções e complicações adicionais, e, assim, intervenções adicionais podem ser necessárias nesses pacientes⁹.

Sabe-se que os fatores de crescimento (GF) são importantes para a aceleração do processo de reparação tecidual. Portanto, os GF podem representar uma alternativa de tratamento das úlceras diabéticas, atuando como um importante coadjuvante por suas propriedades angiogênica e mitogênica, o que poderia reduzir o tempo de cicatrização e representar um significativo elemento preventivo de amputações nesses pacientes^{10, 11}. Dessa forma, justifica-se o estudo de tais fatores de

crescimento, pois a utilização deles como adjuvantes no tratamento poderia trazer melhorias na qualidade de vida de portadores de úlceras decorrentes de DM.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar artigos experimentais e ensaios clínicos que utilizassem os GF isolados ou associados em curativos simples ou de tecnologia avançada, avaliando a eficácia dos GF no tratamento de úlceras em pés de pacientes diabéticos.

2. METODOLOGIA

Foi realizado um estudo de revisão bibliográfica mediante busca de artigos científicos publicados entre 1995 e 2013, nos idiomas português e inglês. As bases de dados pesquisadas foram portais eletrônicos, como Science Direct e Google® Acadêmico, e os portais de periódicos Capes, SciELO e PubMed, empregando as seguintes palavras-chaves, utilizadas individualmente ou em associação: fatores de crescimento, cicatrização, úlceras diabéticas, pés diabéticos (*growth factors*, *wound healing*, *diabetic ulcers*, *diabetic foot*).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados para cada um dos GF analisados, que foram o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento insulínico (IGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

3.1 Fator de crescimento derivado de plaquetas

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é produzido por células endoteliais, macrófagos e plaquetas, com a função de atrair neutrófilos e monócitos na fase inicial do processo de cicatrização e promover a síntese de colágeno e proteoglicanos, bem como induzir a proliferação de fibroblastos e mudança do fenótipo para miofibroblastos, com contração da ferida, produção e reorganização da matriz celular¹².

Observou-se redução da expressão desse fator em ratos diabéticos, que tiveram recuperação mais lenta de lesões e maior índice de mortalidade, o que sugere que o tratamento tópico com PDGF poderia trazer benefícios aos pacientes diabéticos¹³.

O PDGF recombinante humano é comercializado como Becaplermin® e Regranex® e pode ser útil na cicatrização de úlceras crônicas que não respondem ao tratamento convencional. Foi realizada a comparação

do uso de PDGF com o de OASIS® (pele nova) no tratamento de úlceras diabéticas por um período de 12 semanas. Observou-se que o poder de cicatrização do PDGF foi de 28%, enquanto o OASIS® foi de 49%, mas em relação a complicações infecciosas o PDFG teve uma taxa 50% menor quando comparado ao OASIS®¹⁴. A menor taxa de cicatrização desse fator de crescimento, quando comparado com OASIS®, pode ser atribuída tanto à degradação dele como à sua rápida liberação, indicando a necessidade de novos estudos com utilização de encapsulamento e o uso de polímeros, para que a liberação e a degradação sejam controladas¹⁵.

Também foi verificado que Becaplemin® a 30 µg/g no tratamento de úlceras crônicas não foi eficiente na redução do tempo de cura quando comparado ao placebo¹⁶. Além disso, o Becaplemin® 100 µg/g quando usado em associação a curativos inteligentes como TheraGauze® (curativo úmido) também não apresentou diferença significativa no tempo de cicatrização, sugerindo que a eficácia dos fatores de crescimento pode depender da concentração, e poderiam ser testadas concentrações maiores¹⁷.

Assim, o PDGF poderia melhorar a cicatrização e diminuir as infecções, porém deveria ser utilizado por meio de tecnologias de liberação controlada ou em associação com outros tratamentos.

3.2 Fator de crescimento insulínico

Os fatores de crescimento insulínico (IGFs) são produzidos na maioria dos órgãos e tecidos, porém os IGF circulantes são de origem principalmente hepática. Esses fatores de crescimento têm como principais representantes o fator de crescimento insulínico 1 (IGF-1) e o fator de crescimento insulínico 2 (IGF-2), peptídeos que apresentam elevado grau de homologia estrutural com a pró-insulina e têm atividade sobre o metabolismo intermediário, a proliferação, o crescimento e a diferenciação celular, sendo responsáveis pela mitose de fibroblastos¹⁸.

Foi observada redução de IGF-1 em nervos periféricos e medula espinhal de ratos diabéticos, e o tratamento sistêmico melhorou a inervação sensitiva em modelo animal com neuropatia diabética¹⁹. Além disso, em pacientes diabéticos a diminuição local de IGF pode ser parcialmente responsável pela patogênese de feridas crônicas. Essa proteína está ausente na camada basal da epiderme, nos fibroblastos e nos queratinócitos das bordas de úlceras de pés de pacientes diabéticos²⁰. O uso tópico de IGF estimula o processo de cicatrização por meio da estimulação mitogênica nos pacientes diabéticos, podendo ser um adjuvante no tratamento de feridas diabéticas. Contudo, sua utilização sistêmica pode aumentar a incidência de neoplasias²¹.

