

Marília Cavalcanti Coriolano

Potencial cicatrizante da lectina de sementes
de *Parkia pendula* em camundongos

Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão

Co-orientadora

Recife, 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

Potencial cicatrizante da lectina de sementes de *Parkia*
pendula em camundongos

Marília Cavalcanti Coriolano

Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão
Co-orientadora

Recife, 2008.

Marília Cavalcanti Coriolano

Potencial cicatrizante da lectina de sementes de *Parkia*
pendula em camundongos

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada por: _____

Data: ____/____/____

Coriolano, Marília Cavalcanti

Potencial cicatrizante da lectina de sementes de
Parkia pendula em camundongos. / Marília Cavalcanti
Coriolano. – Recife: A Autora, 2008.

V; 46 fls. .: il.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) –
UFPE. CCB

1. Bioquímica 2. Lectina 3. Processo cicatricial 4.
Parkia pendula I.Título

577.1

CDU (2^a. Ed.)

UFPE

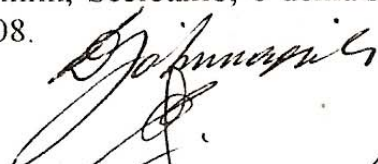
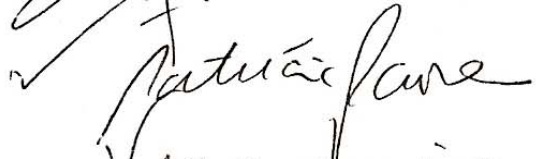
572

CDD (22^a. Ed.)

CCB – 2008 – 40

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Marília Cavalcanti Coriolano**, realizada em 26 de fevereiro de 2008, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia da UFPE.

Às 09:20 horas, do dia vinte e seis de fevereiro de 2008, foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo Lins - Depto. Bioquímica, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Marília Cavalcanti Coriolano**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica e Fisiologia/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. **Vera Lúcia de Menezes Lima** fez a apresentação da aluna, de sua orientadora Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, da co-orientadora Profa. Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, bem como da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, na qualidade de Presidente, Patrícia Maria Guedes Paiva, Vera Lúcia de Menezes Lima, ambas do Depto. de Bioquímica/UFPE e Rita de Cássia Moura do Nascimento do Depto de Ciências Fisiológicas/Universidade de Pernambuco (UPE). Após as apresentações, a Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Potencial Cicatrizante da Lectina de Sementes de *Parkia pendula* em Camundongos**", e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu à explanação e comentários acerca do tema em **25 (vinte e cinco) minutos**. Após a apresentação da mestranda, a Sra. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, Profa. Dra. Rita de Cássia Moura do Nascimento que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, a Sra. Presidente passou a palavra para a Profa. Patrícia Maria Guedes Paiva, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Logo após, a Sra. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, que agradeceu ao convite, fez alguns comentários e sugestões, iniciando sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, a Sra. Presidente, na qualidade de orientadora, usou da palavra para tecer alguns comentários a respeito do trabalho da aluna, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovada com Distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 26 de fevereiro de 2008.



Patrícia Maria Guedes Paiva
Vera Lúcia de Menezes Lima


Dedico aos meus pais

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE TABELA E FIGURAS	III
RESUMO	IV
<i>ABSTRACT</i>	V
INTRODUÇÃO	
1. Processo Cicatricial	01
2. Imunossupressão	09
3. Materiais Biológicos	10
4. Lectinas	11
5. <i>Parkia pendula</i>	15
JUSTIFICATIVA	16
OBJETIVO	17
1. Objetivo Geral	17
2. Objetivos Específicos	17
ARTIGO	19
CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção, por guiar meus passos e por ter me dado força para que eu pudesse superar todos os obstáculos durante o período de desenvolvimento do experimento do Mestrado. E graças a ele, por todas as bençãos derramadas em minha vida!

Aos meus pais, pelo grande amor, amizade, carinho, respeito, atenção, orientação, compreensão e apoio. Amo muito vocês!

À querida Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, pela confiança, oportunidade, orientação, incentivo, apoio e atenção. Minha admiração, carinho e respeito.

À Profa. Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, pelo convite para participar do grupo da cicatrização e pelo apoio científico.

À Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, pela colaboração, atenção e apoio científico.

À Dra. Maria Helena Madruga e Luiz Felipe Viegas, pela ajuda, paciência e apoio durante os 12 dias de experimento no biotério.

Ao Prof. Alex Benício da Silveira, pela grande atenção e pelo apoio na preparação das lâminas histopatológicas.

Ao Prof. Dr. Paulo Jorge Parreira dos Santos, pela importante ajuda e atenção na análise estatística dos resultados.

À Profa. Dra. Sandra Rodrigues de Souza, pela amizade, torcida e apoio desde minha iniciação científica.

Ao amigo Flávio, pela grande e constante ajuda, apoio, atenção, paciência, torcida, por ter me ensinado a arte da cicatrização e também pelos muitos momentos de alegria compartilhados. Meu muitíssimo obrigada!

À minha grande amiga Emmanuela (Manu), pela amizade, apoio, alegria, força, torcida e por ser uma pessoa justa e prestativa, sempre disposta a ajudar. Meu muitíssimo obrigada!

À minha amiga Giuliana Viegas Schirato (Giu), por sua tranquilidade, carinho, paciência, ajuda, atenção e apoio durante o período de elaboração da dissertação. Meu muitíssimo obrigada!

À minha amiga Elba Verônica, por todos esses anos de amizade, confiança, respeito, ajuda, apoio, torcida e por muitos momentos de alegria.

Ao amigo Caio e à amiga Helane, pela tranquilidade, paciência e por estarem sempre prontos para ajudar.

Às minhas grandes amigas do coração Ana Roberta e Joyce, pela amizade, apoio, carinho, respeito, confiança, alegria e por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

A todos que compõe o Laboratório de Biotecnologia do LIKA, em especial a Carol, Roberto (Rob), Danielle Padilha (Dani), Clarissa (Lispector), Germana (German), Rômulo, Rosângela, Cristiane, Andréa e Cíntia, pela amizade, carinho, apoio e muitos momentos divertidos nos intervalos do trabalho.

Aos secretários do Departamento de Bioquímica, Neide e Miron, pelo carinho, atenção, apoio e auxílio concedido sempre que preciso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

LISTA DE TABELA E FIGURAS

Tabela 1: Fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial de lesões cutâneas (extraído de Aukhil, 2000). **5**

Figura 1: Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas. Fonte: *Experts Reviews in Molecular Medicine* ©, 2003. *Cambridge University Press*. **3**

Figura 2: Representação esquemática da hemaglutinação e eritrócitos por lectinas. **13**

Figura 3: Visão geral da árvore *Parkia pendula* do Jardim Botânico de Pernambuco. **16**

RESUMO

Um animal imunocomprometido tem dificuldade de se restabelecer depois de sofrer uma injúria. Lectina de sementes de *Parkia pendula*, PpeL, foi usada como tratamento de lesões cutâneas, com o objetivo de alcançar menores efeitos colaterais, considerando seu potencial cicatrizante. O metotrexato (0.8 mg/kg/semana) foi usado como uma droga imunossupressora. Uma ferida cirúrgica foi produzida (1 cm²) na região dorsal em camundongos albinos suíços (*Mus musculus*), fêmeas normais e imunossuprimidas. Feridas foram tratadas diariamente com administração tópica de 100 µL das seguintes soluções: Grupo 1 - NaCl 0.15 M; Grupo 2 - imunossuprimido NaCl 0.15 M; Grupo 3 - PpeL (100 µg/ mL) ; Grupo 4 - imunossuprimido PpeL (100 µg/ mL). Foram usados parâmetros clínicos tais como, edema, hiperemia, crosta, tecido de granulação e cicatricial, como também contrações das feridas analisadas durante 12 dias. Biópsias para a análise histopatológica e exames microbiológicos foram realizadas após 2º, 7º e 12º dias. Observou-se a presença de edema e hiperemia em todos os grupos durante o período inflamatório. A primeira crosta foi observada a partir do segundo dia somente nos grupos tratados com PpeL. A análise microbiológica das lesões revelou que nos dias 0 e 2, o grupo 3 não apresentou *Staphylococcus* sp., entretanto foi observada a presença da bactéria nos outros grupos todos os dias. O uso da lectina também diminuiu a área da ferida, ocorrendo reepitelização total dos grupos 3 e 4 no 11º dia de evolução, enquanto os grupos controles alcançaram o fechamento das lesões no 12º dia. O presente estudo sugere que PpeL é um potencial biomaterial que apresenta evidência farmacológica preliminar no processo de reparo de lesões cutâneas.

ABSTRACT

An immunocompromised animal has difficulty to recover after any injury. *Parkia pendula* seed lectin, PpeL, was used to treat cutaneous wounds of normal and immunocompromised mice, with minor collateral effect and cicatrization potential. Methotrexate (0.8 mg/kg/week) was the immunosuppressive drug. Wounds were produced in the dorsal region (1 cm²) of female albino Swiss mice (*Mus musculus*), health and immunocompromised. Wounds were daily topically treated with 100 µl of the following solutions: Group 1 - 0.15 M NaCl; Group 2 - 0.15 M NaCl immunocompromised; Group 3 - PpeL (100 µg/mL); Group 4 - immunocompromised PpeL (100 µg/mL). Clinical evaluation during 12 days included the parameters edema, hiperemy, scab, granulation and cicatricial tissues as well as contraction of wounds. Biopsies for histopathology analysis and microbiological examinations were carried out in the 2nd, 7th and 12th days. The presence of edema and hiperemy was observed in all groups during inflammatory period. The first crust was observed from the 2nd day, only in PpeL treated groups. Microbiological analysis of wounds revealed in day 0 and 2nd day did not show *Staphylococcus* sp in group 3, however it was detected in other groups every day. The lectin markedly reduced area of lesion, inducing a total closing on groups 3 and 4 in 11th day of evolution. Control groups had wounds closed in 12th day. The present study suggests that PpeL is a biomaterial potential to show preliminary pharmacological evidence in the repairing process of cutaneous wounds.

INTRODUÇÃO

1. Processo Cicatricial

A pele recobre toda a superfície do corpo e é o seu maior órgão. É dividida em duas camadas distintas, a epiderme e a derme, firmemente unidas entre si. A epiderme é a camada mais externa, composta por três diferentes linhagens celulares: os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans. A derme é a camada mais profunda e é formada por tecido conjuntivo (Santos, 2000).

De acordo com Blanes, a epiderme organiza-se em camadas e à medida que as mais superficiais são eliminadas, as camadas mais profundas são restauradas por divisão celular. É constituída pelas camadas: espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. Apresenta queratinócitos intimamente unidos uns aos outros, os quais fornecem uma barreira contra a invasão de microorganismos e água. A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo que se estende da epiderme até o tecido celular subcutâneo. Nesta camada situam-se os anexos da pele (pêlos, unhas, glândulas sudoríparas e sebáceas), muitos vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. A derme ainda contém muitos tipos diferentes de células, incluindo fibroblastos e fibrócitos, macrófagos, mastócitos e leucócitos sanguíneos, particularmente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos. Esta camada fornece uma base firme para a epiderme e para os anexos cutâneos; as fibras colágenas proporcionam grande força de tensão e as fibras elásticas dão flexibilidade à pele. O controle realizado pelo hipotálamo e pelas fibras nervosas simpáticas sobre o fluxo sanguíneo na derme, proporciona um mecanismo de termoregulação (Blanes, 2004). Abaixo e em continuidade com a derme encontra-se a hipoderme ou tecido celular subcutâneo, que não faz parte da pele, apenas lhe serve de união com os órgãos subjacentes. A hipoderme é um tecido conjuntivo frouxo que pode conter muitas células adiposas, constituindo o pânículo adiposo (Junqueira e Carneiro, 2004).

A principal função da pele é servir como uma barreira de proteção frente ao ambiente (Singer & Clark, 1999). A perda da integridade de grande parte da pele provocada por um ferimento originado por agentes físicos, químicos ou biológicos, como no caso de vírus, bactérias, fungos e protozoários (Calvin, 1998), ou ainda por doenças como úlceras crônicas de pele causadas pela diabetes mellitus podem levar a

uma perda da integridade anatômica e funcional do tecido ou até mesmo a morte (Singer & Clark, 1999; Tsirogianni et al., 2006).

