

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ROSANGELA VIDAL DE SOUZA ARAÚJO

EFEITO DA LECTINA DE *Canavalia brasiliensis* SOBRE A EXPRESSÃO E
ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES EXTRAÍDAS DE LESÕES
CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS



Recife, 2008

**EFEITO DA LECTINA DE *Canavalia brasiliensis* SOBRE A EXPRESSÃO E
ATIVIDADE DE METALOPROTEINASES EXTRAÍDAS DE LESÕES
CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de concentração - Biotecnologia.

Orientadora:

Profa. Ana Lúcia Figueiredo Porto, M.D., PhD.

Co-orientadora:

Profa. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, M.D., PhD.

Prof. Gandhi Rádís, M.D., PhD.

Araújo, Rosangela Vidal de Souza

Efeito da lectina de *Canavalia brasiliensis* sobre a expressão e atividade de metaloproteinases extraídas de lesões cutâneas de camudongos. / Rosangela Vidal Souza. – Recife: O Autor, 2008.

121 folhas : il., fig.

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Biotecnologia, 2008.**

Inclui bibliografia e anexos.

**1. Doenças pele - tratamento 2. Lectina 3. *Canavalia brasiliensis* I.
Título.**

**616.5
616.5**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2008- 180**

COMISSÃO EXAMINADORA

" Efeito da lectina de *Canavalia brasiliensis* sobre a expressão e atividade de metaloproteinases extraídas de pele de camundogos "

TITULARES



Prof.^a Dr.^a **Ana Lúcia Figueiredo Porto** - (Orientador/UFPE)



Prof. Dr. **Luiz Bezerra de Carvalho Júnior** - (UFPE)



Prof. Dr. **Mário Ribeiro de Melo Júnior** - (ASCES)



Prof. Dr. **Paulo Roberto Eleutério de Souza** (UPE)



Prof. Dr. **Benildo Sousa Cavada** (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus, aquele que sempre terá o controle da minha vida.

Aos meus pais por tudo que eu sou. Vocês são muito especiais e imprescindíveis para minha felicidade e “culpados” por mais esta titulação.

À minha orientadora, Profa. Ana Lúcia Figueiredo Porto, pela oportunidade de trabalhar nesse projeto e pela convivência tão prazerosa durante esses dois anos, obrigada pela compreensão, paciência e amizade.

À minha co-orientadora, Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, a quem eu devo o despertar da minha vida acadêmica e de pesquisa, por está ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu co-orientador, professor Gandhi, obrigada pela amizade, colaboração e dedicação na bancada e na teoria, poucos nascem para a pesquisa e ensino, o senhor é um deles.

Ao grande amigo e companheiro de laboratório, Flávio Oliveira, obrigada por me aperfeiçoar no trabalho com animais, e pela sua dedicação ao nosso trabalho, sem a sua atenção nada disso teria se tornado real.

Ao meu namorado, José André, nesta longa caminhada, sempre me incentivando, apoiando, ouvindo, enxugando lágrimas e amando, obrigada.

Aos meus irmãos, Nanda e Hugo, obrigada pela dedicação e apoio ao longo desta caminhada, amo vocês.

A todos aqueles que fazem o Laboratório de Biotecnologia do LIKA-UFPE, especialmente a Carol, Dani Renata, Dani Viana, Torquato, Veri, Giu, pela constante companhia e amizade.

Ao professor Benildo Cavada, pela gentileza em ceder a lectina ConBr para a execução do trabalho, o meu muito obrigada.

Aos estagiários da Biologia molecular, Carlos, Clécia e Alessandra, pela colaboração e boa vontade nos experimentos de Biologia molecular.

Aos coordenadores/diretores da ASCES Sibebe Ribeiro, Angélica Tenório, Wallacy Feitosa, Valquíria Bezerra, Petrônio Martelli, João Eudes e Marileide Rosa, obrigada pelo apoio durante o período de finalização da tese.

A Carmelita, do Setor de Patologia do LIKA, por sempre poder contar com o seu apoio técnico e todos os outros amigos da Patologia, especialmente Mário, obrigada por saber ouvir e sempre me mostrar o lado positivo de tudo. iv

Aos amigos de longa data Maria Helena e Felipe, do Biotério do LIKA, valeu por todos os anos de dedicação, ajuda técnica e amizade, adoro vocês.

A diretoria do LIKA, na pessoa do Prof. José Luíz de Lima Filho e Profa. Elizabeth Chaves, pelo apoio na concretização deste trabalho.

A minha família: avós, tios e tias sei que torcem muito por mim, amo vocês.

Ao suporte financeiro disponibilizado pelo CNPq durante esses anos.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma colaboraram com esse meu trabalho e que não foram citados acima.

Muito Obrigada!
Rosangela Vidal de Souza Araújo

O essencial à vida é invisível aos olhos.
(Antoine de Saint-Exupéry)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
Lectinas- Moléculas Versáteis	1
Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr)	5
Cicatrização	8
Metaloproteinases- Enzimas que Remodelam o Colágeno	11
Gelatinases- Características e funções das MMP-2 e MMP-9	13
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
3. OBJETIVO	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
Capítulo I- Metaloproteinases: Aspectos Físio-Patológicos e sua Importância na Cicatrização.	26
Capítulo II- Atividade Colagenolítica (MMP-2 e MMP-9) e Avaliação Histopatológica de Lesões Cutâneas Experimentais em Camundongos Tratados com a Lectina Isolada das Sementes de <i>Canavalia brasiliensis</i> .	53
Capítulo III- Real-time PCR Analysis of Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) RNA Extracted from Cutaneous Healings Treated with lectin from <i>Canavalia brasiliensis</i> seeds.	70
CONCLUSÕES	97
ANEXOS	98

LISTA DE FIGURAS DA INTRODUÇÃO

	Página
Figura 1. Ligação da lectina com os carboidratos	1
Figura 2. Rede de hemaglutinação mediada por lectinas	2
Figura 3. Planta e sementes da <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr)	8
Figura 4. Estrutura molecular da ConBr	8
Figura 5. Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas	9
Figura 6. Controle da atividade das metaloproteinases	12

LISTA DE TABELAS DA INTRODUÇÃO

	Página
Tabela 1. Diagnóstico diferencial da ferida crônica	10
Tabela 2. Características das feridas de fase aguda X crônica	11

RESUMO

Neste trabalho são relatados os resultados obtidos na utilização da lectina obtida das sementes de *Canavalia brasiliensis*, sobre a expressão e atividade de metaloproteinases extraídas de lesões de pele experimentais. O efeito da lectina foi testado em quatro esquemas terapêuticos (2º, 7º e 12º dia após a cirurgia), em camundongos os quais foram divididos em quatro grupos: ConBr (10µg), NaCl (150mM), ConBr/manose (10µg preparadas em solução fisiológica com manose 0,1M) e manose (0,1M). O estudo prosseguiu com a coleta das lesões para as análises da área da lesão, histopatológica, atividade colagenolítica utilizando azocolágeno e PCR em tempo real com primers específicos para metaloproteinase 2 (MMP-2) e metaloproteinase 9 (MMP-9). O grupo tratado ConBr apresentou sinais inflamatórios macroscópicos menos intensos e uma maior evolução cicatricial quando comparado aos demais grupos. A atividade colagenolítica esteve presente nos quatro grupos estudados, porém o grupo ConBr apresentou a menor atividade no 2º dia após a cirurgia, já o grupo ConBr/manose obteve a maior atividade no tempo referido acima, este perfil de atividade manteve-se para o grupo ConBr/manose no 12º dia após a cirurgia. Este resultado da atividade pode está relacionado com os achados histopatológicos, os quais demonstraram um padrão semelhante na organização tecidual entre os grupos ConBr e ConBr/manose, porém este último apresentou uma melhor organização das fibras de colágeno. Observou-se quanto a área das lesões que houve uma diferença estatisticamente significativa entre o Grupo ConBr e o grupo controle NaCl no 7º e 12º dia após a cirurgia. A expressão dos genes de MMP-2 e MMP-9 foi observada em todos os tempos para os grupos ConBr, ConBr/manose e manose, com diferentes quantidades, porém no grupo NaCl não houve expressão no 2º dia de tratamento da MMP-2 e MMP-9 e no 12º dia para o gene de MMP-9. Apesar do grupo ConBr/manose ter apresentado uma melhor organização das fibras colágenas, o grupo ConBr favoreu positivamente o fechamento da ferida em relação aos demais grupos.

Palavras-chave: lectina, cicatrização, metaloproteinases, *Canavalia brasiliensis*.

ABSTRACT

This study presents results from the *Canavalia brasiliensis* lectin use of *nsis* seeds, on the expression and metalloproteinases activity extracted from skin experimental lesions. The lectin effect was tested in four therapeutic schemes (2nd, 7th and 12th days after surgery), according to the following treatment: (10µg) ConBr, 150mM NaCl, (10µg) ConBr/mannose prepared in physiologic solution with 0.1M mannose and 0.1M mannose. The study proceeded with the collection of surgical lesions for the injury area analyses, histopathology, collagenolytic activity using azocoll and real-time PCR with specific primers for metalloproteinase 2 (MMP-2) and metalloproteinase 9 (MMP-9). Treated ConBr group showed inflammatory signs less intense and greater wound closure when compared to the other groups. Collagenolytic activity was present in all groups studied, but the ConBr group had the lowest activity on the 2nd day after surgery, however the ConBr/mannose group obtained the highest activity at the mentioned time above, this profile has remained for the ConBr/mannose group in the 12th day after surgery. This activity profile may be related to the histopathology findings, which showed a similar pattern in the organization tissue between ConBr and ConBr/mannose groups, but the latter showed a better organization of the collagen fibers. It was observed that injuries area presented a statistically significant difference between the ConBr group and the control group (NaCl) on the 7th and 12th day after surgery. The MMP-2 and MMP-9 gene expression was observed at all times of study for ConBr, ConBr/mannose and mannose groups, with different quantities, but the NaCl group did not expressed MMP-2 and MMP-9 gene in 2nd day after surgery and the MMP-9 gene in 12th day. Despite the ConBr/mannose group had presented a better organization of collagen fibers, the ConBr group showed positive for the wound closure in comparison to other groups.

Key words: lectin, wound repair, metalloproteinases, *Canavalia brasiliensis*.

1. INTRODUÇÃO

Lectinas – Moléculas Versáteis

Uma definição postulada por Goldstein e colaboradores em 1980 conceitua lectinas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que interagem com carboidratos através de, ao menos, dois sítios de ligação, aglutinando células vegetais e/ou animais e que precipita polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídios (Figura 1).

Entretanto, Kennedy (1995), Sharon & Lis (2004) fazem referência às lectinas como proteínas que permitem a aglutinação celular e que são açúcares específicos, os quais se apresentam como moléculas que estão envolvidas em processos de reconhecimento célula-molécula e célula-célula.

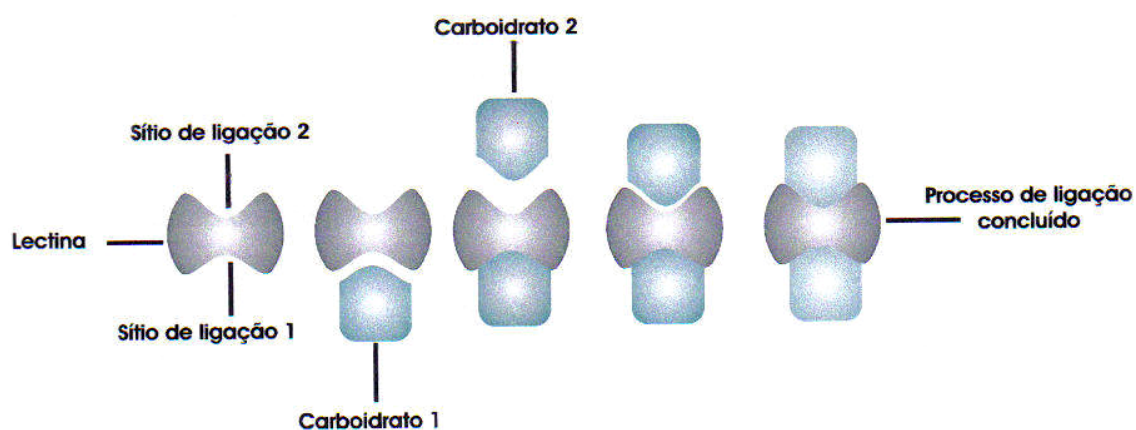


Figura 1. Ligação da lectina com os carboidratos. PIMENTEL, 2006.

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, bactérias (MOREIRA et al., 1991) e vírus, apresentando a função de mediadora numa variedade de eventos biológicos (CAVADA et al.,

1998; GABIUS & GABIUS, 2002; SELL & COSTA, 2003; ALENCAR et al., 2005).

Várias lectinas, em particular as de origem vegetal, são bastante estudadas em termos de estrutura molecular, papel fisiológico e efeitos biológicos em células de mamíferos (DUBOIS et al., 1998; RUDIGER, 1998). Tais proteínas apresentam-se em múltiplas formas e tem sido obtidas com alto grau de rendimento e pureza, principalmente através de cromatografia de afinidade ou de alta afinidade (CORREIA & COELHO, 1995; KENNEDY, 1995).

Para que se entenda melhor a diversidade de funções biológicas das lectinas é necessário o conhecimento sobre quais os tipos de interações que estas moléculas apresentam com as outras. Neste sentido, as definições a respeito das lectinas são debatidas pelos estudiosos em relação ao número mínimo de sítios ligantes a carboidratos por molécula de lectina. Quiocho, 1986, refere-se à hidrofobicidade como sendo a principal força de interação de lectinas aos carboidratos, e com outras moléculas (proteínas), através dos chamados sítios hidrofóbicos (ROBERTS & GOLDSTEIN, 1983; KELLA et al., 1984; ROBERTS et al., 1986; BARONDES, 1988), porém, sabe-se que os principais tipos de interações das lectinas com os carboidratos são pontes de hidrogênio, Van der Waals e interações iônicas (KENNEDY et al., 1994), o sítio hidrofóbico, é um sítio adicional, o qual tem sido descrito como importante por ligarem fitohormônios, citocinas, as quais modulam sua atividade hemaglutinante (Figura 2) e sua interação com carboidratos (SHARON & LIS, 1989; SHARON & LIS, 1990).

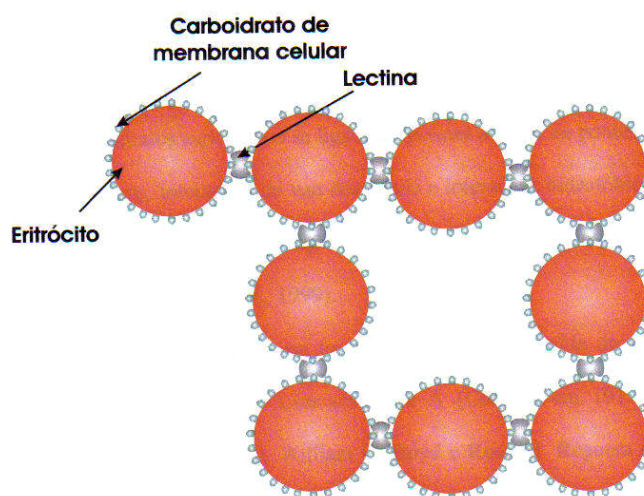


Figura 2. Rede de hemaglutinação mediada por lectinas. PIMENTEL, 2006.

Devido à propriedade das lectinas ligarem carboidratos, tais moléculas, são hoje alvo de pesquisas nas mais diversas áreas da biologia e médica, pois os carboidratos são moléculas que mediam a comunicação biológica, como por exemplo na proliferação e diferenciação celular e interação célula-célula, a qual são importantes eventos em fenômenos fisiológicos e patológicos (SHARON & LIS, 1993; VARKI, 1993). As lectinas são consideradas moléculas que reconhecem e decifram as informações contidas dos oligossacarídeos da superfície celular (RINI, 1995).

Lectinas de leguminosas são uma família de proteínas encontradas principalmente em sementes (MOREIRA et al., 1991; CAVADA et al., 1998; LORIS et al., 1998). Estas glicoproteínas têm sido consideradas uma importante ferramenta em pesquisas biomédicas (RUDIGER, 1998). Um importante mecanismo biológico observado na aplicação das lectinas é o uso destas para explorar a superfície celular através da porção que se liga a carboidratos de glicoproteínas ou glicolipídios projetados pela membrana celular (CUATRECASAS & TELL, 1973; CLARCK, 1991). Neste sentido, há grande interesse no estudo dessas biomoléculas a fim de produzir medicamentos-inteligentes, que atuam em células específicas do organismo, evitando os efeitos colaterais que são tão comuns nos medicamentos tradicionais (CLARCK et al., 2000), sobretudo para o tratamento de neoplasias. Acredita-se que em animais as lectinas participam do mecanismo de endocitose (RUDGER et al., 2000), transporte intracelular de glicoproteínas (MECKLENBURG et al., 2002), apoptose (BARBOSA et al., 2001), defesa contra microrganismos, e na regulação da migração e adesão celular (BELTRÃO et al., 1998), outras lectinas aglutinam preferencialmente células malignas (WANG et al., 2000) de modo que tem sido investigado o seu envolvimento em metástase (BELTRÃO et al., 1998).

Podem-se citar ainda inúmeros e distintos estudos realizados com lectinas, no sentido de visualizar o potencial da aplicabilidade biológica destas moléculas.

Maciel e colaboradores (2004) demonstraram que a lectina extraída da *Cratylia mollis* (Cramoll) apresenta atividade mitogênica em linfócitos humanos, esta atividade é observada em distintos graus entre diferentes lectinas como, Concanavalina A (Con A), Cramoll 1, Cramoll 1,4 e *Phaseolus vulgaris* (PHA).

Esta distinção é possivelmente devido à diferença na especificidade ao açúcar, o qual está envolvido em processos de ligação a receptores de superfície celular (HSU & REE, 1983). As lectinas foram utilizadas em histoquímica de granulomas hepáticos provenientes de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, onde a lectina PNA marcou apenas as células dos grupos controle, sugerindo, neste estudo, uma correlação dos resultados encontrados no número de granulomas hepáticos entre os grupos tratados e controle com o perfil de glicosilação deste sistema (ovo-granuloma) em animais tratados com o polissacarídeo extraído do líquen *Ramalina celastri* (Araújo, 2004). Uma outra aplicação das lectinas é sua utilização para sistema de dosagem de glicose *in vivo* (PICKUP et al., 2005).

O laboratório de Biologia Molecular (BioMol-Lab), do departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, em colaboração com outros laboratórios nacionais e internacionais, desde 1997, tem contribuído fortemente para a pesquisa com as lectinas, podem-se destacar algumas áreas como: atividades biológicas de proteínas, caracterização estrutural de proteínas com atividade biológica, purificação de proteínas, dentre outras (<http://www.ufc.br/biomol>). Como exemplo de atividades desenvolvidas no BioMol-Lab, podemos citar a purificação e caracterização parcial da lectina glicose-manose específica extraída de sementes de *Cymbosema roseum* (CAVADA et al., 2006). Um outro estudo muito interessante desenvolvido no grupo é a ativação de cultura de macrófagos, os quais liberam mediadores químicos. Este estudo foi realizado com a lectina da leguminosa *Vatairea macrocarpa* (ALENCAR et al., 2007).

Cavada et al., 2003 observaram que, lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea virgata*, *Dioclea rostrata* e *Cratylia floribunda*, todas específicas glicose-manose, estimularam a fosforilação do receptor de insulina *in vitro* da membrana de fígado de rato, de maneira dose-dependente, as lectinas de *C. brasiliensis* e *D. rostrata* apresentaram este efeito em uma concentração de 4µg/ml, este efeito foi diminuído em concentrações mais elevadas. Já as lectinas *D. virgata* e *C. floribunda* apresentaram um menor potencial e eficiência e este efeito só foi obtido em altas concentrações (400µg/ml). Esta atividade já havia sido observada por KATZEN et al., 1981; ROTH et al., 1983 e SHIBA et al., 1990, com a lectina Con A extraída da semente de *Canavalia*

ensiformis, a qual se liga a glicoproteínas de superfície celular com alta especificidade por glicose e mano-piranoose, esta lectina apresenta-se como fator estimulador da fosforilação de receptor de insulina de células sistêmicas livres, este efeito foi obtido com concentrações de 40µg/ml, e foi similar na eficiência aos efeitos obtidos com a *C. brasiliensis* e *D. rostrata*.

Outros trabalhos do grupo BioMol-lab vêm mostrando a efetividade das lectinas em processos inflamatórios. A lectina presente em sementes *Vatairea macrocarpa* (Vmac) apresentou efeito pro-inflamatório frente ao modelo de edema de pata em ratos, onde foi observada uma significativa infiltração leucocitária (FREIRE et al., 2003; ALENCAR et al., 2004). Uma outra lectina que apresentou atividade sobre a migração neutrofílica *in vitro* e *in vivo* foi a PAL, uma lectina específica para glicose/manose isolada de sementes da *Pisum arvense* e este mesmo efeito, porém, apenas *in vivo* foi observado com a lectina extraída de *Arum maculatum* (AMA) (ALENCAR et al., 2005). Este efeito biológico, tráfico de leucócitos para o sítio inflamatório, é um importante evento para a efetiva resposta do hospedeiro frente à infecção (SHARON & LIS, 1989). Este mecanismo é bastante interessante e envolve interações entre células endoteliais e neutrófilos por adesão e reconhecimento entre lectinas e moléculas de adesão expressas na superfície das células supracitadas. Outras lectinas liberam citocinas *in vitro* (ASSREUY et al., 2003), produzem óxido nítrico por células mononucleares de sangue periférico humano (ANDRADE et al., 1999) e apoptose em linfócitos (BARBOSA et al., 2001).

Um outro modelo biológico de observação da atividade biológica das lectinas é a cicatrização cutânea experimental, como observado em algumas lectinas, dentre elas, merecem destaque aquelas pertencentes à divisão Angiospermae, família Leguminosae, como a *Cratylia mollis*, *Parkia pendula*, *Canavalia ensiformis*, *Dioclea violacea* e *Canavalia brasiliensis* (MELO et al., 2006; SCHIRATO, 2006; PORTO et al., 2006).

Lectina de Canavalia brasiliensis (ConBr)

Para que o estudo das atividades biológicas com determinada lectina possa ser iniciado, se faz necessário sua purificação a partir de um extrato bruto, a cromatografia de afinidade (BARAÚNA et al., 2006) ocupa uma

posição ímpar na tecnologia de separação de proteínas e, de acordo com a especificidade da lectina, têm sido escolhidas diferentes matrizes de afinidade comercialmente disponíveis. Lectinas específicas para glicose-manose, como a *Canavalia brasiliensis* (ConBr), podem usar como matrizes de afinidade Sephadex (polímero de dextrana), com diferentes limites de exclusão (CORREIA & COELHO, 1995; CAVADA et al., 1998).

A lectina de *C. brasiliensis* (Figura 3) foi isolada de sementes de (Figura 3) planta leguminosa autóctone brasileira, pertencente à subfamília Diocleinae (BARBOSA et al., 2001). Esta é uma lectina com afinidade de ligação glicose/manose, que tem 99% da seqüência de aminoácidos idênticas a Con A (CAVADA et al., 1993). Sua atividade biológica tem sido investigada, em diferentes modelos experimentais como a atividade cicatrizante em camundongos (SCHIRATO et al., 2004), efeito protetor *in vivo* contra infecção pela *Leishmania amazonensis* em camundongos BALB/c, onde a ConBr administrada *in vivo* reduziu as lesões nestes animais (BARRAL-NETTO et al., 1992), estimulação linfocitária em humanos (BARRAL-NETTO et al., 1992), estimulação da produção de macrófagos e linfócitos em administrações intraperitoniais em camundongos C3H/HeJ (RODRIGUEZ et al., 1992), além da indução da produção de histamina (GOMES et al., 1994) e óxido nítrico (ANDRADE et al., 1999). A ConBr estimula linfócitos induzindo altas respostas proliferativas de linfócitos e produção de INF- γ , o uso dessas substâncias naturais *in vivo* resulta em estimulação linfocítica, e pode mediar importantes funções, como prevenção do desenvolvimento de tumores malignos (NEWELL et al., 1991).

A estrutura da ConBr obtida após cristalização (Figura 4) foi estudada e comparada com a lectina Con A, a estrutura da ConBr foi elucidada por cristalização a partir de informações prévias da estrutura da Con A, verificou-se que apesar da seqüência de aminoácidos similares entre essas duas lectinas, a ConBr exerce efeitos biológicos celulares *in vitro* e *in vivo*, bastante diferente da Con A, como por exemplo o modelo biológico de edema de pata em ratos (BENTO et al., 1993), e na estimulação de linfócitos humanos *in vitro* (BARRAL-NETTO et al., 1992). Sugere-se que essas propriedades biológicas distintas devam-se as diferenças na conformação quaternária destas lectinas

de leguminosas, como também comparando a distância entre o íon metal e o sítio ligador de carboidratos nas duas lectinas supracitadas e as diferenças na presença de pontes de hidrogênio e interações de van der Waals que formam os dímeros e tetrâmeros que também são diferentes quando se compara a ConBr e Con A (SANZ-APARICIO et al., 1997), fato que pode explicar uma especificidade diferente ao carboidrato, por parte de cada uma destas lectinas.

