

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

**ANÁLISE DO PERFIL DAS PROTEINASES ENVOLVIDAS NO
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS
EXPERIMENTAIS UTILIZANDO O POLISSACARÍDEO DA GOMA
DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.)**

PRISCILA DAS NEVES SANTOS

RECIFE
2009

PRISCILA DAS NEVES SANTOS

**ANÁLISE DO PERFIL DAS PROTEINASES ENVOLVIDAS NO
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS
EXPERIMENTAIS UTILIZANDO O POLISSACARÍDEO DA GOMA
DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.).**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração Biotecnologia.

ORIENTADORA:

Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto.

RECIFE

Fevereiro de 2009

Santos, Priscila das Neves

Análise do perfil das proteinases envolvidas no processo de cicatrização de lesões cutâneas experimentais utilizando o polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) / Priscila das Neves Santos. – Recife: O Autor, 2009.

52 folhas : fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

**1. Proteínas 2. Ferimentos e lesões 3. Cicatrização de feridas
4. Biotecnologia I. Título.**

572.6

CDD (22.ed.)

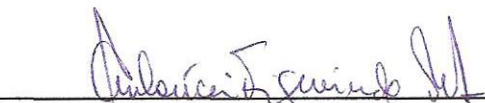
UFPE/ CCB – 2010- 078

PRISCILA DAS NEVES SANTOS

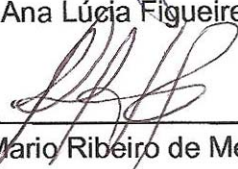
ANÁLISE DO PERFIL DAS PROTEINASES ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS UTILIZANDO O POLISSACARÍDEO DA GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.).

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração Biotecnologia.

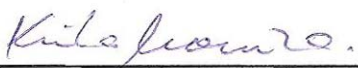
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Ana Lúcia Figueiredo Porto



Prof Dr Mario Ribeiro de Melo-Júnior



Profª Drª Keila Aparecida Moreira

Agradecimentos

A Deus, por minha saúde, família e amigos.

À Dr^a Suely Galdino, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, e a Adenilda Eugênia, secretária, pela dedicação e competência.

À direção do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, na pessoa do Dr. José Luiz de Lima Filho.

A minha orientadora, Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto, pela oportunidade e disponibilidade.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao amigo Flávio Oliveira Silva, pela paciência e dedicação em me transmitir todos os conhecimentos, teóricos e práticos, sem os quais este trabalho jamais se concretizaria; e por seu eterno bom-humor, que torna a ciência prazerosa e divertida.

À amiga Giuliana Viegas Schirato, cuja amizade e contribuição científica foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério do LIKA, Maria Helena Madruga e Luiz Felipe Viegas, pela produção e colaboração na utilização dos animais de laboratório.

À amiga Viviane do Carmo Carvalho, pela ajuda nas mais diversas formas.

À amiga Mariana Arruda, pela simpatia e solicitude.

Aos amigos e colegas de turma, Karla Barbosa, Mariana Donato e Wagner Oliveira, pelo apoio e amizade.

Resumo

O reparo de lesões é um processo dinâmico, que envolve uma resposta coordenada de muitos tipos celulares e é fundamentalmente similar entre tipos teciduais. A cicatrização pode ser dividida em 3 fases: inflamação, fibroplasia e remodelação da matriz extracelular (MEC). A migração de células e a remodelação dos tecidos durante a cicatrização de feridas requerem o controle de degradação da MEC e a ativação e liberação de fatores de crescimento. As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases e apresentam importante papel na remodelação proteolítica da MEC, em várias situações patológicas e fisiológicas, incluindo o reparo de lesões cutâneas. O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil de proteases envolvidas no processo de cicatrização de lesões cutâneas tratadas com o polissacarídeo de *Anacardium occidentale* L. (POLICAJU) durante as fases inflamatória, de fibroplasia e de remodelação em camundongos (*Mus musculus*) Swiss. Os animais (n=90) foram organizados de acordo com o tratamento empregado: Grupo I (NaCl 150mM), Grupo II (ácido ascórbico 75 mg/ml) e Grupo III (emulsão contendo POLICAJU 150 mg/ml preparado em ácido ascórbico 75 mg/ml). As lesões cutâneas foram realizadas assepticamente na região torácica dorsal e cada ferida foi tratada em dose única (200µl) imediatamente após a cirurgia. Através do ensaio com azocolágeno, verificamos que no 2º dia de pós-operatório (P.O.), o grupo tratado com ácido ascórbico foi o que apresentou a maior atividade proteolítica, e tanto no 7º quanto no 12º dias de P.O., as maiores atividades foram observadas nos grupos tratados com o POLICAJU. O perfil das proteínas nos homogenatos, obtidos a partir das lesões cutâneas, realizado através de eletroforese SDS-PAGE demonstrou, em todos os grupos estudados, a presença de proteínas com peso molecular de 53, 76, 170, 220 kDa, e proteínas com aproximadamente 84, 106, 116 e 151 kDa. No zimograma, observamos que todos os grupos estudados apresentaram enzimas que degradam a gelatina com peso molecular de aproximadamente 84, 106 e 116 kDa. No nosso trabalho, observamos que a cicatrização é favorecida pela relação entre POLICAJU e MMPs principalmente na fase de remodelação da cicatrização. Além disso, a proteína de peso molecular de 116 kDa observada no zimograma é a pró-MMP-9.

Palavras-chave: cicatrização, metaloproteinases, *Anacardium occidentale* L., goma do cajueiro.

Abstract

Wound healing is a dynamic process, which involves a coordinated response from many different cell types and is fundamentally similar among tissue types. Wound healing can be divided into 3 phases: inflammatory, fibroplasy and extracellular matrix (ECM) remodelling. Cell migration and tissue remodelling during healing require ECM degradation control and activation and releasing of growth factors. Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of endopeptidases and play an important role at ECM proteolytic remodelling, in many pathological and phisyological situations, including skin wound healing. The objective of this work was to determine the proteases profile involved in skin wound healing treated with *Anacardium occidentale* L. polysaccharide (POLICAJU) during inflammatory, fibroplasy and remodelling phases in Swiss mice (*Mus musculus*). Animals (n=90) were organized according to the employed treatment: Group I (NaCl 150mM), Group II (ascorbic acid 75 mg/ml) and Group III (emulsion containing POLICAJU 150 mg/ml prepared in ascorbic acid 75 mg/ml). Skin lesions were made asseptically at dorsal toracic region and each lesion was single dosis treated (200µl) immediately after surgery. Through azocoll assay, we observed that at 2° after surgery day, acid ascorbic treated group presented the highest proteolytic activity, and both 7° and 12° after surgery day, highest activities were shown at POLICAJU treated groups. Proteins profile checked through SDS-PAGE electrophoresis presented 53, 76, 170, 220 kDa proteins molecular weight, and other approximately 84, 106, 116 and 151 kDa molecular weight proteins in all groups. Zimography showed that all groups presented approximately 84, 106 and 116 kDa molecular weight enzymes which degrade gelatin. We observed in our work that wound healing is favoured for the relation between POLICAJU and MMPs especially at remodelling phase. Besides, the 116 kDa protein seen at zimography is pro-MMP-9.

Key words: wound healing, metalloproteinases, *Anacardium occidentale* L., cashew gum.

Lista de Figuras

Figura 1: Atividade collagenolítica das proteinases presentes nos homogenatos obtidos das lesões cirúrgicas experimentais dos grupos tratados com NaCl, ácido ascórbico e POLICAJU no 2º, 7º e 12º dias de pós-operatório.....pág 42

Figura 2: Perfil de proteínas dos homogenatos provenientes das amostras obtidas a partir das lesões cirúrgicas experimentais. Linha 1: grupo tratado com NaCl, 2º dia P.O.; linha 2: grupo tratado com NaCl, 7º dia P.O.; linha 3: grupo tratado com NaCl, 12º dia P.O.; linha 4: grupo tratado com ácido ascórbico, 2º dia P.O.; linha 5: grupo tratado com ácido ascórbico, 7º dia P.O.; linha 6: grupo tratado com ácido ascórbico, 12º dia P.O.; linha 7: grupo tratado com POLICAJU, 2º dia P.O.; linha 8: grupo tratado com POLICAJU, 7º dia P.O.; linha 9: grupo tratado com POLICAJU, 12º dia P.O.....pág 42

Figura 3: Zimograma das proteínas dos homogenatos provenientes das amostras obtidas a partir das lesões cirúrgicas experimentais. (a) Linha 1: grupo tratado com NaCl, 2º dia P.O.; linha 2: grupo tratado com NaCl, 7º dia P.O.; linha 3: grupo tratado com NaCl, 12º dia P.O.; linha 4: grupo tratado com ácido ascórbico, 2º dia P.O.; linha 5: grupo tratado com ácido ascórbico, 7º dia P.O.; linha 6: grupo tratado com ácido ascórbico, 12º dia P.O.; linha 7: grupo tratado com POLICAJU, 2º dia P.O.; linha 8: grupo tratado com POLICAJU, 7º dia P.O.; linha 9: grupo tratado com POLICAJU, 12º dia P.O. (b) Linha 1: grupo tratado com NaCl, 2º dia P.O.; linha 2: grupo tratado com ácido ascórbico, 2º dia P.O.; linha 3: grupo tratado com POLICAJU, 2º dia P.O.....pág 43

Lista de Abreviaturas e Siglas

1. MMPs – Metaloproteinases da matriz
2. MEC – Matriz extracelular
3. P.O. - Pós-operatório
4. kDa – Kilodáton
5. PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
6. EGF – Fator de crescimento epidermal
7. PMNs – Células polimorfonucleares
8. TGF- β – Fator de crescimento transformante beta
9. TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
10. FGF – Fatores de crescimento de fibroblastos
11. VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
12. bFGF – Fator de crescimento de fibroblastos básico
13. MT-MMPs – Metaloproteinases da matriz tipo membrana
14. TIMPs – Inibidores teciduais de metaloproteinases
15. HGF – Fator de crescimento de hepatócito
16. IL-1 – Interleucina-1
17. FROP-3 – Oligo e polissacarídeo rico em fucose 3
18. SIP-SII – Polissacarídeo sulfatado isolado de *Sepiella maindroni*
19. CSA – Condoitrina sulfato A

Sumário

1. INTRODUÇÃO	09
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivos específicos	12
4. REVISÃO DE LITERATURA	13
4.1 Cicatrização em lesões cutâneas	13
4.1.1 Fase inflamatória	14
4.1.2 Fase de fibroplasia	15
4.1.3 Fase de remodelação	17
4.2 Metaloproteinases da matriz (MMPs)	17
4.2.1 Metaloproteinases na fase inflamatória	20
4.2.2 Metaloproteinases na fase de fibroplasia	20
4.2.3 Metaloproteinases na fase de remodelação	21
4.3 Biomateriais	21
4.3.1 Polissacarídeo obtido do <i>Anacardium occidentale</i> L. - POLICAJU	23
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
6. ARTIGO CIENTÍFICO	36
7. ANEXO – Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal	52

1. INTRODUÇÃO

Metaloproteinases da matriz (MMPs) compreendem um grupo de enzimas estruturalmente relacionadas, que são coletivamente capazes de clivar praticamente todos os tipos de moléculas da matriz extracelular (MEC) e vários outros substratos (incluindo outras proteinases, fatores de crescimento e citocinas, das quais as MMPs frequentemente funcionam como ativadoras). Baseadas em sua especificidade de substratos e similaridade estrutural, as MMPs podem ser divididas em sub-grupos distintos: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilizinas, MMPs tipo membrana e outras MMPs (TORISEVA & KÄHÄRI, 2009).