As feridas cutâneas se revestem de importância em função da alta frequência, do sofrimento que produzem, da proliferação bacteriana verificada em expressivo número de casos, e também do elevado custo dos tratamentos usualmente ministrados (Ribeiro & Schmidt, 2000). De acordo com Blanes, o processo de reparo tissular compreende dois mecanismos de restauração dos tecidos: a regeneração e a cicatrização. A regeneração ocorre com reposição tissular original. O trauma inicial gera uma resposta inflamatória aguda, manifesta através de edema e formação de exsudato seroso, rico em leucócito, que cessa em menos de 24 horas. As células epidérmicas das margens da ferida e das invaginações epidérmicas dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas começam a proliferar e migrar no leito da ferida, ocluindo rapidamente sua superfície. O processo de cicatrização de feridas é composto de uma série de estágios complexos, interdependentes e simultâneos, que são descritos em fases do ponto de vista morfológico, identificam-se três fases consecutivas: fase inflamatória, fase proliferativa e de remodelação da matriz extracelular, havendo um dinamismo com sobreposição entre elas (Blanes, 2004). Por outro lado, Shimizu considera que a cicatrização de lesões cutâneas é um processo biológico dinâmico bem ordenado, onde a lesão tecidual acarreta a ruptura e o conseqüente extravasamento do conteúdo de vasos sanguíneos, sendo este processo dividido didaticamente nas seguintes fases: hemostasia, fase inflamatória, fase proliferativa ou de granulação e de remodelação da matriz extracelular, como ilustrado na Figura 1 (Shimizu, 2005).

O processo de reparo existe para restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido, sendo a cura de uma ferida uma sucessão complexa de eventos bioquímicos e celulares em resposta à lesão tecidual. Para que um ferimento seja curado com êxito, os eventos devem se suceder numa sobreposição das fases ou seqüências de eventos, e o resultado final, geralmente uma cicatriz de tecido conjuntivo, configura o somatório desse processo (Carvalho, 2002). Assim, se a ferida constitui a solução de continuidade anátomo-fisiológica da área lesada, a cicatriz corresponde à tentativa biológica a qual o organismo recorre para restaurar a sua integridade (Pilcher et al., 1999).

A alta complexidade da resposta imune é controlada por diversas moléculas, principalmente as citocinas, um grupo de peptídeos ou glicoproteínas de baixo peso molecular (8 kDa). Elas influenciam tanto a resposta humoral como a resposta celular. Além disso, elas agem também sobre as células de outros sistemas que possuam

receptores apropriados, participando da resposta inflamatória, da cicatrização das feridas e de outros processos biológicos. A maioria é produzida pelas células do sistema imunitário, como macrófagos e leucócitos, porém muitas são sintetizadas por outras células, como as células endoteliais e os fibroblastos. As quimiocinas são as citocinas que atraem leucócitos para as regiões de inflamação. Entre as células do sistema imunitário, os macrófagos atuam como elementos de defesa, fagocitando restos celulares, elementos anormais da matriz extracelular, bactérias e elementos inertes que penetram no organismo. São também células secretoras capazes de produzir uma impressionante variedade de substâncias que participam nas funções dos processos inflamatórios e reparo dos tecidos (Junqueira & Carneiro, 2004).

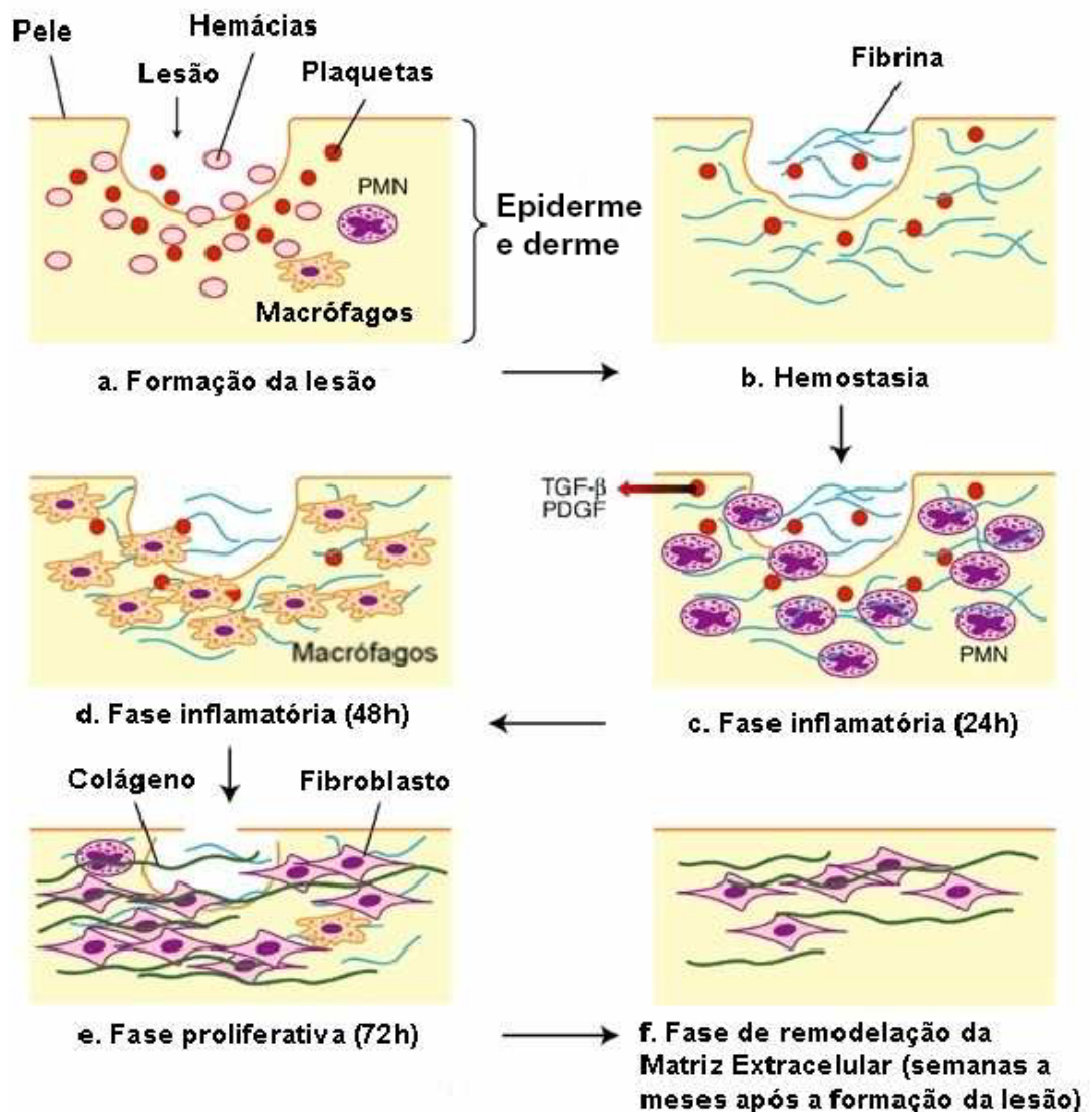


Figura 1. Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas. Fonte: *Experts Reviews in Molecular Medicine* ©, 2003. Cambridge University Press (Beanes et al., 2003).

O primeiro evento que ocorre no processo de cicatrização é o controle da hemorragia na área lesionada ou hemostasia (Laurens et al., 2006), uma vez que a lesão tecidual causa o rompimento dos vasos sanguíneos com a conseqüente liberação dos seus constituintes ainda que este sangramento não seja observado macroscopicamente no leito da lesão (Clark et al., 1998). À medida que a hemostasia vai-se concluindo, a resposta inflamatória é iniciada (Moore, 1999; Tsirogianni et al., 2006). Clinicamente observam-se alguns sinais típicos da inflamação: edema, hiperemia, calor e dor (Diegelmann & Evans, 2004).

A fase inflamatória inicia-se logo após a lesão e é caracterizada pela vasoconstrição mediada por fatores neurogênicos e químicos durante um período de segundos a minutos; em seguida, pela vasodilatação reflexa local que aumenta a permeabilidade vascular, há afluxo de sangue na área, com proteínas séricas, fatores de coagulação e plaquetas. A própria lesão endotelial ativa as plaquetas que iniciam a formação de um tampão plaquetário, o qual é o processo hemostático inicial que pára o sangramento; simultaneamente a cascata de coagulação é iniciada, convertendo fibrinogênio em uma rede de fibras de fibrina insolúveis (Santoro & Gaudino, 2005; Laurens et al., 2006), fornecendo dessa forma uma matriz extracelular provisória para a migração celular (Diegelmann & Evans, 2004).

As plaquetas além de facilitarem a formação do tampão plaquetário, também secretam fatores de crescimento e citocinas, dentre os quais os dois mais importantes são o Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF) e o Fator de Crescimento Transformante-beta ($TGF-\beta$) (Robbins & Cotran, 2005; Santoro & Galdino, 2005; Diegelmann & Evans, 2004). O PDGF inicia a quimiotaxia dos neutrófilos, macrófagos, células musculares lisas e dos fibroblastos e, além disso, também estimula a mitogênese dos fibroblastos e das células musculares lisas. Já o $TGF-\beta$, além de atrair os macrófagos, também estimula os mesmos a secretarem citocinas adicionais como Fator de Crescimento dos Fibroblastos (FGF), Interleucina-1 (IL-1) e o próprio PDGF. A presença dos macrófagos no local da injúria indica que a fase inflamatória está aproximando-se do fim e conseqüentemente a fase proliferativa está sendo iniciada (Diegelmann & Evans, 2004).

Os polimorfonucleares (PMN) atuam fagocitando os restos celulares, a fibrina remanescente, matriz extracelular (MEC) danificada e possíveis microorganismos patógenos oportunistas que infectam a área da lesão. Na verdade essas células imunes exercem um papel fundamental na transição entre o processo inflamatório e a fase de

fibroplasia, uma vez que possuem fatores de crescimento que atraem fibroblastos para a ferida e estimulam a sua proliferação e posterior síntese de colágeno (Werner & Grose, 2003). Os mediadores bioquímicos estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial de lesões cutâneas (extraído de Aukhil, 2000).

FATOR DE CRESCIMENTO	FONTE	EFEITO
Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF)	Macrófagos e células epiteliais	Proliferação dos fibroblastos e angiogênese.
Fator de Crescimento Transformante-α (TGF- α)	Macrófagos e queratinócitos	Reepitelização.
Fator de Crescimento Transformante-β1 e β2 (TGF-β1 e TGF-β2)	Plaquetas e Macrófagos	Quimiotaxia de fibroblastos e macrófagos; síntese da matriz extracelular; secreção de inibidores de protease.
Fator de Crescimento Epidermal (EGF)	Plaquetas	Reepitelização.
Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PGDF), isoformas AA, AB e BB	Plaquetas, macrófagos e queratinócitos	Quimiotaxia de fibroblastos e macrófagos; proliferação de fibroblastos e síntese da matriz.
Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF)	Fibroblastos presentes na derme	Proliferação de queratinócitos.
Interleucina 1 α e β	Neutrófilos	Ativa a expressão do fator de crescimento em macrófagos, queratinócitos e fibroblastos.
Fator de Necrose Tumoral-α (TNF- α)	Neutrófilos	Ativa a expressão do fator de crescimento em macrófagos, queratinócitos e fibroblastos.

A fase proliferativa ou de fibroplasia é caracterizada pela formação do tecido de granulação, reepitelização e contração de ferida. A neovascularização local ocorre a partir de anastomoses dos capilares hipodérmicos em resposta ao FGF e TGF- β , que provocam a entrada de células inflamatórias pró-angiogênicas no local da lesão, secretados por monócitos e possivelmente por queratinócitos (Thomas et al., 1995; Iba et al., 2004).

A neovascularização da ferida é realizada em várias etapas. Fatores de crescimento deverão ser secretados por células e ligar-se a receptores nas células-alvo. Alguns peptídeos, a exemplo do TGF- β , não causam mitose nas células endoteliais, porém são importantes durante a angiogênese, porque provocam a entrada de células inflamatórias pró-angiogênese no local da lesão. Quando as células endoteliais são estimuladas, proliferam-se e utilizam proteases para criar novas vias migratórias ao local da lesão. Uma vez que os vasos são formados, elementos sanguíneos podem fluir através destes (Arbiser, 1996).

O tecido de granulação inicia o preenchimento no local da lesão 2 ou 3 dias depois da sua formação; esse tecido nada mais é do que o próprio tecido conjuntivo, o qual recebe essa denominação devido a sua aparência granular, a qual apresenta inúmeros capilares (Werner & Grose, 2003). Esse tecido é composto pelas células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, linfócitos e pela nova MEC. Nessa fase, os macrófagos liberam PDGF, TGF- β e o FGF, que estimulam a proliferação e migração dos fibroblastos para o local da lesão, sendo estes fibroblastos as células predominantes nessa fase da separação tecidual (Tsirogianni et al., 2006), iniciando a síntese de secreção de componentes da MEC, como os glicosaminoglicanos, proteoglicanos e as fibras colágenas do tipo I e III, associadas à proliferação e ao crescimento interno dos capilares (i.e. angiogênese ou neovascularização da ferida) (Regan & Barbul, 1994; Steed, 1997).

