

## EFEITO DA LECTINA EXTRAÍDA DE *Bauhinia variegata* INCORPORADA AO HIDROGEL NATROSOL NA CICATRIZAÇÃO *IN VIVO*

LARISSA BRUSSA REIS<sup>1</sup>; CAROLINE RIZZI<sup>2</sup>; JULIANA BIDONE<sup>3</sup>, ALEXANDRE FERRAZ FONSECA<sup>4</sup>, MICHELLE MAIDANA<sup>4</sup>, LUCIANO DA SILVA PINTO<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – laribrussa@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – ccrizzi@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>4</sup>Universidade Federal de Rio Grande

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – ls\_pinto@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A pele constitui uma barreira mecânica que dificulta a invasão do organismo por patógenos, sendo de fundamental importância a manutenção de sua integridade (ABBAS & LICHTMAN, 2005). As feridas são lesões físicas que resultam numa abertura ou ruptura da pele. A cicatrização adequada de feridas é essencial para a restauração da estabilidade anatômica interrompida e do estado funcional perturbado da pele (MURTHY, 2013). Em organismos mamíferos adultos, o processo de reparação de feridas é intrincado e altamente coordenado, com as seguintes etapas básicas: fase inflamatória, fase proliferativa (que incluem reepitelização, síntese da matriz e neo-angiogênese) e fase de maturação (TAZIMA, 2008). A compreensão desses processos permite a investigação e o desenvolvimento de fármacos, visto que feridas cutâneas representam um grande problema de saúde pública em muitos países. O desenvolvimento de tecnologias baseadas em fontes naturais para a cura de feridas ou úlceras na pele é de grande interesse para a indústria biomédica e farmacêutica (NASCIMENTO-NETO, 2011).

Lectinas constituem um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas com várias aplicações biomédicas e biotecnológicas (LAM, 2011). Suas propriedades de ligação à galactose são particularmente úteis, pois interagem com diversas moléculas endógenas envolvidas na resposta imune inata e específica. A habilidade dessas moléculas de ativar células imunes indica potencial para acelerar a cicatrização de feridas e a regeneração epitelial (ALENCAR, 2007). A espécie *Bauhinia variegata* pertence à família das Leguminosas, e suas lectinas oriundas são reconhecidas como importantes ferramentas biotecnológicas (LIN, 2008). Nascimento Neto e colaboradores demonstraram *in vivo* que a lectina de *B. variegata* possui propriedades pró-inflamatórias, provavelmente por atuarem na síntese de colágeno por fibroblastos e na angiogênese através da liberação de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento (NASCIMENTO-NETO, 2011). Porém, acredita-se que as propriedades desta lectina possam ser potencializadas com o uso de veículo tópico adequado. Quando a pele está seriamente lesada, a escolha adequada dos componentes da formulação é importante para regular a penetração do composto incorporado. O hidroxietilcelulose (hidrogel Natrosol) é um polímero amorfo, biocompatível e não-tóxico que tem mostrado grande potencial para a liberação controlada de moléculas bioativas, importantes moléculas biológicas de imagem, e medicina regenerativa (GAO, 2013). Pelo fato da lectina ser solúvel em água e o Natrosol ser altamente permeável, ele foi escolhido como veículo para a difusão da lectina em feridas induzidas na pele de camundongos, com o objetivo de investigar o aumento da cinética de liberação da mesma.