A integridade da estrutura da lectinas está intimamente ligada a sua atividade biológica, isto foi bastante nítido no estudo realizado por Baraúna et al., 2006, que demonstrou a ação da administração da lectina ConBr no teste de natação forçada em camundongos, o qual é um modelo para o estudo de atividade anti-depressiva. Os resultados encontrados pelos estudiosos revelam que a ConBr exerce um específico efeito anti-depressivo na natação forçada, e que potencializa a ação da fluoxetina, quando administradas em baixas doses (1-10 µg/site, i.c.v.), entretanto este efeito foi dependente da integridade estrutural da lectina, ou seja, quando desnaturada por altas temperaturas o efeito biológico foi bloqueado.

Há na literatura evidências farmacológicas pré-liminares que algumas lectinas específicas para glicose-manose, como as extraídas de *Cratylia mollis*, *Parkia pendula*, *Canavalia ensiformis*, *Dioclea violacea* e *Canavalia brasiliensis* atuem como prováveis biomateriais potencializando a resposta imune do animal frente ao processo de cicatrização cutânea (PORTO et al., 2006; SCHIRATO, 2006). Há relatos que substâncias de origem natural poderiam constituir materiais alternativos para o tratamento local das lesões (SILVA, 2000). Segundo Spector (2001), na reabilitação de lesões pode-se utilizar 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.



Figura 3. Planta e sementes de *Canavalia brasiliensis*.

(www.fao.org/.../pictures/canbras/canbras5.jpg)

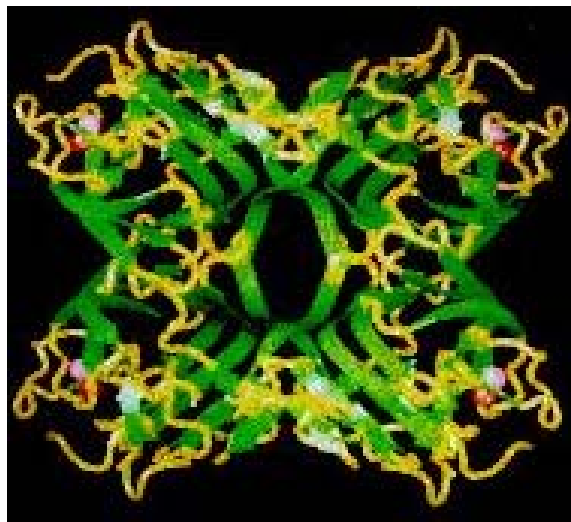


Figura 4. Estrutura Molecular da ConBr

(plab.ku.dk/tcbh/ConBr.jpg)

CICATRIZAÇÃO

A cicatrização é uma série de eventos que se sobrepõem e é iniciado logo após o ferimento (CLARK, 1996). O processo cicatricial envolve uma complexa seqüência de eventos celulares e bioquímicos com o objetivo de restaurar a integridade tecidual após o trauma (SCHIRATO et al., 2006). Deve-se ressaltar a existência de uma diferença entre regeneração tecidual e cicatrização. A primeira, regeneração tecidual, envolve a reconstituição dos componentes teciduais de forma idêntica aqueles destruídos; a cicatrização, pelo contrário, é uma resposta fibroproliferativa, na qual os anexos epidérmicos não se regeneram e mantêm uma cicatriz de tecido conjuntivo em lugar da rede mecanicamente eficiente de colágeno na derme não ferida. Porém, em feridas muito superficiais, o epitélio é reconstituído e pode haver pouca formação cicatricial (ROBBINS & COTRAN, 2005). As lesões cutâneas normalmente cicatrizam de uma maneira ordenada e eficiente, sendo este processo

didaticamente dividido nas seguintes fases: hemostasia, fase inflamatória, fase proliferativa ou de granulação e de remodelação da matriz extracelular ou maturação (Figura 5) (SINGER & CLARK, 1999; CLARK, 2001; DIEGELMANN & EVANS, 2004; BRANSKI et al., 2005; SHIMIZU, 2005; KUOKAWA et al., 2006; LAURENS et al., 2006).

A transição entre essas fases é bastante sutil, uma vez que as mesmas se sobrepõem e esta categorização didática é de certa forma arbitrária.

A reparação do tecido após uma injúria depende da síntese de uma matriz extracelular fibrosa, para haver a substituição do tecido lesado. A participação da matriz extracelular (MEC) no reparo tecidual ocorre regulando o comportamento de uma variedade de tipos celulares, que removem o tecido lesado ordenadamente para a reconstrução do tecido (MIDWOOD, 2004).

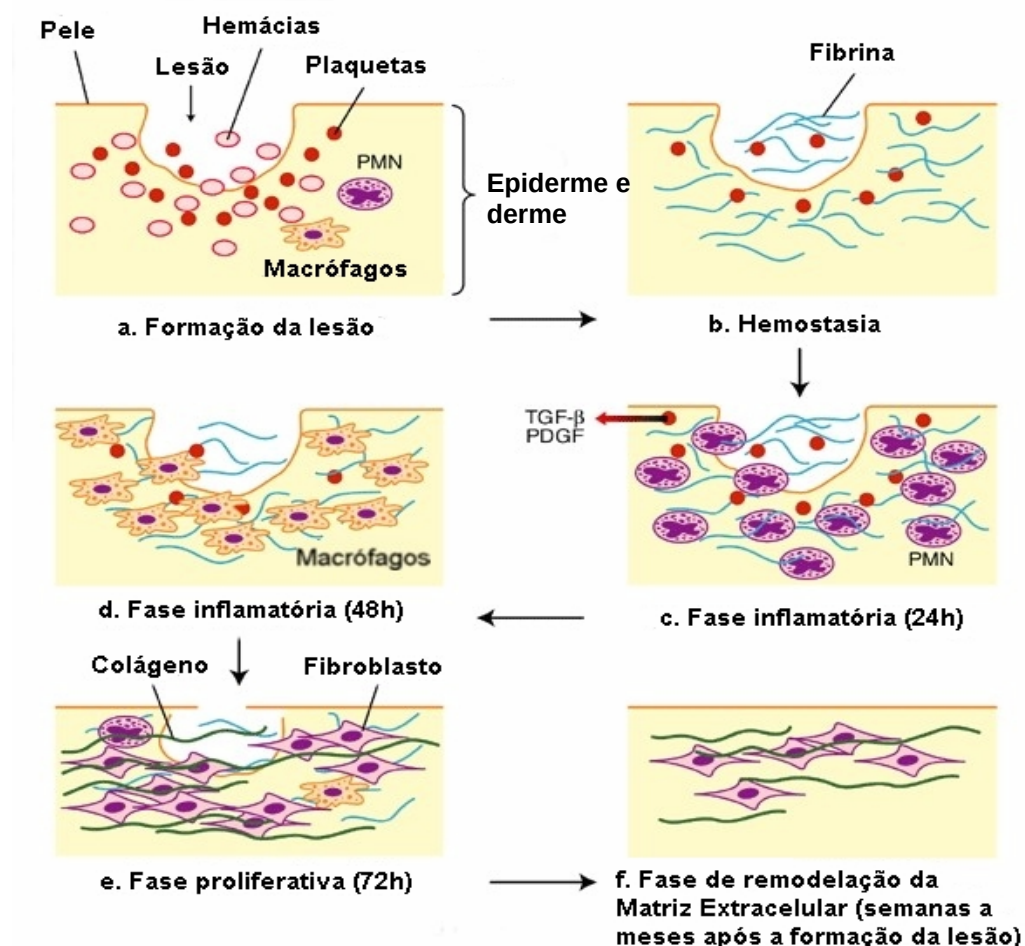


Figura 5. Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas. Fonte: *Experts Reviews in Molecular Medicine* ©, 2003. Cambridge University Press.

As fases da inflamação aguda, repitelização e contração dependem da interação célula-MEC e contribui para minimizar infecções e promover um rápido fechamento da ferida (MIDWOOD, 2004).

A falha na cicatrização representa uma significativa causa de morbidade e mortalidade para uma grande parte da população (MENKE et al., 2007), isto ocorre por variados fatores (KIRSNER, 2007), ou seja, o diagnóstico diferencial para a etiologia de um erro na cicatrização é larga (Tabela 1), porém cerca de 70% é causada por isquemia, diabetes melitus secundária e pressão (úlceras de pressão) (NWOMEH et al., 1998).

Tabela 1. Diagnóstico diferencial da ferida crônica, segundo MENKE et al., 2007.

SISTEMA	DOENÇA
Vascular/Arterial	Aterosclerose, má formação arteriovenosa
Linfático	Linfedema
Vasculitis	Lúpus eritematoso, artrite reumatóide
Neuropatias	Diabetes, neuropatia periférica
Hematológica	Policitemia rubra vera, anemia falciforme
<u>Traumática</u>	<u>Queimaduras, radiação</u>
Neoplásico	Carcinoma basal, melanoma, carcinoma de célula escamosa

A fase de remodelação tecidual é a última e mais longa do processo cicatricial, nesse período há uma reorganização do colágeno sintetizado e formação da cicatriz (MISSIAEN et al., 2000), as metaloproteinases-2 e 9 são as duas proteases gelatinolíticas mais atuantes no processo cicatricial (KAHARI & SAARIALHO-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, é o 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.

As collagenases são peças-chave da MEC porque são as únicas com habilidade em iniciar a degradação do colágeno. São crescentes as evidências que sugerem que estas enzimas apresentam um papel na pato-fisiologia de feridas crônicas (GRINNELL & ZHU, 1996), ao contrário dos achados das feridas agudas, que apresentam um equilíbrio entre as MMPs e seus inibidores (Tabela 2).

Tabela 2. Características das feridas de fase aguda X crônica, MENKE et al., 2007.

Aguda	Crônica
Alta atividade mitogênica	Baixa atividade mitogênica
Fibroblastos normais	Fibroblastos com senescência prematura
Equilíbrio entre MMPs/TIMPs	Excesso de MMPs
Deposição da MEC	Degradação da MEC
Tempo de cicatrização normal	Tempo de cicatrização alterado

METALOPROTEINASES- enzimas que remodelam o colágeno

As metaloproteinases (MMPs) pertencem a uma família de endopeptidases metal dependentes que representam a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC). Conjuntamente, as MMPs são capazes de degradar todas as proteínas da MEC (FORTUNA et al., 2007). Podem-se classificar as MMPs em: collagenases (MMP-1, 8 e 13), gelatinases (MMP-2 e 9), estromelisinases (MMP-3, 7 e 10), matrilisinas (MMP-7 e 26), MMPs tipo membrana (MMP-14, 15, 16, 17 e 24) e outras MMPs, que são classificadas de acordo com sua estrutura e especificidade ao substrato (VISSE & NAGASE, 2003).

A atividade destas enzimas é controlada, principalmente, através de inibidores protéicos teciduais denominados TIMPs, as MMPs e seus inibidores

determinam a arquitetura da MEC (LEE & MURPHY, 2004; CHEN et al., 2007). Os quatro TIMPs até hoje identificados podem inibir todas as MMPs, porém com diferentes graus de inibição, por exemplo, o TIMP-2 é particularmente um inibidor efetivo para a MMP-2 e MMP-14, enquanto que o TIMP-1 inibe preferencialmente a MMP-9 (GILLARD et al., 2004).

Na cicatrização normal, todas as MMPs podem ser inibidas, especialmente, pelos TIMPs, porém em feridas crônicas, as MMPs não estão devidamente reguladas, pois há uma igual concentração de inibidores e de proteases (YAGER et al., 1996). Em feridas crônicas, como por exemplo, as presentes na neuropatia diabética e periodontite crônica, a grande atividade neutrofílica leva a uma extensa liberação de MMPs, especialmente MMP-8 e elastase, as quais são proteases envolvidas na degradação do tecido de granulação, e quando não são reguladas levam a extensa degradação da MEC (HYNES, 2002; LOBMANN et al., 2002).

A atividade das MMPs pode ser controlada por outras MMPs (Figura 6). Quanto a expressão das MMPs, estas podem ser controladas por moléculas endógenas como citocinas inflamatórias ou fatores de crescimento (SOUZA & LINE, 2002).

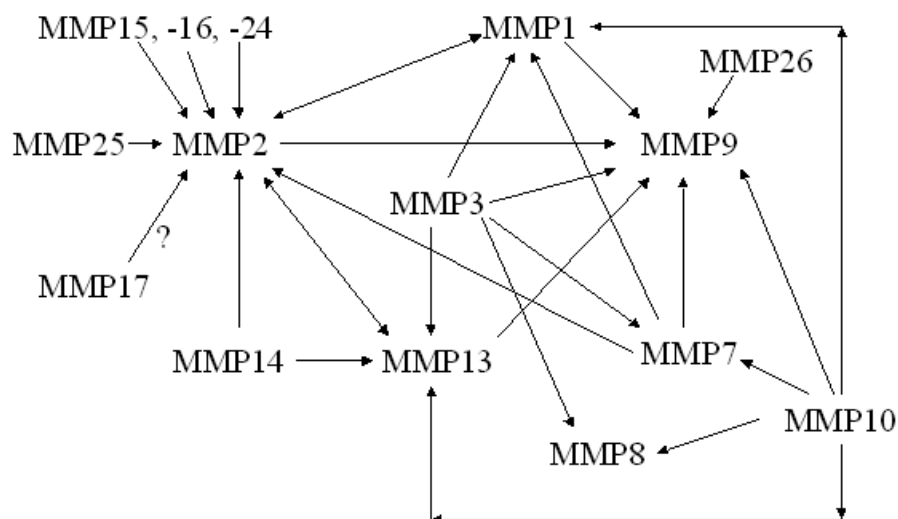


Figura 6. Controle da atividade das metaloproteinases. TRUDE et al., 2003

GELATINASES- Características e funções das MMP-2 e MMP-9

A gelatinase A (MMP-2) e a gelatinase B (MMP-9) são constitutivamente e induzivelmente, respectivamente, sintetizadas pelas células endoteliais no processo inflamatório (OPDENAKKER et al., 1991). Algumas características das gelatinases são importantes de ser relatadas, para que se entenda a biologia destas enzimas em um contexto integrado. A MMP-2 apresenta uma peso molecular de 72 kD (forma latente) e 66kD, 62 kD (forma ativa), esta enzima pode ser ativada pela MT1-MMP, colágeno tipo I, lipopolissacarídeos, fatores de crescimento de hepatócitos, trombina e proteína C ativada e, sua forma latente é ligada ao TIMP-2, enquanto que a MMP-9 apresenta um peso molecular de 92 kD (forma latente) e 86 kD, 67kD (forma ativa), é ativada por serina proteases e está ligada ao TIMP-1 na sua forma latente. (GILLARD et al., 2004; GOMEZ et al., 1995; NGUYEN et al., 2001).

O trabalho de Gómez e colaboradores (1995) demonstrou a capacidade da lectina *Ulex europaeus* (UEA I), a qual liga-se a resíduos de α -fucose da superfície de membrana de células endoteliais, em ativar a forma latente da MMP-2, de uma maneira dose-dependente. Foram testadas doses entre 2-100 μ g/ml, porém esta ação lectínica foi bloqueada por L-fucose, o qual compete pelos sítios ligantes a α -fucose da superfície da membrana.

Um outro trabalho que envolve a interação MMP e Lectinas foi realizado por Dubois e colaboradores (1998), que demonstrou a capacidade da lectina Con A em induzir a produção de MMP-9 provenientes de linfócitos *in vitro*. São interessantes outros estudos que investiguem o envolvimento de outras lectinas na expressão e/ou atividade das MMPs.

Recentes achados tem demonstrado que as MMPs, particularmente as gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9), apresentam um papel central durante a angiogênese. A invasão de células endoteliais é um evento essencial durante a angiogênese, este processo envolve a degradação da base das membranas. Neste caso pode-se perceber que estas MMPs podem está envolvidas nos casos da angiogênese fisiológica, como exemplo a reparação tecidual, desenvolvimento placentário, e na angiogênese patológica, como no desenvolvimento de tumores sólidos (FOLKMAN, 1995; NGUYEN et al., 2001).

As MMP-2 e MMP-9 e a MMP-14 estão envolvidas em vários aspectos do desenvolvimento tecidual, manutenção e cicatrização (FU et al., 2005). As MMP-2 e 9, clivam principalmente o colágeno tipo IV, entretanto possuem a habilidade de degradar outros componentes da MEC.

A MMP-2 é a principal metaloproteinases produzida por fibroblastos da pele, e está envolvida em processos patológicos como lesões de pele cancerosas ou pré-cancerosas após exposição a radiação UV (KOIVUKANGAS et al., 1994).

Tanto a MMP-2 como a MMP-9 possuem um papel nas diferentes fases (idade) da pele (KOIVUKANGAS et al., 1994), desenvolvimento tumoral (RIJKEN et al., 2005; JINGA et al., 2006), bem como em outras lesões cutâneas como a psoríases e dermatites (SUOMELA et al., 2001).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; CRIDDLE, D.N.; SOUZA, E.P.; SOARES, P.M.G.; HAVT, A.T.; ARAGÃO, K.S.; BEZERRA, D.P.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. **Protein and Peptide Letters**, v. 11, p. 195-200, 2004.

ALENCAR, V. B. M.; ALENCAR, M. N. N.; ASSREUY, A. M. S.; MOTA, M. L.; BRITO, G. A. C.; ARAGÃO, K. S.; BITTENCOURT, F. S.; PINTO, V. P. T.; DEBRAY, M.; 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.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; BINDÁ, A. H.; BENEVIDES, R. G.; MOURA, R. R.; SOUSA, R. B.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; CAVADA, B. S. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, p. 275-282, 2007.

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.

ARAÚJO, R.V.S.; MARQUES, H.A.L.; ARAÚJO, F.V.S.; BELTRÃO, E.I.C.; MELO JÚNIOR, M.R.; CARVALHO JR, L.B.; IACOMINI, M.; LEÃO, A.M.A.C.; MAGALHÃES, N.S.S. Antihelminthic activity of liposome-loaded polysaccharide of *Ramalina celastri* on *Schistosoma mansoni* infected mice. In: **XXXIII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, 2004, Caxambu. XXXIII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2004.

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

ASSREUY, A.M.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S.; ROCHA-FILHO, D.R.; FEITOSA, R.F.G.; CUNHA, Q.F.; CALVETE, J.J.; RIBEIRO, R.A. Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1836-1841, 2003.

BARAÚNA, S. C.; KASTER, M. P.; HECKERT, B. T.; NASCIMENTO, K. S.; ROSSI, F. M.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B. S.; RODRIGUES, A. L. S.; LEAL, R. B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 160-169, 2006.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, L. A. R.; BARRAL-NETO, M. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 673-678, 2001.

BARONDES, S. H. **Trends Biochemical Sciences**, v. 13, p. 480-482, 1988.

BARRAL-NETO, M.; SANTOS, S. B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L. I. M.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, R. A. et al. Human lymphocyte stimulation by lectins from the Diocleae tribe. **Immunological Investigations**, v. 21, p. 297-303, 1992.

BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, p. 125-134, 1998.

BENTO, C. A. M.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A.; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plants lectins. **Agent Actions**, v. 38, p. 48-54, 1993.

BRANSKI, R. C.; ROSEN, C. A.; VERDOLINE, K.; HEBDA, P. A. Biochemical markers associated with acute vocal fold wound healing: a rabbit model. **Journal of Voice**, v. 19, n. 2, p. 283-289, 2005.

CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; GRANGEIRO, T. B.; Primary structures and functions of plants lectins. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 2, p. 193-201, 1993.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, 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.; IGLESIAS, M. M.; TRONCOSO, M. F.; TEIXEIRA, E. H.; TURYN, D.; DOMINICI, F. P. Glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans stimulate the autophosphorylation of the insulin receptor in vitro. **Hormone and Metabolic Research**, v.35 (2), p. 125-127, 2003.

CAVADA, B. S.; MARINHO, E. S.; BENEVIDES, R. G.; DELATORRE, P.; SOUZA, L. A. G.; NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, A. H.; MORENO, F. B. M.

B.; AZEVEDO JR, W. F.; DEBRAY, H. Purification, partial characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a mannose-specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. **Acta Crystallographica F.**, v. F62, n. 3, p. 235-237, 2006.

CHEN, W. et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue-derived inhibitors of metalloproteinase in fetal and adult skins. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 5, p. 997–1005, 2007.

CLARK, M. A.; HIRST, B. H.; JEPSON, M. A. Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 43, p. 207-223, 2000.

CLARK, R. A. F. The molecular and cellular biology of wound repair. New York, London: Plenum Press, 1996.

CLARK, R. A. F. Fibrin and wound healing. **Annals of the New York Academy Science**, v. 936, p. 355-367, 2001.

CLARK, V. M. Normal and dystrophic rat retinal pigment epithelia display different sensitivities to plant lectins. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 32, p. 327-335, 1991.

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, p. 261-273, 1995.

CUATRECASAS, P.; TELL, G. P. E. Insulin-Like Activity of Concanavalin A and Wheat Germ Agglutinin-Direct Interactions with Insulin Receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, p. 485-489, 1973.

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

DUBOIS, B.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; VAN DAMME, J. V.; OPDENAKKER, G. Regulation of gelatinase B (MMP-9) in leukocytes by plant lectins. **FEBS Letters**, v. 427, p. 275-278, 1998.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Med.** v. 1, p. 27-31, 1995.

FORTUNA, G. M. et al. A role for matrix metalloproteinase-9 in the hemodynamic changes following acute pulmonary embolism. **International Journal of Cardiology**, v. 114, n. 1, p. 22-27, 2007.

FREIRE, M. G. M.; DESOUSA, I. A.; SILVA, A. C. M.; MACEDO, M. L. R.; LIMA, M. S.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**, V. 42, p. 275-280, 2003.

FU, X. B., LI, J.; SUN, X.; SUN, T.; SHENG, Z. Epidermal stem cells are the source of sweat glands in human fetal skin: Evidence of synergetic development of stem cells, sweat glands, growth factors, and matrix metalloproteinases. **Wound Repair and Regeneration**, v. 13, p. 102-108, 2005.

GABIUS, H. J.; GABIUS, S. **Glycosciences: Status and perspectives**. New York: Wiley-VCH, 2002. 2.ed. p. 659.

GILLARD, J. A.; REED, M. W. R.; BUTTLE, A.; CROSS, S. S.; BROWN, N. J. Matrix metalloproteinase activity and immunohistochemical profile of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 during human dermal wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, p. 295-204, 2004.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, C. E.; MONSIGNY, M. OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.

GOMES, J. C.; FERREIRA, R. F.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans, comparison with concanavalina A. **Agents and Actions**, v. 41, p. 132-135, 1994.

GOMEZ, D. E.; YOSHIJI, H.; KIM, J. C. Ulex europaeus I lectin induces activation of matrix metalloproteinase-2 in endothelial cells. **Biochem-Biophys-Res-Commun.**, v. 2, p. 177-182, 1995.

GRINNELL, F.; ZHU, M. Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase, alpha1-proteinase inhibitor, and alpha2-macroglobulin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 106, p. 335 – 41, 1996.

HSU, S. M.; REE, H. J. Histochemical studies on lectin binding in reactive lymphoid tissues. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 31, p. 538-546, 1983.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, p. 673 – 87, 2002.

JANKOVIC, M.; GOLUBOVIC, S. 200 kDa glycoprotein isolated from breast cancer tissue: a putative ligand for galectin-1. **Archive of Oncology**, v. 8, p. 39-43, 2000.

JINGA, D. C.; BLIDARU, A.; CONDREA, I.; ARDELEANU, C.; DRAGOMIR, C.; SZEGLI, G.; STEFANESCU, M.; MATAACHE, C. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 10, p. 499-510, 2006.

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

KATZEN, H. M.; SODERMAN, D. D.; GREEN, B. G. Evidence that insulin and concanavalin-A can co-bind to solubilized insulin receptors without inhibiting each other. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 115, p. 410-416, 1981.

KELLA, N. K. D.; ROBERTS, D. D.; SHAFER, J. A.; GOLDSTEIN, I. J. Fluorescence energy transfer studies on lima bean lectin. Distance between the subunit hydrophobic binding site and the thiol group essential for carbohydrate binding, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 4777 – 4781, 1984.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition- a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230. 1994.

KIRSNER, R. S. A wound healing perspective. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 1–2, 2007.

KOIVUKANGAS, V.; KALLIOINEN, M.; AUTIO-HARMAINEN, H.; OIKARINEN, A. UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin *in vivo*. **Acta Derm. Venereol.**, v. 74, p. 279-282, 1994.

KUROKAWA, I.; MIZUTANI, H.; KUSUMOTO, K.; NISHIJIMA, S.; TSUJITA-KYUTOKU, M.; SHIKATA, N.; TSUBURA, A. Expression in reepithelization

during human cutaneous wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 14, p. 38-45, 2006.

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.

LEE, M. H.; MURPHY, G. Matrix metalloproteinases at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 4015-4016, 2004.

LOBMANN, R.; AMBROSCH, A.; SCHULTZ, G. et al. Expression of matrixmetalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. **Diabetologia**, v. 45, p. 1011 – 1016, 2002.

LORIS, R.; HAMEBYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, p. 9-36, 1998.

MACIEL, E. V. M.; ARAUJO-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, p. 57-60, 2004.

MECKLENBURG, M.; AVITEL, J.; WINQUIST, F.; GANG, J.; ORNSTEIN, K.; DEY, E.; BIN, X.; HEDBORG, E.; NORRBY, R.; AEWIN, H.; LUUNDSTROM, I.; DANIELSSON, B. Differentiation of human serum samples by surface plasmon resonance monitoring of the integral glycoprotein interaction with a lectin panel. **Analytica Chimica Acta**, v. 459, p. 25-31, 2002.

MELO ET AL (2003). IN: PORTO CS, MELO CML, CORIOLANO M, LIMA-FILHO JL, COELHO LCB B, CORREIA MTS, PORTO ALF, CARNEIRO-LEÃO AMA. Avaliação da atividade cicatrizante da lectina de *Parkia pendula* em feridas isquêmicas experimentais. In: Caminhos da Ciência, Recife: EDUFRPE, v. 1. 2006, p. 133-147.