Os fibroblastos infiltrados na área da lesão desempenham dois papéis significativos: 1º) produzir e depositar grande quantidade de elementos da MEC, principalmente fibras colágenas do tipo I e III, que aumentam a força tensil da lesão, contribuindo para o fechamento da lesão (Carvalho, 2002); 2º) diferenciar-se em miofibroblastos, cuja função primordial é neoformação dermal e contração das margens da ferida, aliando-se a elas e unindo-as (Thomas et al., 1995; Moulin et al., 2000; Gomathi et al., 2003). Os miofibroblastos foram inicialmente identificados como fibroblastos modificados que possuíam características de uma célula muscular lisa,

através de microscopia eletrônica no tecido de granulação de feridas cicatrizadas (Desmoulière et. al., 2005). A conversão de fibroblastos em miofibroblastos é realizada por fatores de crescimento como TGF- β , expressando α -actina do músculo liso e tornando-se células musculares lisas capazes de realizar grandes forças contráteis (Martin, 1997).

Outro evento importante nesse período é a reepitelização, iniciada pela migração de células epiteliais (i.e. queratinócitos), desde as margens da ferida (Carvalho, 2002). Na pele integra, os queratinócitos estão ligados à membrana basal, porém quando ocorre a lesão cutânea, estas células se locomovem através de contração dos filamentos de actina e miosina e se inserem nos novos complexos de adesão (Martin, 1997).

O processo de reepitelização é estimulado pelo EGF, TGF- α e pelo fator de crescimento de queratinócitos, ocorrendo logo após a ruptura da epiderme, pelo movimento dos queratinócitos da margem da lesão sobre a matriz provisória do tecido de granulação (Thomas et al., 1995; Werner & Grose, 2003). Simultaneamente à migração, as células sofrem alterações fenotípicas específicas como a retração dos tonofilamentos intracelulares, dissolução dos desmossomos intercelulares e formação de actina citoplasmáticas na periferia (Carvalho, 2002; Ehrlich & Diez, 2003). Tais alterações liberam as células da membrana basal subjacente e células epiteliais adjacentes, dando-lhes a capacidade de movimentar-se lateralmente. As células migram sobre uma matriz extracelular provisória, quando a superfície da ferida está umedecida e bem oxigenada, ocorrendo a migração epitelial com maior rapidez (Carvalho, 2002).

Quando a ferida está preenchida pelo tecido de granulação, a angiogênese cessa e os vasos degeneram-se por apoptose (Iba et al., 2004). Posteriormente a rede linfática começa a se regenerar e o tecido de granulação adquire mais fibras colágenas. Desta maneira, com o passar do tempo (i.e. 5º dia), a MEC provisória é gradualmente substituída por uma matriz colagenosa, uma vez que as fibras colágenas tornam-se mais abundantes e começam a unir a incisão (Singer & Clark, 1999).

A fase de maturação ou contração da ferida é marcada pela remodelagem dos tecidos no sentido de restaurar a forma e a função do tecido lesado. Caracteriza-se pela deposição, agrupamento e remodelação do colágeno associado à regressão endotelial, apresentando tecido conectivo, fibras colágenas e poucos vasos sanguíneos (Werner & Grose, 2003).

De acordo com Carvalho, o processo de remodelagem da cicatriz envolve a contínua produção, digestão, agregação e orientação das fibrilas de colágeno. A

princípio, o colágeno é depositado sobre a fibronectina de maneira aleatória, dependendo da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras de colágeno são subsequentemente digeridas pela enzima collagenase e formadas novamente, em arranjos similares aos observados no tecido não afetado adjacente. À medida que vai ocorrendo a remodelação da cicatriz, as fibras de colágeno ficam orientadas paralelamente às forças direcionais aplicadas sobre elas, analogamente às fibras de colágeno formadoras de um tendão. Assim sendo, a cicatriz adquire força tensil e, portanto, integridade funcional. A collagenase é produzida por vários tipos celulares na ferida: leucócitos, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais (Carvalho, 2002), degradando, especificamente, colágenos tipos I, II e III presentes no tecido conjuntivo (Wong et al., 2002).

A cicatriz passa a apresentar a forma de uma massa fibrótica acrescida de fibras colágenas. Observa-se apoptose dos fibroblastos e das células endoteliais, e os eosinófilos aparecem nas últimas fases da reparação, possivelmente devido a fatores de crescimento. Os anexos da pele como folículos pilosos e glândulas sudoríparas sofrem regeneração limitada; a coloração da cicatriz é pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficitária (Dipietro & Burns, 2003).

A remodelação ocorre durante a fase final do processo reparatório e pode continuar durante alguns meses, observando-se síntese, depósito, contração e remodelação da MEC neoformada. Os fibroblastos continuam a ser “células-chave” neste processo, pois estes migram até o local da lesão de forma dependente da ativação por enzimas proteolíticas denominadas metaloproteinases (MMP), as quais são enzimas que controlam a degradação do colágeno na lesão, sendo secretadas pelos macrófagos, células epidérmicas e endoteliais, assim como pelos fibroblastos (Singer & Clark, 1999; Naito & Yoshikawa, 2005). Essas MMP desempenham importante função na remodelação proteolítica da MEC em vários processos fisiológicos incluindo a morfogênese tecidual, reparação tecidual e angiogênese (Kahari & Saarialwo-Kere, 1997; Wong et al., 2002).

As MMP-2 e MMP-9 são as duas proteases gelatinolíticas mais atuantes no processo cicatricial (Kahari & Saarialwo-Kere, 1997; Armstrong & Jude, 2002). Gradativamente, os feixes de fibras colágenas tornam-se mais espessos resultando em uma configuração mais regular, a qual está diretamente relacionada às forças mecânicas as quais o tecido está sujeito durante a atividade normal. Em resultado ao processo de remodelação, a lesão torna-se mais resistente após o colágeno ter sofrido maturação. O

tipo de colágeno secretado inicialmente, na fase proliferativa, era do tipo III o qual é substituído por colágeno do tipo I, por degradação proteolítica posterior (Stevens & Lowe, 1996), resultando assim, no aumento da resistência da cicatriz. O resultado final da fase de remodelação da cicatrização é uma cicatriz com aproximadamente 80% da força de tensão da pele íntegra (Fazik et al, 2000).

A pele possui a função de barreira protetora para todos os tipos de fatores externos que possam ser prejudiciais ao organismo. Verificou-se que feridas infectadas cicatrizam mais lentamente e se não forem adequadamente tratadas podem ocasionar infecções sistêmicas. As bactérias encontradas na pele pertencem à flora normal, composta por bactérias comensais que geralmente não provocam infecção, e os pertencentes à flora transitória, composta principalmente por *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pyogenes*. A infecção compromete a reepitelização, porém pouco se sabe a respeito da interferência da infecção na migração e na maturação da nova epiderme após a formação da lesão (Singer & McClain, 2002; Inngjerdinger et al., 2004). As feridas não cicatrizam enquanto estiverem clinicamente infectadas, portanto, esse diagnóstico de infecção exige em alguns casos a drenagem de exsudatos, com o objetivo de ocasionar o aumento do suprimento sanguíneo adequado (Morison et al., 1997; Bikowski, 1998). A cicatrização não pode ocorrer até que todo o material estranho resultante do processo inflamatório seja removido do leito das feridas (Bergstron et al., 1995).

2. Imunossupressão

Uma das formas mais evidentes de se observar a imunodepressão de um organismo é após um procedimento de transplante ou enxertia. A rejeição é causada por respostas imunes a aloantígenos presentes no enxerto, que são proteínas que variam entre indivíduos e são, portanto, reconhecidas como estranhas pelo receptor, mediadas por células T CD8 citotóxicas, por células T_H1 ou por ambas (Abbas et al., 2002).

As terapias imunossupressoras têm sido empregadas principalmente no tratamento de doenças auto-imunes e nos casos de transplante de órgãos e tecidos. Os métodos disponíveis para a inibição das respostas imunes podem ser classificados em dois grupos principais, imunossupressão inespecífica e imunossupressão específica. A imunossupressão inespecífica se baseia na utilização de antiinflamatórios esteróides e drogas citotóxicas que inibem a divisão celular de um modo inespecífico, reduzindo as

respostas de células sensíveis a antígenos. Já que também podem danificar severamente outras populações celulares. A imunossupressão específica é dirigida ao bloqueio seletivo e reversível da atividade do sistema imune, principalmente da atividade das células T (Pich et al., 1997).

Até o momento, as maneiras de imunidade suprimida são pouco compreendidas, pois frequentemente tornam o hospedeiro exposto a infecções secundárias por organismos patógenos comuns no ambiente. Em contrapartida, há enxertos de tecido colocados em determinados locais do corpo que não provocam respostas imunes, ou seja, não induzem rejeição. Esses locais são denominados sítios imunologicamente privilegiados e compreendem o cérebro, os olhos, a bolsa da bochecha, o útero e os testículos do hamster. É observado que os antígenos saem desses sítios e interagem com as células T, ao invés de provocar uma resposta imune destrutiva, eles induzem tolerância ou uma resposta que não é lesiva ao tecido (Janeway et al., 2002).

São conhecidas como drogas de ação imunodepressiva a azatioprina, ciclosporina, metotrexato, prednisolona e tracolimo. Seus principais mecanismos de ação são a redução da função, da proliferação e da resposta das células T, e como efeitos adversos são observados nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hipertensão, anorexia e distúrbios gastrointestinais (Berel et al., 1996; Moris, 1995; Bondenson, 1997).

3. Materiais Biológicos

A utilização de produtos medicinais de origem natural no tratamento de algumas doenças tem sido amplamente utilizada pela população, mas poucas pesquisas têm sido realizadas a fim de atribuir a estes os seus efeitos terapêuticos. Há elementos existentes na natureza que podem constituir materiais alternativos para o tratamento local das feridas, uma vez que os curativos disponíveis, sintéticos ou biossintéticos, utilizados tanto em seres humanos como em outras espécies, muitas vezes são deficientes (Silva, 2000).

Esses materiais naturais têm sido objetos de pesquisas científicas devido à sua disponibilidade e biodegradabilidade na natureza (Spector, 2001), além de conduzirem e acelerarem fenômenos de ocorrência biológica como à regeneração de tecidos na cicatrização das lesões. Alguns tipos de biomateriais, conhecidos como modificadores da resposta biológica, têm sido amplamente utilizados devido aos seus efeitos imunoestimulantes (Mitchell, 1988). Na área dos biomateriais tem-se investigado novos

materiais que apresentam um conjunto de propriedades que permitem o desempenho e aplicações não atingidas pelos materiais ditos convencionais ou tradicionais (Bento, 2000).

A utilização de plantas no tratamento tópico de lesões cutâneas foi descrita por Andrade et al. (1999) que utilizou o alecrim pimenta (*Lippia sidoides* cham.) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em camundongos. Os extratos das leguminosas *Stryphnodendron polyphyium* Mart. e *Stryphnodendron obovatum* Benth. foram eficazes no reparo de lesões e como agentes antimicrobianos (Lopes et al., 2005). *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) da Família das Liliaceae demonstrou atividade antiinflamatória, antifúngica e cicatricial (Choi & Chung, 2003) e *Plantago major* L. da Família das Plantaginaceae tem demonstrado em vários estudos atividades antiinflamatória, analgésica, antioxidante e cicatricial (Yesilada et al., 1995; Guillén et al, 1997).

Os biomateriais, os quais são definidos como qualquer molécula que tenha a capacidade de interagir com o sistema biológico sem induzirem uma resposta adversa no hospedeiro, podem ser utilizados na reabilitação de lesões (Spector, 2001). Existem várias lectinas com especificidade glicose-manose que têm se destacado por serem consideradas possíveis materiais naturais frente à cicatrização experimental como aquelas pertencentes à divisão Angiospermae, Família Leguminosae, como a *Cratylia mollis*, *Parkia pendula*, *Canavalia ensiformis*, *Dioclea violaclea* e *Canavalia brasiliensis*, atuando como prováveis biomateriais, potencializando a resposta imune frente ao processo experimental de cicatrização (Porto et al., 2006).

4. Lectinas

Lectinas são potenciais biomateriais, cujo estudo teve início no século XIX, com a descoberta de que os extratos de algumas plantas, além de serem tóxicas para homens e animais, poderiam também aglutinar eritrócitos. Acreditava-se que estes efeitos ocorriam devido à contaminação por toxinas bacterianas. Esta hipótese foi desacreditada quando Bruylants e Vennerman, em 1884, demonstraram que a toxicidade da semente de *Abrus precatorius* devia-se a uma fração protéica que podia ser precipitada com álcool a partir de um extrato aquoso da semente (Moreira et al., 1991). Em 1888, Stillmark, a partir de uma preparação protéica parcialmente pura, obtida de *Rininus communis* (i.e. mamona), a qual foi denominada ricina, testou seu efeito em sangue e

observou que ao adicionar esta lectina à amostra sanguínea as células vermelhas se agrupavam (Beltrão et. al., 2001).

Lectinas são definidas como proteínas que ligam, especificamente e reversivelmente, a mono, oligo ou polissacarídeos sem alterar sua estrutura através de sítios de reconhecimento a carboidrato (Sitohy et al., 2007), desempenhando papéis importantes em eventos celulares como a aglutinação, proliferação celular, opsonização, transdução de sinal, metástases e apoptoses (Tasumi et al., 2002; Nauta et al., 2004; Tateno et al., 2002; Maciel et al., 2004; Tsutsui et al., 2006b; Litman et al., 2007).

