



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

INGRID SAMANTHA TAVARES DE FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LECTINA DE *Cratylia floribunda* Benth EM
FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS**

FORTALEZA
2008

INGRID SAMANTHA TAVARES DE FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LECTINA DE *Cratylia floribunda* Benth EM
FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

**FORTALEZA
2008**

F49o Figueiredo, Ingrid Samantha Tavares de
Avaliação do efeito da lectina de *cratylia floribunda benth em feridas cutâneas experimentais/* Ingrid Samantha Tavares de Figueiredo. – Fortaleza, 2008.
111f.: il.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Nylane Maria Nunes de Alencar
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2008.

1. Cicatrização de feridas. 2. Tecido de granulação. 3. Lectinas de plantas. I. Alencar, Nylane Maria Nunes de (Orient.) II. Título.

CDD T617.14

INGRID SAMANTHA TAVARES DE FIGUEIREDO
AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LECTINA DE *Cratylia floribunda* Benth EM
FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Vilma de Lima
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa
Universidade Federal do Ceará – UFC

A Deus, por tudo que tenho e sou!

Aos meus pais, Dagoberto Moreira e Aparecida Tavares, por toda renúncia e dedicação desprendida em função dos meus estudos. Sempre acreditando e apoiando as minhas decisões e com isso, me tornando mais forte para seguir em frente.

Ao meu marido, Marcus Braz, por todo amor, compreensão e companheirismo. E com isso torna situações difíceis em momentos mais amenos e agradáveis, de modo que me faz tão feliz.

À minhas irmãs, Monique e Camila, que sempre participaram da minha vida de forma tão especial, que mesmo sem perceberem mostraram-me a importância do amor fraternal quando buscamos um ideal.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar, a qual desde o início da minha formação acadêmica esteve presente, como orientadora e como uma grande amiga, seja dentro ou fora do ambiente profissional. Agradeço, também, não apenas pela conquista desta etapa, bem como pelo exemplo de uma profissional justa, ética e persistente diante seus objetivos.

À Professora Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão que implantou no nosso grupo de pesquisa um novo modelo experimental, contribuindo com novas idéias, elogiando, sempre que necessário criticando e assim aperfeiçoando cada vez mais o nosso trabalho.

Ao Professor Dr. Benildo Sousa Cavada pela colaboração científica e pelo fornecimento da lectina utilizada neste estudo.

À Professora Dra. Vilma de Lima, a qual gentilmente aceitou o convite de participar da banca.

Ao Professor Marcus Raimundo Vale, por transferir durante todos esses anos de convivência parte de sua grande experiência profissional, contribuindo assim para a realização deste trabalho.

À Cinthia Montenegro, meu braço direito desde o início da implantação deste projeto. Um exemplo admirável como estudante de iniciação científica, sempre presente, com idéias ricas e construtivas e que contribuiu de forma valiosa no decorrer deste trabalho.

Ao Flávio Bitencourt, a quem tive o prazer de contribuir no início da sua jornada científica e que hoje tenho como referência no nosso ambiente de trabalho.

À Jozi Godoy, que dia a dia me contagia com sua determinação e dedicação a tudo que faz. Além de sempre disposta a ajudar em todos os momentos que precisei.

Ao Ítalo Cavalcante que em todos os momentos demonstrou disponibilidade em colaborar e pelas idéias que sempre me fizeram aprimorar este trabalho.

Ao Mário Mota, pela suas opiniões construtivas, sempre com um sorriso no rosto, tornando nosso ambiente de trabalho mais agradável.

À Cibele Nóbrega e Carla Camila Bezerra que mesmo sendo coordenadas pela Jozi e Flávio, respectivamente sempre acompanharam o progresso deste trabalho, ajudando sempre que possível e necessário.

À Taiana pierdoná, pela breve colaboração e valiosa convivência no início deste trabalho.

À Patrícia, técnica do laboratório de Bioquímica da Farmacologia, uma pessoa dedicada e responsável.

À minha amiga Karol Aragão, companheira durante a iniciação científica e que mesmo distante atualmente, não esquecerei de ser grata pelos bons e difíceis momentos que compartilhamos juntas durante nossa vida acadêmica.

Ao Tiago Olinda, um amigo fruto do departamento de farmacologia, com quem compartilhei momentos difíceis e de conquistas.

Aos integrantes do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, principalmente aqueles responsáveis pelo brilhante trabalho árduo, mas gratificante, de isolar e purificar as lectinas dia-a-dia.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, que se mostraram prestativos e atenciosos, enriquecendo meus conhecimentos através de aulas maravilhosas e opiniões valiosas em relação à este trabalho.

Ao Laboratório de Inflamação e Dor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Jussie, Mônica, Chiquinho, Aurea, Íris, Marta, Joana e Haroldo.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior), pelo apoio financeiro nesse período de pesquisa.

Meu Muito Obrigada!

“A conquista do sucesso não é uma coisa de ocasião. Ela é planejada e trabalhada até que se atinja a exaustão. E quando já estivermos cansados de lutar pelo sucesso, aí sim ele virá, com um gosto surpreendentemente maravilhoso de vitória”.

(Prof. Nelson Lage)

RESUMO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LECTINA DE *Cratylia floribunda* EM FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS. Ingrid Samantha Tavares de Figueiredo. Orientadora: Prof^a. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2008.

O trauma tecidual é seguido por uma cascata de eventos celulares e bioquímicos que resulta na formação da ferida cicatrizada. Este processo pode ser dividido em três fases: inflamação, proliferação e remodelação. Lectinas são (glico) proteínas que podem reconhecer e se ligar reversivelmente a carboidratos ou a outras substâncias derivadas de açúcares. *Cratylia floribunda* é uma espécie de leguminosa, encontrada exclusivamente na América do sul da qual foi isolada a lectina de *Cratylia floribunda* (CFL). O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do tratamento tópico diário com a CFL em um modelo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos. Feridas cirúrgicas (1cm²) foram produzidas sob condições assépticas na região dorsal de camundongos Swiss albinos (27-33g, n= 23/grupo), sendo estes posteriormente randomizados em dois grupo experimentais de acordo com o tipo de tratamento estabelecido: grupo C (solução salina) ou grupo CFL (100 µg/mL). As feridas foram tratadas diariamente com 100 µL de cada solução durante todo o período pós-operatório (PO). As lesões cutâneas foram submetidas à avaliações clínicas diárias durante 12 dias, onde investigou-se parâmetros macroscópicos relacionados à fase inflamatória e de fibroplasia. Os fragmentos de pele retirados nos dias de biópsia (2^o, 7^o e 12^o dias PO) foram processados e analisados histopatologicamente. Paralelamente, verificou-se a capacidade da lectina em induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α) por macrófagos *in vitro*. CFL reduziu a frequência, intensidade e a duração dos sinais flogísticos edema e hiperemia. No 10^o e 11^o dias PO a presença de crosta nas feridas do grupo tratado com a lectina foi significativamente menor (p<0,05) que no grupo controle. CFL antecipou a formação do tecido de granulação, sendo este visualizado em maior percentual das lesões cutâneas. O grupo CFL apresentou um maior percentual de contração das áreas das lesões desde os primeiros dias de tratamento e se manteve até o 12^o dia PO (p<0,05). As maiores diferenças entre os percentuais de contração das lesões entre os grupos ocorreram no 1^o dia PO (diferença de 22,5%) e no 5^o dia PO (diferença de 20,5%). As áreas compreendidas pelas curvas (ASC) de evolução em ambos os grupos demonstrou diferença estatística entre os grupos (C - 6,27 ± 0,85; CFL - 4,00 ± 1,28, p<0.05). Em relação ao grupo C, CFL apresentou de forma significativa (p<0,05) um maior percentual de animais com feridas cicatrizadas no 10^o e 11^o dia de PO. O tratamento com a lectina antecipou o surgimento de tecido cicatricial, sendo estatisticamente significativo (p<0,05) a frequência com que este foi observado no 6^o e 8^o dia PO. As análises histopatológicas mostraram que o tratamento com a CFL favoreceu a resolução da fase inflamatória. Além disso, a fase proliferativa foi antecipada no grupo CFL, sendo este aspecto evidenciado pela presença de um tecido de granulação fibroso desde o 7^o dia de PO, enquanto que no mesmo período, as lesões do grupo C apresentavam uma formação inicial deste tecido. No 12^o de PO foi observado uma completa reepitelização das lesões tratadas com CFL, enquanto que no grupo C um tecido de granulação sendo ainda invadido por fibras colágenas. CFL *in vitro* estimulou a liberação de TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos. Esses resultados mostram que a lectina de *Cratylia floribunda* modula a fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos. Hipotetizamos que *in vivo* a lectina estimula células residentes (macrófagos) a liberação de TNF-α. Em conjunto, esses resultados revelam que a CFL favorece o reparo de lesões.

Palavras-chave: Lectinas de plantas; Cicatrização de Feridas; Tecido de granulação

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECT FROM *Cratylia floribunda* LECTIN IN EXPERIMENTAL CUTANEOUS WOUNDS. Ingrid Samantha Tavares de Figueiredo. Supervisor: Dr. Nylane Maria Nunes de Alencar. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2008.

The tissue injury evokes a physiological process of complex cellular and biochemical events that results in wound healing. This process can be divided into three phases: inflammation, proliferation and remodeling. Lectins are (glyco)proteins that can recognize and reversibly bind to carbohydrates or other substances derived from sugars. *Cratylia floribunda* is a leguminous species, found only in South America, from which was isolated *Cratylia floribunda* lectin (CFL). The aim of this work was to evaluate the topical treatment of cutaneous wounds using CFL at a cicatricial model. Surgical wounds (1cm²) were produced aseptically in the dorsal region of male Swiss mice (27-33g; n=23/group), which were randomized in two experimental groups according to the treatment set: C (150 mM NaCl) or CFL (100 µg/mL). Wounds were treated topically, daily, with 100 µL from each solution throughout all the post-operative period (PO). Clinical evaluation of the skin lesions was performed along 12 days and the parameters investigated were some macroscopic signals of inflammation and fibroplasia. Cutaneous biopsies have been carried out at 2nd, 7th and 12th PO to histopathological analysis. In parallel, the ability of the lectin to induce the *in vitro* macrophage release of TNF-α, a pro-inflammatory cytokine, was evaluated. CFL reduced the frequency, intensity and duration of some flogistics signals, such as edema and hiperemy. At 10th and 11th PO the wounds treated with CFL had significantly less crust (p <0.05) than the lesions of the C group. CFL anticipated the formation of granulation tissue, being displayed in a greater percentage of skin lesions. The CFL group injuries presented a higher percentage of area contraction at the firsts day of treatment and this effect remained until the 12th PO (p<0,05). The major differences of the area contraction between the groups occurred at 1st PO (22.5%) and 5th PO (20.5%). CFL group showed a statistically lower area under the curve (AUC) of the area measures than the C group (C-6,27±0,85; CFL- 4,00±1,28, p<0.05). Compared to control group, CFL group showed a significant (p <0.05) percentual of animals with healed wounds at 10th and 11th PO. Treatment with the lectin anticipated the appearance of the cicatricial tissue, being statistically significant (p <0.05) the frequency that it was observed at 6th and 8th day PO. The histopathological analyses revealed that the treatment with CFL diminished the inflammatory phase of the wound healing. Moreover, the proliferation phase was anticipated in CFL group, since there was a fibrous granulation tissue since 7th PO on the lesions treated with CFL, while, at the same period in the C group lesions, there was an initial formation of the granulation tissue. At 12th PO, it was observed a complete reepithelization of the lesions treated with CFL, while, in C group lesions, there was a few collagen fibers among the granulation tissue. CFL stimulated the *in vitro* release of TNF-α in peritoneal macrophages culture of mice. Those results show that *Cratylia floribunda* lectin modulates the inflammatory phase of the cicatricial process from cutaneous lesions in mice. We postulate that in *in vivo* the lectin stimulates resident cells (macrophages) for liberation of TNF-α. Together, those results reveal that CFL favors the repair of lesions.

