

Ensaio de cicatrização utilizando o protocolo para avaliar a cicatrização tecidual em modelo experimental *Rattus norvegicus wistar*

DIEGO SERRASOL AMARAL¹; AMILTON SEIXAS NETO²; GUILHERME FEIJÓ DE SOUSA¹; ISABEL LOPES VIGHI²; MARIA TERESA BICCA DODE³; LUCIANO DA SILVA PINTO⁴

¹ Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Graduação em Biotecnologia, CD Tec, UFPel
diegos.amaral@outlook.com; guima.sousa07@gmail.com

² Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, CD Tec, UFPel - amiltonseixas@gmail.com

² Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, CD Tec, UFPel - isavighi@hotmail.com

³ Universidade Católica de Pelotas – UCPel - maria.bicca@ucpel.edu.br

⁴ Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, CD Tec, UFPel – dmpluc@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O processo de reparação tecidual ocorre principalmente através de dois processos, a regeneração tecidual e a cicatrização (Schreml et al., 2010). A regeneração é o processo pelo qual as células que morreram, devido à agressão, são substituídas pelas células do parênquima do mesmo órgão. Já a cicatrização é o processo em que as células lesadas não são substituídas por células parenquimatosas, mas por tecido fibroso. O fato de as feridas crônicas, incluindo as úlceras por pressão, úlceras arteriais, úlceras venosas e úlceras diabéticas, constituírem um problema de saúde pública de grande magnitude. No Brasil as mesmas afetam milhares de pacientes e geram um gasto de bilhões de dólares, contabilizando o período de afastamento do trabalho, decorrente da lesão, os estudos sobre o impacto econômico desse agravo são ainda pontuais, portanto, não se sabe qual o custo total do tratamento de pessoas portadoras de feridas (ANDRADE et al., 2013).

Sendo assim, a descoberta de novas moléculas para aplicação em saúde, na produção de fármacos capazes de ajudar na regeneração tecidual pode melhorar a qualidade de vida da população atingida. Neste sentido as lectinas têm desempenhado um papel de destaque já que esta proteína tem um grande potencial para o desenvolvimento de novos produtos terapêuticos ou no diagnóstico de doenças.

Lectinas são proteínas que se ligam com afinidade os resíduos de glicídios e assim com capacidade de aglutinar células e precipitar glicoconjungados. Essas proteínas são importantes porque estão envolvidas no processo de reconhecimento celular e sinalização em diversas vias metabólicas. É um grupo heterogêneo de proteínas encontrado em plantas, animais e microrganismos, que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga de forma reversível a específicos mono-ou oligossacarídeos. Para isso, o presente trabalho foi desenvolvido com a finalidade de estudar a ação *in vivo*, da ação do Carbopol um polímero hidrossolúvel contendo lectinas nativas biologicamente ativas, visando à possível utilização destes como tratamento para reconstituição tecidual.

2. METODOLOGIA

2.1 Expressão e obtenção da proteína

A obtenção da proteína foi realizada apartir da trituração de 10 gramas de semente em conjunto com o tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 com NaCl 150 mM A proteína foi fracionadas por precipitação com sulfato de amônio, em diferentes faixas de concentração. Posteriormente submetido à diálise contra H₂O destilada com cinco trocas com intervalo de 2 em 2 horas, sendo que a última troca foi contra o tampão utilizado na extração. A amostra dialisada foi purificada por meio da técnica de cromatografia de afinidade, no caso utilizando a coluna agarose-lactose (Sigma) e eluída com 30 mL de tampão glicina 50mM pH 2,6 com NaCl 150 mM. A amostra purificada foi então dialisada e liofilizada. A lectina resultante da liofilização foi ressuspensionadas em 1mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 com NaCl 150 mM e quantificada através de espectrometria.

2.2 Animais

Ratos Wistar machos (8 semanas de idade e pesando em torno de 350-450 g) obtidos do Biotério central da Universidade Federal de Pelotas utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos em gaiolas convencionais, com condições de temperatura normal (22 ± 2 ° C), umidade relativa do ar (60-80%) e ciclo claro / escuro de 12 h, com alimento e água ad libitum. Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação de Animais (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Numero de registro CEEA 6853-2017 de acordo com as diretrizes nacionais e internacionais.

