

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DA LECTINA ISOLADA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Bryothamnion triquetrum*

Aryane de Azevedo Pinheiro^a; João Victor da Silva Bezerra^a; Luiz Gonzaga do Nascimento Neto^{a,b}; Alexandre Holanda Sampaio^{a,b}

^a *Laboratório Integrado de Biomoléculas – LIBS, Departamento de Patologia e Medicina Legal-Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará – UFC;* ^b *Laboratório de Biotecnologia Marinha – BioMarLab, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará - UFC*

1. INTRODUÇÃO

Feridas cutâneas têm se constituído um grave problema de saúde, acometendo a população de forma geral. No Brasil, apenas 2% do orçamento da saúde é dedicado aos cuidados de pacientes acometidos por feridas agudas ou crônicas (Brasil, MS, 2008). No entanto, esse valor ainda é bastante reduzido face ao elevado número de mortalidades e morbidades causados em pacientes acometidos por feridas crônicas. Dados do Ministério da Saúde mostram que mais de 145 mil pessoas foram vítimas fatais devido a feridas crônicas, apenas em 2011, representando uma das principais causas de morte no país (BRASIL, MS, 2011). Além disso, mais de um milhão de internações foram registrados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) desde 2013 (BRASIL, MS, 2015). Apesar dos cuidados médicos, uma larga proporção de pacientes com feridas crônicas sofrem permanentemente devido à morbidade que se traduz na amputação dos membros, prejudicando a qualidade de vida (CAMPOS *et al.*, 2015).

Apesar de vários avanços tecnológicos, principalmente nas estratégias de tratamento no campo da cicatrização de feridas, muitos pacientes tem adotado a medicina tradicional como forma de tratamento, através do uso de remédios baseados em produtos naturais. Lectinas são proteínas que se ligam especifica e reversivelmente a certos açúcares, glicoproteínas e glicolípidos cumprindo múltiplos papéis biológicos em vertebrados, invertebrados, bactérias, vírus e plantas (KUZMANOV; KOSANAM; DIAMANDIS, 2013). As lectinas de plantas têm sido utilizadas na biologia celular, na imunologia como diagnósticos e como imunomoduladoras (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011), testes de atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (SILVA *et al.*, 2010; CAVALCANTE-SILVA *et al.*, 2012). Recentemente, Nascimento-Neto e colaboradores (2012), relataram que a lectina isolada da alga marinha vermelha *Bryothamnion seafortii* (BSL) foi capaz de acelerar o processo cicatricial de feridas agudas induzidas em camundongos. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial cicatrizante da administração tópica da

lectina da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* (BTL) em feridas cutâneas induzidas cirurgicamente em camundongos.

2. METODOLOGIA

2.1 Purificação da lectina

A lectina da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* (BTL) foi purificada por cromatografia de troca iônica como previamente descrito (Ainouz *et al.*, 1995 apud Teixeira *et al.*, 2007).

2.2 Animais

O estudo empregou 33 camundongos albinos Swiss, machos (*Mus musculus*) de dez semanas com peso de 30 ± 5 g que foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN / UFC). No decorrer do experimento, os animais foram mantidos em gaiolas individuais em um ambiente controlado (ciclo circadiano, 25 ± 2 ° C, $55 \pm 10\%$ de umidade, comida e água *ad libitum*) no biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal (UFC).

2.3 Procedimento cirúrgico e grupos experimentais

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, Brasil, sob o registro # 77/2013 e todos os animais foram tratados de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA (publicação NIH nº 85-23, revisada em 1985).

Previamente ao procedimento cirúrgico, os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (n= 11) de acordo com o tratamento tópico administrado: G-I (200 µg/mL BTL); G-II (200 µg/mL de BTL Desnaturada 'BTLD'); e G-III (Grupo sem tratamento).

O procedimento cirúrgico foi realizado de acordo como previamente descrito por Nascimento-Neto e colaboradores (2012). Brevemente, após anestesia, realizou-se a tricotomia e antisepsia da região dorsal. Com auxílio de um molde metálico (1,00 cm²), feridas cutâneas circulares foram produzidas por ressecção do tecido subcutâneo. Imediatamente após o procedimento cirúrgico, as feridas foram tratadas durante 12 dias com dose única diária contendo 20 µg/100 µL das lectinas (BTL, BTLD). Os animais do G-III apenas foram submetidos ao estresse da manipulação, na qual não receberam tratamento.