Keywords: Plant lectins; Granulation tissue; Wounds healing

LISTA DE FIGURAS

1.	Representação esquemática da pele humana	20
2.	Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas	24
3.	Esquema que ilustra o recrutamento de células inflamatórias à lesão	27
4.	Representação da fase de fibroplasia	32
5.	Planta e sementes de <i>Cratylia floribunda</i>	41
6.	Avaliação macroscópica dos aspectos clínicos	52
7.	Lectina de sementes de <i>Cratylia floribunda</i> (CFL) diminui a frequência de edema em feridas cutâneas experimentais	60
8.	Lectina de sementes de <i>Cratylia floribunda</i> (CFL) diminui a frequência de hiperemia em feridas cutâneas experimentais	61
9.	Lectina de sementes de <i>Cratylia floribunda</i> (CFL) diminui a frequência de exsudação em feridas cutâneas experimentais.....	63
10.	Lectina de sementes de <i>Cratylia floribunda</i> (CFL) diminui a frequência de crosta em feridas cutâneas experimentais	63
11.	Lectina de sementes de <i>Cratylia floribunda</i> (CFL) antecipa a formação de tecido de granulação em feridas cutâneas	64
12.	O tratamento com a lectina de sementes de <i>Cratylia floribunda</i> (CFL) aumenta a contração total da área de feridas experimentais	66
13.	Lectina de sementes de <i>Cratylia floribunda</i> (CFL) aumenta a frequência de lesões não visualizadas clinicamente	68
14.	Lectina de sementes de <i>Cratylia floribunda</i> (CFL) antecipa o surgimento de tecido cicatricial e aumenta sua frequência em lesões experimentais	69
15.	Evolução temporal dos aspectos histopatológicos representativos das lesões cutâneas experimentais (Tricrômico de Masson) tratadas com salina e CFL	71
16.	Lectina de sementes de <i>Cratylia floribunda</i> (CFL) induz aumento da liberação de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos	72

LISTA DE TABELAS

1. Lectina de sementes de *Cratylia floribunda* (CFL) diminui a intensidade do edema em feridas cutâneas experimentais 60
2. Lectina de sementes de *Cratylia floribunda* (CFL) diminui a intensidade da hiperemia em feridas cutâneas experimentais 62

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitro (s)
ASC	Área sob a curva
ANOVA	Análise de variância
Ca	Cálcio
CE	Ceará
CCl4	Tetracloroeto de carbono
CFL	Lectina de <i>Cratylia floribunda</i>
CO₂	Dióxido de carbono
ConA	Canavalia ensiformis
Cm	Centímetro (s)
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês: Deoxyribonucleic acid)
DP	Desvio-Padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ELISA	(do inglês: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
E.P.M	Erro padrão da média
Et al.	...e colaboradores
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
G	Grama (s)
GM- CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
h	Hora (s)
HE	Hematoxilina-Eosina

H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
IFN-γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina-1
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
i.p	Intraperitoneal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
Kda	Kilodaltons
Kg	Kilograma (s)
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
LSL	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MEC	Matrix extracelular
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MMPs	Metaloproteinases da matriz
NaCl	Cloreto de sódio
Mn	Manganês
nm	Nanômetro (s)
NO	Óxido nítrico (do inglês: Nitric oxide)
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês: phosphate buffered saline)
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas

Pg	Picograma (s)
pH	Potencial hidrogeniônico
PO	Pós-operatório
RIPs	Proteínas inativadoras de ribossomos
RNA	Ácido ribonucléico (do inglês: ribonucleic acid)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (do inglês: sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis)
TGF-α	Fator de crescimento transformador alfa
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
TIMP	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: tumoral necrosis factor-alpha)
TNF- β	Fator de necrose tumoral beta (do inglês: tumoral necrosis factor-beta)
UFC	Universidade Federal do Ceará
UI	Unidades Internacionais
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
1.1	A pele	19
1.2	Cicatrização	22
1.2.1	Aspectos gerais	22
1.2.2	Hemostasia	24
1.2.3	Fase inflamatória	25
1.2.4	Fase proliferativa	29
1.2.5	Fase de remodelação	32
1.3	Lectinas	35
1.3.1	Definição e classificação	35
1.3.2	Lectinas vegetais: família Leguminosae, subtribo Diocleinae	38
1.3.3	Lectina de <i>Cratylia floribunda</i>	40
1.4	Relevância e justificativa	42
2	OBJETIVOS	45
3	MATERIAIS	47
3.1	Isolamento e Purificação da Lectina de <i>Cratylia floribunda</i> (CFL)..	47
3.2	Animais	47
3.3	Drogas e reagentes	48
3.4	Equipamentos e materiais	49
4	MÉTODOS	51
4.1	Indução das Lesões Cutâneas: procedimento cirúrgico	51
4.2	Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos das lesões.	51
4.3	Avaliação macroscópica dos aspectos clínicos	52
4.3.1	Avaliação dos sinais flogísticos: edema, hiperemia, exsudação e formação de crosta	52
4.3.2	Avaliação de parâmetros relacionados à fase proliferativa	53
4.4	Análise histopatológica	54
4.5	Estimulação de cultura de macrófagos peritoneais com a CFL	55
4.5.1	Isolamento de macrófagos e Incubação com LPS e CFL	55

4.5.2	Dosagem de TNF- α	56
4.6	Análise estatística	57
5	RESULTADOS	59
5.1	Avaliação macroscópica dos aspectos clínicos	59
5.1.1	CFL diminui a presença de sinais inflamatórios nas lesões cutâneas ..	59
5.1.2	CFL antecipa a formação de tecido de granulação em maior percentual das lesões cutâneas	64
5.1.3	CFL favoreceu a contração das lesões cutâneas	65
5.1.4	CFL aumenta a frequência de lesões não visualizadas clinicamente ...	67
5.1.5	CFL antecipa o surgimento de tecido cicatricial	68
5.2	Análise histopatológica	69
5.3	Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais	79
6	DISCUSSÃO	74
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
8	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICE	110

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 A pele

A pele é um órgão que reveste e delimita o organismo, protegendo-o e interagindo com o meio exterior (Figura 1). Caracteristicamente dinâmica, esta apresenta alterações constantes, sendo dotada de grande capacidade renovadora e de reparação, e de certo grau de impermeabilidade. Tem como função maior e vital a conservação da homeostasia (termorregulação, controle hemodinâmico e produção de excreção de metabólitos) e ainda desempenha função sensorial, através dos elementos do sistema nervoso situado na derme, e função de defesa contra agressões físicas, químicas e biológicas, para qual se destacam, pela sua importância, a ceratinização (queratinização), o manto lipídico e o seu sistema imunológico.

Este órgão é composto por três camadas interdependentes: a epiderme, mais externa, a derme, intermediária, e a hipoderme, mais profunda. A transição entre a epiderme e a derme é denominada de junção dermoepidérmica ou zona de membrana basal (AZULAY; AZULAY, 2006).

A epiderme consiste em camadas organizadas de epitélio estratificado com uma transição bem definida de forma e estrutura celular, tanto que ao microscópio, podem ser observadas camadas distintas da epiderme. Da parte mais profunda para a superfície, são chamadas de camada basal ou camada germinativa, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea.

O sistema queratinocítico é responsável por, pelo menos, 80% das células epidérmicas, sendo este sistema caracterizado por sua constante renovação. O alto índice de multiplicação celular dos queratinócitos da camada basal fornece as células que gradativamente se diferenciam e formam a camada espinhosa. Após este processo, estas células passam por um rápido estágio de diferenciação (citoplasma mais basofílico e granuloso), representando a camada granulosa, que posteriormente transformam-se subitamente em células anucleadas, corneócitos, sendo finalmente eliminados para o meio ambiente na camada mais externa da epiderme, a camada córnea.

São necessários 14 dias em média, para que uma célula migre da camada basal para a córnea, e cada célula permanece cerca de 14 dias neste último.

A interface entre a epiderme e a derme é conhecida como zona da membrana basal ou junção dermoepidérmica, cuja função principal é a adesão dermoepidérmica. Além disso, funciona como suporte a epiderme, determinando a polaridade do seu crescimento, fornecendo sinais para seu desenvolvimento, dirigindo a organização do citoesqueleto das células basais e servindo como barreira semi-permeável (IRION, 2005; AZULAY; AZULAY, 2006).

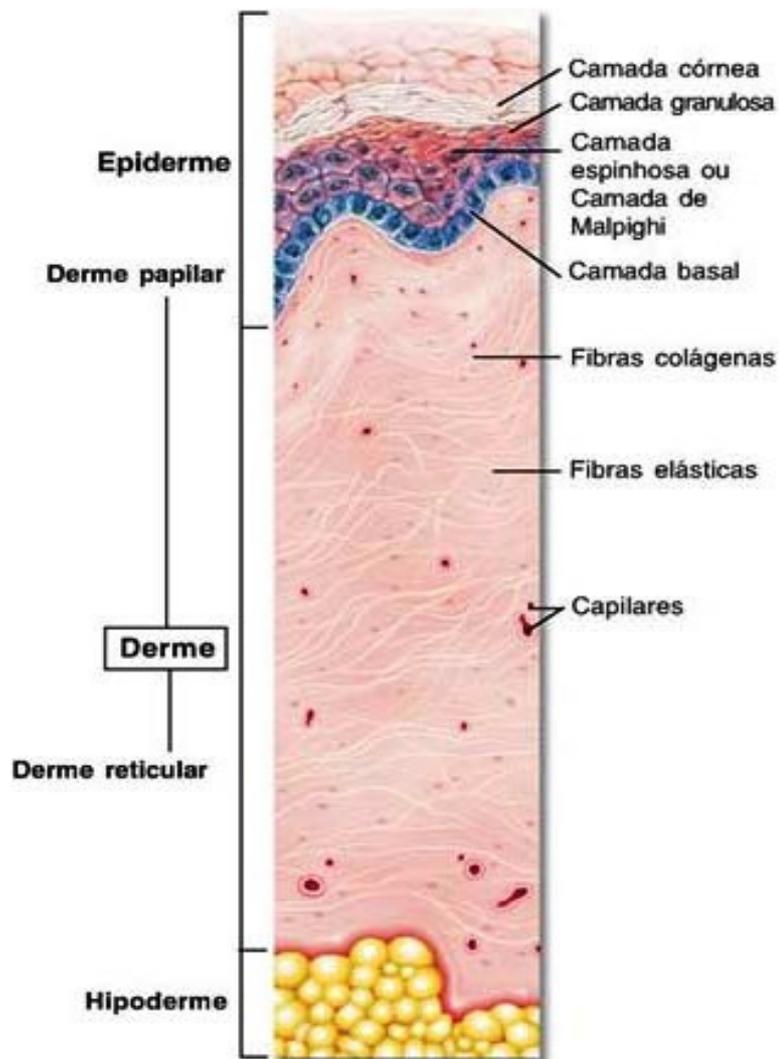


Figura 1 – Representação esquemática da pele humana.
Fonte: PEREIRA, 2008

A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo que se estende da epiderme até o tecido adiposo subcutâneo. Nesta camada situam-se os anexos da pele, muitos vasos sangüíneos, vasos linfáticos e nervos; além de diferentes tipos de células, incluindo fibroblastos e fibrócitos, macrófagos, mastócitos e leucócitos sangüíneos, particularmente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos.

Esta camada pode ser dividida em (1) camada papilar, mais externa, e (2) camada reticular, mais interna. A primeira é composta principalmente por colágeno tipo III e IV, tendo como principal característica a rede de vasos sanguíneos e linfáticos organizados em plexos. A segunda é muito mais espessa do que a primeira. Caracteriza-se por fibras mais densas, tendo o colágeno tipo I uma organização semelhante a uma malha com direção preferencial. Esta organização é importante para a identificação da direção preferencial da contração cutânea após uma lesão (ARNOLD *et al.*, 1994; IRION, 2005).

O colágeno é uma proteína que corresponde a aproximadamente 75% do peso seco da derme e que provê resistência e elasticidade ao tecido. Os diversos tipos de colágeno têm em comum o fato de serem compostos por três cadeias polipeptídicas (cadeias alfa), com uma seqüência fixa de glicina a cada 3^o posição, intercaladas por dois outros aminoácidos, que muito frequentemente, são a prolina e a hidroxiprolina. Essa composição faz com que as três cadeias se entrelacem de modo helicoidal, à semelhança de uma corda, aumentando a resistência da molécula à tração.

No ser humano existem pelo menos 19 tipos de colágeno, designados de I a XIX. Os tipos I, II, III, V e XI são os colágenos intersticiais ou fibrilares e mais abundantes. O colágeno tipo I corresponde por 80% do colágeno dérmico do adulto, enquanto que o tipo III, que predomina na vida embrionária, representa 10% do colágeno da vida adulta. O tipo IV é não fibrilar (forma lâminas em vez de fibrilas) e representa o principal componente da membrana basal (BYERS, 2001; AZULAY; AZULAY, 2006).

Ainda que a força tênsil seja fornecida pelas proteínas da família do colágeno, a habilidade dos tecidos em recuar (alongar-se e retornar ao tamanho original) é proporcionado pelas fibras elásticas.

Estas fibras representam apenas de 1 a 2% do peso seco da derme e formam uma rede que se estendem da junção dermoepidérmica ao tecido conjuntivo da hipoderme. Morfologicamente, consistem em um núcleo central feito de elastina,

cercado por uma rede periférica de microfibrilas. Embora sejam sintetizadas por diversos tipos de células, inclusive queratinócitos, na pele a principal fonte de fibras elásticas é o fibroblasto (MILEWICZ; URBAN; BOYD, 2000; AZULAY; AZULAY, 2006).

Entre as células e as fibras da derme encontra-se a substância fundamental ou matrix extracelular (MEC). Trata-se de um sol-gel viscoelástico de polímeros hidrofílicos com capacidade de reter uma enorme quantidade de líquido intersticial. Desta forma, a MEC tanto lubrifica como separa as fibras da derme, permitindo que elas se movimentem livremente umas em relação às outras. Além disso, a resistência do colágeno às forças de estiramento é favorecida pela ligação da MEC a esta proteína.

A MEC é representada principalmente por um grupo de moléculas denominadas glicosaminoglicanos. Trata-se de compostos formados por cadeias de polissacarídeos ligados a proteínas que são metabolizados e degradados pelos fibroblastos. Os mais comuns glicosaminoglicanos são o ácido hialurônico, sulfato de condroitina a 4%, o dermatan sulfato e o heparan sulfato. Os diferentes tecidos conjuntivos no corpo apresentam proporções diferentes destas moléculas específicas. Em relação à pele normal, o tecido cicatricial apresenta reduções dramáticas no ácido hialurônico, já o sulfato de condroitina alcança proporções semelhantes àquelas dos tendões e ossos (IRION, 2005).