MENKE, N. B.; WARD, K. R.; WITTEN, T. M.; BONCHEV, D. G.; DIEGELMANN, R. F. Impaired wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 19–25, 2007.

MIDWOOD, K. S.; WILLIAMS, L. V.; SCHWARZBAUER, J. E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 1031–1037, 2004.

MISSIAEN, L.F. et al.; Abnormal intracellular Ca^{++} , homeostasis and disease. *Cellular calcium*. n.28, p.1-21, 2000.

MOREIRA, R. A., SOUSA-CAVADA, B., OLIVEIRA, J. T. A., AINOUEZ, I. L. Plants lectins in: Proceeding of the First Brazilian Congress on Proteins. (Oliveira, B. e Sgabieri, S.; ed). Unicamp, Campinas , 1991. p. 71-96.

NEWELL, K. A.; ELLENHORN, J. D. I.; BRUCE, D. S.; BLUESTONE, J. A. In vivo T-cell activation by staphylococcal enterotoxin B prevents outgrowth of a malignant tumor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 1074-1078, 1991.

NGUYEN, M.; ARKELL, J.; JACKSON, C. J. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 33, p. 960-970, 2001.

NWOMEH, B. C.; YAGER, D. R.; COHEN, I. K. Physiology of the chronic wound. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 25, p. 341 – 56, 1998.

OPDENAKKER, G.; MASURE, S.; GRILLET, B.; VAN DAMME, J. Cytokine-mediated regulation of human leukocyte gelatinases and role in arthritis. **Lymphokine Cytokine Research**, v. 10, p. 317-324, 1991).

PICKUP, J.; HUSAIN, F.; EVANS, N. D.; ROLINSKI, O. J.; BIRCH, D. J. S. Fluorescence-based glucose sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 2555-2565, 2005.

PIMENTEL, J. C. *Avaliações eletroquímicas das lectinas de sementes de *Cratylia mollis* e de folha de *Bauhinia monandra* na presença de ligantes específicos*. Recife, 2006, Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Lab. de Glicoproteínas, Universidade Federal de pernambuco.

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 da lectina de *Parkia pendula* em feridas isquêmicas experimentais**. IN: Caminhos da Ciência, Recife: EDUFRPE, v. 1. p. 133. 2006.

QUIOCHO, F. A. **Carbohydrate-Binding Proteins: Tertiary Structures and Protein-Sugar Interactions**. Annual Review of Biochemistry,, v. 55, p. 287-315, 1986.

RIJKEN, F.; KIEKENS, R. C.; BRUIJNZEEL, P. L. Skin-infiltrating neutrophils following exposure to solar-simulated radiation could play an important role in photoageing of human skin. **Br. J. Dermatol.** v. 152, p. 321-328, 2005.

RINI, J. M. **Lectin structure.** Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure, v. 24, p. 551-577, 1995.

ROBERTS, D. D.; ARJUNAN, P.; TOWNSEND, L. B.; GOLDSTEIN, I. J. **Specificity of adenine binding to lima bean lectin.** Phytochemistry, v. 25, p. 589-593, 1986.

ROBERTS, D. D.; GOLDSTEIN, I. J. J. **Adenine binding sites of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*).** The Journal of Biological Chemistry, v. 258, p. 120-138, 1983.

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.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A.; 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, p. 823-826, 1992.

ROTH, R. A.; CASSEL, D. J.; MADDUX, B. A.; GOLDFINE, I. D. **Regulation of insulin receptor kinase activity by insulin mimickers and an insulin antagonist.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 115, p. 245-252, 1983.

RUDGER, H.; SIEBERT, H. C.; SOLIS, D.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LIETH, C. H.; DIAZ-MARINHO, T.; GABIOS, H. J. **Medical chemistry base don the sugar; Fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets.** **Current Medical Chemistry**, v. 7, p. 389-416, 2000.

RÜDIGER, H. **Plant lectins – more than just tools for glycoscientists.** **Acta Anatômica**, v.161, p.130-152, 1998.

SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T. B.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B. S. **The crystal structure of Canavalia brasiliensis lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A.** **FEBS Letters**, v. 405, p. 114-118, 1997.

SCHIRATO ET AL (2004). IN: SCHIRATO GV, SILVA FO, PORTO CS, SILVA LBG, MOTTA RA, LIMA-FILHO JL, CARNEIRO-LEÃO AMA, PORTO ALF. Efeito da lectina de *Canavalia brasiliensis* no tratamento tópico de lesões cutâneas experimentais em camundongos. In: Anais da VII Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Editora Universitária: Recife, 2004, p. 159-161.

SCHIRATO ET AL (2006). IN: PORTO CS, MELO CML, CORIOLANO M, LIMA-FILHO JL, COELHO LCB B, CORREIA MTS, PORTO ALF, CARNEIRO-LEÃO AMA. Avaliação da atividade cicatrizante da lectina de *Parkia pendula* em feridas isquêmicas experimentais. In: Caminhos da Ciência, Recife: EDUFRPE, v. 1. 2006, p. 133-147.

SELL, A. M.; COSTA, C. P. Effects of plant lectins on in vitro fibroblast proliferation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 349-354, 2003.

SHARON, N.; LIS, H. **Articles**. v. 13, p. 233-272, 1989.

SHARON, N.; LIS, H. Legumes lectins – a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell Recognition. **Scientific American**, v. 268, p. 74-81, 1993.

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

SHIBA, T.; TOBE, K.; KOSHIO, O.; YAMAMOTO, R.; SHIBASAKI, Y.; MATSUMOTO, N.; TOYOSHIMA, S.; OSAWA, T.; AKANUMA, Y.; TAKAKU, F.; KASUGA, M. Concanavalin A-induced receptor aggregation stimulates the tyrosine kinase activity of the insulin receptor in intact cells. **Biochemical Journal**, v. 267, p. 787-794, 1990.

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

SOUZA, A. P.; LINE, S. R. P. The biology of matrix metalloproteinases. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2002.

SUOMELA, S.; KARINIEMI, A. L.; SNELLMAN, E.; SAARIALHO-KERE, U. Metalloelastase (MMP-12) and 92-kDa gelatinase (MMP-9) as well as their inhibitors, TIMP-1 and -3, are expressed in psoriatic lesions. **Exp. Dermatol.**, v. 10, p. 175-183, 2001.

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

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

TRUDE, D. et al. Significance of MMP-2 Expression in prostate cancer. **Cancer Research**, v. 63, p. 8511-8115, 2003.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct **Glycobiology**, v. 3, p. 97-130, 1993.

VISSE. R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827-39, 2003.

WANG, H.; GAO, J. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, p. 810-816, 2000.

WWW.UFC.BR/BIOMOL

YAGER, D. R.; ZHANG, L. Y.; LIANG, H. X. et al. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 107, p. 743- 748, 1996.

3. OBJETIVO

3.1 Geral

Investigar a atividade e expressão das metaloproteinases (MMP-2 e 9) envolvidas no mecanismo de ação cicatricial da lectina *Canavalia brasiliensis* (ConBr) em lesões cutâneas em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Tratar as lesões cirúrgicas experimentais nos camundongos e tratá-las por via de administração tópica, em diferentes esquemas terapêuticos, com soluções contendo a lectina ConBr, NaCl 150 mM, Lectina ConBr + manose e manose.
- Avaliar a atividade enzimática das metaloproteinases em lesões tratadas por administração tópica de ConBr, NaCl 150 mM, Lectina ConBr + manose e manose.
- Obter o perfil das MMP-2 e MMP-9 através de eletroforese, nas biópsias das feridas dos diferentes grupos estudados.
- Quantificar a expressão de mRNA das MMPs -2 e MMP-9, nas biópsias das feridas dos diferentes grupos estudados.
- Correlacionar o padrão histopatológico das lesões tratadas com a lectina ConBr, NaCl 150 mM, ConBr+manose e manose, com o perfil da atividade colagenolítica.

ARTIGO SUBMETIDO AO JORNAL BRASILEIRO DE PATOLOGIA E
MEDICINA LABORATORIAL

**CAPÍTULO I: METALOPROTEINASES: ASPECTOS FISIO-PATOLÓGICOS E
SUA IMPORTÂNCIA NA CICATRIZAÇÃO**



**METALOPROTEINASES: ASPECTOS FISIO-PATOLÓGICOS E SUA
IMPORTÂNCIA NA CICATRIZAÇÃO**

**Metalloproteinases: physio-pathological aspects and its importance in the
wound healing**

Rosangela Vidal de Souza Araújo¹

Flávio Oliveira Silva²

Mário Ribeiro Melo Júnior³

Ana Lúcia Figueiredo Porto⁴

¹Mestre em Bioquímica, Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES), PE, Brasil;

²Mestre em Medicina Veterinária, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), PE, Brasil;

³Doutor em Ciências Biológicas, Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES), PE, Brasil;

⁴Doutora em Engenharia Química, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

O papel biológico das metaloproteinases (MMPs), assim como sua variedade estrutural e o mecanismo de inibição destas enzimas foram descritas neste trabalho. As metaloproteinases são enzimas que digerem proteínas da matriz extracelular que apresentam funções importantes em diversos processos biológicos como, morfogênese, e em todos os estágios da cicatrização: reparação tecidual e remodelação em resposta a injúria, porém quando não devidamente controladas, ou seja, quando não são inibidas estão envolvidas na progressão de algumas doenças como ateroma, artrite, câncer e esclerose múltipla. Neste sentido, pode-se perceber que é necessário haver um controle entre a atividade enzimática e a sua inibição, pois o descontrole destas etapas pode culminar com o aparecimento ou progressão de determinadas enfermidades, sendo assim a investigação da atividade e/ou expressão das MMPs de grande interesse em estudos sobre os processos fisio-patológicos, e estes estudos já vem sendo desenvolvidos a algum tempo, no campo de pesquisas clínicas e experimentais.

Unitermos: Matriz extracelular, matriz metaloproteinases, colagenases, cicatrização

Metaloproteínases - Conceitos e Estrutura Molecular

O primeiro relato sobre as metaloproteínases foi publicado por Jerome Gross e Charles Lapière⁽²³⁾ (1962), eles encontraram uma enzima que degradava colágeno tipo I, ativa em culturas de pele, a qual degradou o colágeno tipo I⁽⁶¹⁾.

As metaloproteínases de matriz extracelular (MMPs) são uma família de endopeptidases Zn^{2+} -dependente, que promovem a degradação da matriz extracelular, podendo também ser chamadas de matrixinas. Todos os membros desta família são secretados como proenzimas, e para ser ativadas precisam ser clivadas na região do propeptídeo⁽⁶¹⁾. Estas enzimas são liberadas por neutrófilos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e, além disso, também são secretadas pelas células tumorais em resposta a uma variedade de estímulos^(72, 40).

A família de MMP inclui cerca de 25 proteínas as quais podem ser divididas em: collagenases (MMP-1, 8 e 13), gelatinases (MMP-2 e 9), estromelinas (MMP-3, 7 e 10), matrilisinas (MMP-7 e 26), MMPs tipo membrana (MMP-14, 15, 16, 17 e 24) e outras MMPs⁽⁶⁸⁾, que são classificadas pela especificidade ao substrato e, principalmente, de acordo a sua estrutura, como ilustra a **Figura 1**. Algumas metaloproteínases e seus respectivos substratos estão listados na **Tabela 1**.

Para que a enzima apresente a atividade colagenolítica, é necessário uma mudança conformacional na estrutura do colágeno, ou seja, as fibras tem que apresentar uma orientação específica, para que a tripla hélice seja desenovelada e posteriormente clivada para que possa encaixar no sítio

catalítico da enzima que é estreito para acomodar a estrutura em tripla hélice do colágeno⁽⁴⁰⁾.

Quando a atividade das MMPs não é devidamente controlada, pode acarretar uma disfunção orgânica, e esta atividade deve ser controlada por moléculas chamadas de inibidores endógenos de MMPs, que são a α -2-macroglobulina, inibidor de protease não-específico e um inibidor tecidual de MMPs mais específico (TIMPs), estes são representados pelos TIMP-1 a TIMP-4, são macromoléculas protéicas multifuncionais com capacidade de promover o crescimento celular, como também inibir a atividade das MMPs⁽⁵²⁾. O TIMP-2, por exemplo, demonstra grande afinidade por MMP-2, esta interação MMP-2/TIMP-2 é observada na **figura 2**^(39, 8, 32).

Diversidade biológica e funcional das metaloproteinases

Diversos processos biológicos ocorrem com a participação das metaloproteinases⁽⁷⁴⁾, como determinação da arquitetura da matriz extracelular⁽³³⁾, desenvolvimento embrionário⁽¹⁰⁾, implantação do blastocisto, morfogênese dos órgãos, desenvolvimento do sistema nervoso, ovulação, dilatação cervical, regressão uterina pós-parto⁽⁴⁴⁾ desenvolvimento e remodelação do tecido oral⁽⁶¹⁾, cicatrização⁽²⁰⁾, angiogênese⁽³¹⁾, apoptose⁽⁴³⁾.

A expressão das MMPs pode acontecer em resposta a estímulos específicos por células residentes do tecido conjuntivo, bem como pelas principais células inflamatórias que invadem o tecido nos eventos envolvidos na remodelação tecidual. Esta expressão é controlada através de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento⁽⁶¹⁾.

A participação das MMPs em diversos eventos biológicos deve-se ao fato de que elas podem influenciar potencialmente o comportamento celular através de algumas ações como: clivagem de proteínas que fazem a adesão célula-célula, pela liberação de moléculas bioativas na superfície celular ou por clivagem de moléculas presentes na superfície celular, as quais transmitem sinais do ambiente extracelular. Um exemplo destas ações citadas acima foi discutido por Lochter e colaboradores⁽³⁶⁾ (1997), bem como Noe e colaboradores⁽⁴⁶⁾ (2001), os quais demonstram que MMP-3 e MMP-7 ambas clivam a proteína de aderência caderina-E, molécula presente sobre a superfície das células onde, esta proteína desempenha um importante papel no mecanismo de adesão celular, mediando a interação célula-célula e célula-MEC, mantendo a integridade do tecido epitelial⁽⁶³⁾. Evidências indicam que a perda da função da caderina-E está relacionada com o processo de diferenciação e metástase no carcinoma de mama e do esôfago^(47, 41). O que pode ser claramente notado é que as clivagens realizadas pelas MMPs apresentam uma função central sobre o equilíbrio funcional do organismo, pois como pode ser observado as MMPs em determinadas situações alteram as funções normais de moléculas e células.

Ações das metaloproteinases nos processos patológicos gerais

As MMPs e seus inibidores são constitutivamente expressos e são componentes chave na rota para a modulação da MEC normal e seus distúrbios de constituição⁽⁵⁶⁾. A alteração desta dinâmica pode ser um fator crítico no desenvolvimento de algumas doenças, como por exemplo, diabetes,

formação da aterosclerose no sistema macrovascular e também complicações microvasculares^(58, 67). Neste sentido, a funcionalidade dos inibidores de MMPs tem que ser perfeita, pois alguns estudos tem demonstrado que a ausência de inibidores leva a complicações orgânicas. Pesquisas realizadas com animais demonstraram que, a ausência de TIMP-3 causou danos alveolares, ou seja, enfisema pulmonar⁽³²⁾ e apoptose mais rápida em células epiteliais mamárias, indicando uma função importante deste inibidor *in vivo*⁽¹⁵⁾.

Alguns dos principais sistemas orgânicos que sofrem as ações das MMPs no desenvolvimento de doenças são descritos a seguir:

Sistema pulmonar

O envolvimento das MMPs no sistema pulmonar é verificado com as MMP-1, 2, 3 e 9, as quais são produzidas por células vasculares do músculo liso e por uma variedade de células, incluindo células endoteliais, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais alveolares, potencialmente afetando a circulação pulmonar⁽²⁷⁾. Neste contexto, tem sido proposto que as MMPs possuem um papel importante na remodelação vascular pulmonar e também tem sido implicados no surgimento de hipoxia de hipertensão pulmonar crônica em modelos experimentais⁽¹⁹⁾.

Estudos recentes sugerem que MMPs estão envolvidas no desenvolvimento de hipertensão pulmonar aguda associada a condições como o embolismo pulmonar⁽¹⁸⁾. Por exemplo, a ativação das MMPs (especialmente MMP-2 e 9) que causa fragmentação da camada elástica interna, que é uma característica da hipertensão pulmonar^(27, 65). Portanto, é possível que a

geração de MMP-2 e 9, na situação citada acima, pode potencializar a vasoconstrição pulmonar durante o embolismo agudo, como também demonstrado pelos estudos que relacionam o sistema endotelial na patofisiologia da hipertensão pulmonar resultante da embolia^(64, 3).

Sistema gastro-intestinal

Tratando-se de desordens da mucosa intestinal, existem fortes evidências de que as MMPs são as principais proteinases participantes de alguns eventos, como em doenças inflamatórias intestinais e úlcera péptica, estudos indicam que a MMP-9 apresenta-se em níveis satisfatório, em culturas de células epiteliais de adultos normais e elevadas em quadros inflamatórios⁽²⁾.

Outros experimentos envolvendo o sistema gastrintestinal demonstram que MMP-1, 7 e 10 são expressas através de migração de enterócitos de úlceras intestinais de espécimes cirúrgicas provenientes de pacientes com colite isquêmica^(54, 4). A expressão destas MMPs foi observada em culturas de células de linhagem intestinal e é regulada por citocinas como fator de necrose tumoral alfa (α -TNF), interleucina-1 beta (IL-1 β) e fator beta de crescimento transformante (FCT β). Estes resultados indicam que principalmente as MMP-1, 7 e 10 estão envolvidas na homeostase intestinal ⁽⁵⁴⁾.

Sistema nervoso

Um outro alvo de pesquisas com as MMPs é o sistema nervoso central (SNC), inclusive recentemente com pesquisas sobre esclerose múltipla e outras doenças neurológicas⁽⁷³⁾, como encefalomielite autoimune⁽⁷⁰⁾. Um

trabalho recente de Yong e colaboradores⁽⁷⁴⁾ (2007), investigou o papel destas enzimas na esclerose múltipla. O que se sabe atualmente é que um adulto normal contém baixos níveis de MMPs, porém várias metaloproteinases não estão corretamente reguladas em várias desordens neurológicas do sistema nervoso central, em particular, a MMP-9, 7 e 2 tem se mostrado alteradas na esclerose múltipla em vários estudos^(35, 74). O nível elevado de MMPs no SNC é resultado do aumento da expressão por células neuronais, e por leucócitos que infiltram o SNC sobre qualquer injúria. Esta regulação errônea pode levar a sérios danos como a promoção de inflamação, rompimento da barreira hematoencefálica, desmielinização e toxicidade de axônios e neurônios⁽⁷³⁾.

No entanto, assim como em outras situações, as MMPs em níveis normais são benéficas ao SNC, sobre esta função ambígua destas moléculas se busca o controle na utilização de inibidores destas enzimas em determinadas enfermidades, devendo-se ponderar para a necessidade do uso destes inibidores investigando-se cada situação e se a expressão destas enzimas está realmente sendo prejudicial.

Sistema cardíaco

O desenvolvimento de deficiências cardíacas é acompanhado por remodelação dos tecidos ventriculares após o dano, um processo no qual as MMPs desempenham um papel essencial na remodelação do colágeno da MEC cardíaca^(16, 13). Resultados recentes demonstraram que pacientes com infarto agudo do miocárdio apresentaram níveis elevados de MMP-9⁽²⁶⁾. Estes valores elevados da MMP-9 têm sido considerados como prognóstico valioso de tempo de vida em pacientes com infarto agudo do miocárdio⁽⁵⁾.

A maioria das placas ateroscleróticas aórticas estão associadas a um infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário. O envolvimento desta condição inflamatória com a formação de ateromas resulta no aumento da expressão de metaloproteinases, onde principalmente a MMP-9 tem atividade predominante na mobilização dos macrófagos teciduais⁽⁶⁾. Dados experimentais demonstraram que estimulação inflamatória, como a que ocorre através das citocinas como a interleucinas-1 β , interleucina-6, α -TNF e espécies oxigênio-reativas aumentam a expressão de MMP-9 e ativam fibroblastos cardíacos⁽⁶⁰⁾. Estas citocinas pró-inflamatórias, bem como o estresse oxidativo, estão aumentados em pacientes com deficiência cardíaca, fatores estes que contribuem para as mudanças nos níveis séricos de MMP-9⁽⁷¹⁾.

A ação das metaloproteinases na cicatrização

O processo cicatricial envolve uma complexa seqüência de eventos celulares e bioquímicos com o objetivo de restaurar a integridade tecidual após o trauma⁽⁵⁵⁾. Dentre os eventos bioquímicos estão várias rotas enzimáticas, que são ativadas durante a reparação tecidual, estas enzimas incluem as metaloproteinases⁽²⁹⁾. Uma má regulação neste processo pode induzir a formação de cicatriz exagerada, como observada nas quelóides e cicatrizes hipertróficas, as quais levam aos prejuízos funcionais e psicosociais nestes pacientes⁽⁵³⁾.

Em nosso laboratório, o tema cicatrização vem sendo estudado, tanto no campo da pesquisa dos mediadores químicos que interferem na cicatrização, como também pesquisas experimentais envolvendo novas possibilidades

terapêuticas, como por exemplo, lectinas extraídas de semente de *Canavalia brasiliensis*⁽⁵⁹⁾, e polissacarídeos biologicamente ativos extraídos da goma do cajueiro *Anacardium occidentale*^(50, 55, 42), tem sido testados como produto terapêutico em feridas experimentais, e as próprias MMPs tem sido alvos de investigações sobre seu papel em processos cicatriciais, e a ação de lectinas sobre sua expressão⁽⁵⁹⁾.

As MMPs são imprescindíveis em todos os estágios da cicatrização, degradando todos os componentes da MEC e apresentam habilidade para sintetizar colágeno e outros membros da MEC, portanto são importantes na remodelação da ferida. Estas proteases apresentam grande importância em processos básicos das células, principalmente em mecanismos fisiológicos. Nas doenças podem representar prejuízos no mecanismo regulatório primário da destruição tecidual (ex. artrite reumatóide) ou deposição (ex. fibrose e cicatrização)⁽⁶⁹⁾.

O processo de cicatrização é um evento biológico complexo no qual um grande número de células residentes e infiltrantes estão envolvidas incluindo, queratinócitos, fibroblastos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos e mastócitos⁽¹¹⁾. Estas células regulam uma a outra através da mediação de várias citocinas⁽²⁵⁾. Estes processos podem ser mediados através da ativação das MMPs, as quais são diferentemente expressas durante o processo cicatricial⁽⁴⁵⁾.

A resposta à injúria e subsequente reparo (reepitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e fibroplasia) está relacionada à atividade celular que é influenciada por interações célula-célula e célula/MMPs. A sequência de eventos do reparo pode ser dividida em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação⁽³⁴⁾. A fase inflamatória é caracterizada pelo

influxo de neutrófilos, posteriormente os macrófagos concluem o processo inflamatório, realizando um debridamento no local da injúria⁽¹²⁾. Este processo não é apenas facilitado pela fagocitose, mas também através da produção de enzimas como a collagenase e elastase⁽¹²⁾.

Nesta fase há o escapamento de componentes do plasma, incluindo fibrina e altos níveis de MMP-9. O recrutamento de neutrófilos ocorre poucas horas após a injúria, e logo em seguida chegam os linfócitos e macrófagos. Neste estágio, a MMP-9 encontrada nos grânulos de macrófagos e neutrófilos são liberadas no local da lesão⁽⁶⁹⁾. Uma vez que o sítio da ferida foi limpo, ocorre também um aumento na angiogênese e fibroblastos migram para iniciar a fase proliferativa e para deposição de colágeno para uma nova MEC, formando assim, o tecido de granulação⁽⁵⁰⁾. Nesta fase é essencial que ocorra um controle entre a ação e inibição das MMPs, pois como observado por Fujiwara e colaboradores⁽²¹⁾ (2005) foi encontrada um aumento na produção de colágeno e MMPs em cultura de fibroblastos derivados de quelóides, quando comparadas com fibroblastos de pele normal.

Tem sido demonstrado nesta fase uma super-expressão de MMP-1, 3 e 9 na borda da cicatrização do ferimento. Uma distribuição espacial de MMPs tem sido observada em distintas populações de queratinócitos, sugerindo que ocorre diferenças na expressão das MMPs entre as fases agudas e crônicas da cicatrização. A fase de remodelação é marcada por uma nova matriz colagenosa a qual se torna entrelaçada e organizada. As MMPs facilitam a migração de fibroblastos na MEC e no leito da ferida⁽¹⁾. Estudos demonstraram que um aumento na produção de MMPs facilita a contração do colágeno mediada por fibroblastos conduzindo ao fechamento da ferida⁽⁶⁹⁾.

Recentemente, EGOZI e colaboradores⁽¹⁴⁾ (2003) demonstraram que, na fase inflamatória da cicatrização, a infiltração neutrofílica na ferida foi significativamente menor em camundongos com deficiência de mastócitos em relação a camundongos normais. A relação das MMPs e mastócitos foi observada na angiogênese⁽¹⁾. Tem-se demonstrado que a infiltração de mastócitos e a ativação de MMP-9 coincidem com a mudança angiogênica em lesões pré-malignas durante a carcinogênese do epitélio escamoso em camundongos⁽⁹⁾. Em outro estudo, foi observado que os níveis de MMP-2 e 9 estão aumentados dez a quinze dias após o ferimento experimental em roedores, ou seja, quando a angiogênese é ativada⁽²⁵⁾.