Originalmente, lectinas eram consideradas “substâncias semelhantes a anticorpos”. Este termo se refere à aparente especificidade de ligação e não pretendia refletir a similaridade estrutural (Rüdiger & Gabios, 2001). A ênfase que é dada quanto à origem não imune das lectinas serve para distingui-las de anticorpos anticarboidratos que aglutinam células. Enquanto os anticorpos são estruturalmente similares, as lectinas diferem entre si quanto à composição aminoacídica, requerimentos de metais, peso molecular e estrutura tridimensional. Além disso, as lectinas não são apenas encontradas em animais, mas também em outros organismos que não possuem sistema imune, como plantas e bactérias (Moreira et al., 1991).

As lectinas estão presentes em todas as classes e famílias de organismos, sendo encontradas em vegetais superiores, algas, fungos, animais (vertebrados e invertebrados), bactérias e em vírus. Em vegetais, elas são detectadas em centenas de espécies de plantas (Loris, 2002; Sharon & Lis, 2004; Alencar et al., 2005). No reino das plantas, as sementes de leguminosas constituem a principal fonte de lectinas, mas estas também são abundantes em tecidos vegetais tais como: raiz, folha, talo, vagem, frutas, flores e casca (Coelho & Da Silva, 2000; Wu et al., 2000; Coutiño-Rodríguez et al., 2001).

O papel fisiológico das lectinas em plantas não está claramente definido, mas o crescente número de estudos sugere que lectinas são proteínas de defesa que podem proteger contra ataques de predadores como vírus, fungos e bactérias (Cavada et al., 1998; Ratanapo et al., 2001; Sacchettini et al., 2001; Tsutsui et al., 2006a). Atuam na relação simbiótica planta/ microorganismo (Ponchel & Irache, 1998; Cavada et al., 2000; Ratanapo et al., 2001; Limpens & Bisseng, 2003), estimulação, proliferação e crescimento celular (Wititsuwannakul et al., 1998) e na interação parasita/hospedeiro (Van Damme et al., 1997).

Estas lectinas vêm sendo investigadas, de maneira satisfatória, em diversas pesquisas, como na indução da produção de histamina em ratos (Gomes et al., 1994), indução na produção de óxido nítrico (Andrade et al., 1999), efeito protetor *in vivo* contra infecção pela *Leishmania amazonensis* em camundongos BALB/c (Barral-Netto et al., 1996), estimulação linfocitária em humanos (Barral-Netto et al., 1992), aumento na produção de macrófago e linfócito em administrações intraperitoniais em camundongos C3H/HeJ (Rodriguez et al., 1992).

As lectinas podem se ligar a açúcares livres ou a resíduos de carboidratos de polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolípídeos, onde podem estar livres ou ligados à membrana da célula (Monzo et al., 2007). A presença de lectinas é principalmente revelada através de um ensaio de hemaglutinação, como ilustrado na Figura 2, que utiliza uma diluição seriada da lectina antes da incubação com eritrócitos (Coelho & Da Silva, 2000; Pajic et al., 2002).

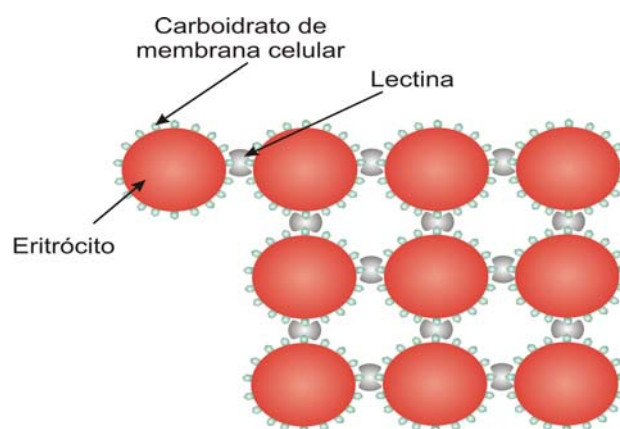


Figura 2. Representação esquemática da hemaglutinação e eritrócitos por lectinas.

Os carboidratos específicos podem se ligar a lectinas através de pontes de hidrogênio, coordenações metálicas, interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas (Schwartz et al., 1993; Drickamer & Taylor, 1998). A especificidade de uma lectina tem sido analisada através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante, utilizando para isto diferentes carboidratos (Gabor et al., 2001; Otta et al., 2002). Os eritrócitos utilizados para este ensaio podem ser humanos ou de animais, onde estes podem ser tratados enzimaticamente (tripsina, papaína, entre outras) ou quimicamente (glutaraldeído ou formaldeído) aumentando ou não a sensibilidade das células a lectina (Correia & Coelho, 1995; Coelho & Da Silva, 2000; Mo et al., 2000).

Vários critérios são utilizados para classificação de lectina, por exemplo, elas podem ser agrupadas dentro de famílias distintas de proteínas homólogas que

apresentam propriedades estruturais comuns, sendo a família das leguminosas a mais estudada e caracterizada (Sharon, 1993; Cavada et al., 1998). Uma outra classificação para lectinas de plantas baseia-se no número de domínios de ligação a carboidratos e outras de natureza não catalítica, dividindo-as em quatro principais tipos distintos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas (Peumans & Van Damme, 1998) e superlectinas (Peumans et al., 2001).

As lectinas, por suas propriedades características, são importantes ferramentas em pesquisa na área da Bioquímica, da Biologia Celular, da Medicina, da Imunologia e áreas relacionadas. Sabe-se, que as lectinas possuem ação pró-inflamatória. Algumas destas induzem a proliferação de linfócitos atuando como agente mitogênico útil para o estudo da interação da lectina com células linfocitárias *in vitro* (Kilpatrick, 1999). A porção sacarídica do receptor de células T (TCR) é provavelmente um sítio específico de ligação com a lectina, promovendo sua ativação e conseqüente proliferação (Maciel et al., 2004).

Em estudos recentes, com lectinas, foi observada: a indução de apoptose em tumor de células humanas (Karasaki et al., 2001); atividade antibacteriana (Gaidamashvili & Standen, 2002; Tasumi et al., 2004); atividade anti-fúngica (Freire et al., 2002; Wang & Ng, 2003); produção dos chamados medicamentos inteligentes, onde estes diferem dos tradicionais por atuarem em células específicas do organismo evitando efeitos colaterais, do tipo provocado pela quimioterapia (Woodley, 2001); atividade mitogênica (Banerjee et al., 2004). A afinidade das lectinas por glicoproteínas de superfície celular tem sido usada para caracterização epidemiológica da *Neisseria gonorrhoeae* e diferenciação de outras espécies de *Neisseria* (Wu et al., 2001).

Vários trabalhos mostraram que determinadas bactérias produzem lectinas específicas para determinados carboidratos, que fazem uso das mesmas para aderir em tecido hospedeiro como sendo o primeiro passo no processo infeccioso. Ao submeter o organismo infectado com a bactéria a injeções de carboidratos, a colonização é reduzida devido à diminuição de sua adesão ao tecido, havendo bloqueio nos locais de ataque das bactérias, um caso claro de terapia antiadesiva contra doenças microbianas. Esta forma de aplicação das lectinas é alvo de intensas pesquisas pelas indústrias farmacêuticas como método contra infecções (Sharon & Lis, 2001; Rudiger et al., 2000). Além de seus papéis fisiológicos, as lectinas estão atraindo um interesse crescente na Biotecnologia, devido a sua habilidade em se ligar a carboidratos com considerável especificidade,

além de serem excelentes modelos para estudos de interações proteína-carboidrato (Rini, 1995).

O conhecimento detalhado dos mecanismos moleculares do reconhecimento de carboidratos pelas lectinas é requerido não apenas para compreender os eventos primários em vários processos biológicos, mas também para traduzi-los em aplicações na Medicina e na Biotecnologia (Raval et al., 2004). Avanços recentes na compreensão da contribuição de glicoconjugados da superfície celular e carboidratos que se ligam a proteínas para processos antiinflamatórios têm motivado a criação de glicoconjugados sintéticos ou lectinas como candidatas para futuras gerações de drogas terapêuticas (Ilarregui et al., 2005).

5. *Parkia pendula*

Pertencente à Família das Leguminosae e subfamília Mimosideae, a *Parkia pendula* recebe como nomes populares: fava de bolota, andirá, angelim, arara-petiú, faveira, paricá-grande, pau de arara, visgueiro, sabiú, rabo de arara, murariena, jupuúba, e sinonímia botânica: *Inga pendula* e *Mimosa pendula*. Sua ocorrência é comum na Região da Zona da Mata dos Estados de Pernambuco e Alagoas, e na Região Amazônica, sul da Bahia, norte do Espírito Santo e floresta pluvial atlântica, com dispersão irregular e descontínua.

Árvore majestosa de copa larga em forma de chapéu de sol, tem inflorescência e depois os frutos pendurados por longos pedúnculos, como ilustrada na Figura 3. Floresce durante agosto-outubro e os frutos amadurecem de dezembro-março, permanecendo por alguns meses na árvore. Produzem grande quantidade de sementes viáveis anualmente, que podem ser armazenadas por mais um ano. Suas flores são hermafroditas, e os frutos vagem glabros e não lenhosos contêm de 10-25 sementes oblongas, envoltas em substância viscosa, chamada de “goma de visgueiro” ou resina, e fétida que prende as sementes às valvas quando o fruto está seco. A obtenção das sementes pode ser diretamente no chão ou dos frutos na árvore quando inicia a queda espontânea, devendo ser secos ao sol para facilitar a abertura manual e retirada das sementes, que em 1,0 kg tem em torno de 8800 unidades (Pio Corrêa, 1984; Lorenzi, 1998).

Uma lectina foi purificada, parcialmente caracterizada e cristalizada a partir de sementes da *Parkia pendula*, PpeL (Lombardi et al., 1998). PpeL tem demonstrado

potencial utilidade como marcador histoquímico de alterações neoplásicas da mama (Beltrão et al., 2001), para a caracterização de tumor meningotelial e para diagnóstico clínico-patológico (Beltrão et al., 2003).



Figura 3. Visão geral da árvore *Parkia pendula* do Jardim Botânico de Pernambuco (Coriolano, M. C.).

JUSTIFICATIVA

As dificuldades muitas vezes encontradas para se manter as condições necessárias ao desenvolvimento cicatricial necessitam de estudos constantes visando à descoberta de meios que favoreçam e acelere o desenrolar do processo cicatricial. O alto índice de perdas cutâneas que acometem os animais domésticos justifica a pesquisa incessante em produtos que acelerem o processo cicatricial.

A Região Nordeste do Brasil apresenta uma flora abundante, da qual podem ser extraídos princípios ativos como as lectinas que possuem propriedades medicinais de grande importância.

Existem várias lectinas que têm se destacado por serem consideradas materiais biológicos eficazes frente à cicatrização experimental, como a lectina de sementes de *Parkia pendula*, PpeL (Porto et al., 2006). Desta maneira PpeL será testada em um novo modelo experimental de reparo de lesões cutâneas, em camundongos normais e imunodeprimidos, a fim de alcançar menores efeitos colaterais, considerando seu potencial cicatrizante.

OBJETIVO

1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento tópico utilizando PpeL frente a lesões cutâneas experimentais em camundongos normais e imunodeprimidos.

Objetivos Específicos

1.2.1 Realizar o tratamento tópico diário de lesões cutâneas experimentais utilizando PpeL.

1.2.2 Acompanhar a evolução do processo de reparo do ponto de vista clínico (avaliação clínica das feridas e mensuração de sua área) durante 12 dias.

1.2.3 Acompanhar a cicatrização do ponto de vista histopatológico, através de biópsias no 2º, 7º e 12º dias de pós-operatório, sendo analisada a possível contaminação das feridas e a estrutura anátomo-funcional das amostras.

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO BIOLOGICALS



PARKIA PENDULA SEED LECTIN: POTENTIAL USE TO TREAT MICE CUTANEOUS WOUNDS

Marília C. Coriolano¹; Cristiane M. L. Melo²; Maria T. S. Correia¹; Paulo J. P. Santos³; Ana M. A. Carneiro-Leão²; Luana C. B. B. Coelho^{1*}.

¹Laboratório de Glicoproteínas ²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), ³Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco – Brazil.