1.2 Cicatrização

1.2.1 Aspectos gerais

A capacidade auto-regenerativa é um fenômeno universal nos organismos vivos. Nos organismos unicelulares, está restrita à presença de enzimas responsáveis pela recuperação de elementos estruturais (como os constituintes do citoesqueleto, membranas e paredes celulares) e de moléculas de alta complexidade (como proteínas de elevada complexidade estrutural, RNAs e o DNA). Em organismos superiores, além destes, também ocorre o reparo de tecidos que pode se dar de duas formas distintas: (1) pela regeneração ou (2) pela cicatrização. A primeira envolve a reconstituição dos componentes teciduais de forma idêntica

àqueles destruídos, como nos ferimentos superficiais cutâneos que somente danifica o epitélio. 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 (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Como desencadeante da cicatrização, ocorre perda tecidual, a partir da qual o fisiologismo volta-se completamente para o reparo, através de uma organizada e complexa cascata de eventos celulares e bioquímicos representados pelo movimento de células especializadas para o sítio da lesão e que resulta ao final na formação da ferida cicatrizada (DIEGELMANN; EVANS, 2004). A ferida em cicatrização é um tecido extremamente complexo e dinâmico que em determinados aspectos, poderia ser considerado como um órgão, mesmo que temporário (KUMAR; WONG; LEAPER, 2004).

O trauma tecidual é seguido por uma série de eventos que podem ser didaticamente divididos em três fases: inflamação, proliferação e remodelação da matriz extracelular, sendo estes eventos precedidos pela formação do coágulo (hemostasia) na lesão, como ilustrado na Figura 2 (BRANSKI *et al.*, 2005; SHIMIZU, 2005). Alguns autores dividem a cicatrização em quatro estágios, iniciando-se com a hemostasia, destacando a importância da resposta vascular (Li; CHEN; KIRSNER, 2007).

Esta divisão do processo cicatricial em fases, contudo tem apenas um caráter didático, visto que a cicatrização caracteriza-se por sua continuidade e interrelação. Cada uma dessas fases envolve substâncias biologicamente ativas, celulares e intercelulares específicas, como as citocinas e fatores de crescimento, que têm atividade sinalizadora, supressora e estimuladora no processo (WITTE; BARBUL, 1997; CLARCK, 1996). A falha ou prolongamento de uma dessas fases pode resultar em retardo da cicatrização ou mesmo o não fechamento da ferida (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

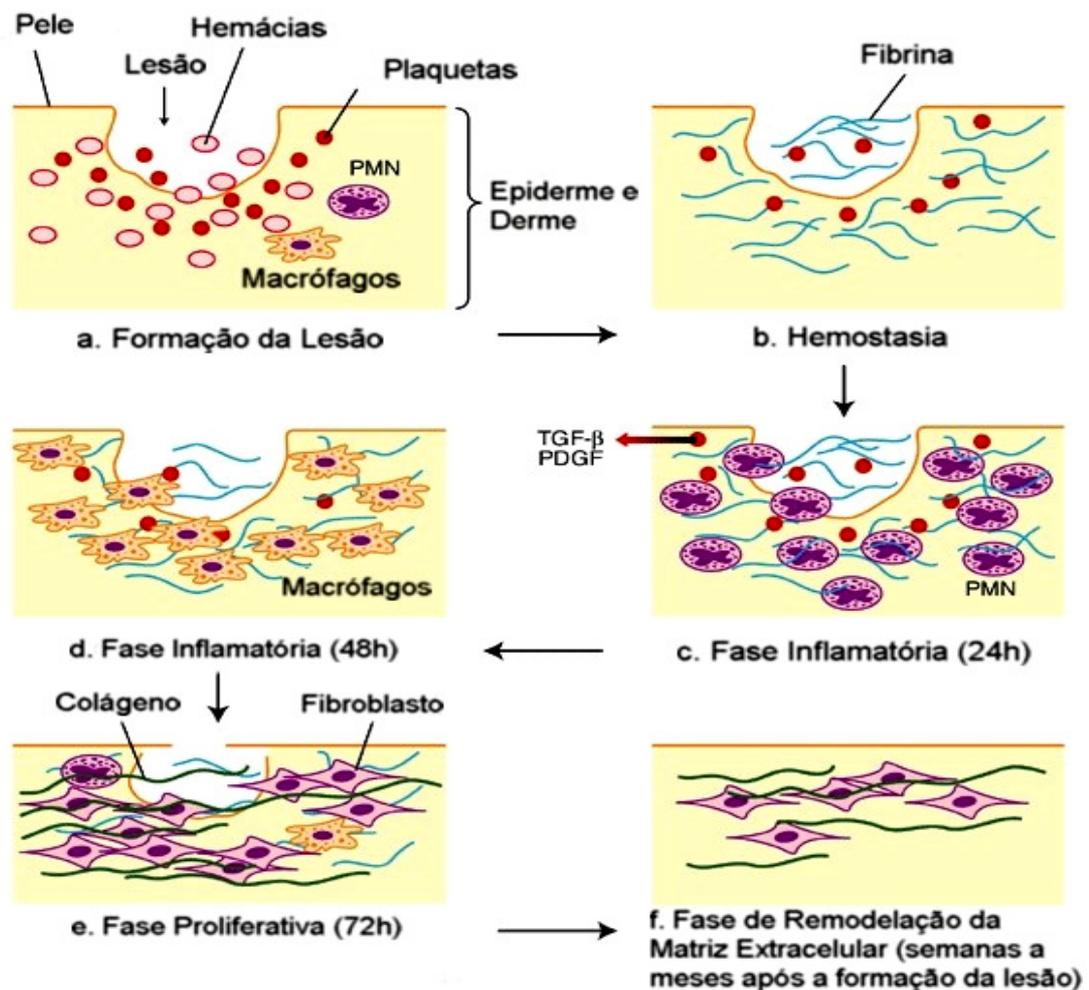


Figura 2 - Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas.

Fonte: *Experts Reviews in molecular medicine* ©, 2003. Cambridge University Press.

1.2.2 Hemostasia

Os eventos iniciais do processo de reparo estão, nos primeiros momentos, voltados para o tamponamento dos vasos. A injúria do endotélio (ruptura, fissura ou erosão) favorece a exposição do colágeno subendotelial, disparando uma seqüência de eventos que se inicia com a deposição de plaquetas, que resulta na formação de um trombo plaquetário, o qual provisoriamente tampona a lesão endotelial (LEFKOVITS; PLOW; TOPOL, 1995). Em paralelo, a via intrínseca da cascata da coagulação é ativada, convertendo o fibrinogênio em uma rede de fibras de fibrina insolúveis (SANTORO; GALDINO, 2005), fornecendo desta maneira uma matriz extracelular (MEC) que alicerçará a migração das células responsáveis pelo desencadeamento do processo de reparo (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

Destacam-se nesse momento as plaquetas, não apenas pelo seu importante papel na formação do tampão hemostático como também por influenciar na formação de um novo tecido através da liberação de citocinas e vários fatores de crescimento extremamente implicados no reparo de lesões, entre os quais incluem-se o Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), Fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e Fator transformador de crescimento alfa (TGF- α) (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Além disso, a própria cascata da coagulação, componentes do complemento e células lesadas geram uma série de fatores quimiotáticos que associados atraem leucócitos para o local da lesão. A ativação endotelial por quimiotáticos também estimula a liberação endotelial de moléculas de elastase e colagenase, que por sua vez facilitam a penetração celular através das membranas basais de vasos sanguíneos (AZULAY; AZULAY, 2006).

1.2.3 Fase inflamatória

Intimamente ligada à fase anterior, a resposta inflamatória consiste em dois componentes principais: uma reação vascular e uma reação celular (ROBBINS; COTRAN, 2005), podendo também ser compreendida pela fase inicial e tardia, dependendo do tempo, duração da resposta e do tipo de célula inflamatória envolvida (ENOCH; LEAPER, 2007).

A resposta vascular tem início pela vasoconstrição mediada por fatores neurogênicos e químicos durante um período de segundos a minutos e, em seguida, pela vasodilatação local que, por aumentar a permeabilidade vascular leva ao extravasamento de fluido rico em proteína (exsudato) para o tecido extravascular. A perda de proteína do plasma reduz a pressão osmótica intravascular e aumenta a pressão osmótica no fluido intersticial. Associado ao aumento da pressão hidrostática, que ocorre devido ao maior fluxo sanguíneo através dos vasos dilatados, esse fenômeno acarreta um extravasamento acentuado de fluido e seu conseqüente acúmulo no tecido intersticial. O aumento do fluido extravascular causa o edema (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Macroscopicamente este sinal flogístico é observado na forma de “inchaço” ou tumor. Outros sinais típicos da inflamação também são observados, tais

como hiperemia “ruborização” e aumento da temperatura na lesão, que são caracterizados pelo intenso metabolismo local (CALVIN, 1998). Além destes, a dor ocasionada pela sensibilização das terminações nervosas locais pelas citocinas típicas desse estágio de reparo (GRINNELL, 2003) também está presente na fase inflamatória.

Fase inflamatória inicial (24-48h): neutrófilos derivados da circulação são atraídos poucas horas após a injúria (Figura 3) e por diapedese atravessam a parede dos vasos sanguíneos próximos à lesão (MULLER, 2003). A identificação de moléculas com propriedades adesivas envolvidas neste processo mostrou que a migração de leucócitos no espaço intravascular depende de uma interação entre estas células e as células endoteliais, na qual ambas contribuem ativamente através da expressão em suas superfícies de proteínas adesivas, denominadas como moléculas de adesão. Dentre estas, as selectinas têm sido extensivamente estudadas.

Selectinas são lectinas que interagem com açúcares e/ou glicoproteínas, responsáveis pela adesão de leucócitos e necessárias para a migração destas células inflamatórias no endotélio vascular. Desta forma, favorecem o passo inicial na seqüência dos eventos que resultará na infiltração dos neutrófilos aos sítios de injúria. Estruturalmente, as selectinas apresentam um domínio lectínico (responsável pela sua propriedade adesiva) e uma série de domínios semelhantes às proteínas do complemento (CRONSTEIN; WEISSMAN, 1993; ROSSITER; KUPPER, 1997).

Embora as lectinas endógenas (selectinas) estejam envolvidas no processo de adesão, elas não são as únicas a participarem deste, pois outras moléculas como as imunoglobulinas e as integrinas também contribuem para o mesmo. No entanto, demonstrou-se que as selectinas estão principalmente envolvidas com a fase de rolamento dos leucócitos ao endotélio vascular (PANÉS; PERRY; GRANGER, 1999).

A infiltração leucocitária na lesão ocorre em resposta à vários fatores, tais como ativação da via clássica e alternativa da cascata do sistema complemento, além dos fatores quimiotáticos gerados durante a homeostasia pelas plaquetas, células do sistema imune ou ainda peptídeos de origem bacteriana (PARK; BARBUL, 2004; SZPADERSKA; DIPIETRO, 2005).

O papel principal nos neutrófilos é inicialmente a fagocitose e o debridamento da lesão. Sabe-se que uma disfunção na ação dos neutrófilos resulta

em processos infecciosos e complicações nas lesões. Além disso, outros estudos propõem um papel benéfico dos neutrófilos no processo da cicatrização, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias que ativam fibroblastos e queratinócitos (WERNER; GROSE, 2003), além do fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos - GM-CSF (CANTURK; ESEN; VURAL, 2001).

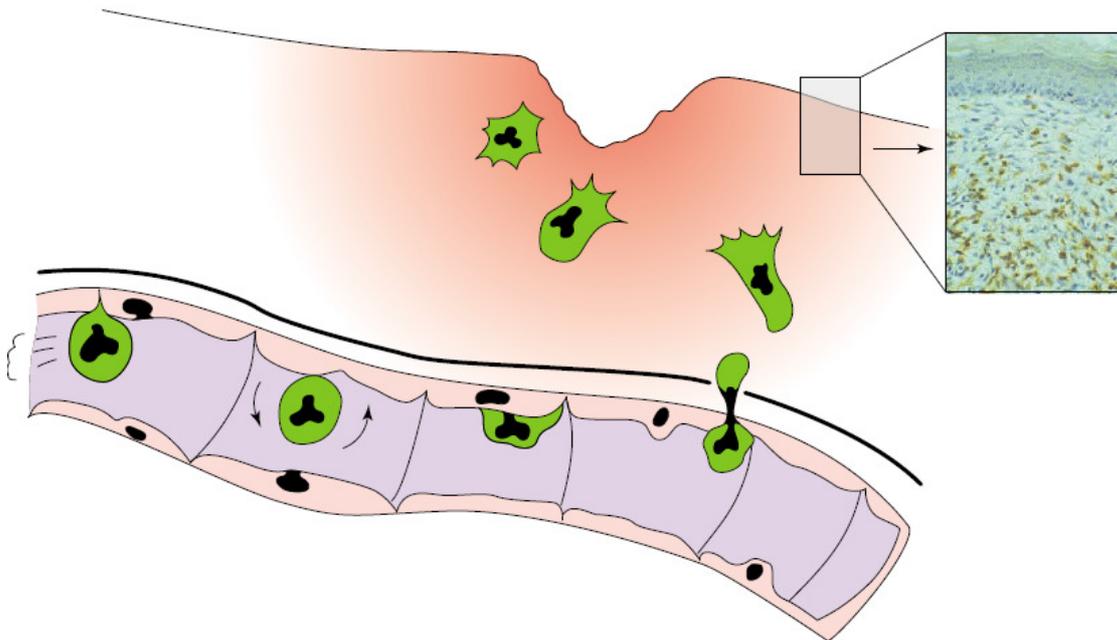


Figura 3 - Esquema que ilustra o recrutamento de células inflamatórias à lesão.
Fonte: MARTIN; LEIBOVICH, 2005.