A utilização de IGF na forma de curativo complexo permeável, constituído por proteínas de ligação ao IGF ligadas à vitronectina (plasma humano purificado associado a colágeno liofilizado), melhorou significativamente as funções celulares. Foram observadas respostas significativas, *in vitro* e *in vivo*, com uso desse fator acoplado à vitronectina²². Dawson e colaboradores, em 2006, utilizando IGF em conjunto com fator de crescimento epidermal (EGF) e vitronectina, obtiveram um número três vezes maior de células da epiderme humana, geradas no período de sete dias, quando comparado às peles cultivadas sem vitronectina. Assim, parece que a vitronectina medeia as respostas celulares a esse fator²³.

Dessa forma, há evidências indicando que esse fator, quando associado à vitronectina, pode melhorar significativamente o processo de cicatrização em diabéticos.

3.3 Fator de crescimento epidermal

O fator de crescimento epidermal (EGF) é um peptídeo produzido por macrófagos que facilita a regeneração de células epidérmicas e desempenha papel essencial no processo de cicatrização cutânea através da estimulação, proliferação e migração de queratinócitos e fibroblastos²⁴.

Foi observada a redução dos níveis do EGF na saliva de 42 pacientes diabéticos com complicações orais e sistêmicas que apresentavam alterações na cicatrização de feridas, sugerido que a reposição desse fator poderia melhorar os processos prejudicados de cicatrização²⁵. Essa proposta é reforçada pela observação de que células estromais multipotentes (MSC) pré-estimuladas com EGF na concentração de 10 ng/mL, quando injetadas em membros isquêmicos de ratos geneticamente diabéticos, induziram melhora significativa na migração, angiogênese, neovascularização e na perfusão dos tecidos desses animais. A recuperação do fluxo sanguíneo foi 100% maior com MSC pré-estimulado com EGF em comparação com o MSC isolado²⁶. Em concordância com esses resultados, a terapia gênica realizada com o EGF demonstrou melhoras na cicatrização de úlceras²⁷.

Adicionalmente, em um estudo feito com um grupo de 61 pacientes diabéticos com úlceras podais, foi observado que a aplicação tópica de creme Actovegin® 5%, que é um extrato ultrafiltrado de células sanguíneas, associado ao EGF na concentração de 0,04%, além de cuidados com os pés por uma equipe multidisciplinar, melhorou significativamente a cicatrização das lesões e reduziu o tempo de cicatrização, quando comparado ao uso de Actovegin® sem EGF ou o uso desse fator em menor concentração²⁸.

Resultado cicatricial semelhante foi observado no tratamento tópico de feridas crônicas nos pés de pacientes diabéticos com a utilização de EGF a 0,005% combinado

com curativo avançado, quando comparados a hidrocolóide ou curativo avançado isolado. Dos 68 pacientes tratados com EGF, a cura completa foi observada em 52 pacientes em um período de 46 dias, e a recorrência das úlceras não foi observada durante 6 meses²⁹.

O EGF recombinante humano, REGEN-D 150[®], testado em 135 pacientes diabéticos com úlceras crônicas nos pés, reduziu significativamente o período de cura dessas lesões. O autor observou a formação de tecido de granulação saudável e estímulo da epitelização das lesões, com encerramento final da ferida e excelente qualidade de cicatrização³⁰. Esse mesmo fator, quando utilizado na concentração de 75 µg por meio de aplicação intralésional em úlceras em fase inicial de lesão nos pés de pacientes diabéticos, induziu desenvolvimento precoce de tecido de granulação, o que é considerado como preditor de cura dessas pequenas úlceras, prevenindo a evolução para lesões avançadas³¹.

Resultados igualmente animadores foram observados com a utilização de REGEN-D 150[®] na concentração de 50 µg por 8 semanas em 28 pacientes com úlceras moderadas a severas³², e com injeções locais de 75 µg, em 149 pacientes diabéticos com úlceras podais, neuropáticas e isquêmicas graves³³. Tais resultados indicam que a recombinação genética pode ser um método útil para a preparação de biomedicamentos altamente eficazes.

Outra estratégia promissora é a conjugação de EGF a outras estruturas, como a pele permeável protamina-recombinante de baixo peso molecular para aplicação tópica, que demonstrou aceleração significativa da taxa de fechamento da ferida em ratos diabéticos, provavelmente devido à sua permeação cutânea reforçada³⁴. Ainda, a associação de EGF com ácido hialurônico e esponja de colágeno levou a cura de feridas em ratos diabéticos³⁵. Kondo e colaboradores, em 2011, obtiveram, de forma similar, a redução de feridas diabéticas, utilizando microesferas de gelatina com EGF. Os pesquisadores observaram estímulo da migração e proliferação celular e promoção de melhor vascularização da ferida³⁶.

Chu e colaboradores, em 2010, objetivando melhorar a eficácia cicatricial do EGF-recombinante humano, utilizaram o encapsulamento em nanopartículas, situação em que a liberação lenta promoveu maior proliferação de fibroblastos com taxa mais rápida de cicatrização³⁷. Alternativas de combinação de EGF-recombinante humano na concentração de 10 µg/mL com dextrina também foram apresentadas para o tratamento de feridas em ratos diabéticos, demonstrando aceleração no processo de cura³⁸. Lao e colaboradores, em 2012, utilizando modelo de ratos diabéticos, combinaram EGF com hidrogel, obtendo liberação controlada desse GF. Essa técnica pareceu promover a indução da expressão do receptor de EGF com aumento significativo na

deposição de tecido de granulação e angiogênese, resultando na aceleração da reparação dos tecidos desse modelo experimental³⁹.