An immunocompromised animal has difficulty to recover after any injury. *Parkia pendula* seed lectin, PpeL, was used to treat cutaneous wounds of normal and immunocompromised mice, with minor collateral effect and cicatrization potential. Methotrexate (0.8 mg/kg/week) was the immunosuppressive drug. Wounds were produced in the dorsal region (1 cm²) of female albino Swiss mice (*Mus musculus*), health and immunocompromised. Wounds were daily topically treated with 100 µl of the following solutions: Group 1 - 0.15 M NaCl; Group 2 - 0.15 M NaCl immunocompromised; Group 3 - PpeL (100 µg/mL); Group 4 - immunocompromised PpeL (100 µg/mL). Clinical evaluation during 12 days included the parameters edema, hiperemy, scab, granulation and cicatricial tissues as well as contraction of wounds. Biopsies for histopathology analysis and microbiological examinations were carried out in the 2nd, 7th and 12th days. The presence of edema and hiperemy was observed in all groups during inflammatory period. The first crust was observed from the 2nd day, only in PpeL treated groups. Microbiological analysis of wounds revealed in day 0 and 2nd day did not show the bacterium in group 3, however it was detected in other groups every day. The lectin markedly reduced area of lesion, inducing a total closing on groups 3 and 4 in 11th day of evolution. Control groups had wounds closed in 12th day. The present study suggests that PpeL is a biomaterial potential to show preliminary pharmacological evidence in the repairing process of cutaneous wounds.

Keywords: Lectin, *Parkia pendula*, cutaneous wound, immunocompromised mice.

*Corresponding author:

Dr Luana C. B. B. Coelho. Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências
Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Av. Moraes Rego, SN,
Cidade Universitária, Recife, 50670-420 Pernambuco, Brasil.

Telephone and fax numbers: Tel: +55-81-2126.8540;

E-mail: mariliacoriolano@uol.com.br

1. Introduction

The skin is a complex organ that function in thermal regulation, protecting against dehydration through evaporation and acts as a mechanical barrier against chemical and biological agent [1].

The cutaneous injuries normally heal in a commanded and efficient way divided in the following phases: hemostasis, inflammatory phase, proliferate phase (or granulation) and remodeling phase of extracellular matrix (ECM or maturation) [2-4]. The healing process is a sequence regulated for ordinate cellular and biochemical events with aim to repair injured tissue integrity. The participation of immune system cells happens for neutrophils, lymphocytes and macrophages migration to lesion site. The cell participates in the inflammatory phase in defence process of the host and is vital to regulate healing process to molecular marker secretions, such as cytokines and factors of growth [5]. After these events fibroblasts and capillaries invade lesion forming granulation contractile tissue that maintain united the lesion margin united. Moreover, keratinocytes migrate to the wound center, restoring the integrity of epidermis. The refurbishment of collagen occurs in the last stage of healing, and may continue by several months. During this period, the ECM is synthesized, deposited, contracted and remodeled. The proteolytic enzymes such as matrix metalloproteases (MMP) have fundamental importance in this process [6-8].

It is a common knowledge through centuries of clinical comments, that the infection of wounds compromises the wound healing. Infected wounds heal more slowly and, if they not treated adequately could cause systemic infections of skin frequently induced by the transitory flora, composed mainly of *Staphylococcus aureus* or *Streptococcus pyogenes*. The infection compromises reepithelization and increases collagen deposition [9, 10].

Many studies have used immunosuppression to elucidate the biochemical stages involving the repair process and, mainly, the immune reply of the organism front to injury. The cyclosporine, methotrexate [11, 12] and cyclophosphamide [13] are among the most used immunossupressor drugs in these studies in function of its mechanism of action to involve the blockade and inactivation of cytokines, factors of growth, integrins and polimorphonuclear cells (PMN), which allowed the briefing of some cicatricial process stages [14].

A great number of lectins with distinct characteristics and specificities have extended its use, as biomaterials, in medical and biological processes. These carbohydrate recognition proteins are ubiquitous in organisms. The majority of plant seed lectins are present mainly in leguminous and constitute about 10% of total proteins of seed, however the isolated amount is small and it varies among 0.1-1% of total [15, 16]. The called biomaterial can be used in the rehabilitation of injuries, which is defined as any molecule that has the capacity to interact with the biological system without inducing an adverse reply in the host [17].

The aim of this work was the evaluation of topical treatment with PpeL of experimental cutaneous wounds in organisms of healthy and immunocompromised mice, to reach minor collateral effect, considering the cicatrization potential.

2. Materials and methods

2.1 Animals

Females of albino *Swiss* mice (n=120), weight 45.0 ± 2.0 g were obtained from the Immunopathology Laboratory Keizo Asami Federal University of Pernambuco (Universidade Federal de Pernambuco) – UFPE. Each animal was maintained in an individual cage, under controlled environmental conditions (12-h light/dark cycle, temperature $23 \pm 2^\circ\text{C}$ and humidity $55 \pm 10\%$) with water and commercial food *ad libitum* (Labina®, Agribands of Brazil). All animal procedures were in accordance with the ethical norms of the International Guiding Principles of Biomedical Research Involving Animals to the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) (Genebra, 1985) and the Ethical Committee of UFPE.

2.2 Lectin from *Parkia pendula*

P. pendula seed extract (10% w/v prepared in 0.15 M NaCl was fractionated using 20-40%, w/v, ammonium sulphate) and the obtained fraction was submitted to

affinity chromatography in Sephadex G-75. PpeL was bioselectively eluted with 0.3 M D-glucose in 0.15 M NaCl, and dialyzed against 0.15 M NaCl. Hemagglutinating Activity (HA) was in the presence of rabbit erythrocytes. Protein concentration was determined according to the method of Lowry et al [18].

2.3 Immunosuppression induction

Methotrexate (MTX) was administered intramuscularly in 0.15 M NaCl in each animal using a low-dose (0.8 mg/kg/week) in groups 2 and 4. MTX was administered weekly on 7 days before surgery, on surgery day and 7 days after surgery [11].

2.4 Experimental protocols and groups

Animals were divided into four groups (n=30/group) and for the surgical procedure were previously anesthetized using 2% xilazine chloridate (10 mg.Kg⁻¹) and 10% ketamine chloridate (115 mg.Kg⁻¹) in subcutaneous injections [19]. Each animal was placed in prone position and prepared for aseptic surgery using 2% chlorexidine digluconate. A standard wound (1 cm²) was preformed on the dorsal thoracic region using scalpel and curved blade surgical scissors after removal of epidermal and dermal layers with minimal bleeding. Wounds were daily topically treated with 100 µl of solutions according to mice Groups: 1 - 0.15M NaCl; 2 - 0.15M NaCl immunocompromised; 3 - PpeL (100µg/mL); 4 - immunocompromised PpeL (100µg/mL).

2.5 Clinical evaluation and contraction of wounds

The clinical characteristics of experimental wounds were evaluated every day after surgery (AS), taking into consideration the following aspects: edema, hiperemy, scab, granulation and cicatricial tissues. Daily, wound areas were measured with pachymeter support and were calculated, starting from borders of wounds, using the equation $A = \pi [(R + r) / 2]^2$ (A = wound area; R and r the large and smaller radii of wound, respectively) [20].

2.6 Histopathological analysis

On each time of biopsy, at the 2nd, 7th and 12th days after surgery, animals were subjected to subcutaneous anesthesia were 10 animals were draw back of the experimental groups across euthanasia with cervical disruption. After anesthesia, as

previously described, samples (fragments of the transition area between complete and wounded skin) were collected. Immediately after withdrawal of skin, samples were disposed on filter paper and incubated in formaldehyde 4% (v/v) prepared in Phosphate Buffered Saline (PBS) 10mM pH 7.2 and submitted to the histopathology's procedures. Each fragment of skin was dehydrated in crescent concentrations of ethanol, dehydrated in xylol and unblocked in paraffin. After microtomy (5 μ m), the slices had been stained with Trichromic of Masson [21].

2.7 Microbiological evaluation

The microbiological evaluation was carried out through collections by means of "Swabs" after surgery (day 0) and at the moment of the biopsies (2nd, 7th and 12th days AS). The material was sown in plates on Petri containing agar nutrient and incubated in a bacteriological greenhouse at 37° C for 24 h. When contaminated, the bacteria had been identified through the morphologic aspects of colonies and staining pattern of Gram [22].

2.8 Statistical analysis

The analysis utilized statistical tests with the software Statistic 5.1. The homocedasticity of variance was evaluated. Aiming to determine if the area of contraction of the lesion was significantly different among the days of analysis, the variables were transformed in sine arc of the root and then Analysis of UNi – factorial Variances (One way Anova) were used. Following, the Least Significant Difference test (LSD) was used to determine among which groups were observed significant difference. For the tests and analysis, the level of significance adopted to reject the null hypothesis (H_0) were 5% ($\alpha = 0,05$).

3. Results

3.1 Clinical evaluation

The presence of edema was observed in all groups during the inflammatory period. The clinical signal stayed until 6th day in group 3 and 4th day of group 4. A significant difference occurred in the parameter edema in group 3 in relation to the control, which showed edema until 6th day in group 1 and until 8th day in group 2. Due to the dilatation of vascular stream present in lesion region, the hyperemia whose purpose is to increase the supplement of oxygen and nutrients to the attacked tissue was

observed in the animals in group 3 until 6th day and in group 4 until 4th day. In this stage animals in group 2 and group 1 were still presenting this signal in the 7th day. This inflammatory characteristic was more intense in the control groups 1 and 2 in relation to PpeL treated groups 3 and 4.

The first crust was observed from the second day only in PpeL treated groups. Between the 2nd to 8th days in group 3; 2nd to 11th days in group 4; 2nd to 11th days in group 2 and in the 1st to 4th days in group 1 in all animals showed first crust. A significant difference was occurred with formation the second crust identified macroscopically between the 5th to 10th day in group 1. However, the second crust, that is formed when it is complete or partial unfastening of the first crust in the injured tissue enough to dry up and consequently to form the second crust.

The presence of the granulation tissue was observed between the 3th to 7th days in group 3; the 5th to 11th days in group 4, while in group 1 was observed between 4th to 11th days and the group 2 was observed between 7th to 12th days. The presence of the granulation tissue was observed in all groups with a delay in the controls groups.

The evolution of the injured areas and related contraction averages are illustrated in the Figure 1. The statistical analysis by variance analysis (ANOVA) with $p \leq 0.05$ demonstrated a significant difference in the average of the area contraction in the injuries of treated group 3 ($p = 0.039$) and the subsequent LSD test ($p \leq 0.05$) confirmed this significant difference during the 12 days (Table 1). In experimental mice, closing of all injuries was observed for the control groups in day 12, and for the groups 3 and 4 in day 11 (Table 1).

3.2 Microbiological Evaluation

The microbiological analysis of injuries disclosed a good surgical asepsis (in time 0) and all the groups were contaminated to the long of 12 days. At zero time no microbial growth was found showing that the assay was carried out in aseptic way. Animals of all groups presented the commensally bacterium *Staphylococcus* sp. that belongs to normal skin microbiota. In day 0 and 2nd day did not show the bacterium in group 3, however it was detected in other groups every day.

3.3 Histopathological Analysis

The histopathological slices differed from the macroscopic aspect of injuries. On the 2nd day groups 3 and 4 presented a transition area between the complete skin and

injury, most defined than the control groups 1 and 2. In this period the control and treated groups presented similar histopathological characteristics, such as crust, infiltrated inflammatory, angiogenesis or neovascularization, suggesting a beginning of vascular granulation tissue (Figures 1 and 2).

On the 7th day the transition areas of injuries from groups 3 and 4 were characterized by a reepithelization more extensive in direction to the center of injury, supported by a fibrovascular granulation tissue and presence of keratin. In relation to infiltrate inflammatory and PMN it was observed a deficiency or reduction of cells in the site of injuries from immunocompromised animals, in relation to health animals (Figures 1 and 2).

On the 12th day the injuries of groups 3 and 4, besides been closed first than its respective control groups, demonstrated an excellent repair in relation to deposition of collagen, presence of keratin and beginning of annex sprout developments (Figure 2). Control group 1 showed significant collagen deposition and reepithelization. On group 2 histopathological slices demonstrated that it was deposited a matrix poor in collagen fibers in the site of wound that conferred local tension fragility and inefficient tissue repair (Figure 1).

4. Discussion

Parkia pendula belongs to the Leguminosae family Mimosoideae subfamily, and is popularly known in Brazil as visgueiro [23, 24]. A glucose/mannose specific lectin was purified, partially characterized and crystallized from seeds of *P. pendula*, PpeL [25]. PpeL showed to be a potential histochemical marker to breast neoplastic alterations [26], useful for characterization of meningothelial tumour and clinico-pathological diagnosis [27].

Lectins extracted from plants have already been used as biomaterials to modulate the biological reply of individuals and have demonstrated the capacity of cell activation from the immune system [28, 29]. Immune cells are vital to regulate the wound healing process through secretion of signaling molecules, such as cytokines, lymphokines and factors of growth [5].

It has been showed that plant lectins have pro-inflammatory action [30, 31]. Some induced the proliferation of lymphocytes, acting as useful mitogenic agents for the study of lectin interaction with lymphocyte cells *in vitro* [32]. The carbohydrate portion of the T cell receptor is probably a specific site of lectin binding, promoting its

activation and consequent proliferation [33]. Many leguminous lectins of glucose-mannose specificity stimulate pro-inflammatory effects mediated by its binding to monosaccharides [28]. Kesharwani & Sodhi [34] believe that Concanavalin A (Con A) induces activation of macrophages from BALB/c mice *in vitro*, which could be observed by the production of various pro-inflammatory cytokines including TNF- α , whose production by activated macrophages is central to immuno-regulatory role of macrophages.