Fase inflamatória tardia (48-96h): Inicialmente, os monócitos teciduais são atraídos à lesão, através da quimiotaxia por fragmentos de colágeno oriundos da degradação da matrix extracelular e fragmentos de fibronectina e trombina (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Em seguida, estas células se diferenciam em macrófagos, que participam concluindo o processo inflamatório, removendo por fagocitose neutrófilos remanescentes que perderam sua função (NEWMAN; HENSON; HENSON, 1992) e detritos celulares, sendo este processo facilitado pela produção de enzimas como a colagenase e elastase (PARK; BARBUL, 2004; SZPADERSKA; DIPIETRO, 2005). A ligação dos macrófagos à membrana celular bacteriana com conseqüente geração de radicais de oxigênio, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio favorece sua ação antimicrobiana (LI *et al.*, 2007; PARK; BARBUL, 2004).

Os macrófagos tornam-se a população celular predominante na área da injúria antes da migração de fibroblastos e da replicação. Alterações físico-químicas do microambiente favorecem a ativação dos macrófagos. Nas regiões distais onde os vasos se romperam, o aporte de oxigênio fica comprometido em função da formação do trombo. O influxo de macrófagos para esta região aumenta a demanda por oxigênio com conseqüente elevação das concentrações de ácido láctico e queda do pH. Esta combinação: hipóxia, baixo pH e alta concentração de ácido láctico, ativa macrófagos para a produção de fatores de crescimento (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A maior contribuição dos macrófagos na cicatrização de feridas é devido à secreção de citocinas e fatores de crescimento, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF), entre outros fatores que agem de forma parácrina na ativação e recrutamento de outras células envolvidas na cicatrização, como outros macrófagos e linfócitos. Em adição, estas citocinas favorecem a quimiotaxia para fibroblastos, promovendo a proliferação e síntese de colágeno, bem como para outras células envolvidas no reparo, tais como as células endoteliais.

Através destas funções, os macrófagos influenciam a angiogênese, fibroplasia e a síntese da matriz extracelular (PARK; BARBUL, 2004; ROBBINS; COTRAN, 2005). A presença dos macrófagos na ferida é um marcador que a fase inflamatória está em seu final e está se iniciando a fase proliferativa (DEODHAR *et al.*, 1997; WITTE *et al.*, 1997; SINGER; CLARK, 1997; DIEGELMANN; EVANS, 2004).

Os linfócitos T migram para a lesão após os macrófagos, de forma significativa entre o 8° e 14° dia após a injúria, podendo persistir por quatro meses (MARTIN; MUIR, 1990). A ativação ocorre em resposta a antígenos apresentado pelos macrófagos, o que resulta na proliferação de células T específica à estes antígenos (CHANG *et al.*, 2000).

Segundo Peterson *et al.* (1987), a depleção total de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) por anticorpos monoclonais em camundongos resultou em um decréscimo da força tênsil e no conteúdo de colágeno na ferida. Outros estudos demonstraram que a depleção somente de linfócitos T CD4⁺ por anticorpos monoclonais em ratos adultos submetidos à timectomia resultou no decréscimo da força tênsil de lesões,

enquanto que a depleção de linfócitos T CD8⁺ resultou no aumento da força tênsil, sugerindo que linfócitos T CD4⁺ possam ter um papel benéfico no controle cicatrização de feridas (DAVIS *et al.*, 2001).

Provavelmente os linfócitos, não somente confere uma proteção contra infecções, enquanto o processo cicatricial ocorre, mas também estimulam o desenvolvimento e regulam o processo para os próximos estágios da cicatrização (CHANG *et al.*, 2000).

Tem sido demonstrado que no processo de cicatrização o óxido nítrico (NO) não é apenas um agente antimicrobiano (EFRON; MOST; BARBUL, 2000), já que em modelos murinos, a inibição da oxido nítrico sintase induzida (iNOS) prejudica significativamente o processo de reepitelização (STALLMEYER *et al.*, 1999). Segundo Yamasaki *et al.* (1998) a inibição desta enzima resulta no prolongamento do tempo de oclusão de feridas abertas. Em outros estudos, esta inibição resultou na diminuição da deposição de colágeno em lesões (SCHAFFER *et al.*, 1999; EFRON *et al.*; 2001). Em experimentos *in vivo*, fibroblastos de camundongos *knock out* para iNOS demonstraram diminuídas proliferação, síntese de colágeno e contração (SHI *et al.*, 2001).

1.2.4 Fase proliferativa

A fase proliferativa é responsável pela restauração da pele após a lesão, sendo didaticamente dividida em três subfases: reepitelização, angiogênese e fibroplasia (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

A reepitelização que se inicia poucas horas após a agressão, pelo mecanismo de “efeitos de vizinhança livre”, geralmente envolve diversos processos, incluindo: migração de queratinócitos, seguida pela proliferação destas células e restauração da zona da membrana basal. Em tecidos normais, este processo se encontra inibido pelo contato existente entre as células pela “inibição por contato”. Com a ocorrência de uma lesão, este mecanismo inibitório desaparece e as células entram imediatamente em processo mitótico (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A migração de queratinócitos em resposta à perda da integridade epidérmica representa o evento inicial na reepitelização. Aproximadamente 12 horas

após a injúria, uma série de eventos, incluindo, “achatamento” e “alongamento” dos queratinócitos, dissolução da maioria dos tonofilamentos intercelulares e perda do contato célula-célula e célula-matrix, ocorrem (SUN; COTSARELIS; LAVKER, 1991). Estes fatores associados à ligação dos queratinócitos aos receptores de integrinas presente em colágenos recém-formados no leito das lesões, favorecem também a etapa de migração dos queratinócitos (PARKS, 1999).

A proliferação dos queratinócitos assegura um abastecimento adequado de células para migrar e cobrir a lesão. Importantes estímulos, tais como: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e fator de crescimento transformador alfa (TGF- α), favorecem a migração e proliferação dos queratinócitos. Quando a migração cessa, possivelmente como resultado do contato por inibição, os queratinócitos reanexam-se à membrana basal e as células que migraram à superfície diferenciam-se em epitélio estratificado (LAPLANTE *et al.*, 2001).

A formação da membrana basal, que ocorre entre 7 à 9 dias após a reepitelização é essencial para o estabelecimento da integridade e função da pele, uma vez que favorece adesão aos queratinócitos através da formação de âncoras composta por filamentos de hemidesmossomas (UITTO; PULKKINEN; MCLEAN, 1997).

A ineficiência e dificuldade de constatação do processo mitótico destas células nas etapas iniciais são devidas à, ainda, inexistência de um substrato adequado para na região da ferida, que somente é fornecido quando o tecido de granulação alcança o nível da epiderme (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Em resposta à injúria, células endoteliais iniciam o processo da angiogênese (MARX *et al.*, 1994), que consiste na formação de novos vasos. Esta etapa favorece o surgimento do tecido de granulação, cuja principal função é o fornecimento de nutrientes e oxigenação ao tecido em crescimento. Este tecido é composto de células inflamatórias, fibroblastos e uma matriz glicoproteica apresentando vasos em formação, colágeno e glicosaminoglicanas (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Recebeu essa denominação pela aparência granular observada ao ser incisado, devido à presença de numerosos capilares neoformados (AZULAY; AZULAY, 2006), os quais são extremamente exsudativos, sangram com facilidade e apresentam uma coloração vermelha escura (Figura 4 A e B).

A hipóxia tecidual favorece a liberação de fatores de crescimento (VEGF, FGF e TGF- β) que contribuem nesta etapa, tendo como fonte vários tipos celulares, entre eles: macrófagos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais danificadas. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além do papel central no crescimento de novos vasos sanguíneos, aumenta a permeabilidade vascular, como também é um potente mitogênico às células endoteliais (SENGER *et al.*, 1997; ROBBINS; COTRAN, 2005; TSIROGIANNI; MOUTSOPOULOS; MOUTSOPOULOS, 2006). Este fator é expresso em baixos níveis na pele normal, enquanto que na cicatrização sua expressão é altamente regulada (DETMAR; BROWN; BERSE, 1997).

Ao final desta etapa, quando o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, a angiogênese cessa e muitos dos vasos degeneram-se por apoptose (IBA; SHIBATA; KATO, 2004). Neste mesmo momento, a rede linfática está passando por regeneração, onde lentamente o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas o que começa a dar à região lesada a aparência de cicatriz empalidecida devido ao acúmulo aumentado de colágeno dentro da cicatriz, acompanhado da regressão dos canais vasculares (GUIDUGLI-NETO, 1992; ROBBINS; COTRAN, 2005).

A fibroplasia representa um processo de proliferação de fibroblastos, produção de um novo colágeno e outras proteínas da matrix, que também contribuem na formação do tecido de granulação (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

A migração de fibroblastos ao local da lesão e sua subsequente proliferação são deflagrados por fatores de crescimento múltiplos, incluindo: TGF- β e PDGF, que além de estimular a migração de fibroblastos, regulam a expressão de integrinas. EGF e FGF modulam esta migração e conferem uma ação mitogênica aos fibroblastos, além das citocinas IL-1 e TNF, que também contribuem neste processo. As fontes desses fatores de crescimento e citocinas incluem plaquetas, células inflamatórias (principalmente macrófagos) e o endotélio ativado (GAILIT *et al.*, 1996; ROBBINS; COTRAN, 2005).

O fibroblasto representa a estrutura celular predominante na fase proliferativa, constituindo a célula crítica na formação do tecido de granulação. Esta célula produz e deposita grandes quantidades de elementos da MEC, como as fibras colágenas tipo I e II, que contribui para o fechamento da lesão (CARVALHO, 2002), fibronectina que atua como substrato à deposição da MEC, ácido hialurônico que

auxilia na resistência do tecido à compressão (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005), fibras elásticas e proteases que são importantes na remodelação da ferida (DEODHAR *et al.*, 1997; WITTE; BARBUL, 1997; PRATHIBA *et al.*, 2000).

Gradualmente, os fibroblastos mudam seu fenótipo migratório para um fenótipo profibrótico, os miofibroblastos, que apresentam características intermediárias entre fibroblastos e uma célula muscular lisa (KURAKONDA *et al.*, 2000). Os miofibroblastos contêm elevadas concentrações de actinmiosina e são fundamentais no processo de neoformação dermal e contração das margens da lesão, alinhando-se a elas e unindo-as, sendo este processo possível pela capacidade de extensão e retração das fibras colágenas (MUDERA *et al.*, 2002; MOULIN *et al.*, 2000; GOMATHI *et al.*, 2003).

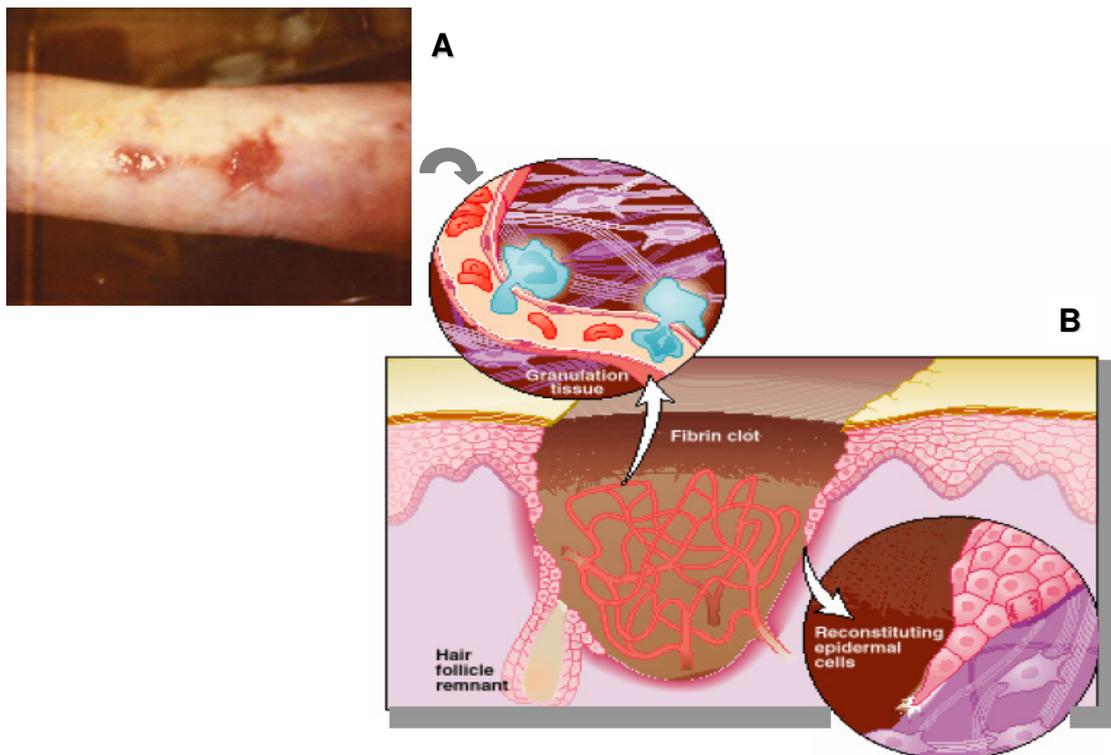


Figura 4 - Representação da fase de fibroplasia. A) representa o aspecto macroscópico do tecido de granulação em uma úlcera de perna (ASHTON, 2004). B) representa o processo de fibroplasia (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000)

1.2.5 Fase de remodelação

O processo de remodelamento da cicatriz tem a deposição de colágeno na ferida como principal característica. A substituição do tecido de granulação por uma cicatriz envolve transições na composição da MEC: de início constituído principalmente por fibrina e fibronectina e por último, os colágenos fibrilares tornam-se proteínas predominantes na matriz que são importantes para o desenvolvimento da resistência na cicatrização de feridas (WITT; BARBUL, 1997; KURAKONDA *et al.*, 2000).