MMPs são um componente necessário no processo de recuperação de lesões, e, como tal, possuem um papel importante na migração celular e na modificação da MEC. Entretanto, se a regulação destas moléculas é rompida, elas podem ser produzidas em quantidades excessivas e podem levar à degradação da MEC, prevenindo migração celular, e, em último caso, podem levar à destruição tecidual (TRENGOVE *et al.*, 1999).

MMPs podem ativar mediadores (como citocinas e quimiocinas), clivando-os da superfície celular ou processando-os para aumentar sua atividade, ou degradá-los, inibindo sinais inflamatórios. MMPs também são capazes de clivar componentes das junções célula-célula e de contatos célula-matriz dentro do epitélio para promover a re-epitelização. Além disso, as MMPs estão envolvidas na remodelação da cicatriz diretamente (pela degradação proteolítica de proteínas como o colágeno) ou indiretamente (através de sua habilidade para afetar o comportamento celular). Assim, MMPs são reguladores chave de múltiplos aspectos do reparo tecidual e estudos destas enzimas e de sua interação com seus substratos não apenas aumentarão nosso conhecimento sobre o reparo de lesões, como também fornecerão dados para possíveis terapias (GILL & PARKS, 2008).

O polissacarídeo obtido a partir da goma do *Anacardium occidentale* L. (cajuzeiro), abundante na região Nordeste do Brasil, tem sido relatado como um potencial agente anti-tumoral, anti-parasítico e cicatrizante. O fácil acesso a este polissacarídeo de baixo custo, não tóxico, hidrofílico, biocompatível e biodegradável, que apresenta interessante atividade biológica e boas propriedades reológicas são fatores que tornam viável sua utilização prática (MONTEIRO *et al.*, 2007). Já foi

observado, por Schirato *et al.* (2006) e Paiva (2003) que a utilização deste polissacarídeo favorece a cicatrização.

Objetivou-se com este trabalho determinar o perfil de proteinases produzidas em resposta ao tratamento tópico, em dose única, com a emulsão contendo o polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), POLICAJU, na evolução do processo cicatricial cutâneo em camundongos.

2. JUSTIFICATIVA

A busca por agentes que promovam o processo cicatricial é fundamental para que os pacientes tenham menor tempo de recuperação com o mínimo de desconforto possível. A utilização de plantas como base para novos agentes terapêuticos se faz importante pela grande biodiversidade existente em nossa flora e pela necessidade em se descobrirem novos fármacos, ao mesmo tempo em que se busca reduzir os custos com a obtenção de novas substâncias. O polissacarídeo extraído da goma do cajueiro tem demonstrado diversos efeitos biológicos, dentre estes, efeito cicatrizante, atraindo o interesse para caracterização das metaloproteinases da matriz envolvidas no processo de reparo de lesões cutâneas tratadas com este polissacarídeo. Além disso, o *Anacardium occidentale* L. é um recurso natural que pode ser explorado sem agressões ambientais, visto ser uma árvore nativa da região Nordeste onde é amplamente cultivada.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar o perfil de proteinases produzidas em resposta ao tratamento tópico em dose única com a emulsão contendo o polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), POLICAJU, na evolução do processo cicatricial cutâneo em camundongos.

3.2 Objetivos Específicos

- Tratar topicamente, em dose única, com a emulsão contendo POLICAJU as lesões cirúrgicas experimentais nos camundongos; e
- Identificar e analisar o perfil eletroforético e a atividade das proteinases envolvidas no processo de reparo de lesões cutâneas, em resposta ao POLICAJU, durante as fases inflamatória, proliferativa e de remodelação.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Cicatrização em lesões cutâneas

A pele é o maior e um dos mais complexos órgãos do organismo, constituindo-se numa adequada superfície de contato com o meio ambiente. Representando a principal barreira protetora do corpo, desempenhando função de defesa contra agentes externos e nocivos. Protege o organismo contra a desidratação, tem função sensorial, de armazenamento de lipídeos, carboidratos e proteínas, na termo-regulação corporal, e na formação da vitamina D (DE NARDI *et al.*, 2004).

A principal função da pele é servir como uma barreira protetora entre o organismo animal e o meio ambiente. A diminuição da integridade de grandes porções da pele, como resultado de lesões, pode levar desde a perda da função até a morte (SINGER & CLARK, 1999).

A pele está sujeita a vários tipos de feridas ou interrupções da sua integridade anatômica. Dois processos estão envolvidos na cicatrização da maioria das feridas: reparo e regeneração. A regeneração é a substituição do tecido lesado por um tecido semelhante àquele perdido na lesão. Nos mamíferos, a regeneração só ocorre em tecidos com grande potencial mitótico, como o epitélio, o fígado e os ossos. Já o reparo é o processo pelo qual os defeitos teciduais são substituídos por uma cicatriz não funcional. Esse processo é caracterizado por uma cascata de eventos celulares e humorais, visando o reparo tecidual e a reposição de colágeno (PEREIRA & ARIAS, 2002).

O processo de reparo ocorre com o objetivo de restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido durante a resposta inflamatória. Para que um ferimento seja curado com êxito, os eventos devem suceder-se em uma sequência apropriada, e o resultado final é geralmente uma cicatriz de tecido conjuntivo, representando o somatório dessas etapas (CARVALHO, 2002).

A cicatrização é um processo complexo caracterizado por reepitelização, formação do tecido de granulação e remodelação da matriz extracelular (WERNER & GROSE, 2003) que apresenta três fases: inflamatória, de fibroplasia e de remodelação (STADELMAN *et al.*, 1998), com elementos celulares e extracelulares, citocinas e fatores de crescimento, que atuam como sinalizadores supressores e promotores do processo cicatricial (KARUKONDA *et al.*, 2000). Nenhuma destas etapas corresponde

a um período de tempo precisamente definido, e existe certo grau de sobreposição em todas as etapas (BAUM & ARPEY, 2005; LI *et al.*, 2007).

4.1.1 Fase inflamatória

Inflamação é a resposta vascular e celular dos tecidos vivos à agressão; o processo inflamatório manifesta-se geralmente por vermelhidão (hiperemia), calor, tumefação (edema) e dor, podendo ocasionar a perda de função. A principal resposta à agressão é o acúmulo de líquidos e células (exsudato) vindos do sangue para o tecido lesado em um processo ativo. O exsudato é o meio pelo qual se reconhece o processo inflamatório nos tecidos, sendo um processo complexo, que envolve muitas reações bioquímicas e leva a alterações funcionais e morfológicas (THOMSON, 1983).

O processo inflamatório tem início na lesão ou na morte das células do tecido agredido. Todos os tipos de agressão induzem o mesmo tipo de resposta nos vasos sangüíneos menores, mas ela varia de intensidade de um tecido para outro, tanto nas fases iniciais quanto no resultado final. Além do tipo de tecido, a extensão do traumatismo é fator importante, pois a resposta inflamatória será tanto mais intensa quanto a lesão tecidual (BEVILACQUA & MODOLIN, 1995).

Uma lesão causa o rompimento de vasos sangüíneos e saída de constituintes do sangue para o espaço da ferida. Ocorre a ativação plaquetária e formação do coágulo (TSIROGIANNI *et al.*, 2006), cujos principais constituintes são plaquetas e fibrina. Além de servir como um reservatório de citocinas e fatores de crescimento liberados das plaquetas ativadas (MARTIN, 1997), o coágulo serve também para coaptar as bordas da ferida e cruzar a rede de fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, na qual os fibroblastos, as células endoteliais e os queratinócitos possam ingressar na área lesada (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

Vários fatores de crescimento estão envolvidos com a inflamação, epitelização, angiogênese e contração da ferida. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento epidermal (EGF) liberados das plaquetas atraem neutrófilos e monócitos/macrófagos para a ferida (SONEJA *et al.*, 2005).

As células polimorfonucleares (PMNs) são as primeiras células inflamatórias a chegar ao local da lesão cutânea. As PMNs são atraídas para a lesão por vários fatores de crescimento e citocinas, e servem como “limpadores” iniciais da lesão através da

remoção de restos celulares, partículas estranhas e bactérias. Também são a principal fonte de várias citocinas pró-inflamatórias e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (BAUM & ARPEY, 2005).

Os macrófagos chegam ao local da lesão logo após as PMNs e sua maior contribuição para a cicatrização de feridas é a secreção de citocinas e fatores de crescimento (PARK & BABUL, 2004). Os macrófagos se destacam por comandarem as demais células durante os eventos que determinam o reparo tecidual, devido à capacidade de produzirem numerosas citocinas como: fator de crescimento derivados de plaqueta, fator de crescimento transformante beta (TGF- β), fator de crescimento epidermal, TNF- α , fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) e outras. As citocinas produzidas por macrófagos e linfócitos provocam o influxo de neutrófilos, bem como a migração e proliferação de células endoteliais, fibroblastos e células indiferenciadas que começarão a repopular o sítio da lesão (RICHES, 1996; DANTAS, 2000).

Inicialmente, os macrófagos atuam de maneira semelhante às PMNs, fagocitando e matando microrganismos. No entanto, os macrófagos também estimulam a produção de collagenase pelos fibroblastos através da secreção de fatores de crescimento, sendo ainda fonte de fatores angiogênicos e fatores de crescimento para que os fibroblastos se diferenciem em miofibroblastos (TIZARD, 1998).

A duração do estágio inflamatório depende de vários fatores, como a intensidade da contaminação, a extensão do tecido lesado e a presença de infecção. Uma ferida limpa, na qual não há agentes microbianos presentes, pode ser caracterizada por atingir o pico de resposta inflamatória em 3-4 dias. A progressão da regeneração é acompanhada pela diminuição gradual e contínua das células inflamatórias (BANKS, 1991).

4.1.2 Fase de fibroplasia

O estágio de fibroplasia (ou proliferativo) envolve a atividade mitótica das células epidérmicas, das células endoteliais e dos fibroblastos e começa cerca de 4 dias após a injúria (BANKS, 1991). A resolução da área lesada necessita da proliferação e migração de fibroblastos para o leito da ferida, onde participam da formação do tecido de granulação e sintetizam, depositam e reorganizam a nova matriz extracelular (IYER *et al.*, 1999).

O tecido de granulação geralmente é formado a partir do quarto dia após a lesão. Esta mudança morfológica representa a chegada dos residentes permanentes da derme reparada (BAUM & ARPEY, 2005). O tecido de granulação é um complexo reservatório de citocinas com atividades quimioatrativas, mitogênicas e fatores de crescimento. As citocinas liberadas pelos macrófagos estimulam os fibroblastos a sintetizar a nova matriz extracelular (AUKHIL, 2000).

Os fibroblastos do tecido conjuntivo das margens da ferida tornam-se ativados, proliferam, migram em direção ao coágulo em reabsorção e começam a sintetizar os componentes da matriz extra-celular, que é uma rede complexa de macromoléculas secretadas (colágenos, elastina, glicoproteína e proteoglicanas), localizadas no espaço extracelular, tendo um papel central no controle dos processos celulares. Todos esses componentes estão em íntimo contato com suas células de origem e formam um leito gelatinoso tridimensional no qual as células evoluem (BAYNES & DOMINICKZAC, 2000). Com a evolução do processo cicatricial a matriz provisória é substituída por uma nova matriz rica em colágeno (AUKHIL, 2000).