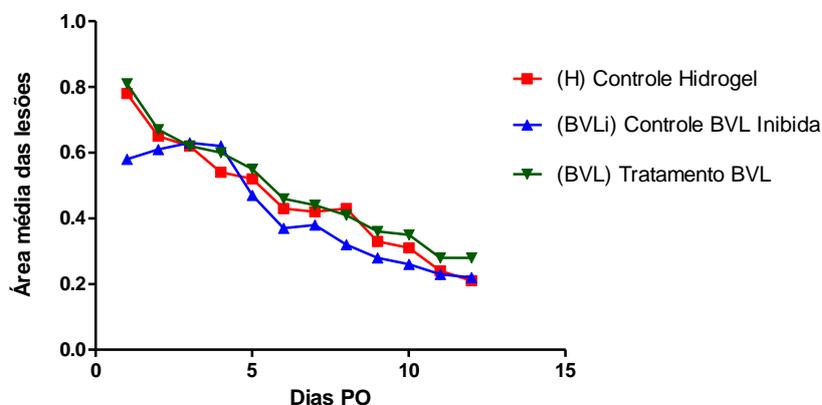
## 2. METODOLOGIA

As lectinas foram extraídas de sementes de *Bauhinia variegata* (BVL) e purificadas seguindo método descrito por PINTO et al, 2008. A seguir, foram caracterizadas e quantificadas. As lectinas BVL foram usadas na concentração de 4 mg diluídas em 3750  $\mu$ L de água MiliQ, e posteriormente incorporadas em 6,25 g de Natrosol preparado a 4%. Trinta e seis camundongos machos da raça Swiss foram divididos em três grupos randômicos com doze animais, anestesiados com xilazina e quetamina (FIOCRUZ, 2008) e lesionados com feridas excisionais sobre a superfície dorsal no dia 1. As feridas foram tratadas topicamente, da seguinte maneira: grupo um apenas com Natrosol (controle negativo), o grupo dois com Natrosol incorporado com BVL inibida por ligante específico lactose 0,2 M (BVLi); e grupo três com Natrosol incorporado com BVL. Os tratamentos foram aplicados nas lesões durante doze dias de experimento, e o tamanho das lesões foi acompanhado diariamente por medição com paquímetro. Amostras de tecido lesionado de animais escolhidos aleatoriamente foram coletadas de cada grupo, nos dias 2, 7 e 12 do procedimento pós-operatório (PO). As amostras foram submetidas à avaliação histopatológica.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

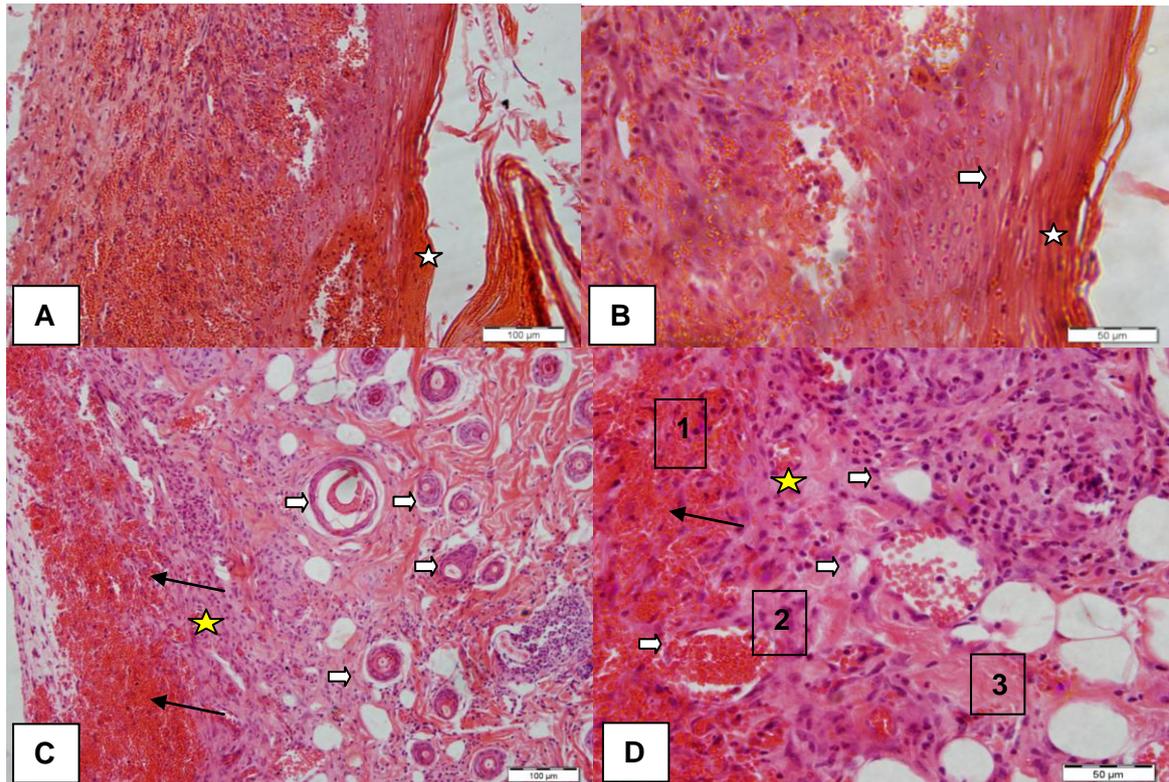
A cicatrização é o processo em que ocorre a substituição de um tecido lesado por um tecido conjuntivo altamente vascularizado. O primeiro passo é o início de uma reação inflamatória, onde as células fagocitárias recrutadas reabsorvem o sangue extravasado e os produtos da destruição celular. Em seguida, a proliferação fibroblástica e endotelial são as responsáveis por originar o tecido conjuntivo cicatricial. As tentativas de restaurar a lesão induzida por uma agressão local resultam em reparo e substituição das células mortas por células saudáveis (CARVALHO, 2002).