Durante os estágios iniciais da cicatrização, entre 48 à 72 horas após a injúria, predomina o colágeno tipo III, sintetizado e secretado pelos fibroblastos no tecido de granulação, tendo sua síntese aumentada entre o 5° e 7° dia e alcançando um máximo entre 2 e 3 semanas após a lesão.

A síntese colagenosa pelos fibroblastos é intensificada por vários fatores, incluindo os fatores de crescimento (PDGF, FGF, TGF- β) e as citocinas (IL-1, IL-13). Durante o período de 1 ano ou mais, a derme gradualmente retorna ao fenótipo de pré-injúria, que consiste em grande parte de colágeno tipo I, enquanto que o tipo III se submete à degradação. O processo desta conversão na derme, compreendida pela síntese de colágeno novo e lise do colágeno velho é realizado principalmente pela ação de metaloproteinases da matriz (MMPs), proteases que geralmente não são detectadas no tecido normal, mas são induzidas preferencialmente durante os estágios de reparo, em resposta à citocinas e fatores de crescimento (BOOTH; POLAK; UITTO, 1980; VISSE; NAGASE, 2003; ROBBINS; COTRAN, 2005; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas da família zinco-endopeptidases que regulam eventos fisiológicos, não apenas o remodelamento da MEC como também influenciam outras funções celulares, como a proliferação e apoptose. Esta família de enzimas incluem collagenases intersticiais (MMP-1, 2 e 3), que clivam o colágeno fibrilar dos tipos I, II e III; gelatinases (MMP-2 e 9), que degradam o colágeno amorfo, bem como a fibronectina; estromelinas (MMP-3, 10 e 11), que atuam numa variedade de componentes da MEC, incluindo proteoglicanas, laminina, fibronectina e colágenos amorfos. As MMPs são produzidas por vários tipos de células (fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, células sinoviais e algumas células epiteliais). Suas secreções são induzidas por certos

estímulos, incluindo fatores de crescimento (PDGF e FGF), citocinas (IL-1, TNF), estresse físico, e são inibidas por TGF- β e esteróides.

Alguns dos fatores de crescimento que estimulam a síntese de colágeno e outras moléculas de tecido conjuntivo também modulam a síntese e ativação de MMPs, tais como os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) e fatores de crescimento. Por exemplo, o fator quimiotático PDGF estimula a liberação dessas enzimas pelo fibroblasto, enquanto que o TGF induz a secreção de inibidores de proteinases, demonstrando o controle minucioso da degradação da matriz durante a migração de fibroblastos. O equilíbrio entre a síntese e a degradação da MEC resulta na remodelação da estrutura do tecido conjuntivo, sugerindo que o acúmulo de colágeno final, entretanto, depende não somente da síntese colagenosa aumentada, mas também da degradação diminuída (AZULAY; AZULAY, 2006; ROBBINS; COTRAN, 2005).

Ao final desta etapa, a cicatriz passa a apresentar a forma de uma massa fibrótica acrescida de fibras colágenas. Em resultado ao processo de remodelação, a lesão torna-se mais resistente, após o colágeno ter sofrido maturação. Observa-se apoptose dos fibroblastos e das células endoteliais. Os anexos da pele, como os folículos pilosos e glândulas sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente e as cicatrizes são hipo-vascularizadas devido ao desaparecimento dos neocapilares (JOHNSTON, 1990; DIPIETRO; BURNS, 2003).

Vários fatores tanto locais como sistêmicos podem determinar alteração no desenvolvimento do processo normal de cicatrização, levando a retardo ou mesmo prolongamento do processo cicatricial. Os fatores locais mais importantes que determinam alterações no processo cicatricial são: a infecção, a técnica cirúrgica, os hematomas na ferida, presença de corpos estranhos, a isquemia tecidual e os curativos. Têm sido relatados fatores sistêmicos que alteram a cicatrização como: a desnutrição, a obesidade, a diabetes, a sépsis, a deficiência de oligoelementos, a deficiência de vitaminas entre outros (BARBUL *et al.*, 1994; MÄKELÄ *et al.*, 1995; DEODHAR *et al.*, 1997; SCHAFFER; BARBUL, 1998; MANDAI *et al.*, 2001).

1.3 Lectinas

1.3.1 Definição e classificação

As lectinas são moléculas biologicamente ativas que estão entre as mais estudadas em todo o mundo. A abundância em sementes, principalmente de leguminosas, a relativa facilidade de purificação de muitas dessas proteínas e a sua solubilidade em soluções fisiológicas, facilitam a aplicabilidade das lectinas nas diversas áreas do conhecimento científico (ALENCAR *et al.*, 2003).

O estudo sobre lectinas deu-se há mais de cem anos, quando em 1988, Stillmark observou que o extrato de sementes de *Ricinus communis* era capaz de aglutinar eritrócitos humanos (citado em BEUTH *et al.*, 1995). Desde esse período, inúmeras pesquisas foram desenvolvidas no que se refere à ocorrência, distribuição, isolamento, caracterização biológica e várias propriedades funcionais destas proteínas (SHARON; LIS, 2004).

A etimologia da palavra lectina é proveniente do latim, “*legere*” que significa selecionar (BOYD *et al.*, 1954); este termo deriva da propriedade destas proteínas aglutinarem seletivamente eritrócitos humanos de um grupo específico (MOREIRA *et al.*, 1991). Na tentativa de melhor conceitua-las, muitas definições lhes foram atribuídas ao longo dos anos. Porém, a definição mais aceita atualmente pela comunidade científica foi proposta por Peumans e Van Damme (1995) na qual lectinas são (glico) proteínas de origem não imune que possuem no mínimo um domínio não-catalítico e que se ligam reversivelmente e especificamente a um mono ou a um oligossacarídeo.

As lectinas são proteínas heterogêneas, apresentando grande variabilidade tanto do ponto de vista estrutural: tamanho e organização molecular (LIS; SHARON, 1998), como na sua especificidade em interagir com diferentes ligantes: acetilamino - carboidratos, amino - carboidratos, ácido siálico, hexoses, pentoses, e muitos outros carboidratos, além de terem a capacidade de precipitar polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos dotados de resíduos de açúcares específicos (SINGH; TIWARY; KENNEDY, 1999).

Uma classificação mais aprimorada dessas biomoléculas foi proposta por Peumans e Van Damme (1998) nas quais os autores subdividiram as lectinas, com

base em suas estruturas globais em três classes distintas: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas:

As Merolectinas são proteínas de baixo peso molecular que possuem apenas um único sítio de ligação a carboidratos, ou seja, apresentam um único domínio lectínico e, devido a sua natureza monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados e aglutinar células. Como exemplo típico, cita-se a heveína, uma proteína ligante à quitina derivada do látex da seringueira (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

As Hololectinas são lectinas que possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, os quais podem ser idênticos ou muito homólogos. A maioria das lectinas vegetais pertence a esse grupo, que pela sua capacidade de aglutinar células e glicoconjugados, são chamadas de “hemaglutininas”.

As Quimerolectinas, compreende as proteínas que possuem um ou mais domínios ligantes à carboidratos e um outro domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica, agindo independente dos primeiros. Dependendo do número de domínios lectínicos, podem ainda comportar-se como hololectinas ou merolectinas. Como exemplo de hololectinas podemos citar as proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIPs – 2 – abrina e ricina), que além de possuírem atividade de N-glicosidase, possuem também dois sítios de ligação a carboidratos. As quitinases de plantas podem ser referidas como exemplo de quimerolectinas que se comportam como merolectinas. Isto acontece porque as quitinases possuem, além do domínio catalítico, um único domínio de ligação a carboidratos, sendo, portanto, incapazes de aglutinar e/ou precipitar.

Peumans e Van Damme (1998) definiram ainda as superlectinas, como um tipo especial de quimerolectinas, em que apresentam dois ou mais sítios de ligação a carboidrato, com especificidades diferentes, ou seja, possuem dois domínios carboidratos ligantes estruturalmente e funcionalmente distintos com capacidade de ligação a açúcares de estruturas diversas. Como exemplo deste grupo temos as lectinas de tulipa.

As lectinas são instrumentos poderosos para a decodificação dos glicocódigos utilizados na troca de informações entre as células (CALVETE *et al.*, 2003). Desde modo, na medida em que as lectinas identificam estas moléculas nas superfícies celulares, elas, desencadeiam uma série de fenômenos biológicos *in vitro* ou *in vivo*.

Algumas lectinas apresentam atividade antitumoral, possivelmente devido a sua ação imunomodulatória (WANG *et al.*, 1996; HAAS *et al.*, 1999; KARASAKI *et al.*, 2001; TIMOSHENKO *et al.*, 2001), tendo também aplicação na pesquisa do câncer por sua habilidade em detectar alterações nas células malignas, redução do potencial tumoral nas células cancerosas, e de estimar o prognóstico do status imunológico do paciente (SINGH; KAMBOJ, 2004).

As lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Dioclea violacea* (Dviol) tem sido utilizada em diversas pesquisas, como na indução da produção de histamina em ratos (GOMES *et al.*, 1994), indução na produção de óxido nítrico (ANDRADE *et al.*, 1999), efeito protetor *in vivo* contra infecção pela *Leishmania amazonensis* em camundongos BALB/c (BARRAL-NETTO *et al.*, 1996), estimulação linfocitária em humanos (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992), aumento na produção de macrófago e linfócito em administrações intraperitoneais em camundongos C3H/HeJ (RODRIGUEZ *et al.*, 1992).

Sprong *et al.* (2004) demonstraram a capacidade de lectinas extraídas do plasma humano, específicas à manose em interagir com componentes bacterianos e com isso estimular a produção de IL-1 e IL-10 por células mononucleares.

Na endocrinologia, foi relatada a fosforilação do receptor para insulina, induzida por lectinas vegetais glicose/manose específicas *in vitro* (CAVADA *et al.*, 2003). Já na neurologia, estudos demonstram a capacidade da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) em interagir com os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico, conferindo uma ação antidepressiva (BARAÚNA *et al.*, 2006).

Algumas lectinas das leguminosas são capazes de induzir migração de leucócitos e formação de edema de pata em ratos (BENTO *et al.*, 1993; ALENCAR *et al.*, 2003, 2004, 2007; ALENCAR *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c; COELHO *et al.*, 2006; FREIRE *et al.*, 2003), o que vislumbra a melhora do tratamento de infecções, principalmente em pacientes imunossuprimidos.

Assreuy *et al.* (2002, 2003) demonstraram que uma lectina animal, originada do sêmen de porco, denominada como esparmadesina, induz migração de neutrófilos através da liberação de uma substância quimiotática liberada por macrófagos, provavelmente TNF- α e que o mastócito modula de forma negativa esta atividade.

Entretanto, foi demonstrado que lectinas de leguminosas quando administradas endovenosamente, apresentam potente ação antiinflamatória,

exercendo ações importantes na interação leucócito-endotélio, e provavelmente bloqueio do sítio de ligação para as selectinas endógenas (ASSREUY *et al.*, 1997, ALENCAR *et al.*, 2005). Além da inibição de eventos inflamatórios agudos, demonstrou-se ainda que estas lectinas previnem a lesão urotelial no modelo de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em camundongos (ASSREUY *et al.*, 1999).

Em trabalho recente, foi esclarecido que o excelente potencial antiinflamatório da lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL), anteriormente demonstrado por Alencar *et al.* (1999, 2005) é em parte, devido a habilidade desta lectina em inibir o rolamento e adesão dos leucócitos no endotélio vascular (NAPIMOGA *et al.*, 2007).

1.3.2 Lectinas vegetais: família Leguminosae, subtribo Diocleinae

Apesar da ampla distribuição das lectinas na natureza, é nos vegetais que a ocorrência destas proteínas tem sido documentada com mais frequência, em diferentes órgãos e tecidos vegetais. Este fato é justificado tanto pela importância econômica de suas espécies como pela facilidade do isolamento (SINGH; TIWARY; KENNEDY, 1999). Entretanto, o papel fisiológico das lectinas de plantas não está claramente definido, mas os estudos sugerem para estas proteínas um papel de defesa na planta contra ataques de predadores como vírus, fungos e insetos (CAVADA *et al.*, 1998; RATANAPO; NGAMJUNYAPORN; CHALAVATNATOL, 2001; SACCHETTINI; BREWER, 2001), além de outras hipóteses, tais como, reconhecimento celular, simbiose, estoque de proteínas (VAN DAMME *et al.*, 1997), como também proliferação e crescimento celular da planta (WITITSUWANNAKUL; WITITSUWANNAKUL; SAKULBORIRUG, 1998).

Deve-se ressaltar que a maioria dos trabalhos pioneiros nas áreas de bioquímica, fisiologia e biologia molecular de lectinas vegetais foram realizados com lectinas de leguminosas, em que a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) foi a primeira a ser purificada, cristalizada (SUMMER; HOWELL, 1936), definida a estrutura primária e tridimensional, sendo essa lectina a mais investigada até a atualidade. Em leguminosas, lectinas são encontradas em diferentes tecidos

vegetativos, porém a maioria é obtida de sementes, constituindo cerca de 10% das proteínas totais, onde são acumuladas no período de maturação, desaparecendo após a germinação (LORIS, 2002; SHARON; LIS, 2004).

Várias lectinas de leguminosas tiveram suas seqüências aminoacídicas determinadas, sendo constatado um alto grau de similaridade entre elas. São formadas por duas ou quatro subunidades, com massa molecular variando entre 25 kDa e 30 kDa e cada uma das subunidades possui um sítio de ligação para carboidratos, sendo que o processo é dependente da presença simultânea de Ca^{2+} e Mn^{2+} (ou outro metal de transição), que são íons essenciais para as suas atividades biológicas (SHARON; LIS, 1990; VAN DAMME *et al.*, 1998).