2.4 Avaliação do potencial cicatrizante de BTL

As feridas foram avaliadas macroscopicamente durante 12 dias levando-se em consideração sinais clínicos como: edema, hiperemia, presença ou não de crosta, exsudato e sangramento. Registros fotográficos foram realizados a cada 48 h com objetivo de monitorar alterações nas áreas das lesões experimentais. Para tanto, o software ImageJ para Microsoft Windows[®] foi utilizado (SCHNEIDER *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Com objetivo de analisar microscopicamente o efeito de cada tratamento, biópsias foram realizadas para coleta dos fragmentos de pele dos animais de cada grupo (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012). As amostras de tecido correspondentes à área da lesão experimental foram coletadas no 3º, 7º e 12º dias pós-operatórios (POD). Secções de 5 µm foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para posterior avaliação. A avaliação histopatológica foi realizada com auxílio de microscopia de luz utilizando ampliações de 4, 10 e 40 x e incluiu os seguintes parâmetros: presença de crosta, infiltrado inflamatório, proliferação de fibroblastos, reepitelização e neovascularização.

2.5 Avaliação estatística

Diferenças das áreas das feridas como também aquelas relacionadas à porcentagem de fechamento utilizou-se One-way ANOVA seguido do *post-test* de Tukey. Os dados foram processados com auxílio do software GraphPad Prism v.5.00 para Windows[®]. Os valores são dados como média ± SEM. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação macroscópica

Baseado na avaliação clínica das feridas foi observado que nos primeiros dias após o tratamento, o grupo GI (BTL) apresentou sinais inflamatórios como edema e hiperemia mais discretos quando comparados ao grupo GII (BTLD) e ao GIII (CONTROLE) que apresentou uma resposta inflamatória aguda mais intensa, sugerindo possivelmente um efeito anti-inflamatório pela lectina testada (Figura 1).

Em relação às alterações nas áreas das feridas, durante a fase inflamatória a variação das medidas foi muito próxima para os grupos BTL, BTLD e o controle (Figura 2). Diferenças significativas entre BTL e o controle foram observadas a partir do POD 8 ($p < 0,05$) (Figura 2). Na fase de proliferação e remodelação (POD 7-12) o grupo tratado com BTL apresentou uma

diminuição acentuada nas áreas das feridas em relação ao grupo BTL e ao controle. No POD12, o fechamento total da ferida foi observado apenas nos animais tratados com BTL, os grupos BTL e controle ainda possuíam fragmentos de crosta no leito da ferida (Figura 2). A avaliação da proporção de fechamento da ferida mostrou que as feridas tratadas com BTL cicatrizaram mais rapidamente quando comparadas às do grupo BTL e controle (Figura 3).