As MMPs tem sido encontradas em quantidade elevada em feridas crônicas, que não progridem para a devida resolução⁽⁴⁸⁾. Estes níveis elevados podem resultar em uma não controlada degradação, e uma nova deposição de componentes da matriz extracelular como colágeno, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, bem como na degradação de vários fatores de crescimento protéicos necessários a uma cicatrização bem coordenada. O comportamento normal destas enzimas seria um pico enzimático durante o início da cicatrização, e então um declínio no estágio de aparecimento de tecido de granulação e subsequentemente novo tecido epitelial no ferimento⁽⁴⁹⁾.

Conclusões e Perspectivas

As MMPs participam fazem parte de uma variedade de eventos importantes para o organismo, porém para garantir a integridade do tecido é necessário um dinâmico balanço entre as MMPs e a atividade dos inibidores

destas enzimas, ou seja, os TIMPs, pois um descontrole na atividade de MMPs provoca uma excessiva degradação ou acumulação de elementos constitutivos da MEC.

O papel de degradação das MMPs tem fundamental importância uma vez que elas controlam os diversos eventos biológicos, como por exemplo, a remodelação tecidual, porém é observado que o desequilíbrio entre a expressão e a inibição enzimática está intimamente ligado ao desenvolvimento de diversas doenças, como observado em eventos anormais nos sistemas pulmonares, cardíaco, intestinais e neurológicos.

Vale ressaltar que a importância das MMPs vai além da sua participação na remodelação tecidual, seu papel é muito importante na manutenção estrutural e funcional dos tecidos, para que estes não venham a perder sua arquitetura normal e com isso contribuindo para o aparecimento de uma desordem orgânica.

Um aspecto interessante a respeito das metaloproteinases é sua característica de redundância funcional, alguns estudos utilizando camundongos transgênicos, *knockouts* para MMP- 3, 7, 9 e 12, mostraram que esses animais obtiveram uma super-expressão de MMP-1 e 3⁽⁵⁷⁾, talvez como mecanismo compensatório da atividade proteásica, ou seja, a ablação de uma MMP em particular, poderá induzir a expressão de uma outra MMP, demonstrando que a multiplicidade de formas das MMPs é de extrema importância para a manutenção e reparo da MEC como observado por SOUZA e LINE⁽⁶¹⁾ 2002.

A variedade de informações encontradas nesta atualização sobre as metaloproteinases e seus inibidores, é de grande importância e vem

aumentando a cada dia, revelando suas funções na gênese de diversos e processos patológicos. Porém muito se tem ainda a esclarecer a respeito destas intrigantes moléculas, pois sua ação *in vivo* é complexa e bastante diversificada.

Dentre as linhas de pesquisas e aplicação biológica das MMPs podemos destacar o tratamento e o diagnóstico. Estudos realizados por BOZ e colaboradores⁽⁷⁾ (2006), demonstraram em estudos clínicos a possibilidade do interferon- β regular os níveis de MMPs, sobretudo a MMP-9 em pacientes com esclerose múltipla, ou seja, uma significativa redução dos níveis desta enzima que encontra-se alterada nesta doença.

Destacam-se também a utilização de MMPs como marcadores teciduais de determinadas doenças, como sua expressão em lesões benignas e malignas de tireóide, esses estudos demonstraram que as MMP-2 e 7 podem ser utilizadas como marcadores no diagnóstico diferencial para distinguir carcinoma folicular invasivo e adenoma folicular⁽³⁷⁾.

Podemos ressaltar as pesquisas a respeito do envolvimento das MMPs com o aparecimento de determinadas doenças. Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado a relação entre a gelatinase B (MMP-9) como um componente importante da estabilidade da placa aterosclerótica⁽²²⁾. A ruptura da placa aterosclerótica é caracterizada pelo acúmulo de células mononucleares inflamatórias e o aumento da expressão de MMPs, e tanto essas células, quanto a MMP-9 são induzidas por mediadores inflamatórios, incluindo TNF- α e LDL-oxidado⁽⁶²⁾. A MMP-9 é derivada principalmente de monócitos e macrófagos⁽⁶²⁾, que são os principais tipos celulares envolvidos na iniciação, progressão e complicações da aterosclerose. Recentemente, estudos

têm demonstrado que os níveis séricos de MMP-9 estão aumentados em pacientes com diabetes tipo 2^(24, 38), potencialmente contribuindo para o aumento de risco cardiovascular⁽¹⁷⁾.

Tabela 1- Tipos de metaloproteinases humanas com seus diferentes substratos e massas moleculares.

MMP	Sinônimo	Peso molecular (kDa)	Substrato	Referências
1	Colagenase 1	45	Colágeno tipo I	(61) 1416
2	Gelatinase A	66, 62	Proteoglicanos, colágeno IV, V, VII e X, fibronectina	(69, 61, 44) 1418
3	Estromelisina 1	45	Proteoglicanos, colágeno X, XI, procolágeno	(28) 1419
7	Matrilisina 1	19	Fibronectina, Plasminogênio	(51) 1420
8	Colagenase 2	58	Proteoglicanos	1421
9	Gelatinase B	86, 67	Plasminogênio, colágeno IV	(69, 61) 1422
10	Estromelisina 2	44	Estromelisina 1	(61) 1423
11	Estromelisina 3	47	IGFBP-1 (proteína de ligação da somatomedina)	(61) 1424
12	Elastase de macrófago	22	Plasminogênio, elastina, colágeno IV, Fibronectina	(28) 1425
13	Colagenase 3	48	Colágeno tipo I	(61) 1426
14	MT1-MMP	54	CD44, Colágeno tipo I	(30) 1427
15	MT2-MMP	61	Transglutaminase de superfície	(44) 1428
16	MT3-MMP	55	Transglutaminase de superfície	(30) 1429
17	MT4-MMP	54	Fibrina	(30) 1430
18	Colagenase 4	-	Colágeno tipo I	(44) 1431

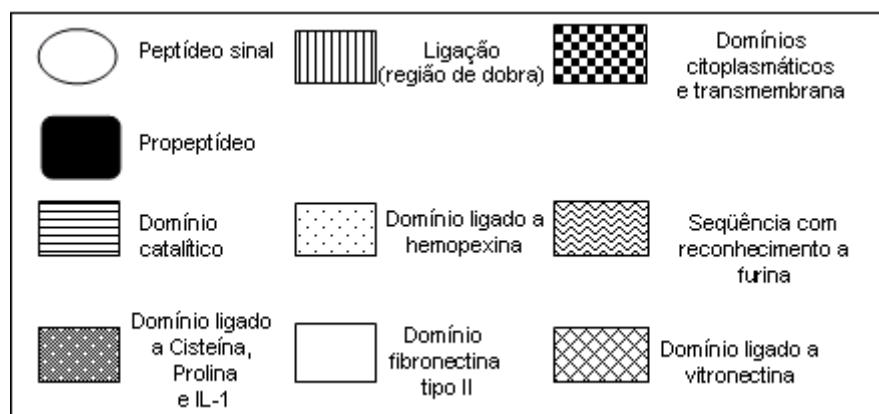
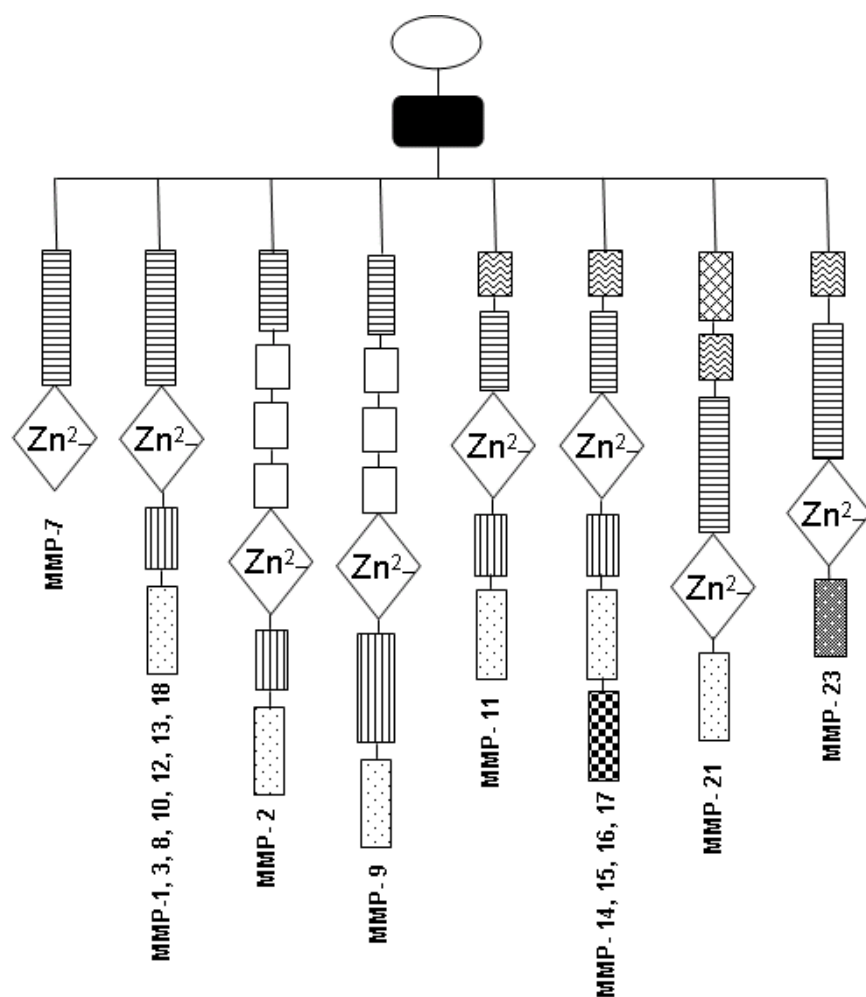


Figura 1- Arranjo dos domínios das diferentes metaloproteínases em humanos, demonstrando as estruturas em comum das metaloproteínases e suas particularidades estruturais.

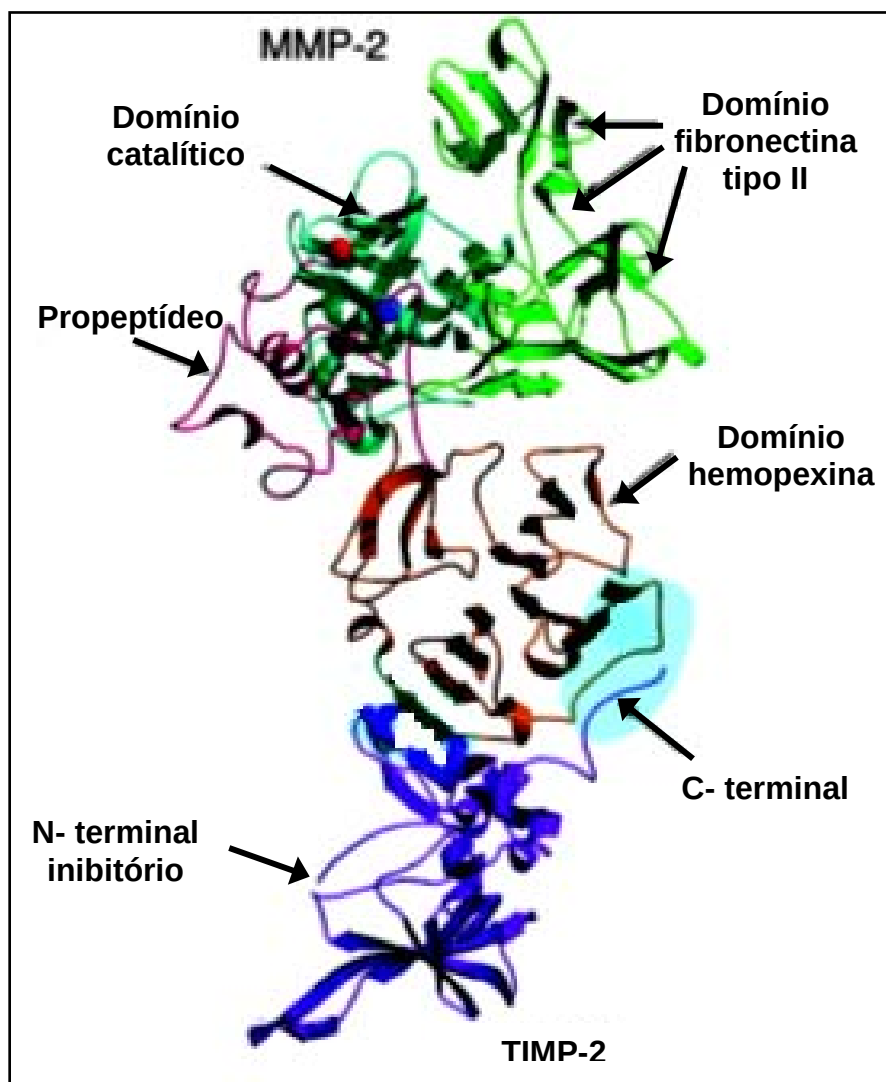


Figura 2. Estrutura molecular da interação entre a MMP-2 e seu inibidor tecidual, o TIMP-2, modificado segundo TRUDEL⁽⁶⁶⁾ (2003).

REFERÊNCIAS

1. ARMSTRONG, D.G.; JUDE, E.B. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *J Am Podiatr Med Assoc*, v. 92, n. 1, p. 12–8, 2002.
2. ATKINSON, J. J.; SENIOR, R. M. Matrix Metalloproteinase-9 in Lung Remodeling. *Am J Resp Cell Mol Biol*, v. 28, n.1, p. 12-24, 2003.
3. BATTISTINI, B. Modulation and roles of the endothelins in the pathophysiology of pulmonary embolism. *Can J Physiol Pharmacol*, v. 81, n.6, p. 555-69, 2003.
4. BISTER, V.O. et al. Differential expression of three matrix metalloproteinases, MMP-19, MMP-26, and MMP-28, in normal and inflamed intestine and colon cancer. *Dig Dis Sci*, v. 49, n. 4, p. 653–61, 2004.
5. BLANKENBERG, S. et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*, v. 107, n. 12, p. 1579-85, 2003.
6. BOYUM, J. et al. Matrix metalloproteinase activity in thoracic aortic aneurysms associated with bicuspid and tricuspid aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*, v. 127, n. 3, p. 686-91, 2004.
7. BOZ, C. O. et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis treated with interferon beta. *Clin Neurol Neurosurg*, v. 108, n. 2, p. 124–8, 2006.
8. CORCORAN, M. L. et al. MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enz Protein*, v. 49, n. 1-3, p. 7-19, 1996.

9. COUSSENS, L.M. et al. Inflammatory mast cells upregulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Develop*, v. 13, n. 11, p. 1382–397, 1999.
10. CHEN, W. et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue-derived inhibitors of metalloproteinase in fetal and adult skins. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 39, n. 5, p. 997–1005, 2007.
11. CHILDRESS, R. N.; STECHMILLER, J. K. Role of nitric oxide in wound healing. *Biol Res Nursing*, v. 4, n. 1, p. 5-15, 2002.
12. DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M.C. wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*, v. 9, n. 1, p. 283-89, 2004.
13. DIEZ, J. Emerging role of metalloproteinases in the pathophysiology of cardiac diseases. *Eur J Clin Invest*, v. 32, n. 5, p. 291-4, 2002.
14. EGOZI, E.I. et al. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. *Wound Repair Reg*, v. 11, n. 1, p. 46–4, 2003.
15. FATA, J.E. et al. Accelerated apoptosis in the Timp-3–deficient mammary gland. *J Clin Invest*, v. 108, n. 6, p. 831-41, 2001.
16. FELDMAN, A. M.; LI, Y. Y.; MCTIERNAN, C. F. Matrix metalloproteinases in pathophysiology and treatment of heart failure. *Lancet*, v. 357, n. 9257, p. 654-5, 2001.
17. FISCHOEDER, A. et al. Insulin augments matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes. *Cardiovasc Res*, v. 73, n. 4, p. 841–48, 2007.
18. FORTUNA, G. M. et al. A role for matrix metalloproteinase-9 in the hemodynamic changes following acute pulmonary embolism. *Int J Cardiol*, v. 114, n. 1, p. 22-27, 2007.

19. FRISDAL, E. et al. Gelatinase expression in pulmonary arteries during experimental pulmonary hypertension. *Eur Resp J*, v. 18, n. 5, p. 838-45, 2001.
20. FU, X. B. et al. Epidermal stem cells are the source of sweat glands in human fetal skin: Evidence of synergetic development of stem cells, sweat glands, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Wound Repair Reg*, v. 13, n. 1, p.102–8, 2005.
21. FUJIWARA, N. H. et al. Type 1 Collagen as an Endovascular Stent-Graft Material for Small-diameter Vessels: A Biocompatibility Study. *J Vasc Intervent Radiol*, v.16, n. 9, p. 1229-236, 2005.
22. GOUGH, P. J. et al. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*, v. 116, n. 1, 59–69, 2006.
23. GROSS, J.; LAPIÈRE, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 48, n. 6, p. 1014-1022, 1962.
24. HAFFNER, S. M. et al. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, v. 106, n. 6, p. 679–84, 2002.
25. IBA, Y. et al. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *Int J Immunopharmacol*, v. 4, n. 14, p. 1873-880, 2004.
26. INOKUBO, Y. et al. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome. *Am Heart J*, v. 141, n. 2, p. 211-7, 2001.

27. JEFFERY, T. K.; MORRELL, N. W. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis*, v. 45, n. 3, p. 173-202, 2002.
28. JOHNSON, J. L. et al. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9 and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, n. 43, p. 15575-580, 2005.
29. KAPOOR, M.; APPLETON, I. Wound healing: Abnormalities and future therapeutic targets. *Curr anaesthe: Critical Care*, v. 16, n. 2, p. 88-93, 2005.
30. KOJIMA, S. et al. Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP. *FEBS Letters*, v. 480, n. 2-3, p. 142-46, 2000.
31. KUZUYA M, IGUCHI A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb*, v. 10, n. 5, p. 275–82, 2003.
32. LECO, K. J. et al. Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3). *J Clin Invest*, v. 108, n. 6, p. 817-29, 2001.
33. LEE, M. H.; MURPHY, G. Matrix metalloproteinases at a glance. *Cell Sci.*, v. 117, n. 18, p. 4015–16, 2004.
34. LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*, v. 25, n. 1, p. 9-18, 2007.
35. LINDBERG, R. L. et al. The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis. *Brain*, v. 124, n. 9, p. 1743-53, 2001.

36. LOCHTER, A. et al. Matrix metalloproteinase stromelysin-I triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol*, v. 139, n. 7, p. 1861-72, 1997.
37. MAR, K. C. et al. Expression of matrix metalloproteinases in benign and malignant follicular thyroid lesions. *Histopathol*, v. 48, n. 3, p. 286-94, 2006.
38. MARX, N. et al. Antidiabetic PPAR gamma-activator rosiglitazone reduces MMP-9 serum levels in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 23, n. 2, p. 283-8, 2003.
39. MATRISIAN, L. M. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioassays*, v. 14, n. 7, p. 455-63, 1992.
40. McANULTY, R. J. Cells in focus Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 39, n. 4, p. 666-71, 2007.
41. MIYATA, M. Relationship between E-cadherin expression and lymph node metastasis in human esophageal cancer. *Int J Oncol*, v. 4, p. 61-5, 1994.
42. MONTEIRO, F. M. F. et al. Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing. *Proc Biochem*, v. 42, n. 5, p. 884-888, 2007.
43. NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, v. 69, n. 3, p. 562-73, 2006.
44. NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, v. 274, n. 2, p. 491-94, 1999.
45. NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Role of metalloproteinases in inflammatory bowel disease. *Mol Aspects Med*, v. 26, n. 4-5, p. 379-90, 2005.

46. NOE, V. et al. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-I. *J Cell Sci*, v. 114, n. 1, p. 111-18, 2001.
47. OKA, H. et al. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and relationship to metastasis. *Cancer Res*, v. 53, n. 7, p. 1696-701, 1993.
48. OVINGTON, L. G. Overview of matrix metalloprotease modulation and growth factor protection in wound healing. Part 1. *Ostomy Wound Manage*, v. 48, n. 6, p. 3 -7, 2001.
49. OVINGTON, L. G. Advances in wound dressings. *Clin Dermatol*, v. 25, n. 1, p. 33-8, 2007.
50. PAIVA, M. G. *Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (Anacardium occidentale L.) em cicatrização experimental*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, 100 p., Recife, 2003.
51. PARK, M. J. et al. Protein kinase C activation by phorbol ester increases in vitro invasion through regulation of matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases system in D54 human glioblastoma cells. *Neurosci Lett*, v. 290, n. 3, p. 201-204, 2000.
52. PEPPER, M. S. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator- plasmin system in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 21, n. 7, p. 1104-17, 2001.
53. ROBLES, D. T.; BERG, D. Abnormal Wound Healing: Keloids. *Clin Dermatol*, v. 25, n. 1, p.26-32, 2007.
54. SALMELA, M.T. et al. Collagenase-1 (MMP-1), matrilysin-1 (MMP-7), and stromelysin-2 (MMP-10) are expressed by migrating enterocytes during

- intestinal wound healing. *Scand J Gastroenterol*, v. 39, n. 11, p. 1095 – 1104, 2004.
55. SCHIRATO, G. V. et al. The polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. in the inflammatory phase of the cutaneous wound healing. *Cienc Rural*, v. 36, n. 1, p. 149-54, 2006.
56. SCHMOKER, M. D. et al. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in atherosclerotic and nonatherosclerotic thoracic aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg*, v. 133 n. 1, p. 155-61, 2007.
57. SHAPIRO, S. D. Mighty mice: transgenic technology “knockout” questions of matrix metalloproteinase function. *Matrix Biol*, v. 15, n. 8-9, p. 527-33, 1997.
58. SIEREVOGEL, M. J. et al. Matrix metalloproteinases: a therapeutic target in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des*, v. 9, n. 13, p. 1033-40, 2003.
59. SILVA, F. O. *Perfil de Proteases e Avaliação Histopatológica de Lesões Cutâneas Tratadas com a Lectina Isolada das Sementes da Canavalia brasiliensis*. Recife, 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal Rural de Pernambuco.
60. SIWIK, D. A.; PAGANO, P. J.; COLUCCI, W. S. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 280, n. 1, p. 53-60, 2001.
61. SOUZA, A. P.; LINE, S. R. P. The biology of matrix metalloproteinases. *Rev FOB*, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2002.
62. STAWOWY, P. et al. Furin-like proprotein convertases are central regulators of the membrane type matrix metalloproteinase-pro-matrix metalloproteinase-2 proteolytic cascade in atherosclerosis. *Circulation*, v. 111, n. 21, p. 2820-27, 2005.

63. TAKEICHI, M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, v.102, n. 4, p. 639-55, 1988.
64. TANUS-SANTOS, J. E. et al. The hemodynamic effects of endothelin receptor antagonism during a venous air infusion in dogs. *Anesth Analg*, v. 90, n. 1, p. 102-06, 2000.
65. TODOROVICH-HUNTER, L. et al. Increased pulmonary artery elastolytic activity in adult rats with monocrotaline-induced progressive hypertensive pulmonary vascular disease compared with infant rats with nonprogressive disease. *Am Rev Resp Dis*, v. 146, n. 1, p. 213-23, 1992.
66. TRUDEL, D. et al. Significance of MMP-2 Expression in prostate cancer. *Cancer Res*, v. 63, p. 8511-15, 2003.
67. TSILIBARY, E. C. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. *J Pathol*, v. 200, n. 4, p. 537-46, 2003.
68. VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res*, v. 92, n. 8, p. 827-39, 2003.
69. WANG, W. et al. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation*, v. 106, n. 12, p. 1543-549, 2002.
70. WEAVER, A. et al. An elevated matrix metalloproteinase in experimental autoimmune encephalomyelitis is protective by affecting Th1/Th2 polarization. *FASEB J*, v. 19, n. 12, p. 1668-70, 2005.
71. WILSON, E. M. et al. Plasma matrix metalloproteinase and inhibitor profiles in patients with heart failure. *J Card fail*, v. 8, n. 6, p. 390-8, 2002.

72. WOESSNER Jr, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*, v.5, n. 8, 2145-54, 1991.
73. YONG, V. W. et al. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, v. 2, n.7, p. 502-11, 2001.
74. YONG, V. W. et al. Elevation of matrix metalloproteinases (MMPs) in multiple sclerosis and impact of immunomodulators. *J Neurol Sci*, 2007. In Press

Autor para correspondência:

Rosangela Vidal de Souza Araújo
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA,
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE.
Av. Moraes Rêgo s/n, Campus Universitário, 50670-910, PE, Brazil.
Fone/Fax: (081) 3271 8484/3271 8485
E-mail: rosangela.vidal@gmail.com

CAPÍTULO II: ATIVIDADE COLAGENOLÍTICA (MMP-2 e MMP-9) E
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE LESÕES CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS
EM CAMUNDONGOS TRADADOS COM A LECTINA ISOLADA DAS
SEMENTES DE *Canavali brasiliensis*.