Conforme pode ser observado nos resultados sumarizados na Tabela 1, a associação dos GF com veículos de tecnologia avançada pode ser a resposta para a efetiva cicatrização de úlceras diabéticas. Adicionalmente, a aplicação de injeção intralésional de EGF parece indicar maior eficácia dessa via quando comparada à tópica, demonstrando que a eficácia dos GF na cicatrização de feridas estaria ligada à persistência de concentrações elevadas no local da lesão.

3.4 Fator de crescimento fibroblástico

O fator de crescimento fibroblástico (FGF) é secretado por macrófagos, mastócitos, células endoteliais e fibroblastos. A família dos fatores de crescimento fibroblásticos inclui os FGF de 1 a 23, sendo as duas formas principais o FGF-1 ou FGFa (ácido) e o FGF-2 ou FGFb (básico), que afetam o recrutamento, a ativação, a mitogênese, a migração e a diferenciação de vários tipos celulares no leito cicatricial. Ambas as formas têm também papel na indução da liberação do fator de crescimento epidermal vascular, potencializando a angiogênese e aumentando a síntese de colágeno, com aumento da resistência tecidual⁴⁰.

Comprovando alguns desses efeitos, observou-se que, em ratos diabéticos, 35% dos analisados apresentaram aumento da síntese de colágeno e da resistência tecidual com uso do FGFb⁴¹, bem como revascularização e infiltração de células inflamatórias na primeira semana em feridas incisionais, apontando para o aumento de resistência à ruptura com o uso tópico de FGFb. Observou-se, ainda, proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno com melhora na qualidade e condição da cicatriz quando comparado ao grupo-controle⁴².

Em pacientes diabéticos a presença do processo infeccioso na lesão ulcerosa afeta a capacidade de migração dos fibroblastos e inibe a angiogênese. Contudo, observa-se que a administração tópica de FGFb é capaz de reverter esses efeitos⁴³. Além disso, foi observada a eficácia clínica do FGF quando testada em 150 pacientes diabéticos com úlceras, demonstrando aceleração significativa na cura dessas úlceras em até 75% quando comparado ao placebo⁴⁴.

Outros veículos tecnológicos associando FGFb podem mostrar melhor desempenho do que quando esse fator é usado de forma isolada ou em curativo simples. O uso tópico de derme artificial com microesferas de gelatina impregnadas com FGFb realizado com ratos diabéticos mostrou aceleração da regeneração tecidual e aumento da resistência às infecções⁴⁵, e a derme artificial à base de esponja gelatinosa de colágeno utilizada em pacientes diabéticos com úlceras crônicas liberou, de maneira

Tabela 1: Caracterização dos estudos com a utilização de fator de crescimento epidermal.

População estudada	Dose e forma de utilização	Tempo de uso	Resultados	Autor (ano)
96 ratos machos Wistar normais e diabéticos por streptozotocina	EGF em microesferas de gelatina	14 dias	Redução da ferida e aumento da resistência à tração.	Dogan et al. (2009)
28 ratos diabéticos BKS.Cg-+Lepr (db)/+Lepr(db) (db/db)	Ácido hialurônico e esponja de colágeno contendo EGF	14 dias	Promoção da cura da ferida por estimulação da migração e proliferação celular.	Kondo et al. (2011)
56 ratos diabéticos (db-db-)/(db-db+).	EGF 10 ng/mL intravenoso	28 dias	Estímulo da vasculogênese e aumento da resistência da lesão, redução do estresse oxidativo e adesão de moléculas. Estimula os fibroblastos a secretar colagenase para a matriz durante a fase de remodelação. Estimula a proliferação de queratinócitos e fibroblastos.	Amin et al. (2010)
Ensaio clínico Fase III com Regen-D 150® em 135 pacientes indianos com úlceras diabéticas nos pés	RH-EGF 150 mcg (fator de crescimento epidérmico recombinante humano)	10 semanas	Redução significativa do tempo de cicatrização e excelente qualidade de reepitelização.	Mohan et al. (2007)
Pacientes com úlceras diabéticas nos pés em 60 unidades de saúde	Uso intralesional de RH-EGF		Desenvolvimento de tecido de granulação de pequenas úlceras em pés de diabéticos, evitando seu avanço para lesões maiores ou complicadas.	Valenzuela et al. (2012)
89 pacientes com úlceras diabéticas (65 do sexo masculino e 24 do sexo feminino)	EGF 0,005% em curativo avançado	2 a 14 semanas	Promoção da cicatrização de feridas crônicas em pés diabéticos.	Hong et al. (2006)
28 pacientes portadores de doença arterial periférica e úlceras nos pés	RH-EGF 0,005% 2x/dia.	8 semanas	Resposta positiva de granulação em 100% dos pacientes, com cura em 56,5. As taxas de cura das feridas foram de 43,3%, 59,9%, 68,7% e 84,8% nas semanas 2, 4, 6 e 8, respectivamente, com boa tolerabilidade.	Tuyet et al. (2009)
149 pacientes diabéticos com úlceras nos pés, randomizados para receber EGF ou placebo	RH-EGF com Infiltração intralesional 75 ou 25 µg 3x/semana	8 semanas	Relação risco-benefício favorável em pacientes com DFU.	Fernandez-Montequín et al. (2009)
Modelo de rato diabético com pele excisada	EGF conjugado com protamina de baixo peso molecular (aplicação tópica)		Aceleração do fechamento completo da ferida nos ratos diabéticos.	Choi et al. (2012)
Ensaio duplo-cego com 127 pacientes diabéticos divididos em 3 grupos	EGF 0,02% ou 0,04% e Actovegin® creme a 5%	12 semanas	Melhora e redução do tempo da cicatrização no grupo que utilizou EGF 0,04% em comparação com o grupo que utilizou 0,02% ou placebo.	Tsang et al. (2003)
48 ratos diabéticos (4 grupos com diferentes espessuras de curativos em nanopartículas de RH-EGF)	RH-EGF encapsulados em nanopartículas com cerca de 193,5 nm de diâmetro	24 horas	Estímulo da proliferação das células e redução do tempo de cicatrização do ferimento.	Chu et al. (2010)
Ratos diabéticos (db/db) com uso de dextrina-RH EGF na cura da ferida	RH-EGF 10 µg/mL associado à dextrina	16 dias	Aceleração da neoformação de tecido dérmico e cura as feridas.	Hardwicke et al. (2011)
56 ratos diabéticos	RH-EGF em hidrogel (aplicação tópica diária)	7 dias	Indução da expressão do receptor de EGF.	Lao et al. (2012)