Dois dos papéis dos fibroblastos incluem a produção de uma matriz extracelular permanente (incluindo colágeno, glicosaminoglicana e proteoglicanas) e fatores de crescimento. Assim, fibroblastos são integrados ao processo de reparo da lesão, pois não apenas produzem colágeno, mas também regulam o crescimento e a função de outras células na matriz. A produção de colágeno começa aproximadamente 3 a 5 dias após a injúria do tecido e é estimulada por vários fatores de crescimento (BAUM & ARPEY, 2005).

O colágeno é o principal componente da cicatriz de tecido conjuntivo maduro. Na ferida em processo de cura, fibroblastos produtores de colágeno são recrutados na margem da ferida e induzidos a sintetizar essa proteína. Concomitantemente com a fibroplasia, ocorre a angiogênese (CARVALHO, 2002).

Angiogênese é o processo pelo qual vasos sanguíneos danificados são repostos a partir dos capilares intactos localizados na vizinhança da lesão. Mudanças locais no microambiente da ferida, como baixo pH, tensão de oxigênio reduzida e aumento da concentração de lactato, levam à liberação de fatores de crescimento, como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e bFGF (fator de crescimento de fibroblastos básico), que estimulam a angiogênese (DIEGELMANN & EVANS, 2004).

Lentamente, o tecido de granulação adquire mais fibras colágenas e começa a ter aparência de cicatriz, por acúmulo de massa fibrosa (GUIDUGLI-NETO, 1987).

4.1.3 Fase de remodelação

As manifestações clínicas da última fase da cicatrização incluem contração, diminuição da vermelhidão, diminuição da espessura e aumento da força de tensão. Os principais participantes da fase de remodelação são os fibroblastos e seus produtos, colágeno e metaloproteinases da matriz (BAUM & ARPEY, 2005). O processo de remodelação da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno (CLARK, 1985).

A deposição do colágeno é feita, a princípio, tendo como orientação a organização da fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subsequentemente digeridas pela collagenase, resintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes. Repetições sucessivas da lise, ressíntese, redirecionamento e religação formam fibras maiores de colágeno e resultam numa configuração mais regular da cicatriz. Isso aumenta a sua resistência devido à organização das fibras acompanhar as forças mecânicas a que o tecido está sujeito durante a atividade normal (CLARK, 1985).

A produção de colágeno aumenta até o 21º dia após o trauma, e após esse tempo, a taxa de síntese diminui (MÔNACO & LAWRENCE, 2003). Quantidades elevadas do colágeno na MEC sinalizam para que os fibroblastos diminuam a produção do colágeno (BAUM & ARPEY, 2005). Além disso, a degradação do colágeno na ferida é controlada por muitas enzimas proteolíticas designadas metaloproteinases, as quais são secretadas por diferentes células, inclusive fibroblastos (STEVENS & LOWE, 1996; FAZIK *et al.*, 2000).

4.2 Metaloproteinases da matriz (MMPs)

A matriz extracelular é composta por diferentes proteínas com múltiplas funções. Algumas proteínas, como elastina e alguns tipos de colágeno, conferem resistência e elasticidade aos tecidos. Várias glicoproteínas da matriz (como lamininas, fibronectina, trombospodinas, fibrilinas, entre outras) formam agregados com vários

graus de complexidade, fornecendo um substrato para adesão celular e são importantes para inúmeras interações proteína-proteína. Todas as proteínas da matriz podem ser degradadas pelas metaloproteinases (PARKS, 1999).

As metaloproteinases responsáveis pela degradação da matriz extracelular são divididas em três classes: serino proteinases, metaloproteinases da matriz (MMPs) e cisteíno proteinases (LORENA *et al.*, 2002).

MMPs são uma família de mais de 26 endopeptidases homólogas, transmembrana ou secretadas, que são capazes de digerir componentes da matriz extracelular e da membrana basal sob condições fisiológicas (CHAMBERS & MATRISIAN, 1997; MERCER *et al.*, 2005).

De acordo com sua estrutura e especificidade de substrato, as MMPs podem ser divididas em subgrupos de collagenases, estromelisinases, gelatinases, MMPs tipo membrana (MT-MMPs) e outras MMPs. As MMPs possuem uma estrutura multi-domínio específica consistindo de um peptídeo sinal; um pró-peptídeo, que é essencial para a manutenção da pró-MMP na forma latente; um domínio catalítico contendo o sítio de ligação Zn^{2+} altamente conservado; uma região em formato de dobradiça rica em prolina que liga o domínio catalítico ao domínio similar à hemopexina, que determina a especificidade de substrato da MMP. Além disso, o domínio catalítico das gelatinases contém três repetições do domínio fibronectina tipo II, envolvido na ligação destas enzimas à gelatina. MT-MMPs contêm um domínio transmembrana de 20 aminoácidos hidrofóbicos na extremidade C-terminal do domínio hemopexina seguido por um domínio intracelular de 24 aminoácidos (JOHANSSON *et al.*, 2000).

Em conjunto, as MMPs são capazes de degradar todas as proteínas da matriz extracelular. A maioria dos membros da família são secretados como pró-enzimas inativas (zimogênios) e são ativados no tecido pela clivagem do pró-peptídeo. O pró-peptídeo da maioria das MMPs pode ser clivado por outras proteinases extracelulares (JOHANSSON *et al.*, 2000). Todas as MMPs contêm zinco em seu sítio ativo e necessitam de cálcio para estabilidade e atividade (BRIKEDAL-HANSEN, 1993).

A atividade das MMPs pode ser controlada durante 3 etapas: transcrição dos genes, ativação de zimogênios por proteólise e inibição das formas ativas pelos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs, do inglês “tissue inhibitors of metalloproteinases”) (FORSYTH *et al.*, 1999).

As atividades das MMPs estão presentes em importantes enfermidades, como destruição da articulação na artrite reumatóide, osteoartrite, aneurisma da aorta abdominal, infarto agudo do miocárdio e câncer. As MMPs também participam do processo normal de remodelação, como desenvolvimento embrionário, involução do útero pós-parto, remodelação óssea, ovulação e cicatrização (WOESSNER Jr, 1991).

As MMPs participam de vários eventos que ocorrem durante a cicatrização cutânea, como remoção do tecido desvitalizado, interações epidermais-mesenquimais durante a migração dos queratinócitos, angiogênese e regulação da atividade de fatores de crescimento. Na pele, diferentes tipos de células (como as inflamatórias, fibroblastos e células endoteliais) são capazes de sintetizar as MMPs (KÄHÄRI & SAARIALHO-KERE, 1997). As MMPs também degradam o colágeno da ferida, sendo essencial para a remodelação do colágeno durante a transição do tecido de granulação para cicatriz (SINGER & CLARK, 1999).

As MMPs não são expressas constitutivamente na pele, mas são induzidas temporariamente em resposta a sinais exógenos, tais como várias citocinas ou fatores de crescimento, interações célula-matriz e contatos célula-célula alterados (KAHARI & SAARIALHO-KERE, 1997). Deste modo, estudos têm demonstrado que a presença tecidual das diferentes MMPs pode variar conforme a fase da cicatrização. Stricklin e colaboradores (1993) e Schaffer e colaboradores (1997), através de hibridização *in situ*, estudaram a presença do mRNA das MMP-1, -2 e -9 em queimaduras durante 5, 10 e 15 dias após a queimadura. O mRNA da MMP-9 foi detectado nos 3 tempos, enquanto que o mRNA da MMP-1 foi mínimo no quinto dia e da MMP-2 foi mínimo do décimo dia.

Grinnel e colaboradores (1993) e Young & Grinnel (1994) verificaram que horas após uma queimadura, a atividade da MMP-9 já pode ser detectada. Já a atividade de MMP-2 e -3 estava presente a partir do quarto dia.

As MMPs são especificamente inibidas por seus inibidores teciduais (TIMPs), que são sintetizados por células do tecido conectivo e leucócitos, e formam ligações não covalentes com as MMPs (MURPHY & DOCHERTY, 1992). Durante as fases iniciais da cicatrização, o balanço entre MMP e TIMPs favorece a produção da matriz extracelular. Nas fases finais do processo cicatricial, quando tem início a remodelação, é possível que o balanço mude e favoreça a degradação da matriz (GRINNEL, 2003).

4.2.1 Metaloproteinases na fase inflamatória

MMPs derivadas do epitélio regulam numerosos aspectos da inflamação. Células inflamatórias são bem conhecidas por expressar MMPs, entretanto, células epiteliais e estromais no tecido lesionado também têm demonstrado expressar múltiplas MMPs. Muitas das quais podem regular a atividade de quimiocinas por proteólise direta. Quimiocinas possuem papéis distintos na atração de tipos específicos de leucócitos. A clivagem de quimiocinas por MMPs frequentemente resulta na redução da atividade destas quimiocinas (GILL & PARKS, 2008).

A inflamação é uma etapa chave do reparo de lesões, que é requerida para proteção contra infecções. Metaloproteinases possuem muitas responsabilidades na regulação da inflamação e isto inclui o controle da atividade de quimiocinas, o estabelecimento de gradientes quimiotáticos e o extravasamento de leucócitos do sangue para o tecido lesionado. Estes dados são apoiados por estudos com camundongos deficientes de MMPs, já que estes camundongos em muitos casos apresentam resposta inflamatória alterada, e acredita-se que a principal função das MMPs é a regulação da inflamação (PARKS *et al.*, 2004).

4.2.2 Metaloproteinases na fase de fibroplasia

Várias MMPs têm sido associadas com esta fase de fibroplasia, como as MMPs-1, -3, -7, -9, -10, -14 e -28. MMP-1 está presente em lesões cutâneas humanas durante a re-epitelização, mas desaparece uma vez que o fechamento da lesão está completo. Uma outra MMP relacionada à re-epitelização é a MMP-7, que é expressa no epitélio pulmonar lesionado e é requerida para a re-epitelização após lesão traqueal. Em camundongos deficientes de MMP-7, a re-epitelização de lesões traqueais é quase completamente interrompida (DUNSMORE *et al.*, 1998).

A MMP-9 também tem sido implicada na re-epitelização após injúria. Fatores de crescimento epidermais (EGF) e o fator de crescimento de hepatócito (HGF) estimulam a migração de queratinócitos em ensaios de lesões *in vitro*. Esta migração celular é dependente de indução pela MMP-9 e é prejudicada pela presença de anticorpos que bloqueiam a MMP-9 ou por algum inibidor geral de MMPs (McCawley *et al.*, 1998).

Um outro aspecto da re-epitelização é a proliferação de células epiteliais. A expressão da MMP-14 é aumentada no epitélio pulmonar dentro de vias aéreas após

lesão por naftaleno e parece que a MMP-14 está envolvida na regulação da proliferação de células epiteliais após o dano (ATKINSON *et al.*, 2007).

4.2.3 Metaloproteinases na fase de remodelação

A remodelação do colágeno, que inclui a degradação das fibrilas de colágeno existentes e a síntese de fibrilas novas, é uma etapa chave da fase de resolução da lesão (SINGER & CLARK, 1999). Como as MMPs são capazes de realizar este processo, parece plausível que elas tivessem um papel chave na remodelação do colágeno durante a resolução da lesão. Curiosamente, a evidência conclusiva disto ainda não foi apresentada *in vivo* (GILL & PARKS, 2008).