Atividade colagenolítica (MMP-2 e MMP-9) e avaliação histopatológica de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada de sementes de *Canavalia brasiliensis*

Colagenolytic activity (MMP-2 and MMP-9) and histopathological analysis of the treatment of cutaneous healings in treated mice with lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds

Flávio de Oliveira Silva ^{I, VII}, Rosângela Vidal de Souza Araújo ^{II, VII, VIII*}, Giuliana Viegas Schirato ^{I, VII}, Edson Teixeira de Holanda ^{III}, Benildo de Sousa Cavada ^{IV}, José Luiz de Lima-Filho ^{V, VII}, Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão ^{VI}, Ana Lúcia Figueiredo Porto ^{VI, VII}

RESUMO

O objetivo desse estudo foi determinar o perfil da atividade colagenolítica e avaliar clínica e histopatologicamente o efeito do tratamento tópico de feridas cutâneas com a lectina isolada das sementes da *Canavalia brasiliensis* (ConBr) livre e conjugada com o seu açúcar específico. Para isso, lesões cirúrgicas foram produzidas na região dorsal de camundongos, divididos em grupos, de acordo com o tratamento que se segue: NaCl (150mM), manose (0,1M), ConBr (10µg) e ConBr/manose (10µg em solução fisiológica com manose 0,1M). Amostras da área lesada foram coletadas para determinação do perfil de atividade das proteases e análise histopatológica (2º, 7º e 12º dias pós-operatório). Entre os grupos estudados, o ConBr/manose apresentou a maior atividade proteolítica no 12º dia de pós-operatório, seguido do grupo ConBr. O grupo ConBr apresentou sinais inflamatórios menos intensos que os outros grupos avaliados, tendo evoluído com maior

^I Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil.

^{II} Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

^{III} Curso de Medicina, Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará

^{IV} Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

^V Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco

^{VI} Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n. Dois Irmãos, Recife-PE, CEP: 52171-900.

^{VII} Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, Universidade Federal de Pernambuco.

^{VIII} Associação Caruaruense de Ensino Superior, ASCES, Caruaru, Pernambuco, Brasil.

*rosangela.vidal@gmail.com Autor para correspondência.

1 percentual de contração, contudo, o grupo ConBr/manose apresentou melhor padrão de
2 organização das fibras colágenas. A lectina isolada das sementes da *Canavalia*
3 *brasiliensis* favoreceu o processo cicatricial das lesões cutâneas experimentais, tendo
4 apresentado um melhor efeito sob o ponto de vista histopatológico quando usada em
5 associação com a manose.
6

7
8 **Palavras-chave:** *Canavalia brasiliensis*, cicatrização, lectinas, metaloproteinases,
9 reparo tecidual.

10 **ABSTRACT**

11 The objective of the present study was determining the collagenolytic activity and
12 evaluate clinically and histopathological effect of the topic treatment of cutaneous
13 healings with free and conjugate lectin of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) and their
14 specific sugar. For conclude the objective, cirurgic lesions were produced on the dorsal
15 regions of the mice, divided in groups, according with the following treatment: 10µg
16 ConBr, 10µg ConBr/manose in physiologic solution with 0,1M manose, 150mM NaCl,
17 0,1M manose. Samples of the injured area had been collected for determination of the
18 collagenolytic activity and histopathological analysis (2nd, 7th e 12th days after the
19 surgery). Among the studied groups, ConBr/manose was which presented the highest
20 proteolytic activity on the 12th day post surgery, followed of the ConBr group. The
21 group ConBr presented inflammatory less intense than the other groups evaluated,
22 evolution with the highest percent of wound contraction, however the group
23 ConBr/manose presented the best standard regarding the organization of the
24 collagen fibres on the 12 day after the surgery. The ConBr favored the wound
25 healing process of the experimental cutaneous lesions, has

1 been presented the best effect under the histopathological point of view when used in
2 association with the manose.

3
4 **Key words:** *Canavalia brasiliensis*, lectins, metalloproteinases, wound healing, wound
5 repair.

6 **INTRODUÇÃO**

7 A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de
8 eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do
9 tecido. Como desencadeante da cicatrização, ocorre a perda tecidual, a partir da qual os
10 processos fisiológicos voltam-se completamente para o reparo de um evento danoso ao
11 organismo. A perda tecidual pode atingir a derme completa ou incompletamente, ou
12 mesmo atingir todo o órgão, chegando ao tecido celular subcutâneo (MANDELBAUM
13 et al., 2003).

14 De acordo com Fazio e colaboradores (2000), pode-se classificar os estágios da
15 cicatrização e dividi-los de uma forma mais completa em cinco etapas: coagulação,
16 inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação. Estas fases, em um
17 determinado período do processo, são sobrepostas, o que caracteriza o sucesso da
18 cicatrização. Vários organismos apresentam uma incrível capacidade de regeneração
19 tecidual (ODELBERG, 2005). Em contraste, os mamíferos possuem uma reduzida ou
20 até mesmo ausente capacidade regenerativa (MANUEL & KOZAK, 2006).

21 A cicatrização é uma associação de eventos migratórios e de remodelação, que
22 requerem a ação de metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores teciduais
23 (TIMPs) (MANUEL & KOZAK, 2006). Estas são endopeptidases zinco-dependentes,
24 que apresentam papel fundamental na manutenção da estrutura tecidual e no reparo a
25 lesões, entretanto também estão envolvidas em algumas doenças como em processos
26 neoplásicos (NEWMAN et al., 2008).

1 A investigação do efeito de lectinas sobre a atividade de MMPs foi alvo do
2 estudo com a lectina de *Canavalia ensiformis* (Con A), a qual induziu a produção de
3 MMP-9 por linfócitos *in vitro* (DUBOIS et al., 1998). A MMP-9 em associação com a
4 MMP-2 é fundamental para o reparo tecidual. Lectinas são proteínas que ligam
5 carboidratos, de origem não imune, e são encontradas em todos os tipos de organismos
6 vivos, as quais decifram os glicocódigos encontrados na estrutura de glucanas solúveis e
7 nos glicoconjugados da membrana celular (GABIUS & GABIUS, 1997). Lectinas de
8 plantas, principalmente as espécies oriundas de leguminosas, apresentam-se como o
9 melhor grupo de lectinas estudadas (CAVADA et al., 2007). Lectinas dessa família
10 representam um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes
11 especificidades a carboidratos. A lectina extraída de *Canavalia brasiliensis* apresenta a
12 afinidade por D-glucose/D-manose. Dentre os efeitos biológicos da ConBr pode-se
13 destacar: indução de apoptose celular (BARBOSA et al., 2001), produção de óxido
14 nítrico *in vitro* e *in vivo* (ANDRADE et al., 1999), liberação de histaminas por
15 mastócitos (GOMES et al., 1994), dentre outras atividades.

16
17 O presente estudo teve o objetivo de analisar através da atividade colagenolítica
18 e do perfil histopatológico o efeito da lectina extraída da semente de *Canavalia*
19 *brasiliensis* (ConBr) sobre lesões de pele em camundongos.

20 MATERIAL E MÉTODOS

21 Camundongos Swiss machos, com 10 semanas de idade, pesando $40,0 \pm 5,0$ g
22 foram criados e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami,
23 Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram alocados em gaiolas
24 individuais, permanecendo em macroambiente controlado (fotoperíodo de 12h
25 claro/escuro, temperatura $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade $55 \pm 10\%$) com fornecimento de água e
ração à vontade.

1 A lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) foi gentilmente cedida pelo Prof.
2 Dr. Benildo de Souza Cavada. A lectina liofilizada foi solubilizada em solução NaCl
3 150mM até obter a concentração final de 100µg/mL. Também foram preparadas
4 soluções com a lectina ConBr conjugada com o seu açúcar específico, neste caso, a
5 solução de lectina em salina contendo manose 0,1M foi incubada a 37°C por 30
6 minutos. Após a dissolução, as soluções foram filtradas em membranas 0,22µm e,
7 posteriormente, armazenadas em frascos esterelizados e estocadas a -4°C até a sua
8 utilização.

9 O procedimento cirúrgico experimental e a avaliação clínica das lesões foram
10 realizados de acordo com Schirato et al. (2006). Os animais (n=25/grupo) foram
11 divididos de acordo com o tratamento experimental empregado: ConBr (10µg em
12 solução salina), ConBr/manose (10µg em solução salina contendo manose 0,1M),
13 manose (0,1M em solução salina) e NaCl (0,15M). Cada lesão recebeu diariamente
14 100µL das soluções testadas. Diariamente, cada lesão foi avaliada clinicamente e
15 mensurada por auxílio de um paquímetro, segundo equação descrita por Prata et al.
16 (1988).

17 No 2º, 7º e 12º dias pós-operatório (P.O.), os animais (n=10/grupo/tempo) foram
18 anestesiados e amostras de tecido da área lesada foram retiradas. Imediatamente após a
19 retirada do tecido, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e pulverizadas
20 em almofariz. Em seguida, as amostras de pele foram homogeneizadas como descrito
21 por NEELY et al (1992). As amostras foram centrifugadas a 6000 x g por 30 minutos e
22 os sobrenadantes utilizados para análise de metaloproteinases.

23 A atividade colagenolítica foi realizada utilizando-se azocolágeno como substrato
24 segundo método descrito por Chavira et al. (1984) modificado, pela mudança no valor
25 do pH de 7,8 para 7,2. O azocolágeno foi suspenso em Tris-HCl 50mM pH 7,2, CaCl₂

1 1mM em uma concentração final de 5mg/mL. O sistema de reação foi constituído por
2 150µL do homogenato de tecido de pele, 150µL de solução tampão Tris-HCl 50mM pH
3 7,2, CaCl₂ 1mM e 270µL da solução de azocolágeno (5mg/mL). O sistema de reação foi
4 incubado a 37°C sob agitação constante. Após 18h de incubação, a reação foi
5 interrompida por centrifugação a 10.000x g por 15 minutos a 4°C. A absorbância do
6 sobrenadante foi lida a 520nm. Uma unidade de atividade colagenolítica foi descrita
7 como sendo a variação de absorbância de 0,01 durante 18 horas de reação.
8

9 Com os camundongos anestesiados conforme previamente descrito, amostras do
10 tecido lesionado foram coletadas no 2º, 7º e 12º dias de P.O., com o objetivo de retirar
11 fragmentos da área para realizar a análise histopatológica. As amostras foram
12 submetidas ao processamento histológico de rotina e incluídas em parafina. Após
13 microtomia, os cortes foram corados pelo Tricrômico de Masson.

14 As áreas foram submetidas inicialmente ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk
15 ($p < 0,05$) para se avaliar a adequação dos dados à análise paramétrica. Constatada a distribuição
16 normal dos dados, estes foram comparados aos pares, utilizando-se o Teste t e considerando-se
17 um nível de significância de 5%. Os resultados da atividade enzimática foram comparados
18 utilizando-se t-test Student's, usando o GraphPad Prism (versão 5.0) e as diferenças foram
19 consideradas significantes quando $p < 0,05$.

20 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

21 Medicamentos oriundos de plantas são frequentemente usados no tratamento de doenças
22 graves, como doenças autoimunes, inflamações e alergias (YANG et al., 2008).

23 Algumas lectinas de origem vegetal, assim como os TIMPs, são moléculas que
24 controlam a atividade das metaloproteinases. As metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9)
25 são cataliticamente específicas para o colágeno tipo IV a V (WOESSNER, 1994). Os
26 dados apresentados neste trabalho mostram que a lectina ConBr apresenta efeito positivo
sobre o modelo de cicatrização experimental em camundongos. A presença

1 das metaloproteinases (MMP-9 e MMP-2) foi confirmada pela determinação de
2 atividade colagenolítica usando azocolágeno, o qual é o ensaio preferencial para análise
3 das gelatinases MMP-2 e MMP-9 (CHAVIRA et al., 1984).
4

5 Analisando os resultados, foi possível observar que durante a fase inflamatória
6 (2º dia P.O.), o grupo ConBr, foi aquele que apresentou uma menor degradação do
7 azocolágeno (Figura 1), e sinais inflamatórios macroscópicos menos intensos nas lesões
8 (Figura 2), este grupo também apresentou diferenças estatisticamente significativas em
9 relação aos demais grupos na medida da área das lesões (Figura 3), este achado do
10 grupo ConBr pode significar que houve um menor afluxo de células inflamatórias e
11 consequentemente menor secreção de MMPs, resultando em um melhor aspecto da
12 ferida neste tempo do estudo (2º dia P.O.). Nos demais grupos houve uma semelhança
13 quanto aos aspectos macroscópicos das lesões, e também uma maior atividade
14 colagenolítica quando comparados ao grupo ConBr (Figura 1).

15 No 7º dia P.O., ou seja, já em fase de fibroplasia, o grupo tratado com a lectina
16 ConBr teve uma clara evolução cicatricial em relação aos demais grupos (Figura 2),
17 nesta fase houve uma maior atividade colagenolítica no grupo ConBr, o que está
18 intrinsecamente ligado com a degradação da MEC, a qual é fortemente influenciada
19 pela expressão e ativação das MMPs, facilitando desse modo a migração celular
20 (STERNLICHT & WERB, 2001). Um dos eventos mais importantes na cicatrização é a
21 migração e proliferação de células, principalmente queratinócitos, para a periferia da ferida,
22 estes eventos são regulados por três moléculas principais: fatores de crescimento, integrinas e
23 metaloproteinases (SANTORO & GALDINO, 2005). A lectina utilizada neste trabalho, ConBr,
24 estimula o afluxo de macrófagos quando injetada por via intraperitoneal em camundongos
25 (RODRIGUEZ et al., 1992). Os macrófagos são as principais células da reação
inflamatória. Muitos fatores de crescimento secretados por macrófagos influenciam

1 a proliferação celular, como exemplos, o TGF- α (Fator de Crescimento Transformante-
2 α) tem um importante papel na migração de queratinócitos e reepitelização (LI et al.,
3 2007).

4 Os grupos ConBr, ConBr/manose e manose obtiveram um perfil da lesão
5 semelhante ao 12º dia P.O. (Figura 1 e 3), já quanto a atividade colagenolítica o grupo
6 ConBr/manose destacou-se dos demais grupos no 12º dia P.O., isto pode explicar um
7 detalhe nos achados histopatológicos, que mostrou semelhanças entre o grupo ConBr e
8 ConBr/manose, entretanto este último demonstrou uma melhor organização das fibras
9 colágenas (Figura 4), possivelmente por uma maior atividade enzimática das MMPs
10 (350 U/mL) que nesse período do processo cicatricial são responsáveis pela
11 remodelação do colágeno recém sintetizado na MEC.

12 Sugere-se que o passo inicial da interação entre as lectinas e as células seja a
13 ligação com carboidratos da superfície celular. Estudos realizados por Freire e
14 colaboradores (2003) e Alencar e colaboradores (2003), demonstraram a diminuição dos
15 efeitos biológicos das lectinas analisadas quando as mesmas foram conjugadas com os
16 seus açúcares específicos. Contudo nos resultados apresentados no presente trabalho,
17 observou-se que a lectina conjugada com a manose apresentou melhor padrão de
18 organização do colágeno, o que pode ser explicado por algum outro tipo de interação da
19 lectina. Barondes, (1988) e Sharon & Lis (1989), comentaram sobre a presença de sítios
20 hidrofóbicos adicionais nas lectinas, os quais podem estar envolvidos em alguns dos
21 seus papéis biológicos, inclusive podendo ser esta uma explicação para a continuidade
22 da atividade biológica das lectinas, mesmo com seus sítios ligadores de carboidratos
23 ocupados.

24 A lectina isolada de sementes de *Canavalia brasiliensis* favoreceu o processo
cicatricial das lesões cutâneas experimentais quando comparadas aos grupos controle

1 manose e NaCl, entretanto apresentou um melhor efeito durante a evolução da
2 cicatrização e do ponto de vista histopatológico, quando usada em associação com a
3 manose.

4 **COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL**

5 Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas
6 preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal-COBEA e o protocolo
7 experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de
8 Pernambuco. Processo nº 39/05.

9 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

10 ALENCAR, N.M. et al. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds
11 induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. The International Journal
12 Of **Biochemistry & Cell Biology**, v.35, p.1674-1681, 2003.

13 ANDRADE, J.L. et al. Lectin-induced NO production. **Cellular Immunology**, v.194,
14 p.98-102, 1999.

15 BARBOSA, T. et al. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the
16 Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.673-678, 2001.

17 BARONDES, S.H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends in**
18 **Biochemical Sciences**, v.13, p.480-482, 1988.

19 SOL, F. G. et al. Crystal structures of Cratylia floribunda seed lectin at acidic and basic pHs.
20 Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer transition. **Journal of**
21 **Structural Biology**, v. 158, p. 1-9, 2007.

22 CHAVIRA, R.J. et al. Assaying proteinases with azocoll. **Analytical Biochemistry**,
23 v.136, p.446-450, 1984.
24
25

1 DUBOIS, B. et al. Regulation of gelatinase B (MMP-9) in leukocytes by plants lectins. **FEBS**
2 **Letters**, v.427, p.275-278, 1998.

3 FAZIO, M.J. et al. Cicatrização de feridas. **Cirurgia Cosmética- Princípios e Técnicas**, 2º ed.,
4 p. 23-28, 2000.

5 FREIRE, M.G. et al. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta*
6 seeds **Toxicon**, v.42, p.275-280, 2003.

7 GABIUS, H. J.; GABIUS, S. Glycosciences: Status and perspectives. New York: Wiley-VCH,
8 2002. 2.ed. p. 659.

9 GOMES, J.C. et al. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated
10 from Brazilian beans comparison with concanavalin A. **Agents Actions**, v.41, p.132–135, 1994.

11 LI, J. et al. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v.25, p.9-18,
12 2007.

13 MANDELBAUM, S.H. et al. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte I. **Anais**
14 **brasileiro de Dermatologia**, v. 78, p. 393-410, 2003.

15 MANUEL, J.A. et al. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless
16 wound healing in athymic nude mice. **Matrix Biology**, v. 25, p. 505–514, 2006.

17 NEELY et al. Proteolytic activity in human burn wounds. **Wound repair and regeneration**.
18 v.5, p.302-309, 1997.

19 NEWMAN, R.G. et al. The cloning and expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue
20 inhibitor of matrix metalloproteinase 2 in normal canine lymph nodes and in canine lymphoma.
21 **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 206–214, 2008.

22 ODELBURG, S.J. Cellular Plasticity in Vertebrate Regeneration. **Anat. Rec. B. New**
23 **Anat.**, v. 287, p. 25-35, 2005.

1 PRATA, M.; HADDAD, C.; GOLDENBERG, S. Uso tópico do açúcar em ferida
2 cutânea. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.3, n.2, p. 43-48.
3 1988.

4 RODRIGUEZ, D. et al. Differences in macrophage stimulation and leukocyte
5 accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/manose-binding
6 plant lectins. **Brazilian Journal Of Medical Biological Research**, v.25, p.823-826,
7 1992.

8
9 SANTORO, M.M. et al. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization
10 during wound healing. **Experimental Cell Research**, v. 304 p. 274– 286, 2005.

11 SCHIRATO, G.V. et al. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase
12 inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, v.36, p.149-154,
13 2006.

14 SHARON, N et al. Lectins, Chapman and Hall, London, 1989.

15
16 STERNLICHT , M.D. et al. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.
17 **Annual Reviews Cell Development**, v. 17, p. 463-516, 2001.

18
19 WOESSNER, J.F. The family of matrix metalloproteinases. **Annual National**
20 **Academy Science.**, v. 732, p. 11-21, 1994.

21
22 YANG, X. et al. Chemical composition and immuno-stimulating properties of
23 polysaccharide biological response modifier isolated from *Radix Angelica sinensis*.
24 **Food Chemistry**, v. 106, p. 269-276, 2008.

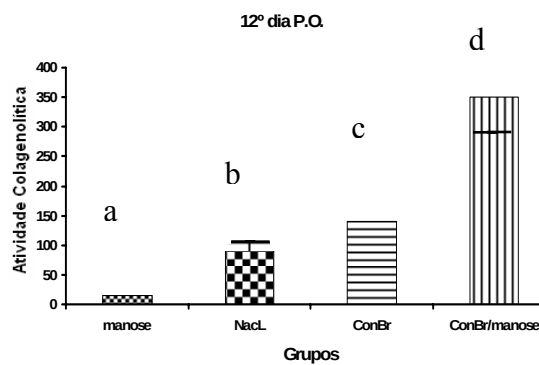
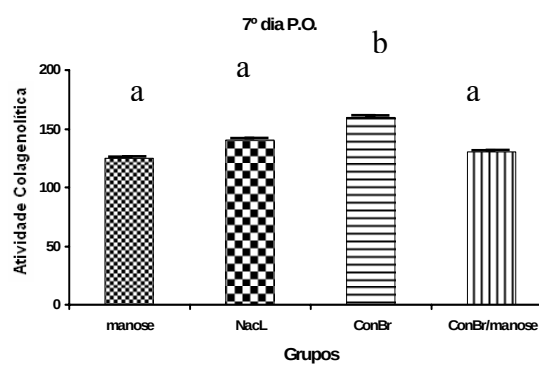
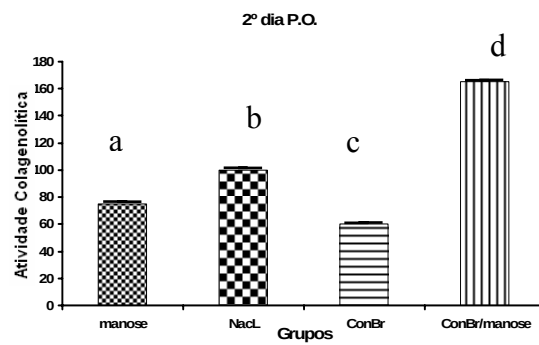


Figura 1. Atividade colagenolítica de metaloproteinases extraídas de feridas cutâneas de camundongos no 2º, 7º e 12º dia P.O. [checkered] manose, [checkerboard] NaCl, [horizontal stripes] ConBr e [vertical stripes] ConBr/manose. Os resultados estão expressos como média ± D.P. Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) foram representados por letras diferentes.

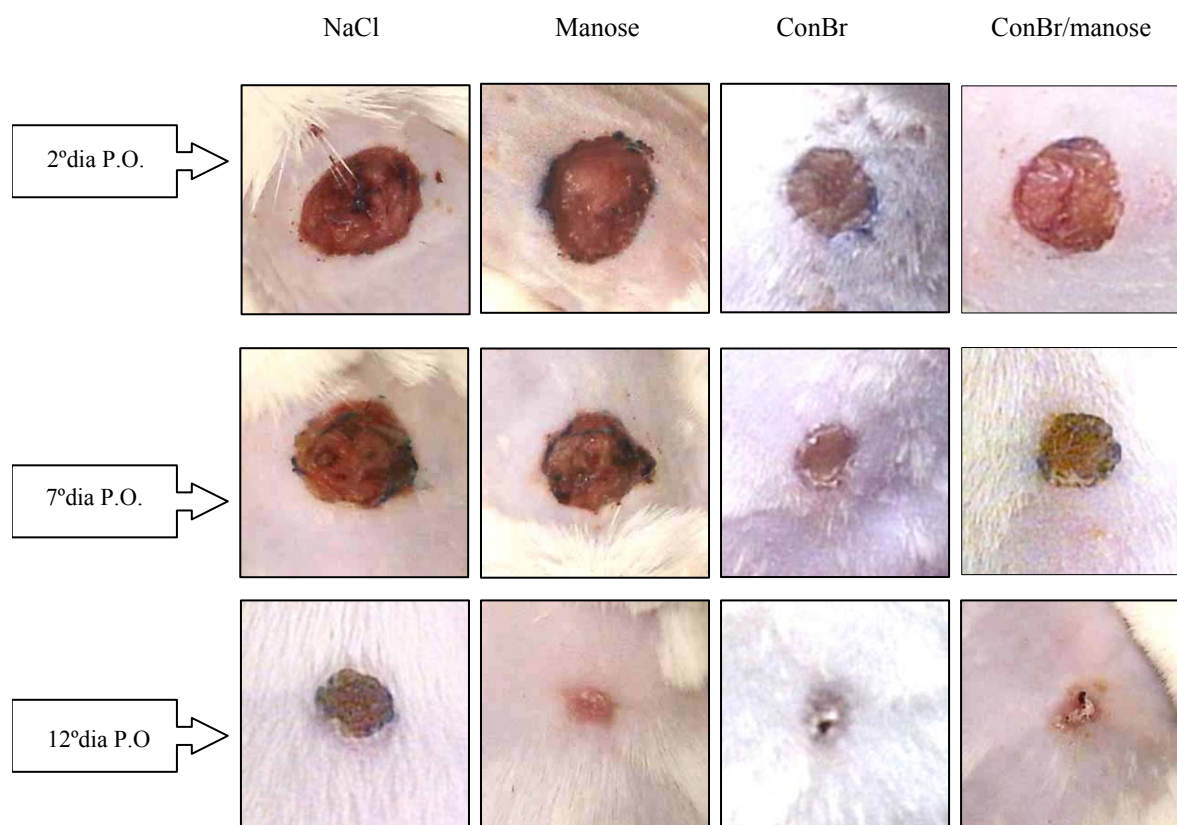


Figura 2. Aspecto macroscópico das lesões cirúrgicas experimentais durante a evolução do processo cicatricial.