EGF: fator de crescimento epidermal; RH-EGF: fator de crescimento epidermal recombinante humano.

progressiva e prolongada, o FGFb, o que resultou a aceleração do processo de cicatrização. Tal resultado pode indicar uma alternativa da bioengenharia de substitutos de pele, qualificando o tratamento das úlceras diabéticas crônicas⁴⁶. Também o FGFb incorporado em esferas fibrosas garantiu a diminuição da degradação do FGFb pelas proteases com liberação gradual desse fator. O resultado foi a modulação da reconstrução e remodelação da matriz extracelular, a formação do colágeno, a completa reepitelização e a formação dos anexos cutâneos¹⁵.

O FGFa foi testado em ratos diabéticos na indução de angiogênese em regiões isquêmicas. No experimento realizado, os ratos controle secretaram largamente fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), proteínas de proliferação imediatamente após injúria, ao contrário dos ratos diabéticos. A aplicação do FGFa nas úlceras dos ratos diabéticos conseguiu reverter essa disfunção celular nos diabéticos, estimulando a secreção de TGF- β , PCNA e proteínas, melhorando a proliferação e migração de células epiteliais, o que resultou em rápido aumento de fibroblastos e reparação da ferida⁴⁷.

Resultado similar foi obtido em estudo feito com o FGFa-recombinante humano, estabilizado com polietilenoglicol, o que levou a maior estabilidade estrutural e prolongamento do tempo de meia-vida⁴⁸, e com curativo contendo colágeno reticulado com quitosana impregnado com FGFa-humano recombinante, em ratos com diabetes. A liberação gradativa pela porosidade do curativo pareceu liberar mais lentamente o FGFa, com aumento da resistência à degradação pelas colagenases, resultando na geração mais rápida de colágeno, no aumento da expressão de TGF- β 1 e na proliferação de células dérmicas. Foi observada redução do tempo de cura em 25% quando comparado ao grupo-controle⁴⁹.

Portanto, conforme observado na Tabela 2, o FGFb parece desempenhar um papel muito importante no processo de cicatrização de úlceras diabéticas, podendo ser útil em pacientes com processo deficiente da cicatrização. Os FGFs são degradados rapidamente, fazendo com que seja necessária uma reaplicação tópica frequente, porém a utilização de novas tecnologias pode possibilitar proteção contra a degradação e permitir liberação controlada, melhorando significativamente a performance na cura de feridas diabéticas.

3.5 Fator de crescimento endotelial vascular

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é sintetizado e secretado por células mesenquimais, principalmente por fibroblastos e macrófagos. Caracteriza-se como um potente indutor da vasculogênese e tem um papel central na angiogênese tumoral, inflamação crônica e cicatrização de feridas e desempenha um papel importante na regeneração dos tecidos em diabéticos⁵⁰.

Esse efeito é demonstrado pelo uso tópico do VEGF associado a géis tridimensionais de colágeno com monocamadas de células endoteliais microvasculares dérmicas humanas ou células derivadas da medula óssea, o que estimula a angiogênese, a vasculogênese e a constrição de colágeno, necessárias para a cura de feridas isquêmicas⁵¹.

Waltherberger e colaboradores, em 2000, demonstraram pela primeira vez que a integridade celular depende das propriedades angiogênicas do VEGF. Os autores observaram em ensaio experimental de quimiotaxia, em pacientes diabéticos, que a função dos monócitos estava reduzida, e a capacidade de migração do VEGF-A, diminuída. Concluíram que a ação direta do VEGF-A no endotélio estimula e promove a remodelação vascular, e de modo indireto o recrutamento de monócitos na parede vascular⁵². O VEGF parece contribuir, ainda, para a formação de neovasos, sendo que o VEGF-A foi identificado como o principal regulador da vasculogênese e angiogênese no processo de cicatrização⁵³.