In respect to the inflammatory characteristics, the reduction of PMN cells in the site of injuries of immunocompromised animals can be justified by the action of immunosuppressor used, MTX, which affects directly the subunit CD18 molecule that constitute β 2 integrin of lymphocyte cellular surface [11]. The β 2 integrin is necessary to normal development of inflammatory reply; deficiency of CD18 subunit do not induce leukocyte migration to tissues due to lack of a firm adhesion to endothelium and, as a result, it has a reduction in inflammation site [35]. However, the higher incidence of PMN in inflammatory site in groups 3 could be explained in previous studies that showed stimulation of neutrophil migration [28, 16], mitosis of lymphocytes [33] and release of histamine in mastocytes for lectins.

In the fibroplasia phase it could be observed that injuries of group 3 showed meaningful collagen deposition, however this aspect was suffering poor deposition on group 4. After the inflammatory phase occurs appears growing to fill cutaneous imperfection through a neovascularization, being granulation tissue filled later on with collagen mainly of type III [36]. Studies affirmed that CD18 present in the surface of phagocytes (i.e. neutrophils) during the migration emits a chemical signal that induces infiltrates of macrophages to secretion of TGF- β 1 [14]. Therefore the lack of CD18 in one or another cell leads to an extremely reduced release of TGF- β 1 due to defective adhesion and to subsequent extravasation of phagocyte in injured area. The deficient release of TGF- β 1 promotes a delay in arrival in myofibroblasts in the site of injury with a consequence of deficit collagen staple fiber depositions [37]. The fibroblast differentiation in myofibroblast represents a key event on cicatricial process; increasing of contractile force is the principal aspect observed [38].

The adhesion to the endothelium is a prerequisite for the movement of leukocytes from blood to tissues, a factor characteristic of inflammation. It has been showed that recognition of carbohydrate specific cells by membrane lectins may mediate, at least in part, adhesion to cells of vascular endothelium and migration of

leukocytes to inflamed tissues [28]. Plants lectins, especially glucose-mannose specific lectins similar to Con A, can modulate the recruitment of neutrophils by indirect mechanisms [16].

The final and important stages in cicatricial process are characterized by total closing of injury. PpeL demonstrated to be efficient in the contraction of area in the injury in all days, in animals with normal and immunocompromised health. Various aspects in healing process are considered among them and constitute the characteristic type of closing injuries.

The "swabs" carried through wounds of animals had been accurate in the area of injury, or either, over the crust. Then, no matter how contaminated the wounds were they did not have a local infection to reveal secretions or significant alterations. Moreover, identified microorganisms belonged to natural animal microbiota, or either, *Staphylococcus* sp. and *Micrococcus* sp. Bacteria [39]. In this work, the microbiological analysis of injuries disclosed in day 0 and 2nd day did not observe presence of *Staphylococcus* sp. in group 3, however it was observed the presence in other groups every day. The lectin markedly reduced area of lesion, inducing a total closing on groups 3 and 4 in 11th day of evolution. Control groups had wounds closed in 12th day. The present study suggests that PpeL is a biomaterial potential to show preliminary pharmacological evidence in the repairing process of cutaneous wounds.

The utility of lectins to detect and study carbohydrates in solution and cell surfaces, as well as their ubiquitous occurrence in nature, represent a major stimulus to its continuous evaluation as viable excipients for pharmaceutical and medical applications [40].

5. Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants and fellowship (LCBBC).

6. References

- [1] Balasubramani M, Kumar TR, Babu M. Skin Substitutes. Burns (In Review), 2001.
- [2] Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous Wound Healing. The New England Journal of Medicine 1999; 341: 738-746,

- [3] Clark RAF. Fibrin and wound healing. *Ann New York Acad Sci* 2001; 936: 355-367.
- [4] Laurens N, Koolwijk P, De Maat MPM. Fibrin structure and wound healing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006; 4: 932-939.
- [5] Park JE, Barbul AB. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery* 2004; 187: 11S-16S.
- [6] Pilcher BK, Wang M, Qin XJ, Parks WC, Senior KM, Welgus HG. Role of matrix metalloproteinases and their inhibition in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1999; 878: 12-24.
- [7] Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends in Cell Biology* 2003; 13: 264-269.
- [8] Phillips JA, Bonassar LJ. Matrix metalloproteinases activity synergizes with $\alpha 2\beta 1$ integrins to enhance collagen remodeling. *Experimental Cell Research* 2005; 310: 79-97.
- [9] Singer A, McClain A. Persistent wound infection delays epidermal maturation and increases scarring in thermal burns. *Wound Repair and Regeneration* 2002; 10: 372-377.
- [10] Inngjerdinger K, Nergard C, Diallo D, Mounkoro PP, Paulsen BS. An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dongoland, Mali, West Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 92: 233-244.
- [11] Ciesielski CJ, Mei J, Piccinini LA. Effects of Cyclosporine A and methotrexate on CD18 expression in recipients of rat cardiac allografts. *Transplant Immunology* 1998; 6: 122-133.
- [12] Koning BAE, Dieren JMV, Lindenberg-Kortleve DJ et al. Contributions of mucosal immune cells to methotrexate-induced mucositis. *International Immunology* 2006; 18: 941-949.
- [13] Garcia M, Silvio OS, Alves GJ et al. Uso da Ciclofosfamida em modelo de Imonodepressão experimental em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2004; 24: 115-119.
- [14] Peters T, Sindrilaru A, Wang H et al. CD18 in Monogenic and Polygenic Inflammatory Process of the skin. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 2006; 11: 7-15.
- [15] Loris R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1572: 198-208.
- [16] Alencar VBM, Assreuy MAS, Alencar MNN et al. Lectin of *Pisum arvense* seeds induces in vivo and in vitro neutrophil migration. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2005; 57: 375-381.

- [17] Spector M. Biomaterials. In: Plastic Surgery, Indications, Operations, Outcomes. Achauer B, Eriksson E, Guyuron B. Mosby. Year Book 2001; p. 239-259.
- [18] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 1951; 193-265.
- [19] Hall LW, Clark KW. Veterinary anaesthesia. 9 rd ed. London: Ballière Tindall; 1991.
- [20] Prata M, Haddad C, Goldenberg S. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. Acta Cirúrgica Brasileira 1988; 3: 43-48.
- [21] Michalany J. Técnica histológica em anatomia patológica. 2 rd ed. São Paulo: Michalany, 1991.
- [22] Carter GR. Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária. 1 rd ed. São Paulo: Roca, 1988.
- [23] Pio Corrêa M. Dicionário das plantas úteis do Brasil, e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: IBDF - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.
- [24] Lorenzi H. Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil 1998; 1: 183.
- [25] Lombardi FR, Fontes MRM, Sousa GMO, Coelho LCBB, Arni RK, Azevedo Jr WF. Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of *Parkia pendula* Lectin. Protein and Peptide Letters 1998; 5: 117-120.
- [26] Beltrão EIC, Cabral T, Figueredo-Silva J, Coelho LCBB, Carvalho Jr LB. Infiltrating Ductal Mammary Carcinoma: A Lectin histochemistry study. In: Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de Pernambuco 2001, v. 46.
- [27] Beltrão EIC, Medeiros PL, Rodriguez GZ, Figueredo-Silva J, Valença MM, Coelho LCBB, Carvalho Jr. LB. *Parkia pendula* Lectin as Histochemistry Marker for Meninge Tumor. European Journal of Histochemistry 2003; 47: 137-142.
- [28] Alencar NMN, Assreuy AMS, Alencar VBM et al. The galactose-binding lectin from *Vatairea macroparca* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. The International Journal of Biochemistry & Cellular Biology 2003; 35: 1674-1681.
- [29] Barauna SC, Kaster MP, Heckert BT, Nascimento KS, Rossi FM, Teixeira EH, Cavada BS, Rodrigues AL, Leal RB. Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (Con Br) administered centrally in mice. Biochemistry and Behavior 2006; 85: 160-169.
- [30] Alencar NMN, Assreuy MAS, Criddle DN, Souza EP, Soares PMG, Havt A, Aragao KS, Bezerra DP, Ribeiro RA, Cavada BS. *Vatairea macrocarpa* lectin

induces paw edema with leukocyte infiltration. *Protein and Peptide Letters* 2004; 11: 195-200.

[31] Rubinstein N, Ilarregui JM, Toscano MA, Rabinovich GA. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens* 2004; 64: 1–12.

[32] Kilpatrick DC. Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1572: 187– 97.

[33] Maciel EVM, Araujo-Filho VS, Nakazawa M, Gomes YM, Coelho LCBB, Correia MTS. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals* 2004; 32: 57-60.

[34] Kesharwani V & Sodhi A. Quantitative role of p42/44 and p38 in the production and regulation of cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-12 by murine peritoneal macrophages *in vitro* by Concanavalin A. *Cytokine* 2007; 37: 62–70.

[35] Sindrilaru A, Seeliger S, Ehrchen JM et al. Site of Blood Vessel Damage and Relevance of CD18 in a Murine Model of Immune Complex-Mediated Vasculitis, *Journal of Investigative Dermatology* 2006.

[36] Robbins SL, Cotran RS. *Patologia – Bases Patológicas das Doenças*. 7rd ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

[37] Ronty MJ, Leivonen SK, Hinz B et al. Isoform-Specific Regulation of the Actin-Organizing Protein Palladin during TGF- β 1-Induced Myofibroblast Differentiation. *Journal of Investigative Dermatology* 2006; 126: 2387–2396.

[38] Hinz B. Formation and function of the myofibroblast. *Journal of Investigative Dermatology* 2007; 127: 526-537.

[39] Singer AJ, McClain A. Persistent wound infection delays epidermal maturation and increases scarring in thermal burns. *Wound Repair and Regeneration* 2002; 10: 372-377.

[40] Toegel S, Harrer N, Plattner VE, Unger FM, Viernstein H, Goldring MB, Gabor F, Wirth M. Lectin binding studies on C-28/I2 and T/C-28a2 chondrocytes provide a basis for new tissue engineering and drug delivery perspectives in cartilage research. *Journal of Controlled Release* 2007; 117: 121–129.

LIST OF CAPTIONS

Table 1. Significant differences in the average of contraction area of injuries by LSD test.

Figure 1. Histopathological aspects of the cutaneous wound treated with 0.15 M NaCl, Trichromic of Masson. Group 1: **A** (200X, 2nd); **B** (100X, 7th) and **C** (100X, 12th). Group 2: **D** (200X, 2nd); **E** (200X, 7th) and **F** (100X, 12th). c-crust; i-infiltrated inflammatory; a-angiogenesis; v-vascular granulation tissue; ep-epidermis; fv-fibrovascular granulation tissue; d-dermis.

Figure 2. Histopathological aspects of the cutaneous wound treated with PpeL, Trichromic of Masson . Group 3: **A** (100X, 2nd); **B** (100X, 7th) and **C** (100X, 12th). Group 4: **D** (100X, 2nd); **E** (100X, 7th) and **F** (100X, 12th). c-crust; i-infiltrated inflammatory; a-angiogenesis; fv-fibrovascular granulation tissue; ep-epidermis; tf-fibers tissue; ac- cutaneous annex; k- keratin.

Table 1

DAY	<i>Groups</i>			
	1	2	3	4
Area of experimental wounds (cm ²)				
2	0.916 ± 0.011 ^a	0.977 ± 0.093 ^a	0.964 ± 0.067 ^b	0.978 ± 0.354 ^c
3	0.803 ± 0.006 ^a	0.937 ± 0.009 ^a	0.853 ± 0.122 ^b	0.939 ± 0.156 ^c
4	0.800 ± 0.007 ^a	0.86 ± 0.064 ^a	0.785 ± 0.122 ^b	0.850 ± 0.049 ^c
5	0.775 ± 0.169 ^a	0.741 ± 0.047 ^a	0.704 ± 0.078 ^b	0.732 ± 0.028 ^c
6	0.754 ± 0.190 ^a	0.491 ± 0.221 ^a	0.659 ± 0.078 ^b	0.521 ± 0.049 ^c
7	0.579 ± 0.173 ^a	0.423 ± 0.177 ^a	0.448 ± 0.009 ^b	0.368 ± 0.049 ^c
8	0.495 ± 0.165 ^a	0.292 ± 0.012 ^a	0.254 ± 0.010 ^b	0.156 ± 0.113 ^c
9	0.190 ± 0.146 ^a	0.174 ± 0.009 ^a	0.113 ± 0.007 ^b	0.074 ± 0.071 ^c
10	0.154 ± 0.365 ^a	0.075 ± 0.022 ^a	0.074 ± 0.006 ^b	0.046 ± 0.127 ^c
11	0.099 ± 0.081 ^a	0.003 ± 0.008 ^a	-	-

Mice Groups: **1** - 0.15 M NaCl; **2** - 0.15 M NaCl immunocompromised; **3** - PpeL (100 µg/mL); **4** - immunocompromised PpeL (100 µg/mL). Lyrics (a, b and c) equal in the horizontally did not differ significantly to the level of 5% of significance by LSD test.