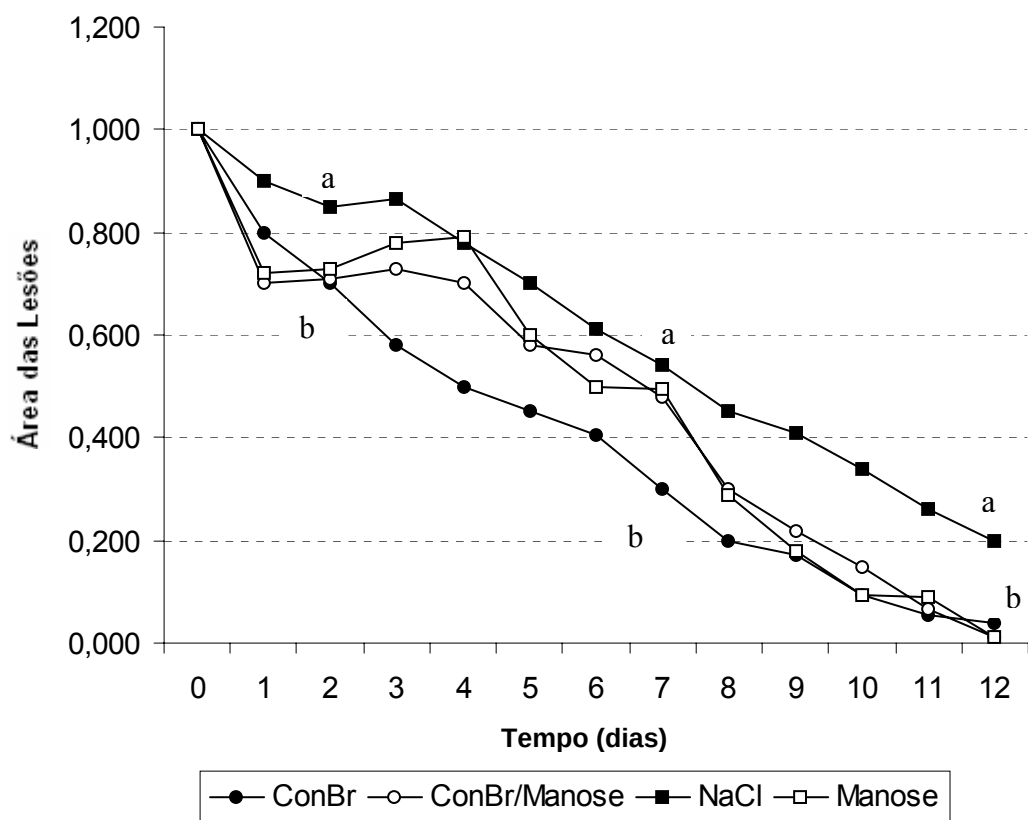


Figura 3. Acompanhamento diário da contração da área da ferida até o final do experimento (12º dia P.O.) dos grupos ConBr, ConBr/manose, NaCl e manose. Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) foram representados por letras diferentes.

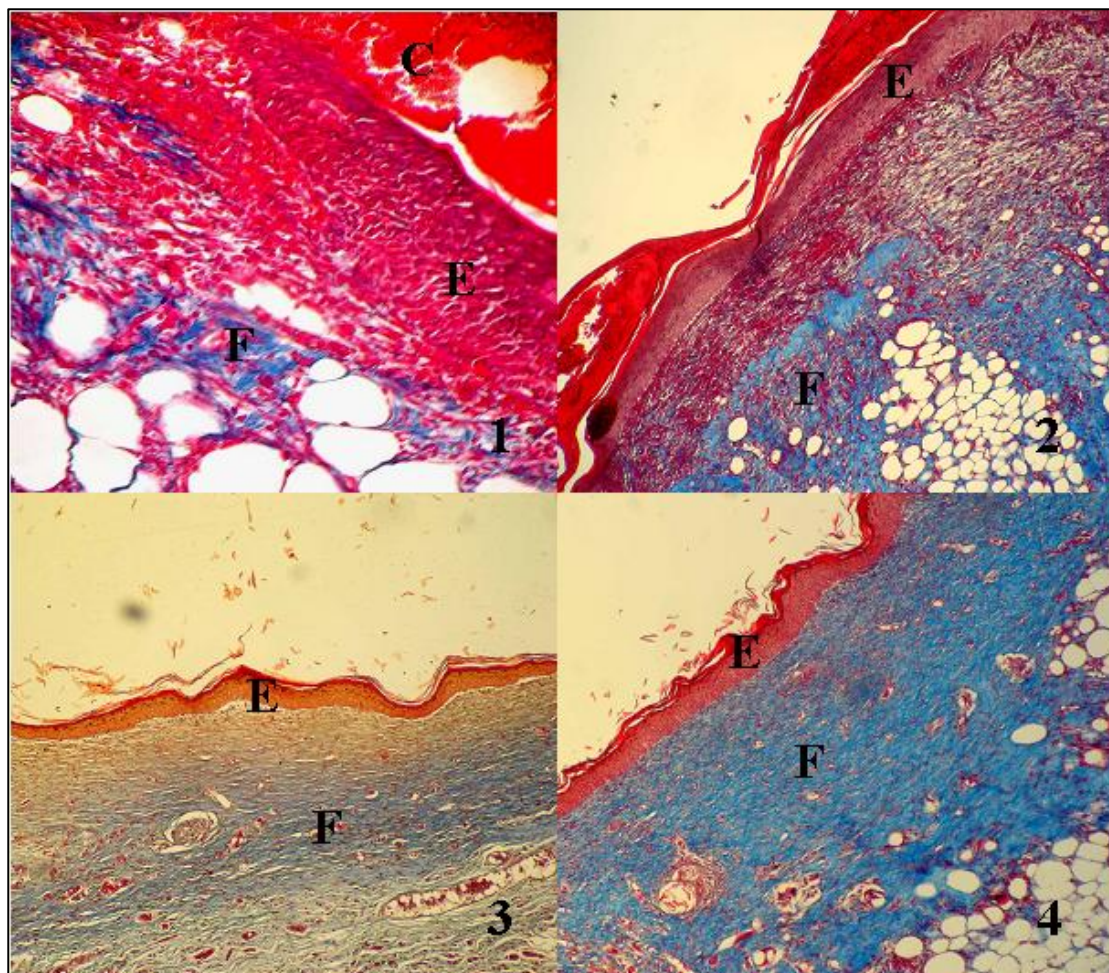


Figura 4. Aspectos histopatológicos das lesões dos grupos experimentais no 12º dia de P.O. 1- NaCl, 2- manose, 3- ConBr, 4- ConBr/manose. E-epitélio, F-tecido de granulação fibrovascular, C-crosta.

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO WOUND REPAIR AND
REGENERATION

CAPÍTULO III: Real-time PCR Analysis of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9)
RNA extracted from cutaneous healings treated with lectin from *Canavalia brasiliensis*
seeds.

Real-Time PCR Analysis of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) RNA extracted from cutaneous healings treated with lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds.

ROSANGELA V. S. ARAÚJO, Msc.^{a,b}; FLÁVIO O. SILVA, Msc.^b; GIULIANA V. SCHIRATO, Msc.^c; BENILDO S. CAVADA, PhD^d; JOSÉ L. LIMA-FILHO, PhD^e; SOUZA, P. R E., PhD^f; ANA M. A. CARNEIRO-LEÃO, PhD^g; GANDHI R. BAPTISTA^e AND ANA L. F. PORTO^g.

^aCaruaruense Association of Higher Education, Caruaru, Pernambuco, Brazil;

^bLaboratory of Immunopathology Keizo Asami, Recife, Pernambuco, Brazil;

^cLaboratory Ageu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brazil; ^dDepartment of

Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, UFC, Fortaleza,

Ceará, Brazil; ^eDepartment of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, UFPE,

Recife, Pernambuco, Brazil; ^fPernambuco University, UPE, Recife, Pernambuco,

Brazil; ^gDepartment of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University

of Pernambuco, UFRPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

Corresponding author (Reprint request):

Rosangela Vidal de Souza Araújo, Msc.

Immunopathology Keizo Asami

Federal University of Pernambuco

University campus, Recife, PE , Brazil,

Box: 50670-901, Tel:+ 55 81 2126 8484

Fax: + 55 81 2126 8485;

Email: rosangela.vidal@gmail.com

Short running title: Real-Time PCR Analysis of metalloproteinases

Key Words: gelatinases, wound healing, lectin, gene expression.

Abstract

Metalloproteinases (MMP) plays a vital role in the tissue repair process, particularly MMP-2 and MMP-9, are extensively involved in wound closure. The present study aimed determine levels of these proteinases and investigate its expression along of topic treatment of cutaneous healings with lectin of *Canavalia brasiliensis* (ConBr). For conclude the objective, cirurgic lesions were produced on the dorsal regions of the mice, divided in groups, according with the following treatment: ConBr, ConBr/mannose, NaCl and mannose, these treatments were realized in three different therapeutic schemes (2nd, 7th e 12th days after surgery). The electrophoresis SDS-PAGE demonstrated the presence of proteins with molecular weight of 67 KDa in all groups, that is, active form of MMP-2. The Real-time PCR assay showed that the treatment with ConBr in the 2° and 12° days after surgery promoted an increase in the content of transcript of mRNA of MMP-2. In the 7° day after surgery the ConBr/manose group presented a higher content of transcript de mRNA for MMP2 and MMP-9. This data showed that ConBr and ConBr/mannose treatments increase in the mRNA expression.

Introduction

The skin acts as a protect barrier against the most variety types of aggressors agents presents in the environment, being essential to keep the homeostasis. Any alteration in the integrity of the skin can unleash pathological conditions as infections, dehydration and prejudice in the electrolytic balance.¹ Nonhealing wounds represent a significant cause of morbidity and mortality for a large portion of the patients.² The healing process involves a complex sequence of cellular and biochemicals events for tissue repair after the trauma. This process is characterized by hemostasis, inflammation, granulation tissues formation and remodeling of extracellular matrix (ECM).³

The ECM degradation is an essential aspect to repair and remodulation during the healing of cutaneous lesions. The metalloproteinases (MMPs) are one family of zinc-dependent endopeptidases that collectively are competent to degrade all components of the ECM.⁴

Proteolytic degradation of extracellular matrix is an essential part of wound repair and remodeling. The expression and activation of MMPs promotes degradation and modification of extracellular matrix proteins at the wound site, facilitating cell migration.⁵ The reepithelization involves the expression of extracellular metalloproteinases such as MMP-2 and MMP-9, whose activity is required for cell migration and extracellular matrix remodeling.⁶ MMPs, particularly MMP-2 and MMP-9, are extensively involved in wound closure.⁷

Dubois and co-workers (1998)⁸ has demonstrated the capacity of Concanavalina A (Con A) lectin in inducing the production of protease MMP-9 proceeding from lymphocytes *in vitro* and Ulex europaeus I lectin induces activation of MMP-2 in

endothelial cells.⁹ In recent studies, bioactive proteins have been used to medical therapy.¹⁰ Lectins are (glyco)proteins of non-immune origin that interact reversibly and specifically with carbohydrates, found mainly in seeds.^{11,12} They are widely distributed in nature, and amongst the plant kingdom, and are molecules that recognize and to decode the information into oligosaccharide of the cell surface.¹¹⁻¹⁴ Therefore, lectins may regulate physiological and pathological events of cell function.^{15,16} Ahead of this context, it is biologically important the inquiry of the involvement of other lectins in the activity of the MMPs.

The most thoroughly investigated lectins are from plants, in particular from the leguminosae family. Lectin from that family represents one proteins group with similar structures, however with different carbohydrate specificities. The lectin extracted from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) seeds are characterized for establish a link with D-glucose/D-mannose, the biological activity of the ConBr had been investigate, in different experimental models.¹⁷

Among the biological activities of ConBr lectins are lymphocytic stimulation and could mediate important functions, as prevention of development of malign tumors, protector effect *in vivo* against infection by *Leishmania amazonensis* in BALB/c mice, induction *in vitro* of the proliferation of lymphocytes with production of interferon- γ , the liberation of histamines by mast cells, production of nitric oxide *in vitro* and *in vivo* and induction of cellular apoptosis.¹⁸⁻²²

Based in the capacity of leguminosae lectins to stimulate the metalloproteinases production in the cicatricial process, we decided to evaluate the *in vivo* effect of the treatment with free and mannose conjugate lectin of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) and their specific sugar in profile in the collagenolytic activity and

investigate their pattern of expression along the treatments evolution in cutaneous injuries in mice.

Methods

Animals

Adult males albino Swiss mice were used (8-10 weeks old, weight $40 \pm 2\text{g}$), from the Biotery of the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE). Each animal was maintained in an individual cage, with water and commercial food (Labina[®]) *ad libitum*. All procedures were carried according to the rules of Brazilian college of animal experimentation (COBEA) and experimental protocol was approved for ethics committee from Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE).

Experimental surgical procedure

After hydric and alimentary jejune of 12 hours, the animals were weighed and anaesthetized for subcutaneous route with 2 % xilazine chloridate (10 mg/Kg) and 10% ketamine chloridate (115 mg/Kg).²³ After anaesthesia were carried out the trichotomy and the antisepsis of dorsal thoracic region with 1 % iodopovidone and 70 % ethanol. The sterilized cloths of field were located and fixed in the skin of the animal. With the help of a leaked metallic mold (diameter = 1.0 cm), the skin was demarcated with dermatographic pen. The cutaneous wound was produced by the incision of the skin with a scissors with fine-fine shears of tips and clamp of dissection, until its recession. The

hemostasis of the area, when necessary, it was carried out by digital compression. The animals were divided into four groups and the wounds were daily treated with 100µl of the following solutions: 10µg ConBr, 10µg ConBr/mannose in physiologic solution with 0,1M mannose, 150mM NaCl, 0,1M mannose, and, these treatments were realized during twelve days after surgery, were realized in three different therapeutic schemes (2nd, 7th e 12th days after the surgery), according protocol used by Monteiro et al, 2007 and Schirato et al, 2006.^{24,25}

Attainment of the tissues for Real-Time PCR and electrophoresis

At 2nd, 7th and 12th days post-operatively, the animals (n=10/group/time) were anaesthetized and tissues from the wound site of the individual animal were removed, the tissues were frozen in N₂ and kept at -80°C for later analysis of real-time PCR.²⁶ For the electrophoresis analysis immediately after incision, skin samples were placed in liquid nitrogen and pulverized. Then, samples were homogenized in 0,05M tris buffer, pH 7.5, supplemented with 0,02mol/L calcium chloride, 0,15mol/L sodium chloride, 0,25% triton X-100 and 0,02% sodium azide (0,5mL of buffer to 0,1g of tissue).²⁷

Polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) of denatured protein

The protein concentration was determined by Bradford method with bovine serum albumin as the standard protein.²⁸ Molecular weight of purified enzyme was detected using 12% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). For separation of proteins by electrophoresis were chosen as samples of the 12th

day after the surgery. All chemicals were obtained from commercial sources. Denatured protein samples were evaluated as described by Laemmli (1970).²⁹ The standard marker proteins were carbonic anhydrase (30 kDa), ovalbumin (43 kDa), bovine serum albumin (67 kDa). Protein bands were stained with Coomassie brilliant blue R-250.

RNA Extraction

In order to isolate total RNA from experimental 100 mg of tissue of each sample were added, as well as Trizol (Invitrogen[®], USA) used in the correct proportion (100mg tissue/1ml of Trizol) for each sample, following the manufacturer's instructions. After sample homogenization, organic and aqueous phases were separated and total RNA was precipitated with isopropyl alcohol. RNA pellets were washed with 70% ethanol, air-dried, and dissolved in RNase-free water. The yield and quality of total RNA and mRNA were determined spectrophotometrically using 260 and 260/280 nm ratio, respectively. Following the isolation of mRNA from tissues, we proceeded with 3'- and 5'-end cDNA amplification.²⁶

First-Strand cDNA Synthesis

First-strand cDNA was synthesized by reverse transcription coupled to RT-PCR using a oligo(dT)₁₈ (Clontech, Mountain View, CA), 6 µg of mRNA, 200 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT) purchased from Promega (Madison, WI), 10mM dTPs, RNasin AoU, 10 x 1st strand buffer and ddH₂O. 3'-rapid amplification of cDNA was achieved with 30 cycles of PCR, 1h/42°C. Specific primer

sequences are listed below in Table 1. Products were separated on a 1% agarose gel, stained with 0.5 µg/ml of ethidium bromide, and visualized with an UV transilluminator.

Table 1. Specific Primers Used for Real-Time PCR of MMP-2 and MMP-9

Name	Nucleotide sequence
P2-SE	5'-AGCTCATCGCAGACTCCTGGAA-3'
P2-AS	5'-TCAGAGTTCTCGCACTTCAAAGC-3'
P9-SE	5'-ATTCGCGTGGATAAGGAGTTCT-3'
P9-AS	5'-TCCACCTGGTTACCCTCATG-3'

Gene Expression Analysis Using Real-Time PCR

First-strand cDNA synthesis was performed for all collected tissues using 2µg of total RNA. Amplification of MMP-2 and MMP-9 cDNA was carried out in a Rotor-Gene 3000 operated with the respective Rotor Gene software version 6.1.81 (Corbett Research, Mortlake, Australia). Each reaction consisted of: 10µl of SYBR[®] green PCR master mix (Applied Biosystems, USA), 20µM MMP-2 e -9 primer sense, 20µM MMP-2 e -9 primer anti sense, 1:10 cDNA and distilled water, to a final volume of 20 µl. Amplification conditions for MMP-2 were as follows: 95°C (4 min), 95°C (10 sec), 50°C (15 sec) and 72°C (20 sec) in 45 cycles. The same conditions were used for MMP-9, however, we decrease cycle number to 40. Real-time PCR products were separated on a 1.8% agarose gel and semi-quantified by comparing the intensity of the band of interest using image analysis. PCR real-time data are expressed as mean ± S.D.

Results

Profile of the proteins from samples

Proteins profile from the samples was submitted to analysis by SDS-PAGE electrophoresis and is shown in Figure 1. We observed that tissue samples obtained on the 12th days after surgery presented 67 KDa bands in all analyzed groups, these bands represents the active form of MMP-2. It was not observed bands from molecular weight of MMP-9. This result may be associated to a low concentration tissue of MMP-9 at all times of the study (2^{sn}, 7th and 12th day A.S), because all groups studied showed a much lower MMP-9 expression compared to the amount of MMP-2 transcript (Table 2).

Total RNA Isolation and First-Strand cDNA Synthesis

15 µg of total RNA total of all samples were loaded in the agarose gel for the synthesis of the first tape of cDNA, this is shown in Figure 2A, where you can see through the intensity of the bands similar quantities of total RNA by µg Sample. The cDNA was synthesized in the same conditions, ie all samples were handled on the same day and on the same standards experimental.

Gene Expression

The gene expression was semi-quantitative, it is an efficient method for evaluating the effect of a treatment on the expression of a specific gene. The expression

of MMP-2 and MMP-9 genes were compared by Curve threshold (Ct) (Figure 3 and 4) of the treatments depending on Ct control, where lower Ct meant higher the content of mRNA transcript, in the two tests, or both for MMP-2 and MMP-9 the group NaCl at 2 days after surgery had the Ct = 0, meaning, no mRNA expression (Figure 2B and 2C).

Ct values showed that inflammatory stage of cicatrization (2° dia A.S.) was characterized by a higher content of transcript (mRNA) of MMP-2 in ConBr Group, followed by ConBr/mannose and mannose group. As for MMP-9, ConBr groups and ConBr/mannose showed a similar profile of transcription. Mannose group was characterized by the highest Ct, meaning a lower transcript quantity.

In the 7th day after surgery, the NaCl group presents MMP-2 and MMP-9 transcript, unlike the result for this group in 2nd day after surgery. Lesions of the ConBr group in 7th day after surgery, showed inflammatory signs less intense in relation to other groups and high collagenolítica activity (data not shown), and correlating with the contents of the transcript to the MMP genes, the ConBr group presented a greater expression of MMP-9 when compared with control group (NaCl). The ConBr/mannose group showed the highest content of transcript when compared to other groups for the two proteases under study. During the remodeling of the experimental lesions (12th day) of the MMP-2 gene expression was visibly higher than MMP-9 expression. The NaCl group not presented MMP-9 transcript (Ct = 0), but also was the group that had the lowest collagenolytic activity and less scarring developments among the groups (data not shown). The ConBr and Group ConBr/mannose group presented at the end of the study (12th day), something similar in healing, but the histopathological analysis (data not shown), showed that the ConBr/mannose group presented a better standard of organization collagen fibers in relation to other groups.

4. Discussion

Lectins have been described as strong immunomodulators for lymphocytic activation induction and cytokine production. Lectin from *Canavalia brasiliensis* induces, *in vitro* lymphocytic proliferation with production of interferon- γ , macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor- α (TNF- α).³⁰ TNF- α is mitogenic and chemotactic to endothelial cells that migrate to the center of the lesion originating new blood vessels.³¹ The neoangiogenesis is essential to evaluate the cicatricial process, by the fact that new vessels formed will provide nutrients necessary to the cells present in the lesion.

Some lectins bind glucose-mannose demonstrated anti-inflammatory activity when intravenous was injected into mice. Lectin from *Canavalia brasiliensis* although belonging to the same group of these lectins do not have anti-inflammatory activities when by intravenous route.³² However, in the present study where the lesions were treated through topic applications of lectin, inflammatory signals observed during the clinic evaluation were less intense in the ConBr group, when compared to the other experimental groups (data not shown).

Studies indicate that during the inflammatory phase, ConBr lectin induces *in vitro* and *in vivo* nitric oxide production.²¹ Nitric oxide is essential to the inflammatory process acting as vasodilators, antimicrobial and promoting the vascular permeability. They also have pro-inflammatory effect acting as chemoattractant to cytokine (e. g. interleukin-1), a potent modulate of the proliferation, recruitment and keratinocytes differentiation, fibroblast stimulating factor -1 (TGF- β -1), monocytes and neutrophils, resulting in angiogenesis and helping the activation of the fibroblast cells.³³

DUBOIS and co-workers (1998) affirmed that some lectins *in vitro* are capable to activate or inhibit some gelatinases activities.⁸ During the inflammatory and remodeling phase, it was observed that ConBr group presented a higher content of transcript (mRNA) to the MMP-2 gene, when compared to control groups mannose and NaCl, but the collagenolytic activity (data not shown) in this group (ConBr) presented a less degradation of azocoll. These data demonstrate that lectin from ConBr inhibited the activity of gelatinases in the analyses of 2 and the day after surgery. Temporal and spatial regulation of MMPs is critical for rapid normal wound healing.³⁴

According Ovington (2007), normal behavior of these enzymes was a enzymatic pick during the inflammatory phase of the healing, and a decline in the appearance stage of the granulation tissue and subsequently new epithelial tissues in the lesion. In the present work, was observed a pick of enzymatic activity in ConBr/mannose group (data not shown) during the inflammatory and remodeling phase (2nd to 7th day A.S.), fact that could explain the best evolution of this group when compared with the others during the experiment, however such peaks of activity were not always followed by transcript in the tissue, in another words, the activity is directly associated to activator or inhibitor from metalloproteinases and not only to transcript.³⁵ This result was also found in the study by Gómez et al. (1995) which tested the effect of Ulex europaeus lectin against the MMP-2 activation in endothelial cells, this study has been shown to increase the collagenolytic activity of MMP-2, not reflected by the increase of MMP-2 gene expression.⁹

Lectin ConBr stimulates the flux of macrophages when injected by intraperitoneal route in mice.³⁶ Macrophages are the mainly cells of the inflammatory response. Several growth factors produced by macrophages induce cell migration as well as proliferation and matrix production. For example, the transformation stimulating

factor- α (TGF- α) has an important function in the migration of the keratinocytes and reepithelization. TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 promote the fibroblast endothelial cells migration and the deposition of the extra cellular matrix by fibroblasts during the granulation tissues growth.³⁷

The best organization of the extracellular matrix, could be caused by the favoring of the fibroblasts migration in center lesions as increased in the metalloproteinases synthesis that in this period of repair process are responsible for the remodeling of the collagen recently synthesized, as verified by Grinnel (2003).³⁸ In the present study the results showed that MMP-2 gene was over-expressed compared to MMP-9 gene, a MMP-2 plays a vital role in the tissue repair process and wound closure by remodeling the ECM and also exerts antiinflammatory effects.^{39,40} Studies conducted by Xue et al. (2004), who worked with RT-PCR and zimograms, showed that protein C treatment in human keratinocytes activated elevated the expression and activated the MMP-2, however these was no effect over the MMP-9.⁴¹

The results observed in ConBr/mannose group also can be explained by specific activity immunomodulators that monosaccharides present. Yang and co-workers (2008) showed that monosaccharides found in fractions (APFs, namely APF1, APF2 and APF3) of polysaccharides of *Radix Angelica sinensis* had immunomodulatory activity of murine macrophages, in this study, it was found that various APFs induced a significant increase in cellular lysosomal enzyme activity, nitric oxide (NO) formation, reactive oxygen species (ROS) production and TNF- α secretion in macrophages *in vitro*.⁴² The best effect was observed in the fraction APF2, followed by APF3 and APF1 in decreasing order. Among APF1, APF2 and APF3, it was found that mannose was only found in APF2 and APF3, but not present in APF1, additionally, glucose was a major sugar in APF2 and APF3, but it was present as minor sugar in APF1. The study

reported above may explain the results observed in this study with the group treated with the lectin ConBr combined with mannose, because the majority of the studies conducted to date have focused on MMPs elaborated by macrophages and T lymphocytes. Normal T cells produce predominantly gelatinase, which act to facilitate movement of lymphocytes out of the vasculature and into tissues.⁴³

Some substances are known for increasing the expression of metalloproteinases, showed that berberine, a plant substance that has anti-inflammatory and anti-oxidative effects, increase MMP-9 expression in normal human keratinocytes, UV irradiation also induces the synthesis of MMP in human skin in vivo and MMP-mediated collagen destruction.⁴⁴ Therefore, the regulation of MMP activity might be a potential strategy for prevention and/or treatment of UV induced skin damage, and other disorders of the skin.