Resultados interessantes foram observados em um estudo com ratos diabéticos modificados geneticamente (*db-/db-*) com diminuição da angiogênese, no qual o uso de VEGF tópico foi capaz de melhorar as feridas por *up regulation*, ou seja, ocorreu um aumento de expressão do próprio VEGF. Os pesquisadores observaram que o tempo de cura das lesões dos ratos diabéticos tratados com placebo foi de 21 dias e de apenas 12 dias nos ratos diabéticos tratados com VEGF¹⁰.

Adicionalmente, a diminuição da disponibilidade do VEGF na condução nervosa em pacientes diabéticos poderia representar um defeito funcional associado com a patogênese da neuropatia diabética, uma vez que a ativação endógena do VEGF é capaz de aumentar a condução nervosa e aumentar a ação neuroprotetora em pacientes diabéticos⁵⁴. Também foi avaliado o efeito de um novo composto de biomaterial de colágeno hidrolizado (polímero 3D) associado ao VEGF, observando melhor vascularização, aumento de tecido de granulação e aceleração da cicatrização de feridas em modelo de ratos diabéticos⁵⁵.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem evidências de que a cicatrização de feridas é impulsionada pelas interações entre proteínas da matriz extracelular e os GF, e não apenas por ação isolada desses fatores. Foi observado que um complexo formado por IGF-1, proteína ligadora de IGF, EGF e vitronectina foi capaz de estimular as funções relevantes à cicatrização *in vitro*, tais como a aumento da proliferação e migração celular. Além disso, esse complexo foi avaliado como um agente tópico da cicatrização

Tabela 2: Caracterização dos estudos com a utilização de fator de crescimento fibroblástico.

População estudada	Dose e forma de utilização	Tempo de uso	Resultados	Autor (ano)
20 ratos wistar	FGFb 5 mg	7 dias	Aumento da resistência da cicatriz.	Medeiros et al. (2003)
30 ratos diabéticos	FGFb 1 µg intravenoso	7 semanas	Aumento de fibroblastos, síntese de colágeno e angiogênese.	Ono et al. (2002)
12 ratos diabéticos induzidos por streptozotocina	Esferas fibrosas impregnadas com 1 µg de FGFb	28 dias	Aumento da taxa de recuperação de feridas, vascularização, maturação reepitelização e formação de apêndices cutâneos.	Yang et al. (2011)
Pacientes diabéticos	FGFb aplicação tópica		Melhora da migração de polimorfonucleados e angiogênese em diabéticos.	Dantas-Filho et al. (2007)
70 ratos diabéticos induzidos por streptozotocina	FGFb 4 mg em colágeno reticulado com quitosana	14 dias	Redução do tempo de cura e recuperação dérmica.	Wang et al. (2008)
40 ratos diabéticos induzidos por streptozotocina	FGFa 6 mg na pele	14 dias	Indução de diferenciação e proliferação celular, neovascularização em regiões isquêmicas, melhora na migração de células epiteliais e redução do efeito inibitório do TGF-β sobre a mitogênese induzida pelo EGF.	Xie et al. (2011)
150 pacientes	FGFb 0,001%, FGFb 0,01%, placebo	8 semanas	Pacientes em uso de FGFb 0,01% apresentam 75% ou mais de redução na área da úlcera em relação ao placebo, indicando aceleração da cicatrização.	Uchi et al. (2009)
Ratos diabéticos <i>in vitro</i> (embriões) e <i>in vivo</i> (aplicação área dorsal)	FGFb em políplexos	28 dias	Aumento da recuperação da ferida (vascularização, deposição de colágeno, reepitelização e formação de anexos cutâneos).	Yang et al. (2011)
Ratos Sprague Dawley diabéticos induzidos por streptozotocina e ratos controle	FGFa peguado		Aumento da eficácia terapêutica com menor tempo de cura, geração mais rápida de tecido de colágeno e proliferação das células da derme.	Huang et al. (2011)
17 pacientes com úlceras cutâneas crônicas	Derme artificial, colágeno/esponja de gelatina (CGS)+(bFGF) CGS impregnado com bFGF 7 mg/cm e 14 mg/cm	14/28 dias	Este estudo foi concebido para avaliar a segurança e eficácia de CGS impregnado com bFGF. Não foram observadas reações adversas ao uso de CGS combinado com EGF, e não foram observadas diferenças significativas com o uso de altas e baixas doses de FGFb.	Morimoto et al. (2012)

FGFb: fator de crescimento fibroblástico básico; FGFa: fator de crescimento fibroblástico ácido; TGF-b: fator de crescimento transformador beta; EGF: fator de crescimento epidermal; CGS: esponja de colágeno e gelatina.

de feridas crônicas de difícil cura, sendo observada reepitelização das feridas de todos os 30 pacientes do estudo-piloto⁵⁶.

Reforçando as vantagens da associação ou combinação de vários fatores de crescimento como PDGF, VEGF e FGFb, Alckermann e colaboradores, em 2011, demonstraram que, contrariamente ao uso isolado de PDFG, o uso em associação com outros fatores de crescimento acelerou a cura de feridas em ratos diabéticos com 1,6 vezes maior densidade de vasos no grupo de combinação do que no controle que utilizou monoterapia⁵⁷.

Os trabalhos experimentais e os ensaios clínicos revisados parecem indicar que o uso tópico dos fatores de crescimento poderia representar importante elemento terapêutico no tratamento de úlceras diabéticas por suas propriedades angiogênica e mitogênica, estimulando diferentes fases do processo de cicatrização e reduzindo o tempo de cura e complicação dessas lesões.