Acreditava-se que a função primária das MMPs fosse a degradação da MEC. Embora agora se acredite que o papel principal da maioria das MMPs seja o processamento de moléculas bioativas (tais como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, bem como seus respectivos receptores), a habilidade para degradar proteínas da MEC tem sido demonstrada em algumas MMPs. Isto inclui MMP-1, -3 e -14, que são capazes de clivar o colágeno, e MMP-7, que pode processar sindecan-1 e elastina (PARKS *et al.*, 2004).

A recuperação da lesão é mais lenta em camundongos que não possuem a MMP-3. Isto não ocorre devido à re-epitelização alterada, já que a migração de queratinócitos não é afetada; entretanto, foi observada contração defeituosa da lesão nestes camundongos (BULLARD *et al.*, 1999).

4.3 Biomateriais

Para otimizar a reabilitação de lesões, podem ser utilizados biomateriais. Biomaterial é definido como qualquer substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que possam ser usadas por qualquer que seja o período de tempo, como parte ou como o todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do organismo (ASM, 1992). Biomateriais também podem ser definidos como materiais interativos, capazes de estabelecer uma afinidade apropriada com o tecido vizinho sem indução de uma resposta adversa do hospedeiro (RATNER & BRYANT, 2004).

Os biomateriais têm sido objeto de pesquisas científicas pela disponibilidade na natureza e por sua biodegradabilidade. Muitos podem ser utilizados como dispositivos dérmicos (SPECTOR, 2001) e têm sido empregados para conduzir e acelerar fenômenos de ocorrência natural, como a regeneração de tecidos na cicatrização das feridas, indução da resposta celular que não deve estar presente normalmente, a cicatrização em indivíduos doentes, a produção de um novo leito para receber futuros transplantes ou para bloquear fenômenos naturais, como a rejeição imune de transplante de células de outras espécies ou a transmissão de sinais de fatores de crescimento que estimulam a formação da cicatriz (HUBBEL, 1995).

O uso de polissacarídeos como biomateriais é vantajoso, uma vez que tais substâncias apresentam baixa toxicidade, simplicidade de operação e diminuem os custos de produtos (SHIGEMASA & MINANI, 1995). Um fator relevante na escolha de um biomaterial é o seu custo, pois quanto menor for, maior será sua acessibilidade pela população (SCHIRATO *et al.*, 2006).

O emprego de produtos medicinais de origem natural no tratamento de certas doenças tem sido amplamente utilizado pela população (SILVA *et al.*, 2000). As plantas são importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos, os quais diferem em termos de estrutura e propriedades biológicas (MOREIRA *et al.*, 2001).

Em geral, polissacarídeos naturais apresentam estrutura complexa devido à sua heterogeneidade incluindo muitos tipos de unidades monossacarídicas, o que dificulta o esclarecimento da relação entre estrutura e atividade biológica. Sabe-se que os polissacarídeos e seus derivados podem ser usados para tratamento sistêmico, como também participam ativamente no processo de cicatrização de feridas (LLOYD *et al.*, 1998; MARQUES & XAVIER-FILHO, 1991; YOSHIDA, 2001).

Alguns polissacarídeos podem ser utilizados como auxiliares no processo de cicatrização, a exemplo da quitina, um elemento estrutural encontrado em animais invertebrados e na parede celular de fungos (KENT, 1964). Além da quitina e da quitosana (forma deacetilada da quitina), os polissacarídeos extraídos de *Areca catechu* (PADJAMA *et al.*, 1994), *Wedelia calendulacea* (HEDGE *et al.*, 1994), *Pleorotus ostreatus* (BONONI *et al.*, 1995) e *Aloe vera* (HEGGERS *et al.*, 1995) são utilizados como biomateriais no processo de reabilitação de lesões cutâneas.

4.3.1 Polissacarídeo obtido do *Anacardium occidentale* L. - POLICAJU

O cajueiro (*A. occidentale* L.) pertence à família botânica Anacardiaceae, que contém de 60 a 80 gêneros e cerca de 600 espécies (LIMA *et al.*, 2002). Várias espécies de *A. occidentale* apresentam casca resinosa, contendo uma goma, que é constituída principalmente por um heteropolissacarídeo ramificado de alto peso molecular (POLICAJU), utilizado como substituto da goma arábica. Este polissacarídeo é secretado por espécies que crescem em áreas tropicais e subtropicais como resposta a uma ferida no caule, remoção de ramos ou pela presença de insetos, bactérias ou fungos (RINCÓN *et al.*, 1999).

Substâncias chamadas gomas são hidrocarbonetos de alta massa molecular. Recentemente, o termo goma, como tecnicamente empregado na indústria, se refere a polissacarídeos vegetais ou microbianos e seus derivados, que são capazes de formar dispersões em água fria ou quente, produzindo misturas viscosas ou soluções. As referências mais recentes ao termo goma significam derivados solúveis da celulose e aqueles derivados de, e modificações de, outros polissacarídeos que, em sua forma original (forma natural), seriam insolúveis (LIMA *et al.*, 2002).

Propriedades adesivas, atividades inseticidas e emulsificantes, são apontadas como possíveis utilidades para a goma do cajueiro. Esta contém como constituintes principais os monossacarídeos galactose (61%), arabinose (14%), ramnose (7%), glucose (8%), ácido glicurônico (5%), além de pequenas quantidades (2% cada) de manose, xilose e ácido metilglicurônico (DE PAULA & RODRIGUES, 1996; MENESTRINA *et al.*, 1998).

O POLICAJU tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios, potencializando, em estudos preliminares, o processo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos (PAIVA, 2003; SCHIRATO *et al.*, 2006). O referido polissacarídeo também demonstrou bons resultados frente ao Sarcoma 180 *in vivo* (MENESTRINA *et al.*, 1998), células HeLa *in vitro* (STEVAN *et al.*, 2000) e à infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni* (GADELHA *et al.*, 2001; SOUZA-ARAÚJO *et al.*, 2002).

Schirato *et al.* (2006) e Paiva (2003) já demonstraram que a emulsão contendo POLICAJU, na concentração de 150 mg/ml, favorece a cicatrização do período inflamatório, considerando as características de sinais flogísticos menos intensos e a presença de tecido granulação fibrovascular e fibras colágenas em lesões experimentais

de camundongos. As lesões que foram tratadas com a emulsão contendo o POLICAJU apresentaram bom efeito cicatrizante e colágeno mais organizado.

Além disso, as lesões tratadas com o POLICAJU apresentaram menor contaminação microbiana, apesar do mesmo não possuir atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, e *Staphylococcus* sp. isolados de feridas cutâneas de cães (SCHIRATO *et al.*, 2006).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASM HANDBOOK. **Materials characterization**, 9. ed. p. 297-426, 1992.

ATKINSON, J.J.; TOENNIES, H.M.; HOLMBECK, K.; SENIOR, R.M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase is necessary for distal airway epithelial repair and keratinocyte growth factor receptor expression after acute injury. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 293, p. 600–610, 2007.

AUKHIL, I. Biology of wound healing. **Periodontology**, v. 22, p. 44-50, 2000.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**, 2. ed., São Paulo: Manole, 1991. p. 103-424.

BAUM, C.L; ARPEY, C.J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatology Surgery**, v. 31, p. 674-686, 2005.

BAYNES, J.; DOMINICKZAC, M. **Bioquímica médica**, São Paulo: Artes Médicas, 2000.

BEVILACQUA, R.G.; MODOLIN, M.L.A Cicatrização. In: _____. Aun, F.; Bevilacqua, R.G. **Manual de cirurgia**. 1a ed. São Paulo. E.P.U (Editora Pedagógica Universitária Ltda.), 1995. Cap. 1, p. 1-17.

BONONI, V. L.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Ícone, 1995, 206p.

BRIKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal disease. **Journal Periodontal**, v.64, p. 474-484, 1993.

BULLARD, K.M.; LUND, L.; MUDGETT, J.S.; MELLIN, T.N.; HUNT, T.K.; MURPHY, B. Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Ann. Surg.*, v. 230, p. 260–265, 1999.

CARVALHO, P. T. C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: Estudo experimental em ratos diabéticos.** 2002, 72f. Dissertação (Mestrado em Interunidades em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHAMBERS, A.F. & MATRISIAN, L.M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 17, p. 1260-1270, 1997.

CLARK, R.A.F. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.13, n.5 Pt 1, p.701-725, 1985.

COHEN, J.K. DIEGELMANN, R.F.; LINDBLAD, W.J. **Wound healing: biochemical and clinical aspects.** Philadelphia: Saunders, 1992.

DANTAS, C.J.S. Reparação Tecidual. In: **Mecanismos Celulares e Musculares da Inflamação.** Rio de Janeiro: Medsi, 2000. cap.17, p.197-225.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; BAUDI, D.L.K.; CASTRO, J.H.T. Cicatrização secundária em feridas dermoepidérmicas tratadas com ácidos graxos essenciais, Vitaminas A e E, lecitina de soja e iodo polivinilpirrolidona em cães. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n.1, p. 1-16, 2004.

DE PAULA, R.; RODRIGUES, J.F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrates Polymers**, v.26, p. 177-181, 1996.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers Bioscience**, v. 9, p. 283-289, 2004.

DUNSMORE, S.E.; SAARIALHO-KERE, U.K.; ROBY, J.D.; WILSON, C.L.; MATRISIAN, L.M.; WELGUS, H.G. Matrilysin expression and function in airway epithelium. **J. Clin. Invest.**, v. 102, p. 1321–1331, 1998.

FAZIK, M. J.; ZITE, J.A ; GOSLEN, J.B. Cicatrização das Feridas. In: COLEMAN, W.P. e HANKE, W. **Cirurgia Cosmética Princípios e Técnicas**, 2ed., Rio de Janeiro: Revinter, 2000, cap.3, p. 18-38.

FORSYTH, P.A.; WONG, H.; LAING, T.D.; REWCASTLE, N.B.; MORRIS, D.G.; MUZIK, H.; LECO, K.J.; JOHNSTON, R.N.; BRASHER, P.M.A.; SUTHERLAND, G.; EDWARDS, D.R. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. **British Journal of Cancer**, v. 79, p. 1828-1835, 1999.

GADELHA, M.M.S.; PROCÓPIO, A. E. A. ; ARAÚJO, R.V.S.; SANTANA, J.V.; MALAGEÑO, E.; IACOMINI, M.; MAGALHÃES, N.S.S.; CARNEIRO-LEÃO, A. M.A.; Effect of free and liposome encapsulated heteropolysaccharide from *Anacardium occidentale* L. against experimental *Schistosoma mansoni* infection. In: **PHARMATEC**, 6, 2001, RECIFE. Proceeding... Recife: Sociedade Brasileira de Tecnologia Farmacêutica, 2001.

GEARING, A.J.H.; BECKETT, P.; CHRISTODOULOU, M. Processing of tumor necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. **Nature**, v. 370, p. 555-557, 1994.

GILL, S.E. & PARKS, W.C. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, p. 1334–1347, 2008.

GRINNEL, F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. **Trends in Cell Biology**, v.13, p. 264-269, 2003.

GRINNEL, F.; BAXTER, C.R.; ZHU, M. ; YIN, H.L. Detection of the actin scavenger system in burn wound fluid. **Wound Repair Registration**, v. 1, p. 236-243, 1993.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue in quantitative study of the vascular volume. **Reviews in Odontology**, São Paulo, v.1, p. 6-8, 1997.

HAKKINEN, L.; UITTO, V.J.; LARJAVA, H. Cell biology of gingival wound healing. **Periodontology**, v. 24, p. 127-152, 2000.