The bands obtained through the SDS-PAGE electrophoreses showed a protein with 67 kDa of molecular mass, suggested the presence of metalloproteinase 2 (MMP-2) in the homogenates obtained from the lesions of the experimental groups studied, result confirmed through the collagenolytic activities. This finding is indeed significant, therefore Iba and collaborators (2004) had observed that the levels of MMP-2 and 9 increase ten days after the experimental wound in mice, that is, when angiogenesis is activated.⁴⁵

In general, MMPs are not constitutively expressed in skin but are induced temporarily in response to the above mentioned exogenous signals to trigger the proteolytic remodeling of the ECM in physiological and pathological situations, such as tissue morphogenesis, tissue repairation, dermal photoaging and tumour cell invasion.⁴⁶

During wound healing the composition of the ECM has to be altered. This can be achieved by transcriptional regulation of cellular genes encoding ECM components

as well as by proteolytic enzymes (particularly matrix metalloproteinases) and their inhibitors that control the ECM turnover on the post-translational level.⁴⁴

MMP production and activity can be modulated by numerous growth factors, Henneman and co-Workers showed (2007) that can be also modulated by the relaxin hormone, this hormone is well known for its role during pregnancy.⁴⁷ Such these researchers showed that the most prominent metabolic effect of relaxin is the stimulation of connective tissue remodeling by inhibiting collagen synthesis and by increasing the production and activity of MMPs. Human dermal fibroblasts *in vitro* respond to relaxin by an elevation of procollagenase secretion (MMP-2), and a decrease in the expression of tissue inhibitor of MMPs (TIMPs) and interstitial collagens.⁴⁸ In conclusion, we have demonstrated that ConBr group presents a positive effect on the MMP-2 and MMP-9 expression, which are involved in angiogenesis, wound healing and wound closure.

5. Acknowledgements

This work was supported by CNPq, Thanks the Felipe Correia and Fernanda Vidal for the technical help.

6. List of Abbreviations

ConBr	lectin from <i>Canavalia brasiliensis</i>
ECM	Extracellular matrix
MMP	Metalloproteinase
Con A	Concanavalina A

SDS-PAGE	Dodecylsulfate polyacrylamide
RT-PCR	Real-time PCR
M-MLV RT	Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase
A.S.	After surgery
Ct	Threshold Cycle
GM-CSF	Macrophage colony stimulating factor
IL-4	Interleukin-4
IL-10	Interleukin
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TGF- β -1	Fibroblast stimulating factor-1
TGF- α	Transformation stimulating factor- α
APFs	Monosaccharides fractions
NO	Nitric oxide
ROS	Reactive oxygen species
TIMPs	Tissue inhibitor of MMP

7. References

1. Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events, review article. *Dermatol Surg* 2005; 674:686-31.
2. Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 19:25-25.
3. Park JEP, Babul AB. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Amer J Surg* 2004; 115:165-187.

4. Gearing AJH, Christodoulou M. Processing of tumor necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature* 1994; 555:557-370.
5. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001; 463:516-17.
6. Turchi L, Chassot AA, Bourget I, Baldescchi C, Ortonne JP, Meneguzzi G, Lemichez E, Ponzio G. Cross-talk between RhoGTPases and stress activated kinases for matrix metalloproteinase-9 induction in response to keratinocytes injury. *J. Invest. Dermatol.* 2003; 1291:1300-121.
7. Thomas G J, Poomsawat S, Lewis MP, Hart IR, Speight PM, Marshall JF. Alpha v beta 6 integrin upregulates matrix metalloproteinase 9 and promotes migration of normal oral keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2001; 898:904-116.
8. Dubois B, Peumans WJ, Van Damme EJM, Van Damme J., Opdenaker G. Regulation of gelatinase B (MMP-9) in leukocytes by plants lectins. *FEBS Letters* 1998; 275:278-427.
9. Gomez DE, Yoshiji H, Kim JC, Thorgeirsson UP. Ulex europaeus I lectin induces activation of matrix-metalloproteinase-2 in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 177:82-216.
10. Andrade CAS, Correia MTS, Coelho LCBB, Nascimento SC, Santos-Magalhães NS. Antitumor activity of Cratylia mollis lectin encapsulated into liposomes. *Int J Pharmac* 2004; 435-445-278.
11. Peumans WJ, Van Damme EJM. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol* 1995; 347:352-109.

12. Cavada BS, Santos CF, Granjeiro TB, Nunes EP, Sales PVP, Ramos RL., De Souza FAM, Crisostomo CV, Calvete JJ. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. *Phytochem* 1998; 675:680-49.
13. Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiol* 2004; 53R:62R-14.
14. Rini JM. Lectin Structure. *Annual Rev Biophys and Biomol Struct* 1995; 551:577-34.
15. Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in Cancer and Inflammation – Potential for Therapeutics and Diagnostics. *Nature Rev. Drug Disc.* 2005; 477:88-4.
16. [Liu FT](#), [Rabinovich GA](#). Galectins as modulators of tumour progression. [Nat Rev Cancer](#). 2005; 29:41-5.
17. Cavada BS, Iglesias MM, Troncoso MF, Teixeira EH, Turyn D, Dominici FP. Glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans stimulate the autophosphorylation of the insulin receptor in vitro. *Horm and Metabol Res* 2003; 125:127-35.
18. Newell KA, Ellenhorn JDI, Bruce DS, Bluestone JA. In vivo T-cell activation by staphylococcal enterotoxin B prevents outgrowth of a malignant tumor. *Proceed Nat Acad Sci United States of America* 1991; 1074:1078-88.
19. Barral-Netto M., Santos SB, Barral A, Moreira LI, Santos CF, Moreira RA. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. *Immunol Invest* 1992; 297:303-21.

20. Gomes JC, Ferreira RR, Cavada BS, Moreira RA, Oliveira JT. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans comparison with concanavalin A. *Agents Actions* 1994; 132:135-41.
21. Andrade JL, Arruda S, Barbosa T, Paim L, Ramos MV, Cavada BS. Lectin-induced NO production. *Cel Immunol* 1999; 98:102-194.
22. Barbosa T, Arruda S, Cavada BS, Grangeiro TB, Freitas LAR, Barral-Netto, M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. *Mem Insti Osw Cruz* 2001; 673:678-96.
23. Hall LW, Clarke KW. *Veterinary anaesthesia*. 9rd ed. London: Ballière Tindall; 1991.
24. Monteiro FMF, Porto CS, Silva, GM, Carvalho Junior LB, Lima Filho JL, Leão AMC, Carneiro-Cunha MGC, Porto ALF. Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing. *Process Biochem*. 2007; 884:888-42.
25. Schirato GV, Monteiro FMF, Silva FO, Lima Filho JL, Carneiro Leão AMA, Porto AL. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. *Ciência Rural* 2006; 149:154-36.
26. Melo LM, Teixeira DIA, Havt RMSC, Martins DBG, Castelletti CHM, Souza PRE, Lima-Filho JL, Freitas VJF, Cavada BS, Baptista GR. Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family 2008; 8:16-75.
27. Agren MS, Taplin CJ, Woessner JF, Eaglstein WE, Mertz, P.M. Collagenase in wound healing: effect of wound age and type. *J Investig Dermatol* 1992; 709:714-99.

28. Bradford M M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 248:254-72.
29. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 680:685-227.
30. Cavada BS, Barbosa T, Arruda S, Grangeiro TB, Barral-Netto M. Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr Prot and Pept Sci* 2001; 123:135-2.
31. Mutsaers SE, Bishop JE, Mcgrouter G, Laurent GJ. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem and Cell Biol* 1997; 5:17-29.
32. Assreuy AMS, Shibuya MD, Martins GJ, De Souza MLP, Cavada BS, Moreira RA, Oliveira JTA, Ribeiro RA, Flores CA. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediat Inflamm* 1997; 201:210- 6.
33. Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Repor* 2005; 108:119-57.
34. Peled ZM, Phelps ED, Updike DL, Chang J, Krummel TM, Howard EW, Longaker M.T. Matrix metalloproteinases and the ontogeny of scarless repair: the other side of the wound healing balance. *Plast. Reconstr. Surg.* 2002; 801:811-110.
35. Ovington LG. Advances in wound dressings. *Clin Dermatol* 2007; 33:38-25.
36. Rodriguez D, Cavada BS, Abreu-de-Oliveira JT, De Azevedo-Moreira R, Russo M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to

intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. *Braz J Medic Biol Resear* 1992; 823:826-25.

37. Li J, Chen J, Kisner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 9:18-25.

38. Grinnel F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol* 2003; 264:269-13.

39. Ravanti L, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in wound repair. *Int. J. Mol. Med.* 2000; 391:407-6.

40. McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties *in vivo*. *Blood* 2002; 1160:1167-100.

41. Xue M, Thompson P, Kelso I, Jackson C. Activated protein C stimulates proliferation, migration and wound closure, inhibits apoptosis and upregulates MMP-2 activity in cultured human keratinocytes. *Experim Cell Res* 2004; 119-127-299.

42. Yang X, Zhao Y, Li G, Wang Z, Lv Y. Chemical composition and immunostimulating properties of polysaccharide biological response modifier isolated from *Radix Angelica sinensis*. *Food Chem* 2008; 269:276-106.

43. Goetzl EJ, Banda MJ, Leppert D. *Commentary: Matrix metalloproteinases in immunity. J. Immunol* 1996; 1:4-156.

44. Kim S, Lee E, Moon-Woo S, Jung J, Hyun J, Min S, Kim D, Kim H. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 gene expression by an isoflavone metabolite, irisolidone in U87MG human astrogloma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 493:499-366.

45. Iba Y, Shibata A, Kato M, Masukawa T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing. *Int Immunopharmacol* 2004; 1879:1880-4.
46. Kähäri V, Saarialho-kere U.. Matrix metalloproteinases in skin, review article. *Experiment Dermatol* 1997; 199:213-6.
47. Henneman S, [Bildt MM](#), [Degroot J](#), [Kuijpers-Jagtman AM](#), [Von den Hoff JW](#). Relaxin stimulates MMP-2 and alpha-smooth muscle actin expression by human periodontal ligament cells. [Arch Oral Biol](#). 2007; 161:7-53.
48. [Lewis M](#), [Amento EP](#) , [Unemori EM](#). [Transcriptional inhibition of stromelysin by interferon-gamma in normal human fibroblasts is mediated by the AP-1 domain](#). *Cell Biochem* 1999; 373:86-3

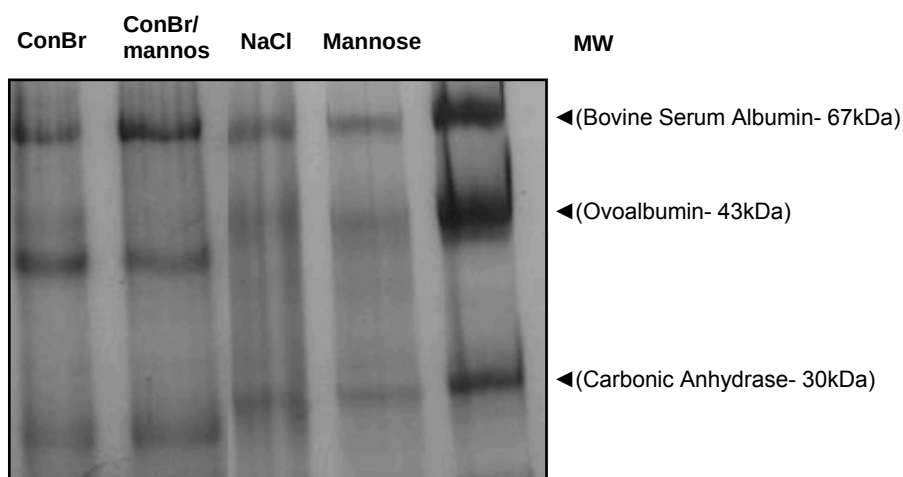


Figure 1. A representative example of molecular weight Profile of Proteins obtained from the wound homogenates in ConBr, ConBr/mannose, NaCl and mannose groups in the 12th day after surgery (containing 10µg of protein each lane and 15µl each well), which was resolved by SDS-PAGE electrophoresis. A 10% SDS-polyacrylamide gel was performed under reducing conditions. MW= molecular weight ladder: ◀Bovine Serum Albumin (67 kDa), ◀Ovoalbumin (43kDa) and ◀Ovoalbumin (43kDa).

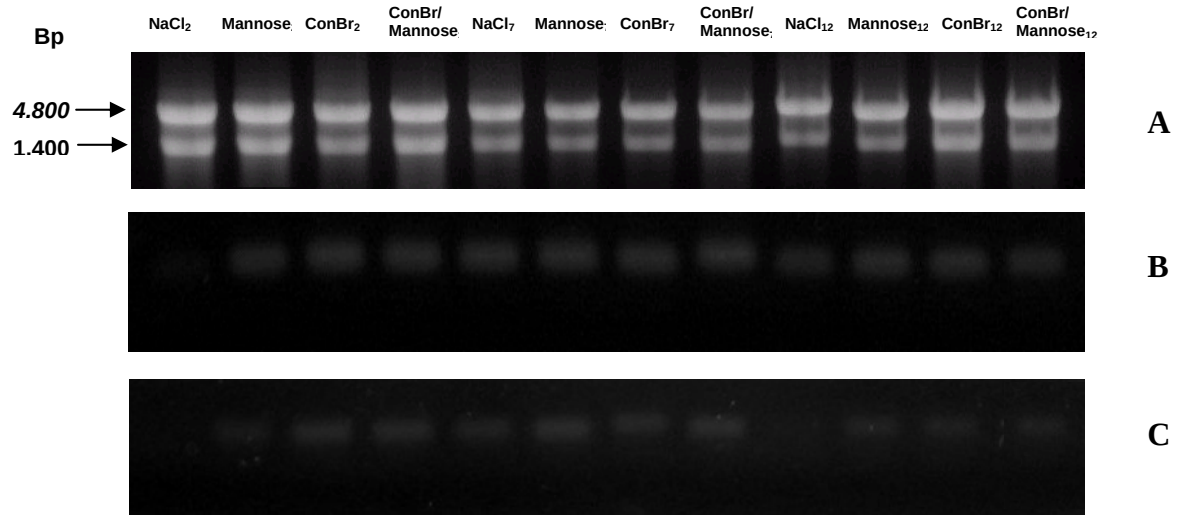


Figure 2. Tissue-specific expression of MMPs in the lesion of skin. (A), Total RNA was extracted from skin of the groups: 2nd NaCl, 2nd Mannose, 2nd ConBr, 2nd ConBr/Mannose, 7th NaCl, 7th Mannose, 7th ConBr, 7th ConBr/Mannose, 12th NaCl, 12th Mannose, 12th ConBr and 12th ConBr/Mannose. Following RT-PCR and Real-Time amplifications with specific primers for MMP-2 (B) and MMP-9 (C), amplification products were separated according to size in 1.8% agarose. Bp, base pairs.

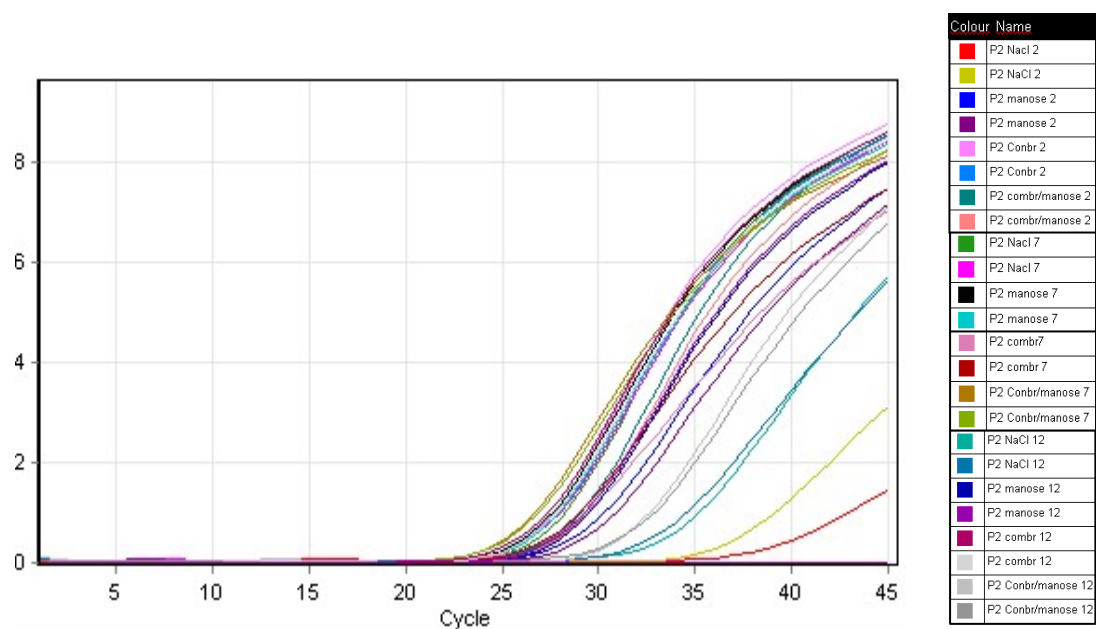


Figure 3. Amplification curves obtained by real-time PCR of MMP-2 gene, using Sybr green I.

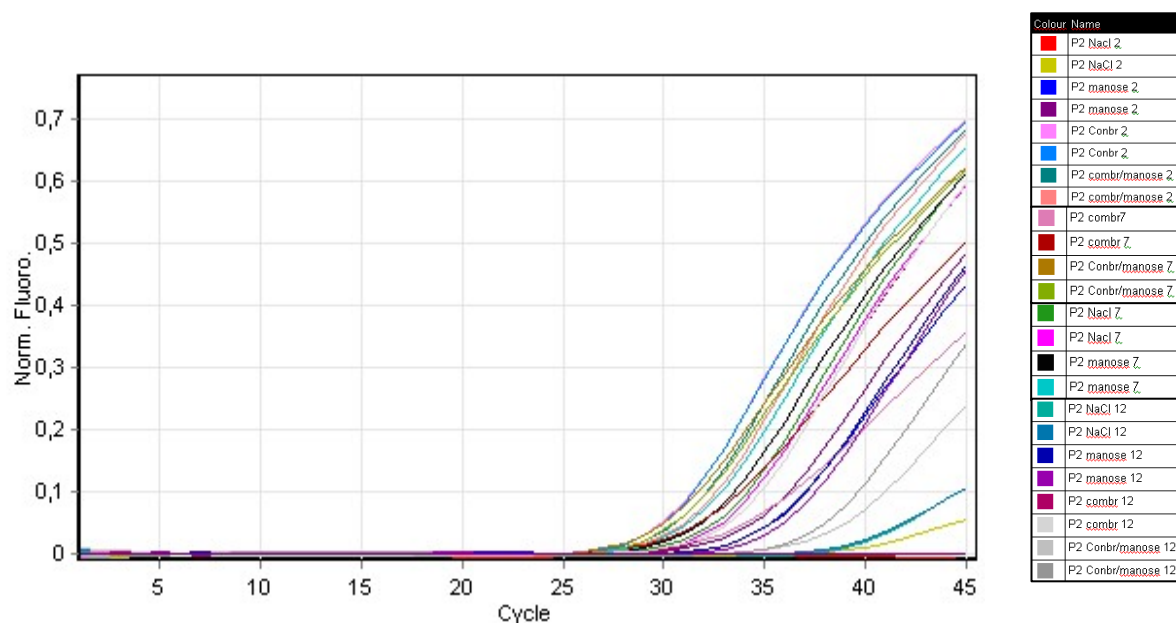


Figure 4. Amplification curves obtained by real-time PCR of MMP-9 gene, using Sybr green I.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- O grupo ConBr apresentou a melhor evolução, do ponto de vista macroscópico, das lesões cutâneas experimentais ao final do estudo.
- A análise histopatológica demonstrou que os grupos controle apresentavam-se com padrões de reparação tecidual menos evoluídos, quando comparados aos grupos ConBr e ConBr/manose, os quais apresentavam fibras colágenas organizadas.
- A atividade colagenolítica das MMP-2 e MMP-9 esteve presente em todos os grupos estudados, porém os grupos controle NaCl e manose apresentaram uma atividade estatisticamente diferente dos seus respectivos grupos controle, sugerindo-se que esta seja uma das causas da melhor evolução do processo cicatricial nos grupos ConBr e ConBr/manose.
- A eletroforese realizada com extratos das lesões experimentais demonstrou bandas com proteínas com 67KDa, o qual representa o peso molecular da forma ativa da MMP-2.
- As cópias de cDNA foram sintetizadas a partir de quantidades iguais de RNA total e sob as mesmas condições experimentais em todos os grupos estudados.
- A expressão do gene da MMP-2 e MMP-9 foi observado em todos os grupos, porém o grupo controle NaCl, não expressou o gene para MMP-2 no 2º dia após a cirurgia e no 2º e 12º dia não expressou para a MMP-9, este fato pode explicar o perfil deste grupo, o qual não teve uma cicatrização positiva em comparação aos demais grupos no 12º dia do experimento.

ANEXOS

Normas científicas para publicação nos periódicos

I- The ***Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*** (**Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**), a continuation of *Jornal Brasileiro de Patologia* (Brazilian Journal of Pathology), and published on a bimestrial basis (February, April, June, August, October and December) is directed towards the publication of scientific articles that contribute to the development of the area of Laboratory Medicine (Clinical Pathology, Pathology, Cytopathology). It accepts the following categories of articles: original articles, review articles, case reports, short communications, updating articles, letters to editors and reviews.

Analysis of the manuscript

The manuscript submitted for publication will be forwarded to one or more referees, scientific peers, of renown and specific knowledge to consider the discussed subject. After the answer of the referee, ***JBPML*** Editor shall contact the authors to inform them if their article is rejected, or the steps to be taken for the definitive publication of the manuscript.

Copyrights

Authors are kindly requested to send an undertaking together with the letter to the Editors. Therefore, when submitted for publication, the manuscript should be accompanied by copyright transfer document including each author's signature (the model is given below): I/We... author/authors of the article entitled... which we hereby submit for publication in the Brazilian Journal of Laboratory Medicine, agree that the copyrights of the above manuscript shall become the exclusive property of Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (Brazilian Society of Clinical Pathology/Laboratory Medicine), and that any full or partial reproduction is prohibited, without obtaining the prior and required authorization. We also declare that the article is original in form and content, and has not been published or submitted for publication in any other scientific periodical in full or in part.

We declare the effective participation of all the authors in conceiving and writing the article in question including performance of experiments that resulted in this communication. We likewise declare our commitment to the data analysis and editing of the manuscript. We clearly state that we have no conflict of interest with neither the theme discussed nor the products mentioned.

Date:... Signature:...

Ethic

All research involving human beings – including organs and/or tissues alone as well as medical records or clinical exams results – should be in accordance with Resolution 196/96 from Conselho Nacional de Saúde (<http://www.bioetica.ufrgs.br/res19696.htm>). Papers to be published shall be accompanied by the patient informed consent and by a copy of the ethics committee certificate from the institution where research has been carried out, in accordance with the Declaration of Helsinki, 1989 (<http://www.bioetica.ufrgs.br/helsin4.htm>).

In experimental research involving animals, ethical principles from the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal–COBEA (<http://www.cobea.org.br/etica.htm#10>) should be respected. Also, rules established by the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission of Life Sciences, National Research Council, Washington, D.C. 1996) <<http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guidex.htm>> should be considered.

It is essential to identify with accuracy chemical substances and drugs used. It may not be used patients' names or initial on illustrative material, as well as is vetoed to inform brand names, companies names and/or hospitals registries.

Form and preparation of manuscript

How to prepare the manuscript before submitting to the Editors

Three hardcopies of the manuscript should be submitted, including a copy in 3 1/2 floppy disk with the text file in Word for Windows 6.0 or higher. Illustrations and tables should be prepared in a graph processor. The first page should include: 1) title of

the article: should be concise and complete, describing the subject it refers to. Unnecessary words should be omitted. The title should be translated into English; 2) full name(s) of the author(s); 3) academic position and name of institution that each author is linked to, followed by the respective address; 4) name of the department and/or institution where the work was performed; 5) name of the corresponding author; 6) if the work was supported by any financial agency, please mention the name of the sponsors; 7) if based on a thesis, mention the title, year and institution where it was presented; 8) if it was presented in a scientific meeting, mention the name of the event, city and country where it was held and date.

Abstracts and uniterms

The second page should contain two abstracts: one abstract in Portuguese (Resumo) and the other in English (Abstract). The abstracts should identify the objectives of the work, procedures and conclusions (maximum of 250 words). Three to six key words that represent the subject of the presented work should be provided by the author using the controlled vocabulary “Decs – Descritores em Ciências da Saúde (Health Science Descriptors)” (Bireme). They should be submitted in Portuguese and English.

The mailing address of the authors should come at the end of the article.

Acknowledgments

Should be brief, direct and addressing only the person or institution that contributed substantially to the development of the work and shall come before the bibliographical references.

Text structure

Original articles

Contributions intended to disclose unpublished original research results, which may be duplicated or disseminated. Articles may contain up to 4,000 words. Their formal structure should be: Introduction; Material and method; Results; Discussion; and Conclusions. The use of subtitles is recommended, particularly in the Discussion. The

clinical implications and limitations of the study should be pointed out. Detailing of Material and method is recommended. Submission of a structure abstract in Portuguese and English is required for these articles, with headings obeying the formal presentation: Introduction, Objectives; Material and method; Results; Discussion; and Conclusions. The Abstract should be preceded by the English title. Bibliographical references should appear at the end of the text.

Up dating and review articles

Review and/or updating articles just will be published by means of specific editor's invitation. Systematic critical evaluation of the literature on a certain subject, which should contain conclusions. Should contain up to 5,000 words. The text of the article, with exception of Introduction, Discussion and Conclusion, shall be decided by the author. A structured abstract in Portuguese and another in English are required. A comprehensive list of bibliographical references should appear at the end of the text.