Há indícios de maior eficácia do uso tópico dos GF associados, de GF humanos recombinantes, e do uso desses GF em curativos de tecnologia avançada, sendo

que a maior eficácia desses curativos parece resultar da liberação programada dos GF no local da lesão quando se utilizam esses veículos, pois em curativos simples estes são rapidamente degradados.

Atualmente estão sendo realizados apenas nove ensaios clínicos registrados no *Clinical Trials* com uso de

fatores de crescimento, contudo novos estudos prospectivos com uso dos GF necessitam ser realizados para que estes sejam aceitos como ferramenta terapêutica eficaz no tratamento das úlceras de pacientes diabéticos, principalmente nas úlceras crônicas ou graves, reduzindo o custo e o sofrimento relacionado ao alto índice de amputações nessa população.

REFERÊNCIAS

- Magalhães CEV, Bosuskela E. Pé diabético e doença vascular: entre o conhecimento acadêmico e a realidade clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011; 52(7):1073-75.
- Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *Int J Vasc Med.* 2011; 30:155-85.
- Rodriguez DL, Castelao AM, Gorris JL, Alvaro F, Gonzales JN. Pathophysiological role and therapeutic implications of inflammation in diabetic nephropathy. *World J Diabetes.* 2012; 153(1):7-18.
- Kruger D. Neo-intimal hyperplasia, diabetes and endovascular injury. *Cardiovasc JAfr.* 2012; Oct; 23(9):507-11.
- Hinchliffe RJ, Valk GD, Apelqvist DG, Arstrong K, Bakker FL, Game FL, Hartemann-Heurtier A, Löndahl M, Price PE, van Houtum WH, Jeffcoate WJ. A systematic review of the effectiveness of interventions to enhance the healing of chronic ulcers of the foot in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008 May-Jun; 24(1):119-44.
- Siersma V, Thorsen H, Holstein PE, Kars M, Apelqvist J, Jude EB, Piaggese A, Bakker K, Edmonds M, Jirkovska A, Mauricio D, Ragnarson Tennvall G, Reike H, Spraul M, Uccioli L, Urbancic V, van Acker K, van Baal J, Schaper NC. Importance of factors determining the low health-related quality of life in people presenting with a diabetic foot ulcer: the Eurodiale study. *Diabet Med.* 2013 Nov; 30(11):1382-7.
- Moura LI, Dias AM, Carvalho E, de Sousa HC. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment-A review. *Acta Biomater.* 2013 Jul; 9(7):7093-114.
- Lee KM, Kim WH, Lee JH, Choi MS. Risk factors of treatment failure in diabetic foot ulcer patients. *Arch Plast Surg.* 2013 Mar; 40(2):123-8.
- Richmond NA, Maderal AD, Vivas AC. Evidence-based management of common chronic lower extremity ulcers. *Dermatol Ther.* 2013 May-Jun; 26(3):187-96.
- Galiano RD, Pelo CR, Bhatt KI, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol.* 2004 Jun; 164(6):1935-47.
- Dumville JC, Soares MO, Omeara S. Systematic review and mixed treatment comparison: dressings to heal diabetic foot ulcers. *Diabetologia.* 2012 Jul; 55(7):1902-10.
- Andrae J, Gallini R, Betschultz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008 May; 22(10):1276-312.
- Wu OH, Chen WS, Chen OX, Wang JH, Zhang XM. Changes in the expression of platelet derived growth factor astrocytes in diabetic rats with spinal cord injury. *Chin Med J (Engl).* 2010 Jun; 123(12):1577-81.
- Niezgoda N. Randomized clinical trial comparing Oasis wound matrix to Regranex gel for diabetic ulcers. *Adv Skin Wound Care.* 2005 Jun; 18(5 Pt 1):258-66.
- Yang Y, Xia T, Zhi W, Wei L, Zhang C, Li X. Promotion of skin regeneration in diabetic rats by electrospun core-sheath fibers loaded with basic fibroblast growth factor. *Biomaterials.* 2011 Jun; 32(18):4243-54.
- Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor- B (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. *Diabetes Care.* 1998 May; 21(5):822-7.
- Landsman A, Agnew P, Freguesia L, Joseph R, Galiano RD. Diabetic foot ulcers treated with Becaplermin and Thera Gauze, a dressing intelligent humidity control: a randomized, multicenter, prospective analysis. *J Am Podiat Med Assoc.* 2010 May-Jun; 100(3):155-60.
- Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol.* 2011; 47(1):R1-R10.