HEDGE, D. A.; KHOSA, R. L.; CHANSOURIA, J. P. N. A study of the effects of *Wedelia calendulacea* Less on wound healing in rats. **Phytoterapy Research**, v. 8, n. 7, p. 439-440, 1994.

HEGGERS, J. P.; KUCUKECELEBI, A.; STABENAU, C. J. Wound healing effects of aloe gel and other topical anti-bacterial agents on rat skin. **Phytoterapy Research**, v. 9, n. 6, p. 455-457, 1995.

HUBBEL, J. A. Biomaterials in tissue engineering. **Bio/Technology**, v. 13, n. 6, p. 565-576, 1995.

HUNT, T. K.; GOODSON, W. H. Cicatrização das Feridas. In: Way, L. W. **Cirurgia, Diagnóstico e Tratamento**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 8, p. 67-75, 1993.

IYER, V.R; EISEN, M.B.; ROSS, D.T., SCHULER, G.; MOORE, T.; LEE, J.C.F.; TRENT, J.M.; STAUDT, L.M.; HUDSON, J. JR.; BOGUSKI, M.S.; LASHKARI, D.; SHALON, D.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. **Science**, v.283: p. 83–87, 1999.

JOHANSSON, N; AHONEN, M.; KAHARI, V.M. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 5-15, 2000.

KAHARI, V.M.; SAARIALHO-KERE, U. Matriz metalloproteinases in skin. **Experimental Dermatology**, v. 6, p. 199-213, 1997.

KARUKONDA, S.R.K.; FLYNN, T.C.; BOH, E.E.; MCBURNEY, E.I., RUSSO, G.G.; MILLIKAN, L.E. The effects of drugs on wound healing. **International Journal of Dermatology**, v. 39, p. 250-257, 2000.

KENT, P.W. Chitin and Mucosubstances. In FLORKIN, M. & MASON, H. S.(eds.) *Comparative Biochemistry*, New York, **Academic Press Inc.**, v. 7, p. 93 - 136, 1964.

KWEON, D.K.; SONG, S.B.; PARK, Y.Y. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. **Biomaterials**, v. 24, p. 1595-1601, 2003.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.

LI, J.; CHENG, J.; KISNER, R. Pathofisiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v.25, p. 9-18, 2007.

LIMA, R.S.N.; LIMA, J.R.; SALIS, C.R.; MOREIRA, R.A. Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exudate gum: a novel bioligand tool. **Biotechnology Applied to Biochemistry**, v. 35, p. 45-53, 2002.

LLOYD, J.F.; KENNEDYA, P.; METHACANONA, M.; PATERSONH; KNILLA, C.J. Carbohydrate polymers as wound management aids. **Carbohydrate Polymers**, v.37, n. 3, p. 315-322, 1998.

LORENA, D.; ACHIO, K.; COSTA, A.M.A.; DESMOULIÈRE, A. Normal scarring: importance of myofribloblasts. **Wound Repair and Regeneration**, v.10, n.2, p.86-92, 2002.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MARQUES, M.R.; XAVIER-FILHO, J. Enzymatic and inhibitory activities of cashew tree gum exudate. **Phytochemistry**, v.3, n.5, p. 1431-1433, 1991.

MARTIN, P. Wound healing- aiming for a perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, p. 75-81, 1997.

McCAWLEY, L.J.; O'BRIEN, P.; HUDSON, L.G. Epidermal growth factor (EGF)- and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF)- mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9. **J. Cell Physiol.**, v. 176, p. 255–265, 1998.

MENESTRINA, J.M.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structure in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v.47, n.5, p. 715-721, 1998.

MERCER, P.F.; SHUTE, J.K.; BHOWMIK, A.; DONALDSON, G.C.; WEDZICHA, J.A.; WARNER, J.A. MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. **Respiratory Research**, v. 6, p. 151, 2005.

MOREIRA, R.R.D.; CARLOS, I.Z.; VILEGAS, W. Release of intermediate reactive hydrogen peroxide by macrophage cells activated by natural products. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.24, n.2, p. 201-204, 2001.

MURPHY, G. E DOCHERTY, A.J.P. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. **American Journal of Respiratory and Cell Molecular Biology**, v. 7, p. 120-125, 1992.

MUTSAERS, S.E.; BISHOP, J.E.; McGROUTHER, G.; LAURENT, G.J. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.29, n.1, p.5-17, 1997.

NAGAPPA, A. N., CHERIYAN, B. Wound healing activity of the aqueous extract of *Thespesia polpunea*. **Fitoterapia**, v.72, n.5 p.503-506, 2001.

NERGARD, C.S.; DIALLO, D.; MICHAELSEN, T.E.; MALTERUD, K.E.; KIYOHARA, H.; MATSUMOTO, T.; YAMADADA, H.; PAULSEN, B.S. Isolation,

partial characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p. 141-152, 2004.

OLAJIDE, O.A.; ADEROGBAB, M.A.; ADEDAPOA, A.D.A.; MAKINDE, J.M. Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on *in vivo* inflammatory models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p.139–142, 2004.

PADJAMA, P. N.; BAIRY, K. L.; KULKARNI, D. R. Pro-healing effect of betel nut and its polyphenols. **Fitoterapia**, v. 65, n. 4, p. 293-300, 1994.

PAIVA, M.G. **Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em cicatrização experimental**. 2003. 56f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco.

PARK, J. E. P.; BARBUL, A. B. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**, v. 187, p. 115-165, 2004.

PARKS, W.C.; WILSON, C.L.; LOPEZ-BOADO, Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 617–629, 2004.

PARKS, W.C. Matrix metalloproteinases in repair. **Wound Repair and Regeneration**, v.7, p. 423-432, 1999.

PEREIRA, A.M.; ARIAS, M.V.B. Manejo de feridas em cães e gatos: uma revisão. **Clínica Veterinária**, ano VII, n. 38, 2002.

RATNER, B.D.; BRYANT, S.J. BIOMATERIALS: Where we have been and where we are going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.6, n.1, p.41-75, 2004.

RICHES, D.W.H. Macrophages involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, R A F. **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York Plenum, 1996, p. 95-141.

RINCÓN , F.; CLAMENS, C.; BELTRÁN, O. SANABRIA, L. PINTO, G.; MARTÍNEZ, M. Evaluación del rendimiento y caracterización físicímica de los exudados gomosos de especies diseminados en el Estado Zulia, Venezuela. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, v. 16, p.56-63, 1999.

ROCHA, C. Utilização de polissacarídeo extraído da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) na reabilitação de lesões experimentais, Recife, 28p., 2000.

SANTORO, M.M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimentall. Cell Research**, v.304, p. 274-286, 2005.

SCHAFFER, C.J.; REINISCH, L.; POLIS, S.L.; STRICKLIN, G.P.; NANNEY, L.B. Comparisons of wound healing among excisional, laser-created, and standard thermal burns in porcine wounds of equal depth. **Wound Repair Registration**, v. 5, p. 52-61, 1997.

SCHIRATO, G.V.; MONTEIRO, F.M.F.; SILVA, F.O.; LIMA FILHO, J.L.; LEÃO, A.M.A.C.; PORTO, A.L.F. The polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. in the inflammatory phase of the cutaneous wound healing. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 149-154, 2006.

SIGURDSON, L.; SEN, T.; HALL, L.; RUBENFELD, A.; HARD, R.; GARDELLA, J. Possible impedance of luminal reepithelialization by tracheal cartilage metalloproteinases. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 129, p. 197–200, 2007.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F.; Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n.10, p.738-746, 1999.

SILVA, J. G. Correção de cicatrizes. In: MELEGA, J.M. **Cirurgia Plástica Reparadora e Estética**, São Paulo: Medsi, 2000.

SONEJA, A.; DREWS, M.; MALINSKI, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 108-119, 2005.

SOUZA-ARAÚJO, F.V.; GADELHA, M.M.S.; ARAÚJO, R.V.S.; SANTANA, J.V.; IACOMINI, M.; MAGALHÃES, N.S.S.; CANEIRO-LEÃO, A.M.A. Effects of the treatment with liposome load ASM HANDBOOK. **Materials characterization**, 9. ed. p. 297-426, 1992.

SPECTOR, M. Biomaterials. In: ACHAUER, B. et. al. **Plastic surgery: indications, operations, outcomes**. St. Louis: Mosby Year Book, Inc., cap. 19, p.239-259, 2001.

STADELMAN, W.K.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 176, (supl. 2A), p. 26S-38S, 1998.

STEVAN, F.R.; MENESTRINA, J. M.; VEIGA, S.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Biological activities of polysaccharide from *Anacardium occidentale* exsudate against Hela cells. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 29. , 2000, Caxambu. **Anais ...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2000, p.11.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**, 1. ed., São Paulo: Manole, 1996. p.72.

STRICKLIN, G.P.; NANNY, L.B. Immunolocalization of collagenase and TIMP in healing human burn wounds. **Journal of Investigation in Dermatology**, v. 103, p. 488-492, 1994.

STUELP-CAMPELO, P.M.; DE OLIVEIRA, M.B.; LEÃO, A.M.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.; IACOMINI, M. Effect of a soluble α -glucan from the lichenized

fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **International Immunopharmacology**, v. 2, I. 5, p. 691-698, 2002.

SUMITRA, M.; MANIKANDAN, P.; SUGUNA, L. Efficacy of *Buttea monosperma* on dermal wound healing in rats. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 37, p. 566-573, 2005.

THOMSON, R.G. **Patologia Veterinária**, 1 ed. Guanabara Koogan, p. 144 - 247, 1983.

TIZARD, I. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 5 ed. São Paulo: Rocca, 1998.

TORISEVA, M. & KÄHÄRI, V.M. Proteinases in cutaneous wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, artigo não impresso, disponível apenas on line, 2009.

TSIROGIANNI, A. K.; MOUTSOPOULOS, N.M.; MOUTSOPOULOS, H.M. Wound healing: immunological aspects. **International Journal of The Care of The Injured**, v. 37S, p. S5-S12, 2006.

UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.52, p. 105-115, 2001.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiology Review**, v.83, p. 835-870, 2003.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical clinical of North American**, v. 77, p. 509-528, 1997.

WOESSNER JR. J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB Journal**, v.5, n.8, p. 2145-2154, 1991.

YOSHIDA, T. Synthesis of polysaccharides having specific biological activities. **Prog. Polym Sci.**, v. 26, p. 379-441, 2001.

YOUNG, P.K.; GRINNEL, F. Metalloproteinase activation cascade after burn injury: a longitudinal analysis of the human wound environment. **Journal of Investigation in Dermatology**, v. 103, p. 660-664, 1994.

6. ARTIGO CIENTÍFICO

O presente artigo será submetido à revista Journal of Biomedicine and Biotechnology, cujo fator de impacto atualmente é 1,922.



Análise do perfil das proteinases envolvidas no processo
de cicatrização de lesões cutâneas experimentais
utilizando o polissacarídeo da goma do cajueiro
(*Anacardium occidentale* L.)