Apesar de suas seqüências aminoacídicas serem bastante similares, as lectinas dessa família diferem com relação a suas especificidades finas de interação a carboidratos (CAVADA *et al.*, 1993), possuindo o mais largo espectro de especificidade a monossacarídeos, podendo interagir com açúcares simples ou com estruturas glicanas complexas presentes nas glicoproteínas (DRICKAMER, 1995; WEIS; DRICKAMER, 1996). O alto grau de homologia entre as seqüências de aminoácidos de lectinas de leguminosas permite que as mesmas sejam úteis como marcadores moleculares para a classificação botânica de espécies vegetais similares, em estudos de quimiotaxonomia. Alguns desses trabalhos envolvendo lectinas abordam similaridades bioquímicas, enquanto outros abordam aspectos estruturais (AINOUZ *et al.*, 1995; MOREIRA *et al.*, 1995; BARRE; LAUCA; ROUGÉ, 1994).

A subtribo Diocleinae pertence à família Leguminosae e compreende 13 gêneros: *Calopogonium*, *Camptosema*, *Canavalia*, *Cratylia*, *Cleobulia*, *Collaea*, *Cymbosema*, *Dioclea*, *Galactia*, *Herpyza*, *Luzonia*, *Macropsychanthus* e *Pachyhisus* (POLHILL; RAVEN; STIRTON, 1981). Entretanto, apenas alguns gêneros se destacam com relação à lectinas já detectadas e isoladas (*Canavalia*, *Cratylia*, *Calopogonium*, *Dioclea*, *Galactia*, *Herpyza*).

A reatividade de várias lectinas da subtribo Diocleinae já foi detalhadamente investigada por Ramos *et al.* (1999), através da inibição da atividade hemaglutinante por uma ampla variedade de carboidratos simples e complexos e por glicoproteínas. Estes comprovaram que, embora possuam afinidade pelos monossacarídeos D-glucose e D-manose, essas lectinas interagem com uma variedade de carboidratos simples, reconhecendo também estruturas

glicanas complexas como aquelas presentes em glicoproteínas. Entretanto, apesar de exibirem a mesma afinidade pelos ligantes, e de serem estruturalmente muito semelhantes, as lectinas dessa subtribo apresentam diferenças significativas quanto à especificidade fina com relação a um mesmo ligante glicídico refletindo numa grande variabilidade de propriedades biológicas (CALVETE *et al.*, 2000; SANZ-APARICIO *et al.*, 1997; RAMOS *et al.*, 1999)

1.3.3 Lectina de *Cratylia floribunda*

A planta do gênero *Cratylia*, conhecida vulgarmente por camaratuba ou copada, pertence à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae e subtribo Diocleinae é um gênero neotropical, aparentemente de origem recente, com ampla distribuição na América do Sul, ocorrendo, no sentido norte-sul, do estado do Pará ao sul dos estados de Mato Grosso e Goiás e, no sentido leste oeste, do Peru ao estado de Ceará. Desse gênero são conhecidas cinco espécies diferentes, a *C. bahiensis*, *C. hypargyrea*, *C. intermedia*, *C. mollis* e *C. floribunda* (QUEIROZ; CORADIN, 1995).

A espécie *Cratylia floribunda* Benth (sinônimos *Cratylia argêntea* Desv., *Cratylia nitens* Benth., *Dioclea argêntea* Desv. e *Dioclea floribunda*) é um arbusto nativo da Amazônia, sendo encontrada exclusivamente na América do Sul (Figura 5). Em comparação com outras espécies de *Cratylia*, *C. floribunda* é encontrada nos principais tipos de vegetação, ocorrendo da transição cerrados-caatinga a cerrados e florestas sazonais com solos bem drenados e arenosos (QUEIROZ; CORADIN, 1995; PIZARRO; CARVALHO; RAMOS, 1995).

Apresenta-se na forma de uma trepadeira arbustiva, profusamente ramificada, com elevada resistência a períodos de seca e podendo alcançar até três metros de altura. Suas folhas são trifoliadas e a inflorescência nodulosa contém de seis a nove flores por nódulo. As flores são lilás e as vagens (20cm de comprimento x 1-3 cm de largura) contém de quatro a oito sementes (QUEIROZ; CORADIN, 1995). É uma espécie forrageira de alto teor protéico (21 a 28%), com digestibilidade

relativamente alta (53 a 65%) e ausência de taninos condensados (PIZARRO; CARVALHO; RAMOS, 1995).



Figura 5 - Planta e sementes de *Cratylia floribunda*.

Fonte: CRATYLIA..., 2008.

A *Cratylia floribunda* possui uma lectina em suas sementes, que quando isolada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida é caracterizada por três grupos de bandas protéicas com massa molecular em torno de 29 a 30 kDa para a cadeia α , 16 a 18 kDa para o fragmento β e entre 12 e 13 kDa para o fragmento γ . O fragmento β é visualizado como duas bandas protéicas que migram muito próximas uma da outra, sendo denominadas de banda β_1 (banda de mobilidade mais lenta) e β_2 (banda de maior mobilidade) (CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985; GRANGEIRO *et al.*, 1997).

Estudos de caracterização da lectina *Cratylia floribunda* (CFL) demonstraram que a mesma apresenta-se como uma hololectina não glicoprotéica, específica por resíduos de glicose e manose (OLIVEIRA; CAVADA; MOREIRA, 1991).

A CFL tem sido alvo para isolamento, estudo molecular e estrutural (CALVETE *et al.*, 1999; RAMOS *et al.*, 2002; GALLEGO *et al.*, 2007); entretanto pouco explorada no que se refere às suas propriedades biológicas. Em uma retrospectiva, podemos citar:

Assreuy *et al.*, (1997) demonstraram a capacidade da CFL em reduzir reações inflamatórias mediada por neutrófilos em modelos clássicos de inflamação. Neste estudo, a CFL quando administrada endovenosamente inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos induzida tanto por estímulos quimiotáticos diretos quanto por indiretos.

Assim como outras lectinas da subtribo Diocleinae, CFL conferiu atividade imunológica *in vitro* ao estimular a proliferação de linfócitos e conferir a ativação de células mononucleares, deflagrando a liberação de citocinas e secreção de histamina (CAVADA *et al.*, 2001).

Teixeira *et al.* (2005) demonstraram *in vitro* a capacidade da CFL em impedir a adesão de espécies cariogênicas e não-cariogênicas do gênero *Streptococcus* em hidroxiapatita embebida em saliva; sugerindo uma possível aplicação em procedimentos que previnam e controlem doenças associadas à colonização microbiana das superfícies dentárias.

1.4 Relevância e justificativa

A ferida é algo que leva a dor e ao desconforto, físico e emocional, de modo a fragilizar e incapacitar o indivíduo, deixando marcada uma cicatriz. Em vista disso, o tratamento de feridas vem sendo tema destacado em diversos setores profissionais da área de saúde no mundo todo.

O que vivenciamos nos dias de hoje, são profissionais, instituições, e indústrias, se empenhando e buscando a excelência para proporcionar ao portador de lesões, em especial àquelas de caráter crônico, um tratamento eficaz, em curto prazo que possam trazer maior conforto e breve retorno à normalidade de sua vida.

Entretanto, nota-se um lento progresso na descoberta de drogas direcionadas a acelerar o processo da cicatrização e que minimizem o desconforto do paciente durante este processo.

Em vista disso, existe a necessidade de alternativas terapêuticas eficazes, de fácil aplicação e baixo custo. Acreditamos que elementos da natureza poderiam constituir materiais alternativos para o tratamento local de lesões, em virtude da grande variedade de estruturas químicas e de serem uma fonte biológica renovável. Além disso, é grande o interesse das indústrias farmacêuticas pelo uso da biodiversidade brasileira como fonte de novos medicamentos, levando assim a um interesse por medicações fitoterápicas e homeopáticas.

Nesse contexto, as lectinas extraídas de leguminosas, em especial àquelas com ligação glicose/manose emergem como um princípio ativo relevante, em face dos múltiplos efeitos biológicos já comprovados até o momento. Além disso, não existem artigos científicos que relatem a aplicabilidade de lectinas em modelos de cicatrização. Desta forma, conhecendo-se a inexistência na clínica de terapias licenciadas que favoreça de forma satisfatória a deposição de tecido cicatricial em lesões (RHETT *et al.*, 2008), acreditamos que este estudo pode sugerir uma aplicabilidade biotecnológica para lectinas como substâncias úteis na construção de medicamentos alternativos com propriedades cicatrizantes.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Desta forma, este estudo foi delineado com o objetivo geral de avaliar o efeito do tratamento tópico com a lectina de *Cratylia floribunda* (CFL) em um modelo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos. Para tanto, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o efeito da CFL na fase inflamatória do processo cicatricial, através da avaliação macroscópica dos parâmetros: edema, hiperemia, exsudato e crosta;
- Investigar o efeito da CFL na fase proliferativa, avaliando-se macroscopicamente a presença de tecido de granulação, tecido cicatricial, presença de lesões não visualizadas clinicamente e mensuração da área das lesões;
- Caracterizar o efeito da CFL em todas as etapas do processo cicatricial sob o ponto de vista histopatológico;
- Numa extensão aos efeitos da CFL sobre a fase inflamatória do processo cicatricial, objetivou-se verificar a capacidade desta lectina em induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) por macrófagos *in vitro*

Materials

3 MATERIAIS

3.1 Isolamento e Purificação da Lectina de *Cratylia floribunda* (CFL)

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BiolMoLab) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob a coordenação do professor Dr. Benildo Sousa Cavada.

Para tanto, sementes de *Cratylia floribunda* foram coletadas no Campus do Picí da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE. As sementes quiescentes tiveram seus tegumentos retirados manualmente e os cotilédones foram fragmentados e pulverizados, até a obtenção da farinha, a qual foi submetida à técnicas de extração para obtenção da fração protéica; onde então, a CFL foi isolada através de cromatografia de afinidade em matriz de Sephadex G-50 por metodologia já estabelecida (OLIVEIRA; CAVADA; MOREIRA, 1991). A pureza da amostra foi verificada por eletroforese em SDS-PAGE (LAEMMLI *et al.*, 1970).

A CFL foi solubilizada em NaCl 150mM (solução salina) na concentração de 100µg/mL em volume suficiente para o tratamento das lesões durante todo o experimento. Para tanto, a solução preparada foi alíquotada e congelada a -4°C, sendo individualmente descongeladas e imediatamente utilizadas para o tratamento das feridas diariamente ao longo do período experimental.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) machos, com 10 semanas de idade e massa corpórea variando de 33,0 a 27,0 g, provenientes do Biotério Central da UFC, os quais foram mantidos no Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC. Durante todo o período experimental os animais permaneceram em gaiolas individuais, sob as mesmas condições adequadas de luz, temperatura e umidade com fornecimento *ad libitum* de água e ração, exceto no período pré-operatório descrito posteriormente.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal- COBEA e os protocolos utilizados estão de acordo com os padrões éticos estabelecidos pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da UFC.

3.3 Drogas e reagentes

- Álcool 70%;
- Anticorpo biotinilado TNF- α (Dako).
- Cloridrato de ketamina 10% (Dopalen® – Vetbrands);
- Cloridrato de xilazina 2% (Anasedan® – Vetbrands);
- Eosina (Reagen);
- Formaldeído 4% (Sigma);
- Formol (PA – Merck);
- Hematoxilina (Reagen);
- Heparina (ampolas de 5.000 UI/mL; HEPARIN®) (Cristália);
- Iodopovidona 10% (Bio Trat);
- Lipopolysaccharide- from *Salmonella typhymurium* (Sigma ®);
- Meio RPMI 1640 (R 5382);
- Parafina
- Sabonete líquido anti-séptico (LM farma);
- Solução de Turk (Ácido acético e violeta de genciana-Isofar);
- Solução Salina – Cloreto de sódio estéril a 0,9% (Pharmace);
- Tampão PBS 0,01 M, pH 7,2;
- Tioglicolato (Lab Difco Ltda);
- Tricrômico de Masson
- Xilol

3.4 Equipamentos e materiais

- Balança analítica, digital modelo 260 (MARTE);
- Balança para pesagem dos animais, modelo ID-1500 (FILIZOLA);
- Cabo de bisturi n° 3
- Câmara de Neubauer
- Câmera digital SONY– T5
- Estufa de CO₂
- Lâmina de bisturi n° 15
- Luva cirúrgica (Luvatex)
- Medidor de pH (PHmetro, Metrohm Herisau)
- Microcâmara de 24 poços (NEUROPROBE Inc. CABIN JOHN, MD);
- Micropipetas automáticas (Gilson)
- Microscópio óptico binocular;
- Molde metálico vazado (área= 1cm²)
- Panos de campo estéril
- Paquímetro (Messen)
- Pinça histológica ponta fina n°12 (ABC instrumentos);
- Tesoura de pontas tipo fina/fina, 11.5cm (QUINELATO ÍRICL);

Métodos

4 MÉTODOS

4.1 Indução das lesões cutâneas: procedimento cirúrgico

Após jejum hídrico e alimentar de 12 horas, os animais foram pesados e anestesiados com cloridrato de ketamina 10% associado à cloridrato de xilazina 2% nas doses de 115 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente, por via intramuscular (HALL; CLARKE,1991). Após o procedimento anestésico, cada animal foi submetido à tricotomia por tração manual de parte da região torácica dorsal e à antissepsia utilizando-se iodopovidona 1% seguido de etanol 70%.