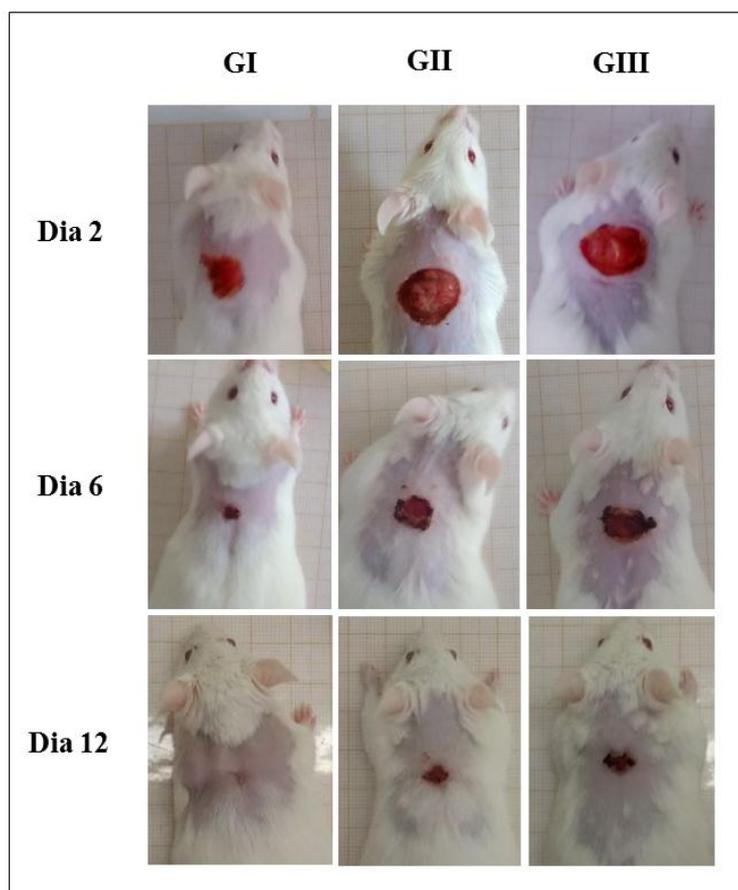


Figura 1: Avaliação macroscópica da evolução do processo de cicatrização nos grupos GI (BTL), GII (BTL) e GIII (CONTROLE).

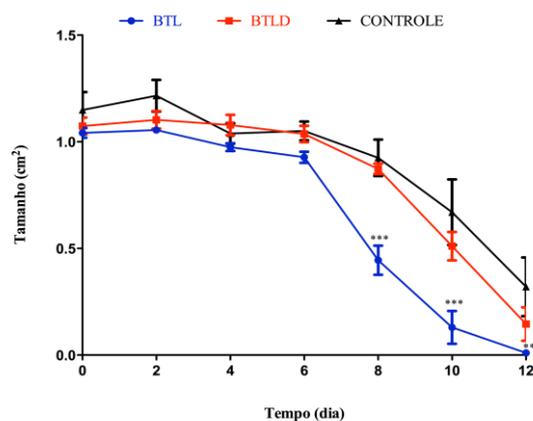


Figura 2: Variações nas áreas das feridas. ** $p < 0,05$ para BTL comparado ao controle. *** $p < 0,05$ para BTL comparado ao controle.

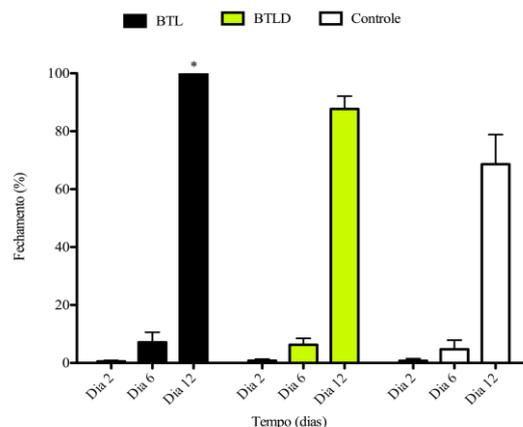


Figura 3: Proporção de fechamento das feridas. * $p < 0,05$ para BTL comparado ao controle.

3.2 Análise histopatológica

Para fins de avaliação histopatológica da ferida, amostras de tecido correspondentes à área da lesão experimental foram coletadas no 3º, 7º e 12º dias pós-operatórios (POD).

No POD 3, as feridas tratadas com BTL apresentaram infiltrado inflamatório moderado, com presença de fibroblastos ativos abaixo da crosta, numerosos microvasos de tecido de granulação no tecido adiposo reacional e início da reepitelização, indicando um processo de reparo adiantado. No grupo tratado com BTL observou-se um intenso infiltrado inflamatório, com muitos

fibroblastos na derme e início de neovascularização. No grupo que não recebeu tratamento a crosta apresentou um moderado infiltrado inflamatório como vasos característicos de diapedese e pouco tecido adiposo reacional sugerindo um processo cicatricial mais lento em relação ao grupo da BTL.

As feridas do grupo tratado com BTL apresentaram um número reduzido de microvasos no tecido de granulação com muitos fibroblastos ativos no leito da ferida e a clara presença de reepitelização no POD 7. No mesmo POD o grupo BTL D apresentou características histológicas semelhantes ao do grupo BTL. O grupo controle mostrou um processo de cicatrização atrasado quando comparada ao grupo BTL e BTL D, além de um intenso infiltrado inflamatório.