References

Bibliographical references should come at the end of the article in numbered alphabetical order. These should be followed by standards of the Brazilian Association of Technical Standards – NBR-6023 (August 2000). Titles of periodicals should be referenced in abbreviated form according to the List of Journals Indexed in Index Medicus. If the reference list does not follow this adopted standard, the manuscript shall be immediately rejected without review of their contents. Authors should certify that references cited in the text appear in the reference list with accurate dates and name of authors spelled correctly. Authors are responsible for the accuracy of the references. Personal information, unpublished works or works in progress may be cited when absolutely necessary. However, they should not be included in the bibliographical reference list, but merely cited in the text or in a footnote. The reference list should follow the style of the examples below: If more than three authors collaborate in a publication, the first author should be mentioned followed by the Latin expression et al.

Tables and figures

Examples:

•Periodical articles (one author only)

COTRIM, F. L. S. Coleta de sangue para dosagem de triglicerídeos. J Bras Patol, v. 33, n. 4, p. 201-02, 1997.

•Periodical articles (more than three authors)

ABREU, E. S. et al. Doença de Hodgkin infanto-juvenil no estado do Ceará e sua relação com o vírus Epstein-Barr: parâmetros clínicos e análise morfológica imuno-histoquímica e por hibridização in situ. J Bras Patol, v. 33, n. 4, p. 178-84, 1998.

•Online periodical article

YAZLE, J. S. R. et al. Assistência hospitalar como indicador da desigualdade social. Rev Saude Publ, São Paulo, v. 31, n. 5, 1997. Available at: <http://www.fsp.usp.br/rsp>. Accessed on: March 23, 1998.

•Book as a whole (two authors)

RINGSVEN, M. K.; BOND, D. Gerontology and leadership skills for nurses. Albany, N. Y.: Delmar Publishers, 1996.

•Chapters or part of book edited by another author

SCIVOLETO, R. Sistema nervoso autônomo. In: ZANINI, A. C.; OGA, S. Farmacologia aplicada. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1989. Cap. 9; p. 97-141.

•Event in electronic médium

SILVA, R. N.; OLIVEIRA, R. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total da educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 4., 1996, Recife. Anais eletrônicos... Recife: UFPe, 1996. Available at: <http://www.propesq.ufpe.br/anais/educ/ce04.htm>. Accessed on: January 21, 1997.

•Thesis or dissertation

Oliveira, C. M. Isolamento e caracterização de estreptococos de placa dental. Rio de Janeiro, 1974. Tese (doutoramento) – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

•Citations in the text

Citations in the text should be identified with Arabic numerals (index numbers). The author's name and the year may also be added. References with more than one author should contain the author's surname followed by the expression et al, e.g. Higashi et al.

Abbreviations and names of medications

Abbreviations should be indicated on their first appearance in the text. Use generic name of medications and indicate source of compounds not available for prescription. Units of measurement, including their abbreviations, should be expressed in metric system and also in the International System (SI) between parentheses.

II- *Revista Ciência Rural*. The scope of CIÊNCIA RURAL is to publish original articles (full papers), short notes and reviews. Manuscripts should be submitted exclusively to *Ciência Rural*.

2. Full paper should not contain more than 15 typed pages, reviews 20 pages, short notes should contain at most eight pages. Use double spacing throughout the text, including the Abstract and References. The pages should be numbered consecutively, beginning from the title page. The size of the print paper should be A4 210 x 297mm containing no more than 28 lines per page. The font Times New Roman 12 should be used.

3. Full papers should contain the following sections: Title, Abstract and Key words in English and Portuguese; Introduction (containing the respective Literature review); Material and Methods; Results, Discussion and Conclusions; Acknowledgements; Paper presentation; Sources and Manufactures when necessary; Bioethics and Biossecurity Committee Approval (Required when animals and genetically modified organisms are involved) and References. The sections results and Discussion; or Results, Discussion and Conclusions may be combined.

4. Review Articles should contain the sections: Title, Abstract and Key words in English and Portuguese; Introduction; Text; Conclusion; Acknowledgements; Sources and Manufactures when necessary; Bioethics and Biossecurity Committee Approval (Required when animals and genetically modified organisms are involved) and References.

5. Short notes should contain: Title, Abstract and Key words in English and Portuguese; Text (without subdivision in sections, but ordered accordingly in introduction, methodology, results, discussion; conclusion) Acknowledgements; Sources and Manufactures when necessary; Bioethics and Biossecurity Committee Approval (Required when animals and genetically modified organisms are involved) and references. The text may also include tables and figures ([Paper example](#)).

6. No reprints will be supplied to authors. The articles are free at www.scielo.br/cr.

7. Describe the title in english and portuguese. Only the first letter of the title should be in capital letter except for official names. Do not use abbreviations in the title. Scientific names should be used in the title only when strictly necessary. Please use them as key

words and in the other sections of the paper. Full name(s) of the authors should be written below the title, side to side, followed by number (roman numbers in superscript). These numbers which will indicate, when repeated at the bottom of the page, the affiliation and corresponding address, etc. The corresponding author be indicated and should be accompanied by full address, including the e-mail, when available.

8. Within the text, the References should be cited as follows: a. MASON (1964) observed... b. The average cited by ZONTINI & UNO (1986) was similar... c. PRESNEL et al. (1973) indicated... d. ...the congenital malformation (MOULTON, 1978).

9. The Reference List should be placed at the end of the manuscript; the references should be ordered alphabetically. Please follow the following examples:

9.1. Book References: BARHAM, J.N. Mechanical kinesiology. Saint Louis : Mosby, 1978. 509p. MENGEL, K.; KIRBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. 4 ed. Bern : International Potash Institut, 1987. 687p.

9.2. Chapter in a book: GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Willians & Wilkins, 1964. Chap.2.p.32-48.

9.3. Chapter without authorship in a book: COCHRAN, W.G. The stimulation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Chap.4,72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo: Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Standard Journal Article :
GUENZI, W.D., et al. (More than two authors) Nitrification and dinitrification in cattle manure-amended soil. **J Environ Qual**, Madison, v.7, n.2, p.196-202, 1978.

9.5. Theses, dissertations...

MOSCARDI, G. **Control of Anticarsia gemmatalis Hübner on soybean with a baculovirus and selected insecticides and their effect on natural epizootics of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) samson.** 1977. 68f. Dissertation/Thesis (Master/PhD in Biological control and integrated pest management) - Course of Entomology, University of Florida.

9.6. Bulletins:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose.** São Paulo: Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. Boletim Técnico, 20.

9.7. Non-published paper (should be avoided when possible): Read after the text, e.g.: Comparative study about the effect of different sutures in the trachea anastomosis of dogs. Sheila Canevese Rahal authorship (in preparation).

9.8. Personal Communication (should be avoided when possible): Information in the text is identified by (Personal Communication) after the statement: e.g. ...described by Johnston (1980) (Personal Communication).

9.9. Electronic documents:
MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico.** São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. CD-Rom.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow dysplasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Capturado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em:
<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos.** Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Capturado em 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and

conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet <http://www.medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRUGIA VETERINARIA, 3, 1997. Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Illustrations, graphs, photographs will be named Figures; identified by arabic numerals (Figure 1, Figure 2, etc...). Each figure will be considered as a full page. Graphs and illustration should measure 7.5 or 16cm width. The figures may also be sent digitized in .tiff with at least 800 dpi. Tables should be identified with the word Table, ordered by Roman numerals, and cannot exceed one page should appear after the reference section. However separated.

11. The authors are responsible for all the statement and concepts contained in the article.

12. Submission requires metadata for all authors. The papers will not proceed for evaluation before the data is not provided. Exceptionally other forms can be used. Please contact Ciência Rural for additional information.

13. Tramitation and page charges - Ciência Rural charges US\$ 15.00 for paper tramitation and US\$ 20.00 for each printed page published. Color plates are US\$ 120.00 per page. The payments can be made at the Banco do Brasil, agency number 1484-2, account 250945-8 due FATEC - Project 96945. Payments can also be made by using [VISA](#) credit cards . The payment for page charges should only be made at the time the authors return the galley proofs. The check or receipt of each payment should be always enclosed at the right moment.

14. Articles will be published according to the order of approval.

15. Articles that are not recommended for publication will be archived. However there will be sent a message for the authors explaining why the paper was not approved.

16. Doubts can be solved by examining a previous issue of the *Ciência Rural* before contacting the Editorial Committee.

III- Wound Repair and Regeneration

Author Guidelines

The International Journal of Tissue Repair and Regeneration is the official publication of the Wound Healing Society, the European Tissue Repair Society, the Japanese Society for Wound Healing, and the Australian Wound Management Association. This Journal publishes original scientific and/or clinical papers on the broadly defined topics of wound healing and tissue regeneration. Articles that significantly advance the knowledge of processes involved with wound healing and regeneration in all tissues and organisms, or that provide new insights into clinical therapies will be given highest priority. Manuscripts that describe product evaluations will be considered but will receive lower priority. The Journal also welcomes articles that provide the reader with a thorough understanding of a specific methodology or technique pertinent to wound healing and regeneration studies. These articles will be subjected to the same peer review as regular research articles. Manuscripts will be accepted from any country but must be written in idiomatic English, and will be subject to copyediting before publication. Authors may be required to have manuscripts edited for English, either on their own or through the English Language editing services, which may be found on the Author Services webpage (http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp).

Submission of manuscript

The Journal requires, except by pre-arrangement, submission of manuscripts using our online manuscript processing system WRR-Manuscript Central TM. This system may be accessed at <http://mc.manuscriptcentral.com/wrr>. Authors MUST suggest the names of three reviewers for the manuscript, ONE OF WHICH MUST BE AN EDITORIAL BOARD MEMBER. However, selection of the referees will be determined by the Editor. Authors are also encouraged to indicate individuals they feel should NOT be considered _____ as _____ reviewers.

The Journal requires that for each submission, the submitting author provides written assurance that the paper has not been previously published and that no other submission or publication will be made. Abstracts of oral or poster presentations are not considered to constitute prior publication. Copyright to all papers is vested in the Wound Healing Society. Manuscripts purporting to contain original material will be considered for publication with the understanding that neither the article nor any of its essentials, including tables and figures, has been or will be published or submitted for publication elsewhere before appearing in this Journal. When submitting a paper, the submitting author should always make a full statement to the editor-in-chief about all submissions and previous reports that might be regarded as redundant, duplicate or overlapping significantly with the presently submitted paper to WRR. The submitting author should also alert the editor-in-chief if the research in the current submission to WRR includes subjects about which a previous report has been published. Any such research should be referred to and referenced in the WRR paper. The Editor-in-chief will assess the information provided by the submitting author and subsequently may request copies of such previously published, in-press, or submitted (to another journal) papers before further review is permitted. It is the responsibility of the submitting author to disclose to the Editor any significant financial interests they may have in products mentioned in their manuscript. This information will be deemed confidential and will only be disclosed to manuscript reviewers if, in the opinion of the Editor, the information is directly pertinent for an informed review.

General Instructions

Manuscripts must be submitted for review through the WRR website at <http://mc.manuscriptcentral.com/wrr>. Step-by-step instructions for formatting and uploading manuscripts are available on the opening screen of the site. In preparing for submission, place the text, tables, and figures in a single file. Save your document as a Word or RTF (rich text format) file on your word processor. Please note that Word 2007 is not yet compatible with journal production systems. Unfortunately, the journal cannot accept Microsoft Word 2007 documents until such time as a stable production version is released. Therefore, please use Word's "Save As" option to save your document as an older (.doc) file type. Type the manuscript using a 12-point font size, set text margins at 1" from edge, page number your manuscript beginning with the title page, and double-space all elements of the paper, organized in the following order.

1. Cover Letter with Assurances
2. Title Page
3. Abstract
4. Introduction
5. Materials and Methods
6. Results
7. Discussion
8. Acknowledgments
9. Footnotes
10. References
11. Tables
12. Figure Legends
13. Figures
14. Supplemental Data (if applicable)

Cover letter with Assurances

This letter from the submitting author must provide written assurance that the paper has not been previously published and that no other submission or publication of the original work has been or will be made. Abstracts or oral or poster presentation are not considered to constitute prior publication. The submitting author must further assure

that every author listed meets the qualifications for authorship (see below) and has had the opportunity to read and comment upon the submitted manuscript.

Title page

The title page should include (a) the title of the article, which should be concise but informative; (b) first name, middle initial, and last name of each author, with highest academic degree(s) and institutional affiliation; (c) name of department(s) and institution(s) to which the work should be attributed; (d) name, address, telephone number, fax number, and email address of corresponding author; (e) name and address and email address of the author to whom requests for reprints should be addressed, (f) short running title, and (g) key words.

Authorship

All persons designated as authors must qualify for authorship according to guidelines established by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>). Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship. General supervision of the research group is also not sufficient for authorship.

Abstract

The second page should contain an abstract of not more than 200 words. The abstract should state the purpose of the investigation, basic procedures, main findings (BE SPECIFIC), and the principal conclusion. Emphasize new or unique aspects of the investigation. Abbreviations should not be used in the abstract. Generally, the abstract should be a single paragraph and should NOT be structured into separate sections with headings.

Text

The text of the manuscript should be divided into the following sections with headings: Introduction, Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Longer articles may be further divided with appropriate subheadings. For original research papers, the body of the text including title page should not exceed 21 pages, and the number of references should be limited to 40 or fewer. Tables and figures should be used to support all reported results, but should not be redundant and should be limited to those necessary for data presentation and interpretation. For perspective articles, the manuscript length and number of references may be greater, and will be determined by the Editor.

Introduction

State the purpose of the article; for original research, the statement of a hypothesis to be tested is appropriate. Summarize the rationale for the study, giving only pertinent references, and do not review the subject extensively. Do not include data or conclusions in this section from the work to be reported.

Materials and Methods

Identify the methods, apparatus (include manufacturer's name, city and state or country in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Give references for established methods; provide references and brief descriptions for methods that have been published but are not well known; and describe in greater detail new or substantially modified methods (if deemed necessary, a diagram or flow chart may be used for complex procedures). Identify precisely all drugs and chemicals used, including generic name(s), dose(s), and route(s) of administration.

Animal Investigations

Study protocols must be in compliance with the institution's guidelines or the National Research Council's criteria for humane care as outlined in the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 86-23, Revised 1985, <http://books.nap.edu/catalog/5140.html>). Researchers from countries other than the US are encouraged to consider guidelines of the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, international (<http://www.aaalac.org/index.cfm>) and to recommend membership in this organization to their institutions. A statement of assurance of the humane treatment of research animals must be provided within the Materials and Methods section.

Statistics

Statistical methods must be described in sufficient detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. Whenever possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty. Statistical probability (p) should be reported in tables, figures, and figure legends at only one of the following levels: $p < 0.05$, 0.01, 0.005, or 0.001. If exact probability levels are expressed, an explanation for this requirement must be included in the statistics section of Materials and Methods.

Results

The narrative of the text should take the reader through a logical progression of data consideration and interpretation. Present results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. DO NOT repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasize or summarize only important observations.

Discussion

Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. DO NOT repeat in detail data or other material given in the Introduction or Results sections. Include in the Discussion section the implications of the findings and their limitations, including implications for future research. It is appropriate to briefly discuss how the results fit into (or deviate from) the larger body of published work on the topic. Link the conclusions with the goals of the study, and avoid unqualified statements and conclusions not supported by the data. State the hypotheses when warranted but clearly label them as such.

Acknowledgments

This section should contain one or more statements that specify (a) contributions that need acknowledgment but do not justify authorship; (b) acknowledgment of technical help; (c) acknowledgments of financial material support (specify the nature of the support); (d) financial relationships that may pose a conflict of interest.

List of Abbreviations and Other Footnotes

All nonstandard abbreviations should be grouped in alphabetical order into one footnote, with all footnotes placed on a separate page of the manuscript following the acknowledgments. Footnotes in the text should be denoted with a superscript Arabic numeral.

References

Number references consecutively in the order in which they are mentioned in the text. Identify references in text, tables, and figure legends by Arabic numerals in parentheses. References cited only in tables or figure legends should be numbered last. Use the style of the following examples, which are based with slight modification on the formats set forth in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals," (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). The titles of journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus. "Unpublished

observations" and "personal communications" may not be used as references but should be inserted in parentheses in the text. Include among the references papers accepted but not yet published; designate the journal and add "In press." Examples of correct reference styles are given below:

Articles in Journals

Standard Journal Article - List all authors:

Whitby DJ, Ferguson MW. Immunohistochemical localization of growth factors in fetal wound healing. *Dev Biol* 1991;147:207-15.

Organization as Author:

The Royal Marsden Hospital Bone-Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post-hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977;2:742-4.

No Author Given:

Coffee drinking and cancer of the pancreas [editorial]. *BMJ* 1981;283:628.

Volume with Supplement:

Magni F, Rossoni G, Berti F. BN-52021 protects guinea pig from heart anaphylaxis. *Pharmacol Res Commun* 1988;20 (5 Suppl):75-8.

Issue with Supplement:

Gardos G, Cole JO, Haskell D, Marby D, Paine SS, Moore P. The natural history of tardive dyskinesia. *J Clin Psychopharmacol* 1988;8(4 Suppl):31S-37S.

Issue with Part:

Reif S, Terranova VP, EL-Bendary M, Lebenthal E, Petell JK. Modulation of extracellular matrix proteins in rat liver during development. *Hepatology* 1990;12(3 pt 1):519-25.

Article Containing Comment:

Piccoli A, Bossatti A. Early steroid therapy in IgA neuropathy: still an open question [comment]. *Nephron* 1989;51:289-91. Comment on *Nephron* 1989;48:12-7.

Article Comment On:

Kobayashi Y, Fuji K, Hiki Y, Tateno S, Kurokawa A, Kamiyama M. Steroid therapy in IgA nephropathy: a retrospective study in heavy proteinuric cases [see comments]. *Nephron* 1989;51:289-91.

Books and Other Monographs

Personal Author(s):

Majno GA. The heading hand: man and wound in the ancient world. Cambridge: Harvard Univ Press, 1975.

Chapters in a Book:

Philips C, Wenstrup RJ. Biosynthetic and genetic disorders of collagen. In: Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ, editors. Wound healing: biochemical and clinical aspects. Philadelphia: Saunders, 1992:152-77.

Conference Proceedings:

Harely NH. Comparing radon daughter dosimetric and risk models. In: Gammage RB, Kaye SV, editors. Indoor air and human health. Proceedings of the Seventh Life Sciences Symposium; 1984 Oct 19-31; Knoxville (TN) Chelsea (MI): Lewis 1985;6-78.

Unpublished Material:

In press (use only if accepted in book or journal format)

McMahon SB, Monroe JG. Role of primary response genes in generating cellular responses to growth factors. FASEB J. In press.

Tables

Type each table double-spaced on a separate page. DO NOT submit tables as photographs or digital images (pdf files). Number tables consecutively using Arabic numerals in the order of their first citation in the text and supply a brief title for each. Place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all nonstandard abbreviations that are used in each table. DO NOT use internal horizontal and vertical rules. The use of too many tables in relation to the length of the text can produce difficulties in the page layout. The Editor may recommend removal or modification of tables if the page layout is untenable. If the table has been published previously, written permission must be obtained and appropriate acknowledgment must be made. Large data tables may be included as supplementary data and referenced in the text as being available online (the author(s) should coordinate this with the managing editor).

Figure Legends

Type figures legends double-spaced starting on a separate page following the tables, with Arabic numerals corresponding to the illustrations. Explain each symbol used in the illustration, such as arrows, and other visual aids. Scale bars should be labeled within the image, but original magnification may also be stated in the legend.

Units of Measurement

Measurements of length, height, weight, and volume must be reported in metric units or their decimal multipliers. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressures in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI).

Figures

All figures must be either professionally drawn and photographed or produced with appropriate computer graphics. All figures must be submitted electronically according to the specifications outlined below. Failure to submit images according to these specifications will result in reproductions that are small and illegible or in images that are declined. Color photographs should be saved in CMYK as TIF or JPG files at 600 dpi at 5 inches in width. Black and white photographs should be saved in greyscale as TIF files at 600 dpi at 5 inches in width. New line drawings should be prepared in Microsoft Word, PowerPoint, or Illustrator without embedded images from other sources. Existing line drawings should be scanned at 1200 dpi at a minimum of 12.5 cm (5 in) in width and saved as EPS files (flow charts must not exceed 7 inches [18 cm] in width). Any existing images added to Microsoft Word or PowerPoint will be rejected. Send original TIF or EPS files. All lettering should be done professionally and be of adequate size to retain clarity after reduction (final letter size in print is 1.5mm high or larger). It is understood that figures will be reproduced at a width of one column (approx. 12 cm or 2 inches), two columns (approx. 26.5 cm or 4 5/8 inches). All figures must be referred to specifically in the text, and numbered in order of appearance in the text. Graphs should be labeled with font size that will be legible in published format; groups or categories should be indicated within the graph whenever possible and error bars and statistical differences included where appropriate. More detailed information on the submission of electronic artwork can be found at www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp.

Photomicrographs should include a scale bar embedded in the image. For multiple panels of the same magnification in one figure, only the first panel needs to have a scale bar.

If photographs of persons are used, either the subjects must not be identifiable or their pictures must be accompanied by written permission to use the photograph.

The manipulation of photographs by computer or other means may include a vast array of changes. These include addition of text or graphics, change of color, brightness, or contrast; enlargement; or other changes to image quality. Processes that destroy photographs in order to deceive an audience represent unethical manipulation. Distortion of photographs may be achieved by over or under exposure of the film at the time of photography or through computer manipulation. The WRR considers the manipulation of photographs used in presentation to patients, the media, in journals, or at scientific meetings for the purpose of deceiving the audience to be against the ethical standards of the Society. Figures should be numbered using Arabic numerals consecutively according to the order in which they are cited in the text. If a figure has been published previously, acknowledge the original source and submit written permission from the copyright holder to reproduce the material. Wound Repair and Regeneration will publish illustrations in color. However, the authors are responsible for all publication costs associated with color reproduction. Please contact the Editorial Office for these costs. Figures should not be submitted in color if authors do not wish to pay for the color cost.

Copyright Release Form

The copyright release form is available online at the WRR manuscript submission website on the opening screen of the site. This should be filled out and signed by the submitting author and submitted according to instructions on the form, at the same time that the manuscript is submitted online.

Reprints

Single reprints should be obtained directly from the author. A reprint order form will be sent to authors at the time of page proofs.

NEW: Online production tracking is now available for your article through Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article -once it has been accepted- through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production so they don't need to contact the production editor to check on progress. Visit www.blackwellpublishing.com/bauthor for more details about online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

PERSPECTIVAS DO TRABALHO

- Um quarto trabalho a ser submetido ao periódico ***Histochemistry*** está em fase de conclusão, onde neste trabalho estamos avaliando o padrão histoquímico de outras proteínas envolvidas na cicatrização: teste histoquímico Watanabe (elastina), Van Gienson (reticulina) das lesões cirúrgicas, pois complementará os dados da histoquímica com TM (colágeno) que já foi realizado.
- Analisar a expressão de inibidores teciduais das MMP (TIMPs), através de PCR em tempo-real, e correlacionar com os achados da expressão da MMP-2 e MMP-9.
- Realizar um estudo que possibilite a investigação dos efeitos da lectina ConBr com o seu sítio de ligação ao carboidrato alterado (mutado), através de técnicas de biologia molecular.
- Realizar dosagens de citocinas que estejam envolvidas no processo de ativação ou inibição das metaloproteinases, para melhor entender a relação expressão X atividade das enzimas.

TRABALHOS CIENTÍFICOS DESENVOLVIDOS DURANTE O DOUTORADO.

Artigos completos publicados em periódicos

FLORENCIO, A. P. S. ; Melo, J. H. L. ; MOTA, C. R. F. C. ; MELO JÚNIOR, Mário Ribeiro de ; ARAÚJO, R. V. S. . Study of the Antitumoral Activity of a Polysaccharide from *Anacardium occidentale* (P JU) Using the Sarcoma 180 Experimental Model. Revista Eletrônica da Faculdade de Farmácia, v. IV, p. 61-65, 2007.

Resumos publicados em anais de congressos Internacional

1. Oliveira, F.; ARAÚJO, R. V. S. ; Schirato, J. ; Lima-Filho, J. L. ; Cavada, B. S. ; LEÃO, Ana Maria dos Anjos Carneiro ; Porto, A. L. F. . Protease activity in experimental wounds treated with *Canavalia brasiliensis* lectin seeds using mice as model of wound healing. In: I Congresso Nacional de la Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio, 2007, Buenos Aires. I Congresso Nacional de la Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio, 2007.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

SILVA, F. O. ; ARAÚJO, Rosângela Vidal de Sousa ; SCHIRATO, Giuliana Viegas ; LIMA, Maria da Conceição Gomes de ; CAVADA, Benildo de Sousa ; LIMA-FILHO, José Luiz de ; CARNEIRO-LEÃO, Ana Maria dos Anjos ; PORTO, Ana Lúcia Figueiredo . Atividade Proteolítica em Lesões Cutâneas Tratadas com a Lectina Isolada das Sementes de *Canavalia brasiliensis*. In: VII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, VIII Simpósio de Pós-Graduação, 2007, Recife. Anais da VII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, VIII Simpósio de Pós-Graduação, 2007.

Atividades Acadêmicas

Ensino na qualidade de Professor-regente, a disciplina de Bioquímica 1 e 2 aos cursos de graduação em: Odontologia, Biomedicina e Fisioterapia na Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES), onde também desenvolve pesquisas científicas, inclusive com orientação de alunos do programa PIBIC-ASCES.