2.3 Ensaio de cicatrização in vivo

Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais, grupo controle contendo somente Carbopol e outro grupo contendo lectina-carbopol sendo as formulações realizadas com a parceria dos profissionais da Dermakos Farmácia de Manipulação. Foram utilizados 18 animais por grupo (6 para cada fase de cura da ferida: 48h, 7 dias e 12 dias). Nas 48h ocorre a fase inflamatória, do 2^a ao 7^a dia, a fase proliferativa e do 8^a ao 12^a dia a fase de maturação. Após o procedimento anestésico, cada animal foi submetido à tricotomia da região dorsal e posterior antisepsia utilizando iodopovidona 1%. A ferida cutânea foi produzida com auxílio de um “punch” metálico de 8,0mm de diâmetro delimitando-se uma área na região dorsal do tórax e removendo-se o segmento circular de pele com tesoura de pontas tipo fina/fina e pinça de dissecação, ate sua ressecção, expondo as fáscias musculares. Diariamente foi aplicado sob cada lesão um dos tratamentos e a área da ferida foi mensurada por auxílio de um paquímetro. Nos 2^º, 7^º e 12^º dias do pós-operatório 6 animais de cada grupo foram eutanasiados por inalação através de overdose anestésica com isoflurano inalatório. Em seguida, foi realizadas biópsias das feridas retirando-se fragmentos de pele através de incisão abrangendo pele íntegra e área da ferida (Nascimento, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de uma análise estatística dos resultados prévios obtidos durante os 12 dias de experimento a respeito das medidas das feridas cutâneas e seus níveis de cicatrização foi possível constatar uma melhora comparativa entre o tratamento e o controle ao passar das fases do experimento. Durante os primeiros

dias de tratamento (fase inflamatória – dia 0 ao dia 2) foi evidenciada a mais expressiva melhora das feridas em relação ao controle (Gráfico 1). Durante a fase proliferativa (Dia 2 ao 7) os resultados entre os dois grupos se tornaram os mais próximos (Gráfico 1), mesmo que ainda o grupo tratado com a lectina apresentasse uma melhora de 5% , diferente do dia 2 em que o grupo tratado apresentava uma melhora de 25%. Na fase de maturação (Dia 7 ao 12), com as feridas tratadas cerca de 99% regeneradas, a diferença não se mostrou como nos primeiros dias, mas mais evidente do que durante o período proliferativo, os resultados dessa fase do experimento (Gráfico 1) foram de uma diferença de 15 % entre os tratados e o controle negativo. Sendo assim, é possível estabelecer uma relação entre a aplicação da proteína testada com a melhora da regeneração tecidual, no futuro ainda serão testadas as reações inflamatórias e as características histológicas dessas feridas, podendo assim melhorar a caracterização da proteína na ação regenerativa.

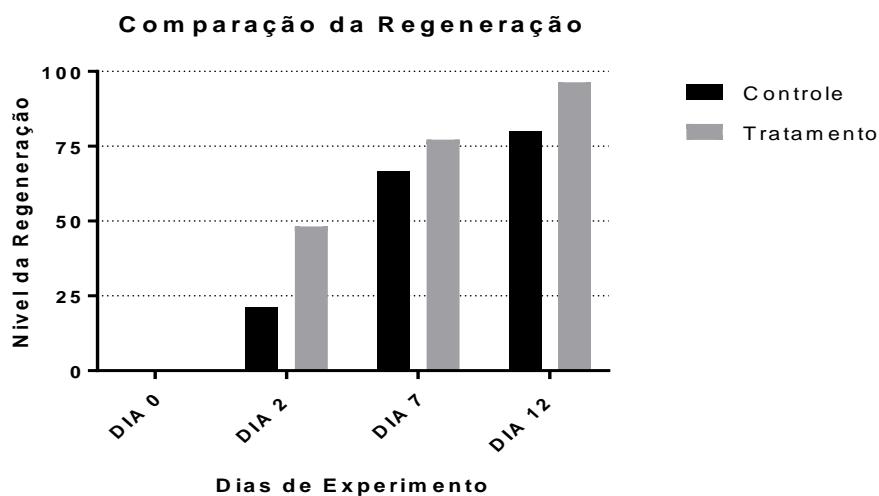


Fig. 1 . Comparação das áreas das feridas tratadas e das não tratadas, nos dias 0, 2, 7, e 12 de experimento.

4. CONCLUSÕES

O uso das nossas lectinas associadas a veículos apropriados são capazes de reparar tecidos cutâneos em animais de laboratório, um primeiro passo para o desenvolvimento de um produto para a regeneração de lesões cutâneas. Assim, um novo produto pode ser empregado na medicina regenerativa brasileira, diminuindo os custos de importação de materiais similares. Visto a atividade regenerativa promissora ainda serão feitos novos experimentos, buscando novas lecitinas e veículos de aplicações.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade MGL, Camelo CN, Carneiro JA, Terêncio KP. Evidências de alterações do processo de cicatrização de queimaduras em indivíduos diabéticos: revisão bibliográfica. **Rev Bras Queimaduras** 2013; 12(1): 42-48

Nascimento Neto, L G; **Pinto, L.S.**; Bastos, R M; Evaristo, F F V; Vasconcelos, M A; Carneiro, V A; Arruda, F. V. S; Porto, A. L.. F ; Leal, R. B ; Júnior, V. A.S ; CAVADA, B. S ; Teixeira, E. H.. Effect of the Lectin of Bauhinia variegata and Its Recombinant Isoform on Surgically Induced Skin Wounds in a Murine Model. **Molecules** (Basel. Online), v. 16, p. 9298-9315, 2011.

SCHREML, S. et al. Wound healing in the 21st century. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 5, p. 866–81, 2010