REFERÊNCIAS

19. Ishii DN. Implication of insulin-like growth factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Brain Res Rev*. 1995 Jan; 20 (1):47-67.
20. Blakytyn R, Jude EB, Martin-Gibson J, Boulton AJ, Ferguson MW. Lack of insulin like growth factor 1 (IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers. *J Pathol*. 2000 Apr; 190(5):589-94.
21. Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factor and neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jul; 4(7):505-18.
22. Upton Z, Cuttle L, Noble A, Kempf M, Topping G, Malda J, Xie Y, Mill J, Harkin DG, Kravchuk O, Leavesley DI, Kimble RM. Vitronectin: growth factor complexes have potential as a therapeutic healing. *J Invest Dermatol*. 2008 Jun; 128(6):1535-44.
23. Dawson RA, Upton Z, Malda J, Harkin DG. Preparation of cultured skin for transplantation using insulin-like growth factor I in conjunction with insulin-like binding protein 5 growth factor, epidermal growth factor, and Vitronectin. *Transplantation*. 2006 Jun; 81(12):1668-76.
24. Hardwicke J, Schmalijohann D, Boyce D, Thomas D. Epidermal growth factor therapy and wound healing – past, present and future perspectives. *Surgeon*. 2008 Jun; 6(3):172-7.
25. Oxford GE, Tayari L, Barfoot MD, Peck AB, Tanaka Y, Humphrey BM. Salivary EGF levels reduced in diabetic patients. *J Diabetes Complications*. 2000 May-Jun; 14(3):140-5.
26. Amin AH, Abd Elmageed ZY, Nair D, Partyka IM, Kadowistz PJ, Belmadani S, Matrougui K. Modified multipotent stromal cells with epidermal growth factor restore vasculogenesis and blood flow in ischemic hind-limb of type II diabetic mice. *Lab Invest*. 2010 Jul; 90(7):985-96.
27. Kim HS, Yoo HS. In vitro and in vivo epidermal growth factor gene therapy for diabetic ulcers with electrospun fibrous meshes. *Acta Biomater*. 2013 Jul; 9(7):7371-80.
28. Tsang MW, Wong WK, Hung CS, Lai KM, Tang W, Cheung EY, Kam G, Leung L, Chan CW, Chu CM, Lam EK. Human epidermal growth factor enhances healing of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*. 2003 Jun; 26(6):1856-61.
29. Hong JP, Jung HD, Kim YW. Recombinant Human epidermal growth factor (EGF) to enhance healing of diabetic foot ulcers. *Ann Plast Surg*. 2006 Apr; 56(4):394-8.
30. Monhan VK. Recombinant human epidermal growth factor (REGEN-D 150): effect on the healing of diabetic foot ulcers. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007 Dec; 78(3):405-11.
31. Valenzuela-Silva CM, Tuero-Iglesias AD, García-Iglesias E, González-Díaz O, Del Río-Martín A, Alos IBY, Fernández-Montequín JI, López-Saura PA. Granulation response and partial wound closure predict healing in clinical trials on advanced diabetes foot ulcers treated with recombinant human epidermal growth factor. *Diabetes Care*. 2013 Feb; 36:210-5.
32. Tuyet HL, Nguyen Quynh TT, Vo Hoang Minh H, Thi Bich DN, Do Dinh T, Le Tan D, Van HL, Le Huy T, Doan Huu H, Tran Trong TN. The efficacy and safety of epidermal growth factor in the treatment diabetic foot ulcers: the preliminary results. *Int Wound J*. 2009 Apr; 6(2):159-66.
33. Fernández-Montequín JI, Valenzuela-Silva CM, Díaz OG, Savigne W, Sancho-Soutelo N, Rivero-Fernández F, Sánchez-Penton P, Morejón-Vega L, Artaza-Sanz H, García-Herrera A, González-Benavides C, Hernández-Cañete CM, Vázquez-Proenza A, Berlanga-Acosta J, López-Saura PA; Cuban Diabetic Foot Study Group. Intra-lesional injections of recombinant human epidermal growth factor promote granulation and healing in advanced diabetic foot ulcers: a multicenter randomized, placebo-controlled, double-blind study. *T Wound J*. 2009 Dec; 6(6):432-43.
34. Choi JK, Jang JH, Jang WH, Kim J, Bae J, Bae IH, Park YH, Kim BJ, Lim KM, Park JW. The Effect of Epidermal Growth Factor (EGF), Coupled With Low Molecular Weight Protamine (LMWP) on Healing of Skin. *Biomaterials*. 2012 Nov; 33(33):8579-90.
35. Dogan S, Demirel S, Kepenekci I, Erkek B, Kiziltay A, Hasirci N, Müftüoğlu S, Nazikoglu A, Renda N, Dincer UD, Elhan A, Kuterdem E. Epidermal growth factor-containing wound closure enhances wound healing in diabetic and non-diabetic mice. *Int Wound J*. 2009 Apr; 6(2):107-15.
36. Kondo S, Niiyama H, Kuroyanagi Y. Evaluation of a wound dressing composed of hyaluronic acid and collagen sponge containing epidermal growth factor in diabetic. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2011 Sep; 128:756-92.
37. Chu Y, Yu D, Wang P, Xu J, Li D, Ding M. Nanotechnology promotes the total thickness diabetic wound healing effect of recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats. *Wound Repair Regen*. 2010 Sep-Oct; 18(5):499-505.
38. Hardwicke JT, Hart J, Bell U, Duncan R, Thomas DW, Moseley R. The effect of dextrin-rh EGF on the healing of full thickness excisional wounds in (db / db) diabetic mouse. *Control Release*. 2011 Jun; 152(3):411-7.