Campos operatórios esterilizados foram posicionados sobre o animal e em seguida, a pele a ser excisada foi marcada com o auxílio de uma caneta dermatográfica e de um molde metálico vazado estéril, estabelecendo uma área circular de 1cm².

A pele foi incisionada utilizando lâmina de bisturi número 15, sendo a tela subcutânea divulsionada para remoção das camadas de derme e epiderme até a exposição da fáscia muscular dorsal com o mínimo de sangramento, com tesoura de pontas tipo fina/fina e pinça de dissecação até sua ressecção. A hemostasia da área foi realizada por compressão digital, com gaze estéril, embebida com solução salina por aproximadamente um minuto.

4.2 Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos das lesões

Após o procedimento cirúrgico descrito no item anterior os animais foram randomizados em dois grupos experimentais (n=23/grupo) de acordo com o tipo de tratamento estabelecido: grupo C (solução salina) e grupo CFL (100 µg/mL).

O tratamento tópico com 100µLde salina ou da lectina em solução foi feito imediatamente após a indução da ferida, diariamente até o 11º dia do período pós-operatório (PO).

Nos 2º, 7º e 12º dias do PO, cinco animais foram retirados aleatoriamente de cada grupo experimental para realização de procedimentos necessários à análise histopatológica descritos a seguir.

4.3 Avaliação macroscópica dos aspectos clínicos

As avaliações clínicas diárias foram realizadas em todos os animais dos dois grupos experimentais, sendo iniciadas 24 horas após a cirurgia e finalizadas no 12º dia do pós-operatório (PO). As lesões cutâneas foram fotografadas e analisadas macroscopicamente em relação a diferentes aspectos representativos do processo de reparação cicatricial: edema, hiperemia, exsudação, crosta, tecido de granulação, tecido cicatricial e reepitelização (Figura 6). Os resultados das avaliações foram catalogados em fichas (APÊNDICE).

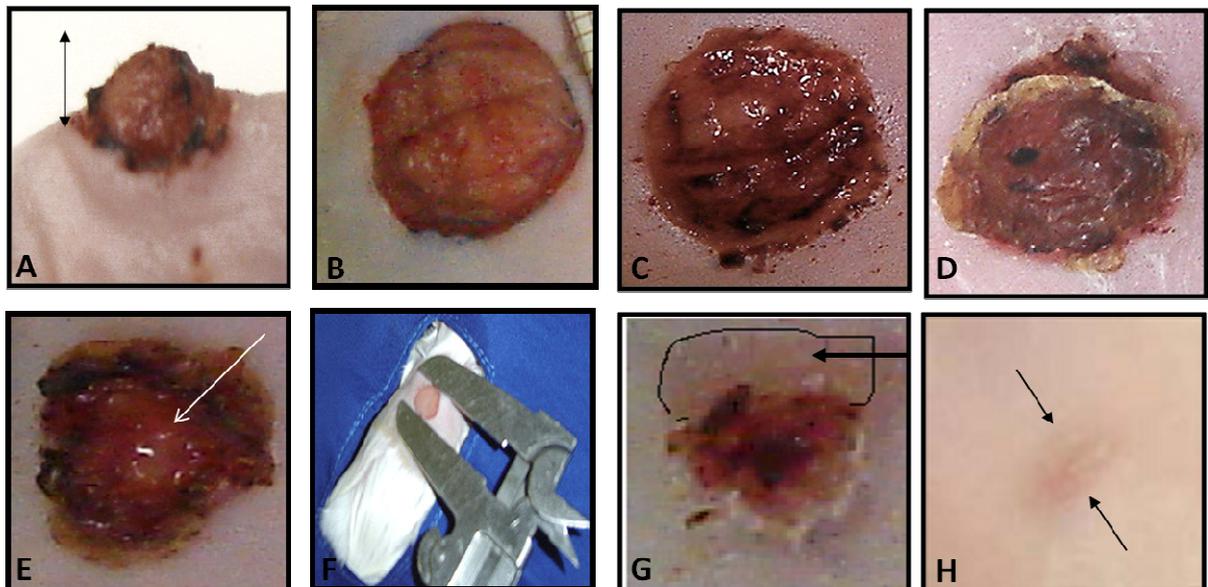


Figura 6 - Avaliação macroscópica dos aspectos clínicos:

A) edema, B) hiperemia, C) exsudação, D) crosta, E) tecido de granulação, F) área das lesões, G) tecido cicatricial, H) lesões não visualizadas clinicamente.

4.3.1 Avaliação dos sinais flogísticos: edema, hiperemia, exsudação e formação de crosta

A presença de edema foi registrada quando se observava um aspecto tumefeito, sendo este atribuído ao acúmulo anormal de líquido no espaço intersticial do leito e/ou bordas da lesão e confirmado, quando necessário, por meio de digitocompressão com o polegar revestido por luva estéril, onde estando o edema presente, formava-se uma depressão.

Além da frequência, o edema foi também avaliado e classificado de forma semi-quantitativa conforme a intensidade do volume da lesão tumefeita. Para tanto, foram atribuídos os seguintes escores: (0): Ausência de edema, (1): Edema leve, (2): Edema moderado e (3): Edema intenso.

O aumento do fluxo sanguíneo nas feridas foi observado devido ao aspecto avermelhado “rubor”, sendo este sinal flogístico denominado hiperemia. Feridas pálidas foram registradas como ausência de hiperemia, já as feridas ruborizadas como feridas hiperemiadas. Estas últimas foram classificadas, de acordo com a intensidade do rubor através dos seguintes escores: (0): Ausência de hiperemia, (1): Hiperemia leve, (2): Hiperemia moderada e (3): Hiperemia intensa.

A presença ou não de exsudato inflamatório na ferida foi avaliado, além da análise de sua aparência (cor e consistência), podendo assim, quando presente, ser classificado como: seroso, sanguinolento, serossanguinolento, purulento e seropurulento. Em acréscimo, o ressecamento do exsudato filtrado da ferida foi registrado pelo início da formação crostosa e o tempo de permanência destas durante todo o experimento.

4.3.2 Avaliação de parâmetros relacionados à fase proliferativa

➤ **Identificação do tecido de granulação**

O tecido granuloso foi observado macroscopicamente nas feridas, quando estas apresentavam fissuras e/ou desprendimento parcial ou total das crostas, sendo reconhecido pela sua fragilidade, coloração vermelho brilhante e facilidade no sangramento.

➤ **Determinação da área das lesões**

A área das feridas experimentais foi estimada através da mensuração dos diâmetros horizontal e vertical, com o auxílio de um paquímetro, e do cálculo da área pela equação (PRATA; HADDAD; GOLDENBERG, 1988): $A=p.R$ onde “A” representa a área, “R” o raio maior e “r” o raio menor da ferida. A contração da área

foi calculada utilizando-se a equação (RAMSEY *et al.*,1995) = $100 \times (W_o - W_i) / W_o = M \pm DP$, onde W_o = área inicial da ferida; W_i = área final da ferida.

➤ **Identificação de tecido cicatricial**

A evolução do ferimento para a cicatrização também foi acompanhada pelo surgimento do tecido cicatricial em substituição à área lesionada. Este tecido foi diferenciado da pele normal circundante pelo surgimento das seguintes características: 1. Tecido frágil e rosado, localizado entre a pele normal e área lesionada; 2. Ausência de pigmentação (não há nova formação de melanócitos na epiderme) e 3. Ausência de pêlos

O parâmetro lesões não visualizadas clinicamente referiu-se ao número de animais (%) à cada dia de PO que apresentavam apenas uma cicatriz na região em que estava localizada a ferida.

4.4 Análise histopatológica

Com o objetivo de avaliar microscopicamente os aspectos da fase inflamatória e a evolução do processo de cicatrização tecidual, cinco animais foram retirados de cada grupo experimental no 2º, 7º e 12º dias do período pós-operatório, para a análise histopatológica.

Seguindo as mesmas condutas anestésicas descritas anteriormente para realização da lesão, os animais foram submetidos à retirada da ferida, com o cuidado de remover parte do fragmento de pele normal em volta da lesão, abrangendo um centímetro além de cada margem dorsal e ventral no sentido caudal, aprofundando-se até o plano muscular. Após a realização do procedimento cirúrgico para a ressecção da ferida, os animais foram submetidos à eutanásia com superdosagem de pentobarbital sódico (200 mg/Kg) por via intraperitoneal.

As amostras de tecido excisadas foram dispostas em papel filtro e fixadas em formaldeído 4% (v/v) preparado em PBS 0,01 M, pH 7,2 por um período máximo de 48 horas, substituído por uma solução de etanol 70% (v/v). Cada fragmento de pele foi desidratado em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Após microtomia (5µm de espessura), os cortes foram

corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) e por Tricrômico de Masson para estudo histológico por microscopia óptica (BANKS,1992) .

4.5 Estimulação de cultura de macrófagos peritoneais com a CFL

Considerando a importância da resposta inflamatória na cicatrização de lesões cutâneas, este protocolo teve como objetivo investigar o possível efeito da CFL em estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) por macrófagos *in vitro*.

4.5.1 Isolamento de macrófagos e Incubação com LPS e CFL

Macrófagos (MØs) peritoneais foram obtidos de camundongos normais inoculados por via intraperitoneal com 2 mL de tioglicolato a 4% em água destilada (CUNHA *et al.*,1986). Após quatro dias, os animais foram sacrificados e o exsudato peritoneal foi coletado em condições estéreis, após ser injetado i.p. 3 mL de RPMI heparinizado, pH 7,4. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em RPMI por centrifugação a 100 x g durante 5 minutos. O precipitado final foi ressuspenso em 1 mL de RPMI, sendo então diluído (1:20) em solução de Turk para contagem total das células em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram ressuspenso em RPMI, na concentração de 2×10^6 células /mL e distribuídas em placas de cultura de 24 poços (1 mL/poço). Para aderência dos macrófagos, incubou-se a placa por 1 hora em estufa de CO₂ a 5%. Após este período, o sobrenadante foi descartado e, as células aderidas, lavadas três vezes com RPMI e incubadas novamente por 12 horas em CO₂ a 5%. Em seguida, as células foram lavadas com RPMI e incubadas como a seguir: RPMI (controle negativo), LPS (1 μ g/mL;controle positivo) e CFL (200 μ g/mL).

4.5.2 Dosagem de TNF- α

Depois de 5 horas de incubação com RPMI, LPS e CFL, os sobrenadantes das culturas foram coletados e utilizados para determinação da

concentração de TNF- α por ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”), através de protocolo já descrito (TAKTAK *et al.*, 1991).

Brevemente, placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 μ L de “PBS coating buffer” contendo 2,0 μ g/mL do anticorpo monoclonal (mAb) anti-TNF- α (purificado do soro de carneiro; Peptotec). A placa foi incubada “overnight” a 4°C. Após esse período, a placa foi lavada de 3 a 5 vezes com PBS contendo 0,1% Tween 20 (PBS-T; 200 μ L/poço), e em seguida foram incubadas com 50 μ L de solução de bloqueio (1% de albumina bovina em “PBS coating buffer”) durante 2 h em temperatura ambiente (T.A.). A placa foi lavada conforme descrito acima e, em seguida adicionou-se as amostras testes em triplicatas (sobrenadante da cultura de macrófagos) e concentrações decrescentes de TNF- α (Peptotec) diluída em PBS-Tween. A placa foi novamente coberta e mantida “overnight” a 4°C. No terceiro dia a placa foi lavada por três vezes e adicionada com anticorpo biotilado anti-TNF- α (1:1000 em solução de lavagem contendo 1% de soro de cabra, Peptotec).

Após 1 h de incubação à T.A., a placa foi lavada e em seguida adicionou-se 50 μ L de uma solução 1:5000 do conjugado avidina-horseradish peroxidase (DAKO A/S, Denmark) diluída em PBS-T. Após incubação por 30 minutos, a placa foi lavada e incubada com 50 μ L do substrato dihidroclorido de 1,2-fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD, Sigma) diluído em tampão e adicionado com 0,4 μ L de H₂O₂ 30% por mL.

Após o desenvolvimento da cor, a reação foi interrompida pela adição de 75 μ L de solução “stop” (H₂SO₄ – 1M). A medida da absorbância foi determinada a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL de citocinas, com base na curva padrão obtida.

4.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como percentual médio (avaliação dos sinais flogísticos, tecido de granulação, % feridas reepitelizadas e tecido cicatricial), mediana e variações (intensidade do edema e hiperemia) média \pm desvio-padrão (% de contração, área sob a curva), e média \pm erro padrão da média (dosagem de TNF- α).

Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizado teste não paramétrico do qui-quadrado (avaliação dos sinais flogísticos, tecido de granulação, % de lesões não visualizadas clinicamente e tecido cicatricial), teste t de Mann-Whitney (intensidade do edema e hiperemia), teste t de Student não pareado (área sob a curva) e one-way ANOVA (% de contração e dosagem de citocinas), seguido do teste de Tukey (% de contração) e Bonferroni (dosagem de TNF- α), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação macroscópica dos aspectos clínicos

5.1.1 CFL diminui a presença de sinais inflamatórios nas lesões cutâneas

O edema foi evidenciado desde o 1º dia de avaliação nas lesões de ambos os grupos, observando-se os seguintes aspectos, ilustrados na Figura 7: A) o grupo controle apresentou edema por um período de tempo mais prolongado em comparação ao grupo CFL, persistindo até 5º dia PO; e B) a frequência de edema em feridas tratadas com CFL é menor que a do grupo controle (C). Este aspecto pode ser evidenciado no 1º dia PO, quando a diferença foi mais evidente, observando-se que 85% das feridas tratadas com solução salina apresentaram edema, frente a 46% das lesões tratadas com a lectina. De forma similar, no 5º dia PO nenhuma lesão tratada com a lectina apresentou edema, entretanto 54% dos animais tratados com salina apresentaram esse sinal, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A avaliação macroscópica da intensidade do edema observado do 1º ao 5º dia PO está demonstrada na tabela 1. De acordo com os escores atribuídos, as feridas do grupo CFL, quando apresentavam edema, este ocorria de forma menos intensa (leve a moderado) quando comparado ao grupo C, sendo esta diferença estatisticamente significativa nos 1º, 3º e 5º dia PO ($p < 0,05$).