Priscila das Neves Santos¹, Flávio de Oliveira Silva², Giuliana Viegas Schirato³,
Ana Lúcia Figueiredo Porto⁴

RESUMO

Foi avaliado o efeito do polissacarídeo de *Anacardium occidentale* L. (POLICAJU) sobre o perfil de proteinases no processo cicatricial de camundongos durante as 3 fases da cicatrização: inflamatória, de fibroplasia e de remodelação. Os camundongos (*Mus musculus*) Swiss (n=90) foram organizados de acordo com o tratamento empregado: Grupo I (NaCl 150mM), Grupo II (ácido ascórbico 75mg/ml) e Grupo III (emulsão contendo POLICAJU 150mg/ml preparado em ácido ascórbico 75mg/ml). As lesões cutâneas foram realizadas assepticamente na região torácica dorsal e cada ferida foi tratada em dose única (200µl) imediatamente após a cirurgia. No ensaio com azocolágeno, foi possível observar que o grupo tratado com o POLICAJU, durante as fases proliferativa e de remodelação, apresentou os maiores valores de atividade colagenolítica em comparação com os grupos tratados com NaCl e com ácido ascórbico. A eletroforese demonstrou, em todos os grupos, a presença de proteínas com peso molecular de 53, 76, 170, 220 kDa, e proteínas com aproximadamente 84, 106, 116 e 151 kDa. Já o zimograma demonstrou, em todos os grupos estudados, enzimas que degradam a gelatina com peso molecular de 84, 106 e 116 kDa, que se trata provavelmente da pró-MMP-9. Acredita-se que a MMP-9 pode estar envolvida na fase de remodelação. Nossos resultados sugerem que a cicatrização de lesões cutâneas tratadas com o POLICAJU pode ser favorecida pela interação deste polissacarídeo com a pró-MMP-9.

1. Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP:50670-901.

2. Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 52171-900.

3. Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 52171-900.

4. Professor adjunto, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil, CEP: 52171-900. Autor para correspondência. E-mail: analuporto@yahoo.com.br

Apoio financeiro: CAPES.

INTRODUÇÃO

O reparo cutâneo é um processo complexo e altamente coordenado, onde diferentes tipos celulares participam para renovar o tecido danificado. Um dos processos mais versáteis envolvidos no reparo de lesões é a proteólise. Durante a migração celular, as proteínas da matriz extracelular (MEC) são clivadas, frequentemente criando produtos de clivagem biologicamente ativos, e a proteólise de contatos celulares aumenta a motilidade e a divisão celulares. Além disso, proteinases ativam vários fatores de crescimento e outras proteinases na lesão e regulam os fatores de crescimento. Normalmente, a proteólise é rigidamente controlada e mudanças na atividade de proteinases estão associadas a alterações no fechamento de lesões e formação da cicatriz. (TORISEVA & KÄHÄRI, 2009).

Metaloproteinases da matriz (MMPs) constituem uma família de endopeptidases que requer íons divalentes, tais como Ca^{2+} ou Zn^{2+} , no domínio catalítico, necessários a sua atividade enzimática. Substratos moleculares para as MMPs incluem todas as classes de proteínas da MEC. Além disso, a atividade e a biodisponibilidade de citocinas e fatores de crescimento podem ser moduladas pelas MMPs. MMPs estão envolvidas na remodelação do tecido pela degradação de componentes da matriz extracelular, fisiológica e patologicamente, e são o grupo de enzimas mais estudado na recuperação de lesões (EMING *et al.*, 2008).

Em geral, lesões cutâneas podem ser divididas em 3 fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação (STADELMAN *et al.*, 1998). Nenhuma destas etapas corresponde a um período de tempo precisamente definido, e existe certo grau de sobreposição em todas as fases (LI *et al.*, 2007).

Para otimizar a reabilitação de lesões, pode-se utilizar biomateriais, compreendidos como materiais interativos capazes de estabelecer uma afinidade apropriada com o tecido vizinho sem indução de uma resposta adversa do hospedeiro. Polissacarídeos estimulam o sistema imune *in vitro* e *in vivo* e contribuem favoravelmente no processo cicatricial, podendo ser utilizados como biomateriais (LLOYD *et al.*, 1998; RATNER & BRYANT, 2004).

A espécie *A. occidentale* L., o cajueiro, é caracterizada como uma árvore folhosa, a qual é facilmente encontrada no Brasil. *A. occidentale* é utilizado para

propósitos terapêuticos, devido a suas atividades anti-hipertensivas, anti-diarréicas e anti-inflamatórias. Estudos pré-clínicos com metabólitos isolados demonstraram efeitos bactericidas e anti-piréticos do ácido anacárdico, um composto presente em altas concentrações no cajueiro (BARCELOS *et al.*, 2007). O heteropolissacarídeo proveniente da goma do *Anacardium occidentale* L. (POLICAJU) tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios, potencializando, em estudos preliminares, o processo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos (SCHIRATO *et al.*, 2006).

O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil de proteinases produzidas em resposta ao tratamento tópico, em dose única, com a emulsão contendo o polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), POLICAJU, na evolução do processo cicatricial cutâneo em camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação da emulsão de POLICAJU

A goma de *Anacardium occidentale* L. foi coletada no litoral sul do estado de Pernambuco (Praia de Tamandaré), Brasil. A goma do cajueiro isenta de casca de árvore foi purificada de acordo com o método de Menestrina *et al.* (1998). Para o preparo da emulsão de POLICAJU e ácido ascórbico, utilizou-se a metodologia de Shigemasa & Minami (1995), onde adiciona-se 1 parte de ácido ascórbico (1500mg) a 2 partes de POLICAJU (3000mg) em 10ml de água destilada esterilizada. Esta solução permaneceu sob agitação, durante 24 horas, até completa dissolução. Após a dissolução, o pH da emulsão foi aferido e corrigido, com solução de NaOH 1N, para o pH 5,0. O volume final foi aferido para que se obtivesse uma emulsão com 150 mg/ml de POLICAJU.

Animais de laboratório

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas preconizadas pelo Canadian Council Animal Care (CCAC) e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Foram utilizados 90 camundongos (*Mus musculus*) albinos Swiss machos, com 8 semanas de idade e peso médio de 42g. Os animais foram avaliados e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami. Os

animais foram alocados em gaiolas individuais, permanecendo em macroambiente controlado (fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade $55\pm 10\%$) com fornecimento de água e ração *ad libitum*.

Procedimento cirúrgico experimental

O procedimento cirúrgico foi realizado de acordo com Schirato *et al.* (2006) com modificações. Foi administrado cloridrato de xilazina 2% na dosagem de 10mg/kg seguido de cloridrato de cetamina 10% na dosagem de 115mg/kg. Os anestésicos foram aplicados na região cervical, por via intramuscular. Realizou-se a tricotomia da região dorsal com o auxílio de clorexidina 2% e lâmina e, posteriormente, anti-sepsia com iodopovidona e álcool a 70%. Com o auxílio de molde metálico vazado, foram produzidas lesões cirúrgicas com aproximadamente 1cm^2 de área da região dorsal. Os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos ($n=30/\text{grupo}$), de acordo com o tratamento empregado. No grupo I, foi aplicado 200 μl de solução salina fisiológica de NaCl a 0,9%, uma única vez, sobre a lesão, com o objetivo de observar o padrão de cicatrização normal do camundongo. Nos animais pertencentes ao grupo II, foi aplicado, uma única vez, 200 μl da solução de ácido ascórbico (75 mg/ml) logo após a cirurgia. Os animais do grupo III tiveram suas lesões tratadas (200 μl por lesão) com a emulsão constituída por POLICAJU (150mg/ml) e ácido ascórbico (75 mg/ml) logo após a realização da cirurgia.

Os grupos I, II e III foram subdivididos, cada um, em 3 grupos de 10 animais. Nos tempos de 2, 7 e 12 dias de pós-operatório (nos quais são observadas as fases inflamatória, proliferativa e de remodelação, respectivamente), os 10 animais de cada sub-grupo foram submetidos à eutanásia (através de deslocamento cervical, após a anestesia) para retirada dos fragmentos de pele.

Análise das proteinases da lesão

Preparação das amostras

Imediatamente após a retirada do tecido, os fragmentos de pele foram congelados em nitrogênio líquido e pulverizados. Em seguida, as amostras de pele foram homogeneizadas como descrito por Neely *et al.* (1997). As amostras foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM, suplementado com cloreto de cálcio 20 mM, cloreto de sódio 150mM, Triton X-100 a 0,25% (v/v) e azida sódica a 0,02%, na

proporção de 1,0 ml de tampão para 100 mg de tecido. As amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 30 minutos a 4°C e os sobrenadantes utilizados para análise de metaloproteinases.

Ensaio com azocolágeno

A atividade proteolítica foi realizada utilizando-se solução de azocolágeno como substrato (5 mg/ml) em tampão Tris-HCl 50mM, CaCl₂ 1mM, pH7,2. O sistema de reação foi constituído por 150 µL do homogenato das feridas, 150 µL da solução tampão e 270 µL da solução de azocolágeno. Utilizou-se como controle o homogenato inativado pelo calor (100° C por 5 minutos). O sistema de reação foi incubado a 37°C sob agitação constante. Após 18 horas de incubação, a reação foi interrompida por centrifugação a 10000 x g por 15 minutos a 4°C. A absorbância do sobrenadante foi lida a 520nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi descrita como sendo a variação de absorbância de 0,01 durante 18 horas de reação.

Eletroforese SDS-PAGE

Os homogenatos obtidos foram submetidos à técnica de eletroforese SDS-PAGE, realizada em gel com gradiente de 10% de poliacrilamida (p/v) de acordo com o método de Laemmli (1970). Para identificação dos pesos moleculares, foram utilizados os padrões de peso molecular: desidrogenase glutâmica (53 kDa), transferrina (76 kDa), α-galactosidase (116 kDa), β₂-macroglobulina (170 kDa) e miosina (220 kDa).

Zimograma

Além da eletroforese, os homogenatos também foram submetidos ao zimograma, de acordo com Agren (1994). A gelatina, na concentração de 0,2% (p/v), foi incorporada ao gel de poliacrilamida a 10% (p/v). Após a eletroforese, os géis foram submetidos a duas lavagens de 20 minutos cada, em Triton X-100 a 2,5% (v/v), seguidas por 3 lavagens de água destilada. O gel foi incubado por 18 horas em tampão contendo Tris-HCl 0,05M (pH 7,5) e CaCl₂ 0,01M sob agitação constante. Como controle negativo, um gel foi incubado por 18 horas em tampão contendo Tris-HCl 0,05M (pH 7,5), EDTA 0,5mM sob agitação constante. As bandas digeridas foram visualizadas como intervalos nos géis corados com Coomassie a 0,1% (p/v) e descorados com solução descorante.

RESULTADOS

Durante a fase inflamatória, ou seja, até o 2º dia pós-operatório (P.O.), observou-se no grupo NaCl uma menor degradação do azocolágeno (Figura 1). Neste estudo, não foi observado pico de atividade colagenolítica em nenhum grupo experimental durante a fase inflamatória, no entanto, o grupo tratado com ácido ascórbico durante esta fase obteve o maior valor de atividade colagenolítica, quando comparado aos demais grupos.

Quanto ao comportamento da atividade colagenolítica apresentado na fase proliferativa, todos os grupos apresentaram aumento desta atividade em relação à fase inflamatória.

Já durante a fase de remodelação, enquanto houve diminuição da atividade colagenolítica no grupo tratado com NaCl (em comparação com a fase proliferativa), os grupos tratados com ácido ascórbico e com o POLICAJU apresentaram aumento da atividade. O grupo tratado com o POLICAJU, durante esta fase, apresentou a maior atividade colagenolítica entre todos os grupos em todos os tempos de pós-operatório.

O perfil das proteínas nos homogenatos, obtidos a partir das lesões cutâneas, realizado através de eletroforese SDS-PAGE demonstrou, em todos os grupos estudados, a presença de proteínas com peso molecular de 53, 76, 170, 220 kDa, e proteínas com aproximadamente 84, 106, 116 e 151 kDa (Figura 2).