REFERÊNCIAS

39. Lao G, Yan L, Yang C, Zhang L, Zhang S, Zhou Y. Controlled release of epidermal growth factor from hydrogels accelerates wound healing in diabetic mice. *J Am Podiatr Med Assoc.* 2012 Mar-Apr; 102(2):89-98.
40. Itoh N. Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Re.* 2010 Oct; 342(1):1-11.
41. Medeiros AC, Dantas AM, Aires NT, Lima FP, Azevedo IM, Alves SG. O fator de crescimento de fibroblasto básico melhora a cicatrização de anastomoses duodenais em ratos. *Acta Cir Bras.* 2003; 18(1):10-4.
42. Ono I. The effects of basic fibroblast growth factor (FGFb) on the breaking strength of acute incisional wounds. *J Dermatol Sci.* 2002 Aug; 29(2):104-13.
43. Dantas-Filho AM, Aguiar JL, Rocha LR, Azevedo IM, Ramalho E, Medeiros AC. Effects of the basic fibroblast growth factor and its anti-factor in the healing and collagen maturation of infected skin wound. *Acta Cir Bras.* 2007 Mar-Apr; 22(Suppl 1):64-71.
44. Uchi H, Igarashi A, Urabe K, Koga T, Nakayama J, Kawamori R, Tamaki K, Hirakata H, Ohura T, Furue M. Clinical efficacy of basic fibroblast growth factor (FGFb) for diabetic ulcer. *Eur J Dermatol.* 2009 Sep-Oct; 19(5):461-468.
45. Kawai K, Suzuki S, Tabata Y, Nishimura Y. Accelerated wound healing through the incorporation of basic fibroblast growth factor impregnated gelatin microspheres into artificial dermis using a pressure-induced decubitus ulcer model in genetically diabetic mice. *Br J Plast Surg.* 2005 Dec; 58(8):1115-23.
46. Morimoto N, Yoshimura K, Niimi M, Ito T, Tada H, Teramukai S, Murayama T, Toyooka C, Takemoto S, Kawai K, Yokode M, Shimizu A, Suzuki S. An exploratory clinical trial for combination therapy with wound care and an array novel fibroblast growth factor in patients with chronic skin ulcers: a study protocol. *Am J Transl Res.* 2012; 4(1):52-9.
47. Xie L, Zhang M, Dong B, Guan M, Lu M, Huang Z, Gao H, Li X. Improved refractory wound healing with administration of acidic fibroblast growth factor in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Sep; 93(3):396-403.
48. Huang Z, Lu M, Zhu G, Gao H, Xie L, Zhang X, Ye C, Wang Y, Sun C, Li X. Accelerated diabetic - wound healing in healing with pegylated rh FGFa disabled Streptozotocin diabetic rats. *Wound Repair Regen.* 2011 Sep-Oct; 19(5):633-44.
49. Wang W, Lin S, Xiao Y, Huang Y, Tan Y, Cai L, Li X. Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired Stz diabetic rats. *Life Sciences.* 2008 Jan; 82(3-4):190-204.
50. Yan X, Chen B, Lin Y, Li Y, Xiao Z, Hou X, Tan Q, Dai J. Acceleration of Diabetic Wound Healing by Collagen-Binding Vascular Endothelial Growth Factor in Diabetic Rat Model. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010 Oct; 90(1):66-72.
51. Bauer SM, Liu ZJ, Chen H, Goldstein L, Velazquez OC. Vascular endothelial growth factor-C that promotes vasculogenesis, angiogenesis and constriction of the collagen in the collagen gels tridimensionais. *J Vasc Surg.* 2005 Apr; 41(4):699-707.
52. Waltermberger J, Lange J, Kranz A. Vascular endothelial growth factor-a-induced chemotaxis of monocytes is attenuated in patients with diabetes mellitus a potential predictor for the Individual capacity to develop collaterals. *Circulation.* 2000; 102:185-190.
53. Ko J, Jun H, Chung H, Yoon C, Kim T, Kwon M, Lee S, Jung S, Kim M, Park JH. Comparison of EGF with VEGF non-viral gene therapy for cutaneous wound healing of Streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Metab J.* 2011; 35(3):226-35.
54. Pawson EJ, Duran-Jimenez B, Surosky R, Brooke HE, Spratt SK, Tomlinson DR, Gardiner NJ. Engineered zinc finger protein mediated VEGF-A activation restores deficient VEGF-A in sensory neurons in experimental diabetes. *Diabetes.* 2010 Feb; 59(2):509-18.
55. Tan Q, Chen B, Yan X, Lin Y, Xiao Z, Hou X, Dai J. Promotion of wound healing diabetic by collagen scaffold with collagen binding vascular endothelial growth factor in a diabetic rat model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012 May; 2:1513-28.
56. Upton Z, Wallace HJ, Shooter GK, van Lonkhuyzen DR, Yeoh-Ellerton S, Rayment EA, Fleming JM, Broszczak D, Queen D, Sibbald RG, Leavesley DI, Stacey MC. Human pilot studies reveal the potential of a Vitronectin: complex growth factor for the treatment of chronic wounds. *Int Wound J.* 2011 Oct; 8(5):522-32.
57. Alckermann M, Wolloscheck T, Wellmann A, Li VW, Li WW, Konerding MA. Priming with a combination of proangiogenic growth factors improves wound healing in diabetes induced by Streptozotocin in rats. *Eur Surg Rev.* 2011; 47(2):81-9.

Endereços para correspondência:

Maria Cristina Travi-Carneiro
questir@hotmail.com

Maria Isabel Carneiro-Travi
misatravi@hotmail.com.

Patricia Martins Bock
patriciabock74@gmail.com