Figure 1

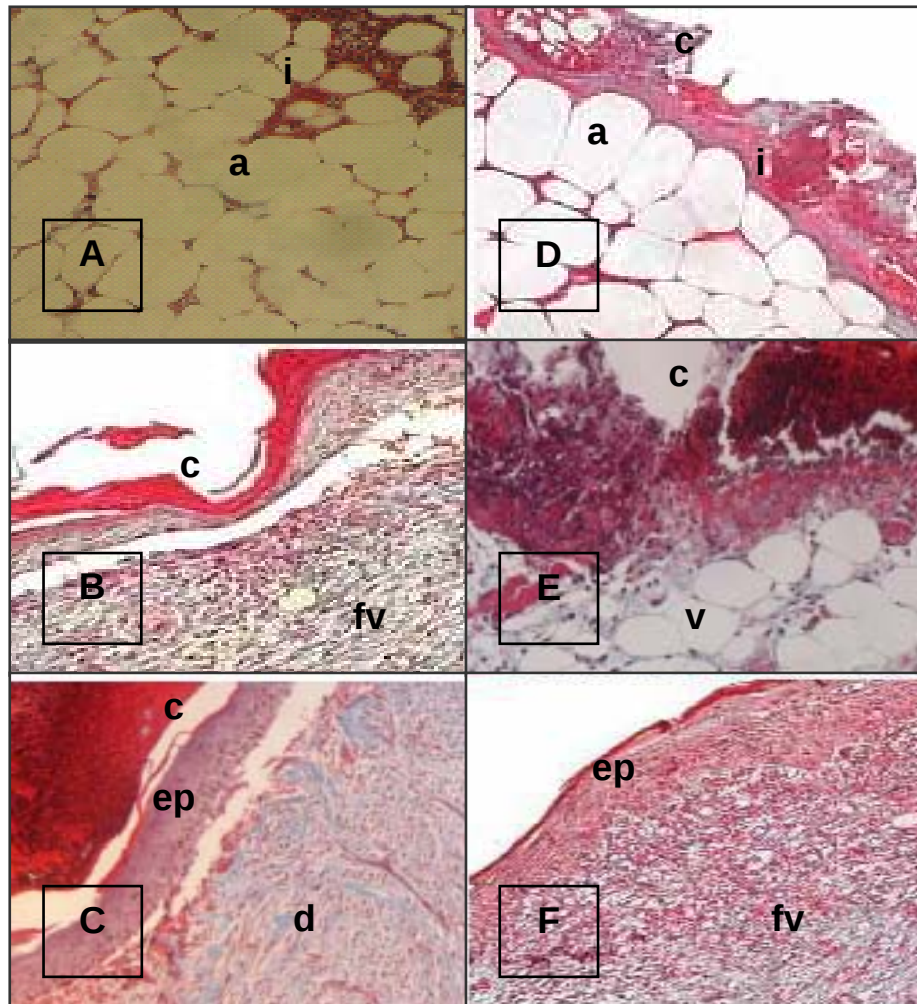
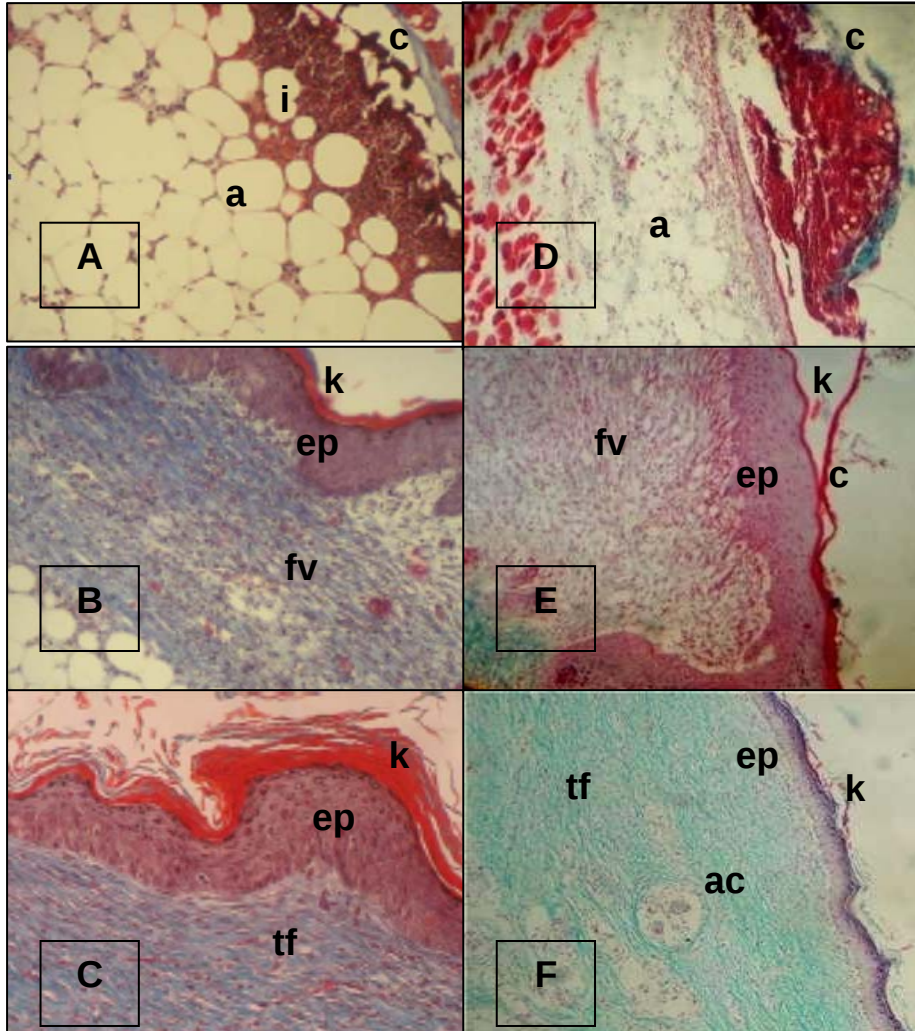


Figure 2



CONCLUSÕES

- Os sinais inflamatórios iniciais e de reparo das lesões foram menos intensos e permaneceram por menos tempo nos grupos 3 e 4 tratados com PpeL.
- A diminuição da área ocorreu de forma significativa nos grupos 3 e 4 em relação aos seus respectivos controles.
- A análise microbiológica das lesões revelou que o grupo 3 nos dias 0 e 2 não apresentou *Staphylococcus* sp., microorganismo que faz parte da microbiota normal da pele, entretanto foi observada a presença da bactéria nos outros grupos todos os dias.
- A análise histopatológica das lesões apresentou pequenas diferenças entre os grupos 3 e 4 e seus respectivos controles, sendo evidenciada a presença de um tecido de granulação fibroso nos grupos tratados.
- Os resultados obtidos demonstraram que PpeL é capaz de estimular o processo cicatricial tanto em animais com saúde normal, como em animais imunossuprimidos.

PERSPECTIVAS

O presente estudo oferece evidência farmacológica preliminar sobre o uso de PpeL como provável biomaterial frente ao processo de cicatrização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 486 p, 2002.

ALENCAR, V.B.M., ALENCAR, N.M.N., ASSREUY, A.M.S., MOTA, M.L., BRITO, G.A.C., ARAGÃO, K.S., BITTENCOURT, F.S., PINTO, V.P.T., DEBRAY, H., RIBEIRO, R.A., CAVADA, B.S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 1805-1814, 2005 .

ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, v. 194, n. 1, p. 98-102, 1999.

ARBISER, J. L. Angiogenesis and the skin: a primer. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 34, p. 486-497, 1996.

ARMSTRONG, D. G.; JUDE, E. B. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, c. 92, p. 12-18, 2002.

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

BANERJEE, S.; CHAKI, S.; BHOWAL, J. CHATTERJEE, B. P. Mucin binding mitogenic from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 421, p. 125-134, 2004.

BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R. L.; TEIXEIRA, K. et. al. *In vivo* protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on Balb/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, v. 60, p. 237-250, 1996.

BEANES, S. R.; DANG, C.; SOO, C.; TING, K. Skin repair and ocar formation: the central role of TGF- β . **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, p. 1-22, 2003.

BELTRÃO, E. I. C.; CABRAL, T.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B.; CARVALHO, JR. L. B. (2001) Infiltrating Ductal Mammary Carcinoma: A Lectin histochemistry study. In: **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de Pernambuco**, v. 46.

BELTRÃO, E. I. C.; MEDEIROS, P. L.; RODRIGUEZ, G. Z.; FIGUEREDO-SILVA, J.; VALENÇA, M. M.; COELHO, L. C. B. B.; CARVALHO, JR. L. B. *Parkia pendula* Lectin as Histochemistry Marker for Meninge Tumor. **European Journal of Histochemistry**, v. 47, p. 137-142, 2003.

BENTO, C. A. S. **Estudo da interface Ti-6 Al – 4V/ TiO₂ por microscopia eletrônica de varredura**, 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de

Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São paulo, 2000.

BEREL, J. F. et al. *In vivo* pharmacological effects of ciclosporin and some analogues. **Gene. Pharmacol.**, v. 29, p. 42, 1996.

BERGSTON, N.; ALLMAN, R. M.; ALVAREZ, O. M.; BENNETT, C. E.; CARLSON, C. E.; FRANTZ, R. A.; GARBER, S. L.; GOSNELI, D.; JACKSON, B. S.; KAMINSKI, M. V.; KEMP, M. G.; KROSKOP, T. A.; LEWIS, V. L.; MAKLEBUST, J.; MARGOLIS, D. L.; MARVEL, R. M.; REGER, S. L.; RODEHEAVER, G. T.; SALCIDO, R.; XAKELLIS, G. C.; YARKONY, G. M. Pressure ulcer treatment: quick reference guide for clinicians. **Advances in Wound Care**, v. 8, n. 2, p. 22-44, 1995.

BIKOWSKI, J. Antimicrobial wound management in the emergency department: an educational supplement. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 1, p. 197-206, 1998.

BLANES, L. Tratamento de feridas. **Cirurgia Vascular: Guia ilustrado**. Baptista-Silva, JCC, editor. São Paulo, 23 p, 2004.

BONDENSON, J. The mechanisms of action of diseases-modifying antirheumatic drugs: a review with emphasis on macrophage signal transduction and the induction of proinflammatory cytokines. **Gene. Pharmacol.**, v. 29, p. 127-150, 1997.

CALVIN, M. Cutaneous wound repair. **Wounds**, v. 10, p. 12-32, 1998.

CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. **Avaliação da atividade cicatrizante da lectina de *Parkia pendula* em feridas isquêmicas experimentais**. IN: Caminhos da Ciência, Recife: EDUFERPE, v. 1, p. 133, 2006.

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.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANJEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUZA, F. A. M.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v. 49, p. 675-680, 1998.

CAVADA, B. S.; MADEIRA, S. V.; CAL VETE, J. J.; SOUZA, L. A.; BOMFIM, L. R.; DANTAS, A. R. LOPES, M. C.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, B. T.; PINTO, V. P.; LEITE, K. B. & RAMOS, M. V. Purification, chemical and immunochemical proprieties of a new lectin from Mimosoideae (*Parkia discolor*). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, p. 271-280, 2000.

CHOI, S.; CHUNG, M. A review on the relationship between aloe vera components and their biologic effects. **Seminars in Integrative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 53-62, 2003.

CLARK, L. D.; CLARK, R. K.; HEBER-KATZ, E. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 88, n. 1, p. 35-45, 1998.

COELHO, L. C. B. B. & DA SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 1-6, 2000.

CORREIA, M.T.S. & COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/manose specific Lectin, isoforma 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and biotechnology**, v. 55, 3, p. 261-73, 1995.

COUTIÑO-RODRÍGUEZ, R.; HERNÁNDEZ-CRUZ, P. & GILES-RÍOS, H. Lectins in fruits having gastrointestinal activity: Their participation in the hemagglutinating property of *Escherichia coli* 0157:H7. **Archives of Medical Research**, v. 32, p. 251-257, 2001.

DESMOULIÈRE, A.; CHAPONNIER, C.; GABBIANE, G. Tissue repair, contraction and the myofibroblast. **Wound repair and Regeneration**, v. 13, p. 7-12, 2005.

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

DRICKAMER, K. & TAYLOR, M. E. Evolving views of protein glycosylation. **Trends Biochemistry Science**, v. 23 (9), p. 321-324, 1998.