No POD 12 o grupo que recebeu o tratamento com BTL mostrou a camada epitelial e de tecido conjuntivo totalmente reestruturado, enquanto o grupo da BTL D apresentou um tecido conjuntivo ainda em processo de reestruturação, fibroblastos ativados na região da derme e presença de crosta selando a ferida. No grupo controle, as feridas apresentaram crosta com leve infiltrado inflamatório, tecido adiposo unilocular ainda em regressão e processo de reepitelização das bordas ainda em andamento. Diante do que foi observado, o grupo tratado com BTL mostrou um processo de reparo mais adiantado que os demais grupos em todos os dias analisados.

No presente estudo testou-se a lectina da alga vermelha marinha *Bryothamnion triquetrum* (BTL) em feridas cutâneas induzidas cirurgicamente em modelo murino. A BTL foi a primeira lectina de algas a ter sua estrutura primária totalmente caracterizada, está disposta estruturalmente na forma de: monômeros, dímeros e multímeros, com cada monômero > 10 kDa (CALVETE *et al* 2000). As lectinas de algas marinhas possuem um peso molecular menor que as lectinas de plantas, o que pode resultar em uma menor imunogenicidade, além de possuir grande estabilidade molecular (SAMPAIO; ROGERS; BARWELL, 1998; NAGANO *et al.*, 2005).

Diante dos resultados obtidos, a BTL demonstrou atividade pró-cicatrizante com indícios que sua atuação ocorra marcadamente na fase de proliferação e remodelação (POD 7-12) agindo na fibroplasia e angiogênese, fases essenciais para a formação do tecido de granulação. O maior número de microvasos de tecido de granulação presentes já no POD 3 do grupo tratado com BTL sugeriu um adiantamento na cicatrização das feridas quando comparado aos grupos BTL D e controle que no POD 3, baseado na análise microscópica, ainda estavam iniciando o processo de neovascularização.

4. CONCLUSÃO

Em conclusão, pode-se constatar que o tratamento com BTL induziu o processo cicatricial mais rápido e efetivo, resultando na proliferação de fibroblastos, aumento da síntese de fibras

colágenas e neoangiogênese. Dessa forma, sugere-se que BTL pode ser uma alternativa terapêutica promissora no tratamento de feridas agudas. Contudo, outros estudos são necessários para estabelecer o efeito pró-cicatrizante de BTL sobre feridas crônicas, bem como especificar seu mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASCHNEIDER, C. A; RASBAND, W. S; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p.271-275, 2012.

CALVETE, J. J. *et al.* The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **Cell. Mol. Life Sci**, p.343-350, 2000.

CAMPOS, M. R. *et al.* Morbidity and mortality associated with injuries: results of the Global Burden of Disease study in Brazil, 2008, **Cad Saude Publica**, p.121-136,2015.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. *et al.* Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Crude Methanolic Extract of Red Alga *Bryothamnion triquetrum*. **Marine Drugs**, v. 10, n. 12, p.1977-1992, 17 set. 2012.

GHAZARIAN, H; IDONI, B; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 3, p.236-247, maio 2011.

KUZMANOV, U; KOSANAM, H; DIAMANDIS, E. P. The sweet and sour of serological glycoprotein tumor biomarker quantification. **Bmc Medicine**, v. 11, n. 1, p.1-14, 7 fev. 2013.

NAGANO, C. S.; DEBRAY H.; NASCIMENTO, K. S.; PINTO, V. P.T.; CAVADA, B. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W.R.L.; SAMPAIO, A. H.; CALVETE J. J., HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. **Protein Science** v.14, n. 8, p.2167-2176, 2005.

NASCIMENTO-NETO, L. G. do *et al.* Characterization of Isoforms of the Lectin Isolated from the Red Algae *Bryothamnion seaforthii* and Its Pro-Healing Effect. **Marine Drugs**, v. 10, n. 12, p.1936-1954, 4 set. 2012. MDPI AG.

RODRIGUES, D. F. *et al.* O PROGRAMA IMAGE J COMO FERRAMENTA DE ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE FERIDAS CUTÂNEAS. v. 17, n. 9, p.1955-1964, 2013.

SAMPAIO, A.H.; ROGERS, D.J.; BARWELL, C.J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, p.765-769, 1998.

SILVA, L. M. C. M. *et al.* Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Lectin from Marine Red Alga *Pterocladia capillacea*. **Biol. Pharm. Bull**, v. 33, n. 5, p.830-835, 2010.

TEIXEIRA, E.H. *et al.* In vitro inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p.1001-1006, out. 2007.