O zimograma demonstrou, em todos os grupos estudados, enzimas que degradam a gelatina com peso molecular de aproximadamente 84, 106 e 116 kDa (Figuras 3a e b).

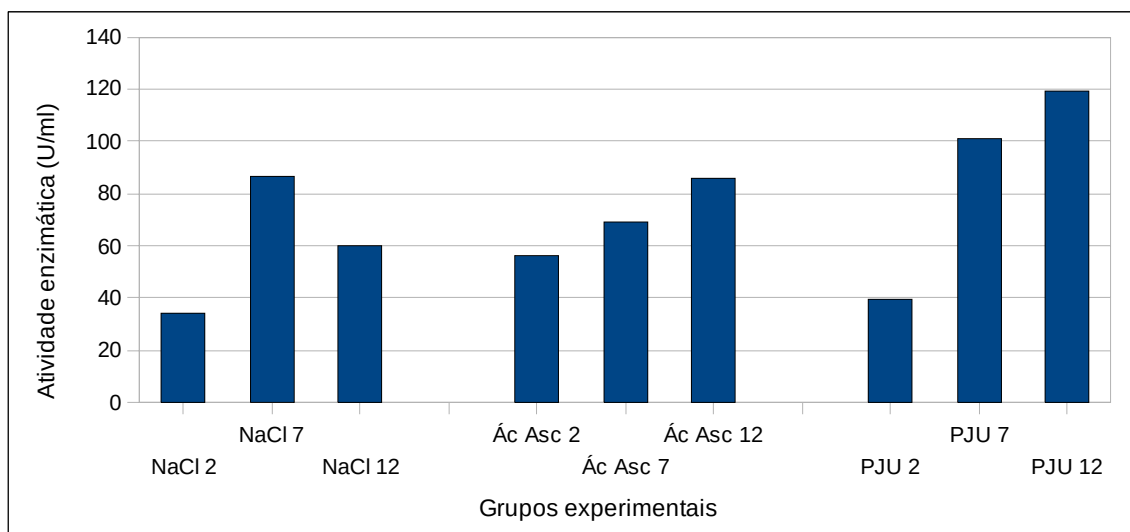


Figura 1: Atividade collagenolítica das proteinases presentes nos homogenatos obtidos das lesões cirúrgicas experimentais dos grupos tratados com NaCl, ácido ascórbico e POLICAJU no 2º, 7º e 12º dias de pós-operatório.

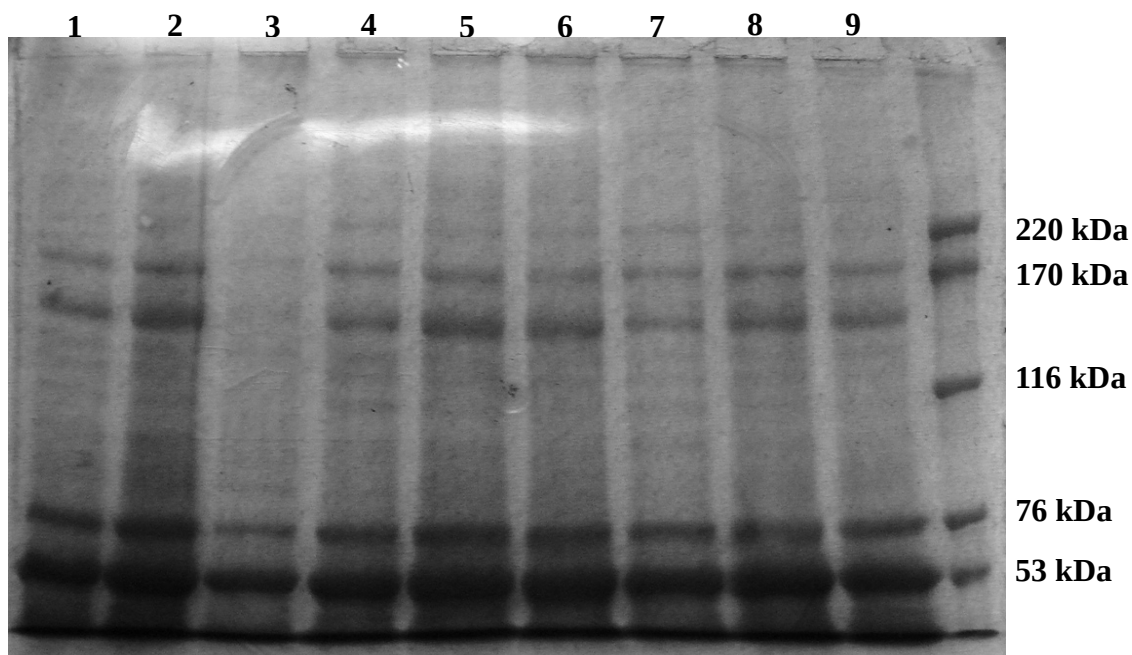


Figura 2: Perfil de proteínas dos homogenatos provenientes das amostras obtidas a partir das lesões cirúrgicas experimentais. Linha 1: grupo tratado com NaCl, 2º dia P.O.; linha 2: grupo tratado com NaCl, 7º dia P.O.; linha 3: grupo tratado com NaCl, 12º dia P.O.; linha 4: grupo tratado com ácido ascórbico, 2º dia P.O.; linha 5: grupo tratado com ácido ascórbico, 7º dia P.O.; linha 6: grupo tratado com ácido ascórbico, 12º dia P.O.; linha 7: grupo tratado com POLICAJU, 2º dia P.O.; linha 8: grupo tratado com POLICAJU, 7º dia P.O.; linha 9: grupo tratado com POLICAJU, 12º dia P.O.; linha 10: padrões de peso molecular.

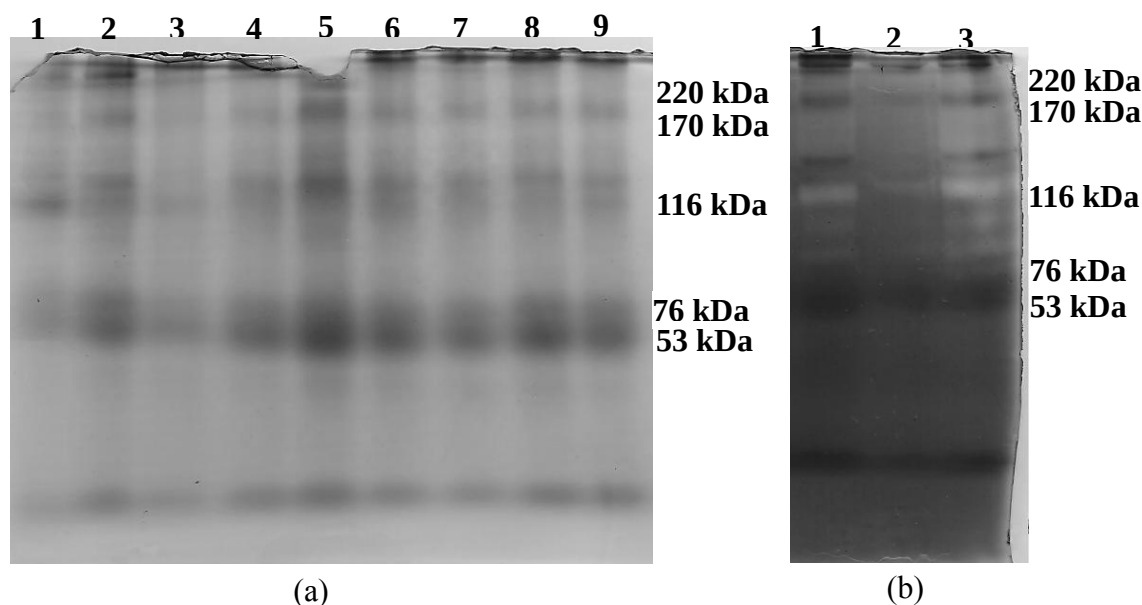


Figura 3: Zimogramas de proteínas dos homogenatos provenientes das amostras obtidas a partir das lesões cirúrgicas experimentais. (a) Linha 1: grupo tratado com NaCl, 2º dia P.O.; linha 2: grupo tratado com NaCl, 7º dia P.O.; linha 3: grupo tratado com NaCl, 12º dia P.O.; linha 4: grupo tratado com ácido ascórbico, 2º dia P.O.; linha 5: grupo tratado com ácido ascórbico, 7º dia P.O.; linha 6: grupo tratado com ácido ascórbico, 12º dia P.O.; linha 7: grupo tratado com POLICAJU, 2º dia P.O.; linha 8: grupo tratado com POLICAJU, 7º dia P.O.; linha 9: grupo tratado com POLICAJU, 12º dia P.O. (b) Linha 1: grupo tratado com NaCl, 2º dia P.O.; linha 2: grupo tratado com ácido ascórbico, 2º dia P.O.; linha 3: grupo tratado com POLICAJU, 2º dia P.O.

DISCUSSÃO

MMPs são componentes importantes em muitos processos biológicos e patológicos, por causa de suas habilidades para degradar componentes da MEC. Tem se tornado claro que a MEC não é um mero suporte para células, mas sim que ela também abriga funções biológicas críticas que podem ser reveladas na proteólise (VISSE & NAGASE, 2003).

Tradicionalmente, o papel presumido das MMPs estava confinado ao catabolismo da MEC. Recentemente, entretanto, vários trabalhos têm demonstrado que as MMPs clivam uma ampla faixa de substratos extracelulares bioativos e, regular a atividade de tais proteínas, pode de fato ser a função predominante das MMPs *in vivo*. As funções estabelecidas para as MMPs incluem a liberação de fatores de crescimento da membrana celular ou da MEC, clivagem de receptores de fatores de crescimento da

superfície celular, desprendimento de moléculas de adesão celular e ativação de outras MMPs (GILL & PARKS, 2008).

Embora atualmente diferentes autores apóiem a hipótese de que a principal função das MMPs na cicatrização se encontre durante a fase inflamatória (VISSE & NAGASE, 2003; GILL & PARKS, 2008; TORISEVA & KÄHÄRI, 2009), observamos no nosso grupo controle, tratado com NaCl, que o maior pico de atividade colagenolítica se encontra durante a fase proliferativa. Além disto, dentre os grupos tratados com o POLICAJU, a menor atividade colagenolítica ocorreu durante a fase inflamatória e a fase de maior atividade colagenolítica foi a fase proliferativa. Estes fatos indicam que o favorecimento da cicatrização pelo tratamento com o POLICAJU e seu efeito sobre as MMPs se dá principalmente na fase de remodelação.

Apesar de Baskovich *et al.* (2008) ter observado que níveis excessivos de MMPs estão presentes em lesões crônicas, não permitindo o fechamento da ferida, observamos neste trabalho que o maior pico de atividade colagenolítica das lesões tratadas com o POLICAJU ocorreu durante a fase de remodelação, o que não impediu o fechamento da lesão, pelo contrário, uma vez que o polissacarídeo estudado favorece a cicatrização (SCHIRATO *et al.*, 2006).

O fato que o nível de atividade de MMP em fluido de lesão crônica é 30 vezes maior que o encontrado em lesões agudas sugere que, em lesões crônicas, há um rompimento dos mecanismos usuais que controlam os níveis destas enzimas (TRENGOVE *et al.*, 1999).

Durante a fase inflamatória, ou seja, até o 2º dia P.O., observou-se no grupo NaCl uma menor degradação do azocolágeno, diferente do encontrado por outros autores. Segundo Ovington (2007) o comportamento normal destas enzimas seria um pico enzimático durante a fase inflamatória da cicatrização, e então um declínio no estágio de aparecimento de tecido de granulação e subsequentemente novo tecido epitelial no ferimento.