DIPIETRO, L.; BURNS, A. L. **Wound healing: methods and protocols**. New Jersey: Humana Press, 2003. p. 38-46

EHRlich, H. P.; DIEZ, T. Role for gap junctions intercellular communications in wound repair. **Wound Repair and Regeneration**, v. 11, p. 481-489, 2003.

FAZIK, M. J.; ZITE, J. A.; GOSLEN, J. B. Cicatrização de feridas. In: COLEMAN, W. P.; HANKE, W. **Cirurgia cosmética, princípios e técnicas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, p. 18-38, 2000.

FREIRE, M.G.; GOMES, V.M.; CORSINI, R.E.; MACHADO, O.L.T.; DE SIMONE, S.G.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

GABOR, F.; KLAUSEGGER, U.; WIRTH, M. The lectin interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221 (1,2), 19, p. 35-47, 2001.

GAIDAMASHVILI, M.; STANDEN, J. V. Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 131-135, 2002.

GOMATHI, K.; GOPINATH, D.; AHMED, M. R.; JAYAKUMAR, R. Quercetin incorporated collagen matrices of dermal wound healing process in rat. **Biomaterials**, v. 24, p. 2767-2772, 2003.

GOMES, J.C.; FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. comparison with Concanavalin A. **Agents Actions**, v. 41(3-4), p. 132-5, 1994.

GUILLÉN, M. E. N.; EMIM, J. A. S.; SOUCCAR, C. et al. Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract of *Plantago major* L. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, p. 99-104, 1997.

IBA, Y.; SHIBATA, A.; KATO, M. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1879-1880, 2004.

ILARREGUI, J. M.; BIANCO, G. A.; TOSCANO, M. A.; RABINOVICH, G. A. The coming of age of galectins as immunomodulatory agents: impact of these carbohydrate binding proteins in T cell physiology and chronic inflammatory disorders. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 64, p. 96-103, 2005.

INNGJERDINGER, K.; NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; MOUNKORO, P. P.; PAULSEN, B. S. An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dongoland, Mali, West Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 233-244, 2004.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M.; **Imunobiologia: O Sistema Imune na Saúde e na Doença**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 262-359.

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

KARASAKI, Y.; TSUKAMOTO, S.; MIZUSAKI, K.; SUGIURA, T.; GOTOH, S. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. **Food Research International**, v. 34, p. 7-13, 2001.

KILPATRICK, D. C. Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. **Molecular Biotechnology**, v. 11, p. 55-65, 1999.

LAURENS, N.; KOOLWIJK, P.; DE MAAT, M. P. M. Fibrin structure and wound healing. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, p. 932-939, 2006.

LIMPENS, E.; BISSELING, T. Signaling in symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 343-350, 2003.

- LITMAN, G. W.; DISHAW, L. J.; CANNON, J. P.; HAIRE, R. N.; RAST, J. P. **Alternative mechanisms of immune receptor diversity**. *Current Opinion in Immunology*, v. 19 (5), p. 526-534, 2007.
- LOMBARDI, F. R.; FONTES, M. R. M.; SOUSA, G. M. O.; COELHO, L. C. B. B.; ARNI, R. K.; AZEVEDO Jr., W. F. Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of *Parkia pendula* Lectin. **Protein and Peptide Letters**. v. 5, p. 117-120, 1998.
- LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; HERNANDES, L.; MELLO, J. C. P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. And *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of curaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 99, p. 265-272, 2005.
- LORENZI, H. *Parkia pendula*. Árvores Brasileiras. **Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**, v. 1, p. 183, 2º ed., 1998.
- LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 198-208, 2002.
- MACIEL, E. V. M.; ARAÚJO-FILHO, V. S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y. M.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32 (1), p. 57-60, 2004.
- MARTIN, P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, p. 74-81, 1997.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, Jr. C. Innate immunity. **N. Eng. J. Med.**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.
- MITCHELL, M. S.; Combining chemotherapy with biological response modifiers in treatment of cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 80, p. 1445-1450, 1988.
- MO, H.; WINTER, H. C. & GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of a Neu5alpha2-6Galbeta1-4Glc/GlcNA-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10623-10629, 2000.
- MONZO, A.; BONN, G. K. & GUTTMAN, A. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26 (5), p. 23-43, 2007.
- MOREIRA, R.A.; SOUSA-CAVADA, B.; OLIVEIRA, J.T.A.; AINOUEZ, I.L. **Plants lectins in : Proceeding of the First Brazilian Congresso in Proteins**. (Oliveira, B. e Sgabieir, S.). Unicamp, Campinas, 1991. p. 71-96
- MORIS, R. E. Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs. **Ther Drug Monit**, v. 17, p. 564-569, 1995.

MOORE, K. Cell biology of chronic wounds: the role of inflammation. **J. Wound Care**, v. 8, n. 7, p. 345-348, 1999.

MORISON, M.; MOFFATT, C.; BRIDEL-NIXON, J.; BALE, S. **A colour guide to the nursing management of chronic wounds**. London: Mosby, 1997, p. 298. 2. ed.

MOULIN, V.; AUGER, F. A.; GARREL, D.; GERMAIN, L. Role of wound repair myofibroblasts on re-epithelization of human skin. **Burns**, v. 26, p. 3-12, 2000

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T.; Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 379-390, 2005.

NAUTA, A. J.; CASTELLANO, G.; XU, W.; WOLTMAN, A. M.; BORRIAS, M. C.; DAHA, M. R.; VAN KOOTEN, C.; ROOS, A. Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. **Journal Immunology**. v. 173, p. 3044-3050, 2004.

OTTA, Y.; AMANO, K.; NISHIYAMA, K.; ANDO, A.; OGAWA, S.; NAGTA, Y. Purification and properties of a lectin from *Ascomycete mushroom, Ciborinia camelliae*. **Phytochemistry**, v. 60 (2), p. 103-107, 2002.

PAJIC, I.; KLJAJIC, Z.; DOGOVIC, N.; SLADIC, D.; JURANIC, Z.; GASIC, M. J. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 132 (2), p. 213-221, 2002.

PEUMANS, W. J. & VAN DAME, E. J. Plant lectins: Versatile Proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 199-228, 1998.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A. & ROUGÉ, P. Classification of plant lectins in families of structural and evolutionary related proteins. In: The molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2, (Wu A. M. ed.), p. 27-54. **Kluwer Academic**, 2001.

PILCHER, B. K.; WANG, M.; QIN, X. J.; PARKS, W. C.; SENIOR, R. M.; WELGUS, H. G. Role of matrix metalloproteinases and their inhibition in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 878, p. 12-24, 1999.

PIO CORRÊA, M. Fava de bolota. **Dicionário das plantas úteis do Brasil, e das exóticas cultivadas**, v. III, p. 27-28, Rio de Janeiro: IBDF - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

PIRCH, J. D.; MILLER, J; DEIERHOI, M. H. et al. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. **Transplantation**, v. 63, p. 977, 1997.

PONCHEL, G. & IRACHE, J. M. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, p. 191-219, 1998.

PORTO, C. S.; MELO, C. M. L.; CORIOLANO, M.; LIMA-FILHO, J. L.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; PORTO, A. L. F.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. **Avaliação da atividade cicatrizante de *Parkia pendula* em feridas isquêmicas experimentais**. In: Caminhos da Ciência, Recife: EDUFRPE, v. 1, p. 133, 2006.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHALAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. **Plant Science**, v. 160, p. 739 – 744, 2001.

RAVAL, S.; GOWDA, S.B.; SINGH, D.D.; CHANDRA, N.R. A database analysis of jacalin-like lectins: sequence–structure–function relationships. **Glycobiology**, v. 14 n. 12, 1247–63, 2004.

REGAN, M. C.; BARBUL, A. **The cellular biology of wound healing**. In: SCHALAG, G.; RED, H. (Eds.). Fibrin sealing in surgical and nonsurgical fields. Heidelberg: Springer, p. 3-17, 1994.

RIBEIRO, M. G.; SCHIMIDT, E. M. S. **Relato do uso de cicatrizante à base de sulfadiazina de prata 1% micronizada em equino**. Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR, 3 (2): ago./dez., 2000.

RINI, J.M. Lectin structure. **Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure**, v.34, p. 551-77, 1995.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 112-123. 7. ed.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B.S.; ABREU-DE-OLIVEIRA, J. T.; DE-AZEVEDO-MOREIRA, R.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25(8), p. 823-826, 1992.

RÜDIGER, H. & GABIUS, H.J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, 18, 589–613, 2001.

SACCHETTINI, J. C.; BAUM, L. G. & BREWER, C. F. Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. **Biochemistry**, v. 40 (10), p. 3009-3015, 2001.

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

SANTOS, V. L. C. G. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. **Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico**. São Paulo: Atheneu, 2000 , p. 265-306, 1. ed.

SCHWARTZ, F. P.; SUROLIA, A.; BHAT, R. G. & PURIT, K. D. Thermodynamics of monosaccharide binding to Concanavalin A Pea (*Pisum sativum*) lectin and lentil (*Lens culinaris*) lectin. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 268 (11), p. 7668-7677, 1993.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. Trends in Biochemistry. **Science**, v. 18, p. 221-226, 1993.

SHARON , N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: WU, A. M. **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2**, p. 1-16, 2001.

SHARON, N. & LIS, H. **Lectins**. Heildelberg: Springer, 470 p., 2004, 2. ed.

SHIMIZU, T. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. **Journal of Dermatological Science**. V. 37, p. 65-73. 2005.

SILVA, I. G. Correção de Cicatrizes. In: MEGELA, I. M. **Cirurgia plástica reparadora e estética**. São Paulo: Medsi, 2000.

SINGER, A. J.; McCLAIN, A. Persistent wound infection delays epidermal maturation and increases scarring in thermal burns. **Wound Repair and Regeneration**, v. 10, p. 372-377, 2002.

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

SITOHY, M.; DOHEIM, M.; BADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. **Food Chemistry**. v. 104; p. 971-979, 2007.

SPECTOR, M. **Biomaterials**. In: Plastic Surgery, Indications, Operations, Outcomes. Achauer, B.; Eriksson, E.; Guyuron, B. Mosby Year Book, p. 239-259, 2001.

STEED, O. L. Papel dos fatores de crescimento na cicatrização das feridas. In: BARBUL, A. **Clínica Cirúrgica da América do Norte**, v. 3, Rio de Janeiro: Interlivros. p. 571-582, 1997.

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

TATENO, H.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, S.; SANEYOSHI, M. Rhamnose-binding lectins from stealhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs recognize bacterial lipopolysaccharides and lipoteichoic acid. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 66, p. 604-612, 2002.

TASUMI, S.; OHIRA, T.; KAWAZOE, I.; SUETAKE, H.; SUZUKI, Y.; AIDA, K. Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). **Journal Biology Chemical**, v. 227, p. 27305-27311, 2002.

TASUMI, S.; YANG, W-J; USAMI, T.; TSUTSUI, S.; OHIRA, T.; KAWAZOE, I.; WILDER, M. N.; AIDA, K.; SUZUKI, Y. Characterization and primary structures of galactin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Developmental Comparative Immunology**, v. 28, p. 325-335, 2004.

THOMAS, D. W.; O'NEILL, I. D.; HARDING, K. G.; SHEPHERD, J. P. Cutaneous wound healing: a current perspective. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 53, p. 442-447, 1995.

TSIROGIANNI, A. K.; MOUTSOPOULOS, N. M.; MOUTSOPOULOS, H. M. Wound healing: Immunology aspects. **Injury**, v.37, p.5-12, 2006.

TSUTSUI, S.; OKAMOTO, M.; TASUMI, S.; SUETAKE, H.; KIKUCHI, K.; SUZUKI, Y. Novel mannose-specific lectins found in torafugu, *Takifugu rubripes*: A review. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 1, p. 122-127, 2006a.

TSUTSUI, S.; TASUMI, S.; SUETAKE, H.; KIKUCHI, K.; SUZUKI, Y. Carbohydrate-binding site of a novel mannose-specific lectin from fugu (*Takifugu rubripes*) skin mucus. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 143, p. 514-519, 2006b.

VAN DAME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, R. & PEUMANS, W. Molecular cloning of the bark and seed lectins from the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 523-536, 1997.

WANG, H. X.; NG, T. B. Purification of Castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. **Protein Expression & Purification**, v. 32, p. 44-51, 2003.

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

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORRIRUG, C.; A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, p. 183-187, 1998.

WOODLEY, J. Bioadhesion: New possibilities for drug administration. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, p. 77-84, 2001.

WONG, T. T. L.; SETHI, C.; DANIELS, J. T.; LIMB, G. A.; MURPHY, G.; KHAW, P. T. Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment. **Survey of Ophthalmology**, v. 47, n. 3, 2002.

WU, A. M.; WU, J. H.; TSAI, M. S. & HERP, A. Carbohydrate specificity of an agglutinin isolated from the root of *Trichosanthes kirilowii*. **Life Sciences**, v. 66, p. 2571-2581, 2001.

YESILADA, E.; HONDA, G.; SEZIK, E. et al. Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 133-152, 1995