A atividade cicatrizante de BVL incorporada ao Natrosol foi verificada nas lesões cutâneas induzidas em camundongos. A evolução macroscópica do processo cicatricial foi acompanhada por parâmetros morfométricos, como a mensuração das lesões ao longo de 12 dias PO. Não foi possível verificar uma diferença no diâmetro das lesões entre o grupo tratado com a BVL e os grupos controle Natrosol e controle BVLi (Figura 1).



**Figura 1: Evolução da área da lesão (cm<sup>2</sup>) durante os 12 dias de experimento aplicando os tratamentos tópicos.** (H) Controle Hidrogel; (BVLi) Controle Hidrogel + BVL inibida; (BVL) Hidrogel+ Tratamento BVL.

Apesar dos eventos de reepitelização macroscópica não terem sido evidenciados, foram observados processos de regeneração profunda, como processos de formação de tecido de granulação, característico da fase proliferativa de reparação de feridas. Outro evento característico desta fase, e que se acentuou nas lesões do grupo tratado com BVL é a neo-angiogênese, responsável pelo suprimento sanguíneo aos fibroblastos e pelo aumento do aporte de macrófagos e fibroblastos para o local da ferida (TAZIMA, 2008). Além disso, camadas de pele regenerada foram observadas, sugerindo que BVL incorporada a Natrosol tem maior potencial de cicatrização do que os controles testados neste estudo (Figura 2).



**Figura 2: Avaliação histopatológica das lesões após sete dias de tratamento. A:** (Hidrogel) – Pele de animal controle. Notar presença de crosta (estrela) recobrendo leito da ferida. **B:** (Hidrogel) Detalhe da foto anterior. Observar área com tecido de granulação (seta branca). **C:** (BVL+Hidrogel) – Pele de animal tratado com BVL. Notar reestruturação do epitélio de revestimento (seta) e da derme com deposição de colágeno (estrela amarela). Também observar grande número de vasos característicos da neo-angiogênese (setas brancas). **D:** (BVL+Hidrogel) Detalhe da foto anterior. Observar pele reestruturada com suas camadas normais: 1) Epiderme; 2) Derme papilar; 3) Derme reticular.

#### 4. CONCLUSÕES

Observou-se a partir desses dados que a lectina de *Bauhinia variegata*, apesar de não ter mostrado uma diminuição nos sinais clínicos macroscópicos, demonstra através do estudo histopatológico um potencial de indução de cicatrização, principalmente no 7º dia de experimento.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2005.

TAZIMA, M.F.G.S.; VICENTE, Y.A.M.V.A.; MORIYA, T. *Biologia da Ferida e Cicatrização*. São Paulo: Medicina (Ribeirão Preto), v.41, p.259-264. 2008.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; HAVT, A.; BENEVIDES, R.G.; MOURA, T.R.; SOUSA, R.B.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S. ***Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin actives cultured macrophages to release chemotaxis mediators**. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. Germany, v. 374, p. 275-282. 2007.

CARVALHO, P.T.C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: Estudo experimental em ratos diabéticos**. 2002. Dissertação. (Mestrado em Bioengenharia). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC. Universidade de São Paulo.

CLARK, R. A. F. **Wound Repair: Overview and General Considerations. The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. Plenum Press, New York. 1996. Cap. 1, p. 3-35.

GAO, J.; ZHENG, W.; ZHANG, J.; GUAN, D.; YANG, Z.; KONG, D.; ZHAO, Q. **Enzyme-controllable delivery of nitric oxide from a molecular hydrogel**. Chemical Communications. v. 49, p. 9173-9175. 2013

LAM, S.K.; NG, T.B. **Lectins: Production and practical applications**. Applications Microbiology Biotechnology. Japan, v. 89, p. 45-55. 2011.

LIN, P.; NG, T.B. **Preparation and Biological Properties of a Melibiose Binding Lectin from *Bauhinia variegata* Seeds**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. United States, v. 56, p. 10481-10486. 2008.

MURTHY, S.; GAUTAM, M.K.; GOEL, S.; PUROHIT, V.; SHARMA, H.; GOEL, R.K. **Evaluation of *In Vivo* Wound Healing Activity of *Bacopa monniera* on Different Wound Model in Rats**. BioMed Research International. United States, v.2013, n. 972028, p. 1-9. 2013.

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., JUNIOR 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. Switzerland, v. 16, p. 9298-9315. 2011.

PINTO L.S., NAGANO C.S., OLIVEIRA T.M., MOURA T.R., Sampaio A.H., DEBRAY H., PINTO V.P., DELLAGOSTIN O.A., CAVADA B.S. **Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds**. Journal Biosciencia. v. 33, p. 355-363. 2008.