Já de acordo com Madlener *et al.* (1998), não todas, mas sim a maioria das MMPs apresentam máxima expressão no primeiro dia após a injúria. No 13º dia, quando a re-epitelização está completa, os níveis transcricionais destas MMPs declina. Os autores também observaram que, após a injúria, a expressão de MMP-2 e seu

ativador biológico, MT1-MMP (MMP tipo membrana 1) aumentou, e os níveis mais altos foram alcançados por volta dos dias 5 e 7 após a lesão (MADLENER *et al.*, 1998).

Vários autores discordam em relação ao peso molecular das MMPs, podendo ser encontrados diferentes valores de peso molecular para uma mesma MMP (ARAÚJO *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2008; MASON *et al.*, 1999). No zimograma realizado neste trabalho, observamos em todos os grupos uma proteína que degrada gelatina com peso molecular de cerca de 116 kDa, estando de acordo com um dos pesos moleculares propostos para a pró-MMP-9 (gelatinase B) (MASON *et al.*, 1999).

A MMP-9 é uma das MMPs que têm sido identificadas em lesões de pele (TORISEVA & KÄHÄRI, 2009) e, avaliando a expressão das MMPs na pele de pacientes queimados, Neely *et al.* (1997) verificaram que a atividade das MMP-2 e -9 estavam estatisticamente elevadas no quarto dia após a queimadura, em comparação com os controles.

A remodelação da membrana basal após a re-epitelização e a degradação da matriz provisória são defeituosas em camundongos deficientes de MMP-9. MMP-9 pode estar envolvida no ajuste final do tecido epidermal após o reparo pela remodelação da zona da membrana basal e pela completa reabsorção da matriz provisória da lesão (TORISEVA & KÄHÄRI, 2009). Estas afirmações corroboram os nossos dados obtidos pelo zimograma (onde foi observada uma enzima com peso molecular compatível com a pró-MMP-9) e pela atividade colagenolítica (onde o grupo tratado com o POLICAJU obteve maior pico durante a fase de remodelação).

Lesões tratadas com a emulsão do POLICAJU, na concentração utilizada neste estudo (150 mg/ml), apresentam tecido de granulação com fibras colágenas bem organizadas e total re-epitelização, ao contrário das lesões de grupos controle (SCHIRATO *et al.*, 2006).

Em geral, polissacarídeos naturais têm estrutura complexa devido à sua heterogeneidade, possuindo muitos tipos de unidades monossacarídicas, isto dificulta a elucidação da relação entre estrutura e atividade. Polissacarídeos ou seus derivados podem participar ativamente no processo de cicatrização de feridas (LLOYD *et al.*, 1998; YOSHIDA, 2001).

Filmes de polissacarídeos têm sido largamente utilizados no campo farmacêutico. Eles também têm sido aplicados no desenvolvimento de biosensores,

membranas biológicas, experimentos imunológicos e fios de sutura, pois são biodegradáveis e biocompatíveis. Lesões de camundongos tratadas por filme de POLICAJU com tripsina enclausurada apresentaram aceleração da proliferação de fibroblastos, neovascularização do tecido de granulação e efeito estimulante na formação do epitélio (MONTEIRO *et al.*, 2007).

Peles de ratos tratadas por 4 semanas com creme contendo fucose a 1%, exibiram um aumento significativo de sua espessura, com fibras de colágeno densas e bem orientadas (ROBERT *et al.*, 2004).

Diversos estudos relacionam o efeito de oligo- e polissacarídeos à atividade de MMPs. Fucoidans (polissacarídeos extraídos da parede celular de algas) são capazes de estimular *in vitro* a proliferação de fibroblastos dermais e a deposição da matriz extracelular. Também podem inibir a secreção de MMP-2 e indução de MMP-3 nos fibroblastos dermais em cultura. Além disso, foi observado que fucoidans aumentam a taxa de associação de MMPs com seus inibidores específicos, os TIMPs (SENNI *et al.*, 2006).

Acredita-se que SIP-SII (um polissacarídeo sulfatado isolado a partir do molusco *Sepiella mandroni*) pode suprimir invasão e migração de células de carcinoma de ovário humano através da inibição da atividade proteolítica de MMP-2 (WANG *et al.*, 2008).

O oligossacarídeo CSA (condroitina sulfato A) possui efeito anti-ártrico. Animais tratados com este oligossacarídeo apresentaram atividade mais baixa de MMPs. Os autores sugerem que o CSA poderia afetar a progressão da artrite pelo seu efeito nas MMPs, inibindo-as, já que MMPs estão criticamente envolvidas na degradação da matriz que ocorre durante a progressão da doença (SANDYA & SUDHAKARAN, 2007).

A literatura atual oferece uma grande variedade de evidências que MMPs e seus inibidores são requeridos para a recuperação de lesões. Além disso, polissacarídeos naturais têm demonstrado interagir com as MMPs de modo a favorecer a cicatrização. Neste trabalho, observamos que o favorecimento da cicatrização pelo POLICAJU pode ocorrer através da interação deste polissacarídeo com a pró-MMP-9. Os dados aqui obtidos sugerem a necessidade de maiores investigações acerca dos mecanismos de interação entre o POLICAJU e as MMPs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGREN, M.S. Gelatinase activity during wound healing. **British Journal of Dermatology**, v. 131, p. 634-640, 1994.

ARAÚJO, C.F.R.; SOUZA FILHO, Z.A.; GRECA, F.H.; GUERREIRO, M.M.C.P.M.; LEITE, L.A.; MANSUR, A.E.C.; KANTOR, D.C.; NASSIF, A.E. Efeitos do Agarol® do Trigliceril sobre a cicatrização de pele, estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.13, n.4, p.232 – 237, 1998.

BARCELOS, G.R.M.; SHIMABUKURO, F.; MACIEL, M.A.M.; COLUS, I.M.S. Genotoxicity and antigenotoxicity of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in V79 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1468–1475, 2007.

BASKOVICH, B.; SAMPSON, E.M.; SCHULTZ, G.S.; PARNELL, L.K.S. Wound dressing components degrade proteins detrimental to wound healing. **International Wound Journal**, v. 5, p. 543–551, 2008.

EMING, S.; SMOLA, H.; HARTMANN, B.; MALCHAU, G.; WEGNER, R.; KRIEG, T.; SMOLA-HESS, S. The inhibition of matrix metalloproteinase activity in chronic wounds by a polyacrylate superabsorber. **Biomaterials**, v. 29, p. 2932–2940, 2008.

GILL, S.E. & PARKS, W.C. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, p. 1334–1347, 2008.

LI, J.; CHENG, J.; KISNER, R. Pathofisiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v.25, p. 9-18, 2007.

LLOYD, L.L.; KENNEDY, J.F.; METHACANON, P.; PATERSON, M.; KNILL, C.J. Carbohydrates polymers as wound management aids. **Carbohydrate Polymers**, v.37, p. 317-322, 1998.

MADLENER, M.; PARKS, W.C.; WERNER, S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. **Experimental Cell Research**, v. 242, p. 201–210, 1998.

MASON, D.P.; KENAGY, R.D.; HASENSTAB, D.; BOWEN-POPE, D.F.; SEIFERT, R.A.; COATS, S.; HAWKINS, S.M.; CLOWES, A.W. Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery. **Circulation Research**, v. 85, p. 1179-1185, 1999.

MENESTRINA, J.M.; IACOMINI, M.; JONES, C.; GORIN, P.A. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structure in gum of *Anacardium occidentale* L. **Phytochemistry**, v.47, p.714–721, 1998.

MONTEIRO, F.M.F.; SILVA, G.M.M.; SILVA, J.B.R.; PORTO, C.S.; CARVALHO-Jr, L.B.; LIMA-FILHO, J.L.; CARNEIRO-LEAO, A.M.A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; PORTO, A.L.F. Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 884–888, 2007.

NEELY, A.N.; BROWN, R.L.; CLENDENING, C.E.; ORLOFF, M.M.; GARDNER, J.; GREENHALGH, D.G. Proteolytic activity in human burn wounds. **Wound repair and regeneration**, v. 5, p. 302-309, 1997.

OVINGTON, L.G. Advances in wound dressings. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 33-38, 2007.

RATNER, B.D.; BRYANT, S.J. BIOMATERIALS: Where we have been and where we are going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.6, n.1, p.41-75, 2004.

ROBERT, L.; FODIL-BOURAHILA, I.; BIZBIZ, L.; ROBERT, A.M. Effect of L-fucose and fucose-rich oligo- and polysaccharides (FROP-s) on collagen biosynthesis by human skin fibroblasts. Modulation of the effect of retinol, ascorbate and a-tocopherol. **Biomedical Pharmacotherapy**, v. 58, p. 65–70, 2004.

SANDYA, S. & SUDHAKARAN, P. R. Effect of glycosaminoglycans on matrix metalloproteinases in type II collagen-induced experimental arthritis. **Experimental Biological Medicine**, v. 232, p. 629–637, 2007.

SCHIRATO, G.V.; MONTEIRO, F.M.F.; SILVA, F.O.; LIMA FILHO, J.L.; LEÃO, A.M.A.C.; PORTO, A.L.F. The polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. in the inflammatory phase of the cutaneous wound healing. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 149-154, 2006.

SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. **Biootechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 383 - 420, 1995.

SENNI, K.; GUENICHE, F.; FOUCAULT-BERTAUD, A.; IGONDJO-TCHEN, S.; FIORETTI, F.; COLLIEC-JOUAU, S.; DURAND, P.; GUEZENNEC, J.; GODEAU, G.; LETOURNEUR, D. Fucoidan a sulfated polysaccharide from brown algae is a potent modulator of connective tissue proteolysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 56–64, 2006.

STADELMAN, W.K.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 176, (supl. 2A), p. 26S-38S, 1998.

TORISEVA, M. & KÄHÄRI, V.M. Proteinases in cutaneous wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, artigo não impresso, disponível apenas on line, 2009.

TRENGOVE, N.J.; STACEY, M.C.; MACAULEY, S.; BENNETT, N.; GIBSON, J.; BURSLEM, F.; MURPHY, G.; SCHULTZ, G. Analysis of the acute and chronic wound

environments: the role of proteases and their inhibitors. **Wound Repair and Regeneration**, v. 7, p. 442–452, 1999.

VISSE, R. & NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, p. 827-839, 2003.

WANG, S.; CHENG, Y.; WANG, F.; SUN, L.; LIU, C.; CHEN, G.; LI, Y.; WARD, S.G.; QU, X. Inhibition activity of sulfated polysaccharide of *Sepiella maindroni* ink on matrix metalloproteinase (MMP)-2. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 297-302, 2008.

YOSHIDA, T. Synthesis of polysaccharides having specific biologic activities. **Progress in Polymers Science**, v.26, p.379-441, 2001.

7. ANEXO

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal.

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº28/05

Recife, 21 de junho de 2005

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
À : Profa Ana Lúcia Figueiredo Porto - LIKA/UFPE

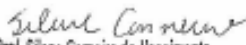
Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO TÓPICO DE LESÕES CUTÂNEAS COM MEMBRANAS OBTIDAS DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DO CAJUEIRO *ANACARDIUM OCCIDENTALE L.*".

Concluíram que os procedimentos descritos para a utilização experimental com os animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos um **PARECER FAVORÁVEL** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
Presidente CEEA