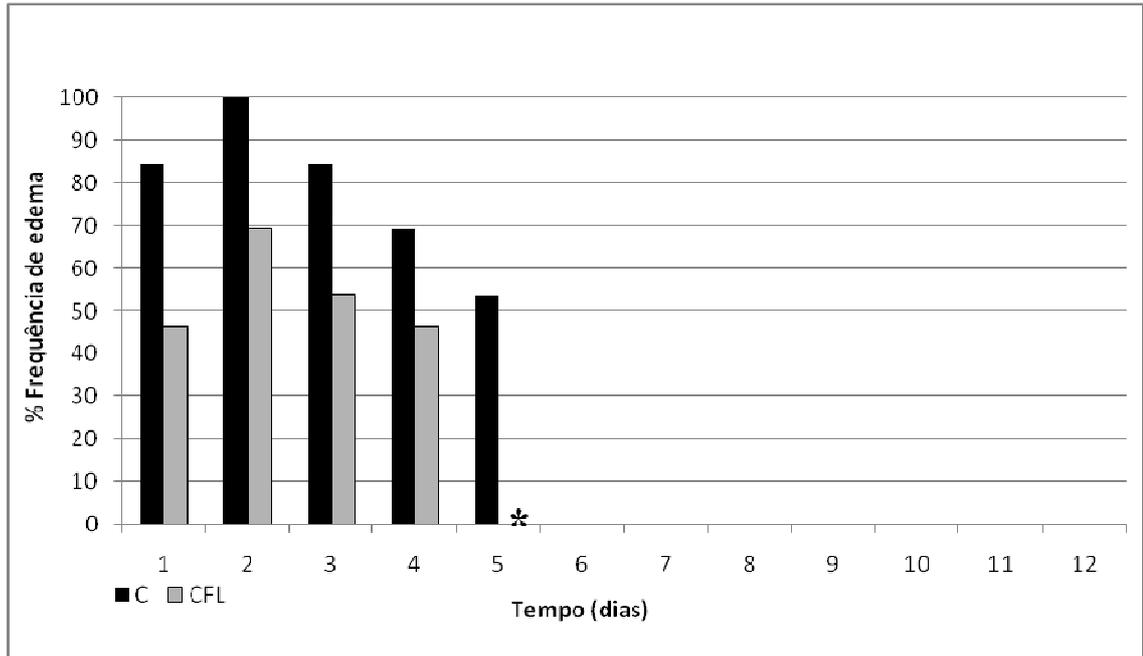


Figura 7 - Lectina de sementes de *Cratylia floribunda* (CFL) diminui a frequência de edema em feridas cutâneas experimentais. As lesões foram tratadas topicamente durante 12 dias com 0,1mL de salina (C) ou CFL em salina (CFL; 10 μ g/0,1mL). A presença de edema foi avaliada em cada dia de PO e expressa como percentual médio (%) da frequência de edema em cada grupo (n=13/grupo). * P<0,05 comparado ao controle (teste qui-quadrado).

DIAS	GRUPO	
	C	CFL
1	1 (0 - 3)	0 (0 - 1)*
2	1 (0 - 3)	1 (0 - 2)
3	1 (0 - 2)	1 (0 - 1)*
4	1 (0 - 2)	0 (0 - 1)
5	1 (0 - 2)	0 (0 - 0)*

Tabela 1 - Lectina de sementes de *Cratylia floribunda* (CFL) diminui a intensidade do edema em feridas cutâneas experimentais. As lesões foram tratadas topicamente durante os 12 dias com 0,1mL de salina (C) ou CFL em salina (CFL; 10 μ g/0,1mL). Os resultados são reportados por medianas e variações dos escores atribuídos à intensidade do volume da lesão tumefeita: (0): Ausência de edema, (1): Edema leve, (2): Edema moderado e (3): Edema intenso (n = 13). *p<0,05 em relação ao grupo controle (teste- t de Mann-Whitney).

Hiperemia foi outro sinal inflamatório observado no modelo utilizado até o 6º dia PO nos animais do grupo controle e até o 5º dia PO naqueles tratados com a CFL (Figura 8). Em todos os dias de avaliação uma menor frequência deste sinal foi observada no grupo CFL quando comparado ao controle. Este fato teve maior destaque a partir do 3º dia PO, onde CFL determinou uma significativa redução ($p < 0,05$) deste sinal na ordem de 39%, 15%, 8% e 0% nos 3º, 4º, 5º e 6º dias PO, respectivamente. Nota-se ainda que a redução máxima da hiperemia no grupo controle foi de 39% no 6º dia PO; entretanto, as lesões tratadas com a lectina já apresentavam este nível de redução desde o 3º dia de avaliação.

Da mesma forma demonstrada para o edema, as feridas tratadas com a lectina apresentavam hiperemia significativamente menos acentuada ($p < 0,05$), quando comparada ao grupo controle em toda a fase inflamatória exceto nos 2º e 6º dia de PO (Tabela 2).

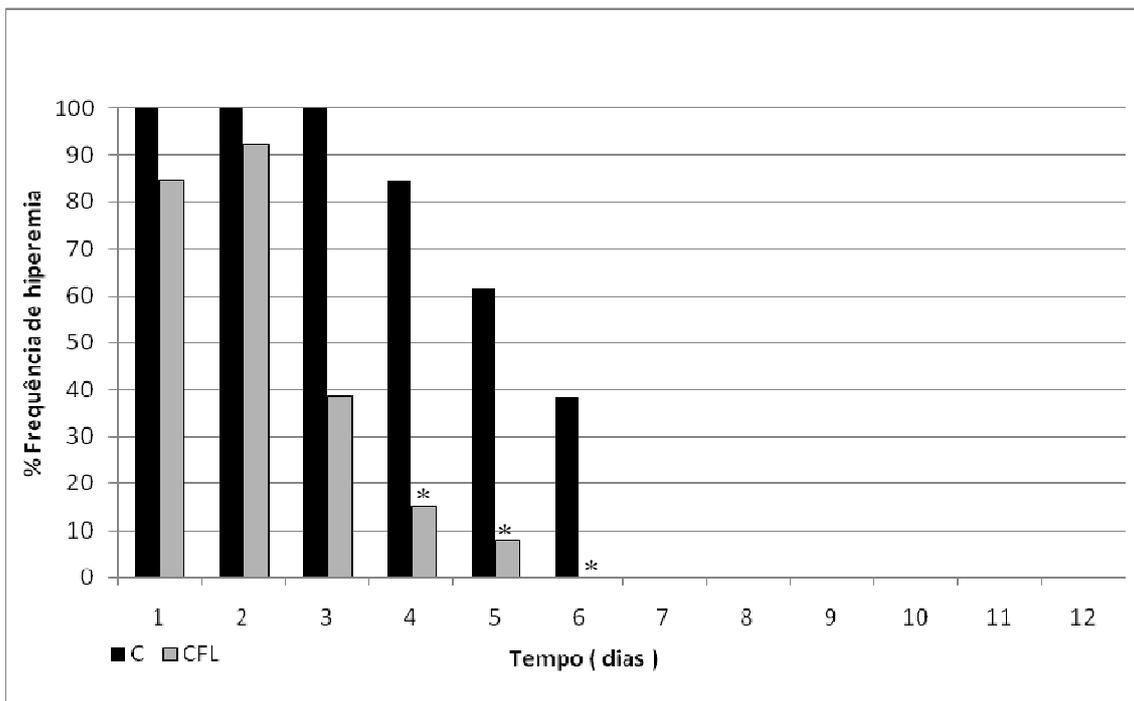


Figura 8 - Lectina de sementes de *Cratylia floribunda* (CFL) diminui a frequência de hiperemia em feridas cutâneas experimentais. As lesões foram tratadas topicamente durante 12 dias com 0,1mL de salina (C) ou CFL em salina (CFL; 10µg/0,1mL). A presença de hiperemia foi avaliada em cada dia de PO e expressa como percentual médio (%) da frequência em cada grupo (n=13/grupo). * $P < 0,05$ comparado ao controle (teste qui-quadrado).

GRUPO		
DIAS	C	CFL
1	1 (1 - 2)	1 (0 - 1)*
2	1 (1 - 2)	1 (0 - 2)
3	1 (1 - 2)	0 (0 - 2)*
4	1 (0 - 2)	0 (0 - 1)*
5	1 (0 - 2)	0 (0 - 1)*
6	0 (0 - 1)	0 (0 - 0)

Tabela 2 – Lectina de sementes de *Cratylia floribunda* (CFL) diminui a intensidade da hiperemia em feridas cutâneas experimentais. As lesões foram tratadas topicamente durante 12 dias com 0,1mL de salina (C) ou CFL em salina (CFL; 10µg/0,1mL). Os resultados são reportados por medianas e variações dos escores atribuídos à intensidade do volume da lesão tumefeita: (0): Ausência de hiperemia, (1): hiperemia leve, (2): hiperemia moderada e (3): hiperemia intensa (n = 13). *p<0,05 em relação ao grupo controle (teste- t de Mann-Whitney).

Exsudação foi visualizada nas lesões do grupo controle do 1º ao 8º dia PO, exceto no 3º dia, em 23%, 23%, 8%, 23%, 8%, 8% e 8% das lesões. Por outro lado, no grupo tratado com CFL a frequência de exsudação nas feridas foi menor que no grupo controle e ocorreram somente no 1º, 2º e 5º dia de PO, em 23%, 8% e 8% das lesões, respectivamente (Figura 9). Quando presente, o exsudato em ambos os grupos foi classificado em relação à cor e nos dias em que foi observado apresentava-se com aparência serosa.

As avaliações diárias mostraram que a partir de 48 horas de PO, houve formação de crosta nas feridas em ambos os grupos (Figura 10), sendo esta observada até o 12º dia PO no grupo Controle e até o 10º dia PO no grupo CFL. Desta forma, notou-se um prolongamento no tempo de permanência da crosta nas feridas do grupo controle comparado ao grupo CFL. No 10º e 11º dias PO a presença de crosta nas feridas do grupo tratado com a lectina foi significativamente menor (p<0,05) que no grupo controle. No 10º dia PO 61% e 15% das feridas apresentavam crosta nos grupos controle e CFL, respectivamente e no 11º dia PO a crosta foi encontrada em 46% dos animais controle e em nenhum animal do grupo lectina.

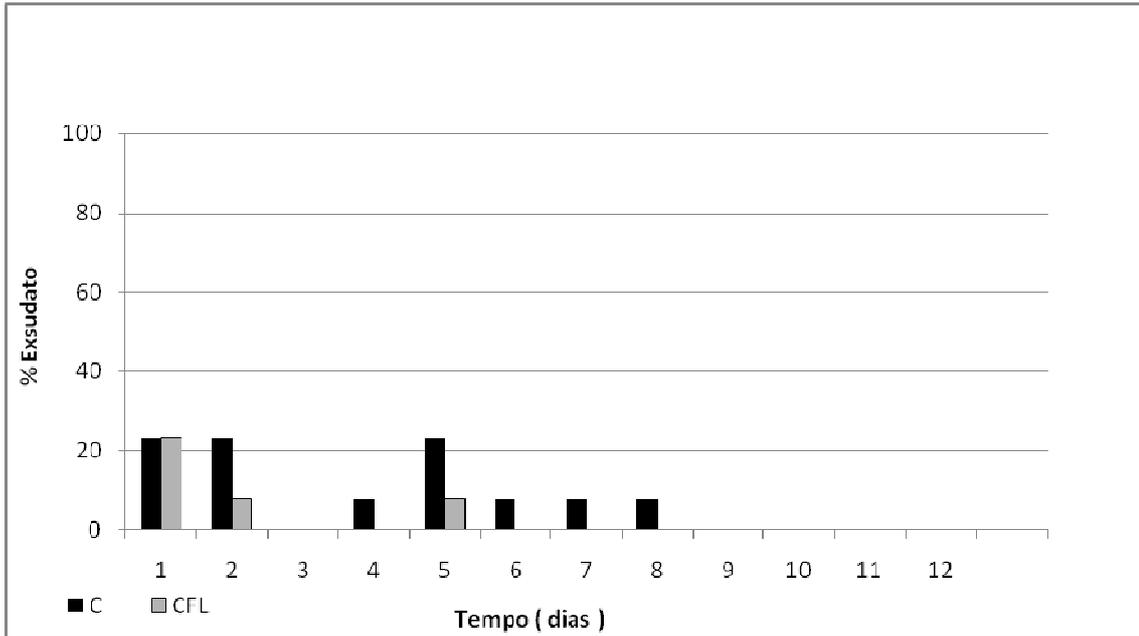


Figura 9 - Lectina de sementes de *Cratylia floribunda* (CFL) diminui a freqüência de exsudação em feridas cutâneas experimentais. As lesões foram tratadas topicamente durante 12 dias com 0,1mL de salina (C) ou CFL em salina (CFL; 10µg/0,1mL). A presença de exsudato foi avaliada em cada dia de PO e expressa como percentual médio (%) da presença em cada grupo (n=13/grupo). * $P < 0,05$ comparado ao controle (teste qui-quadrado).

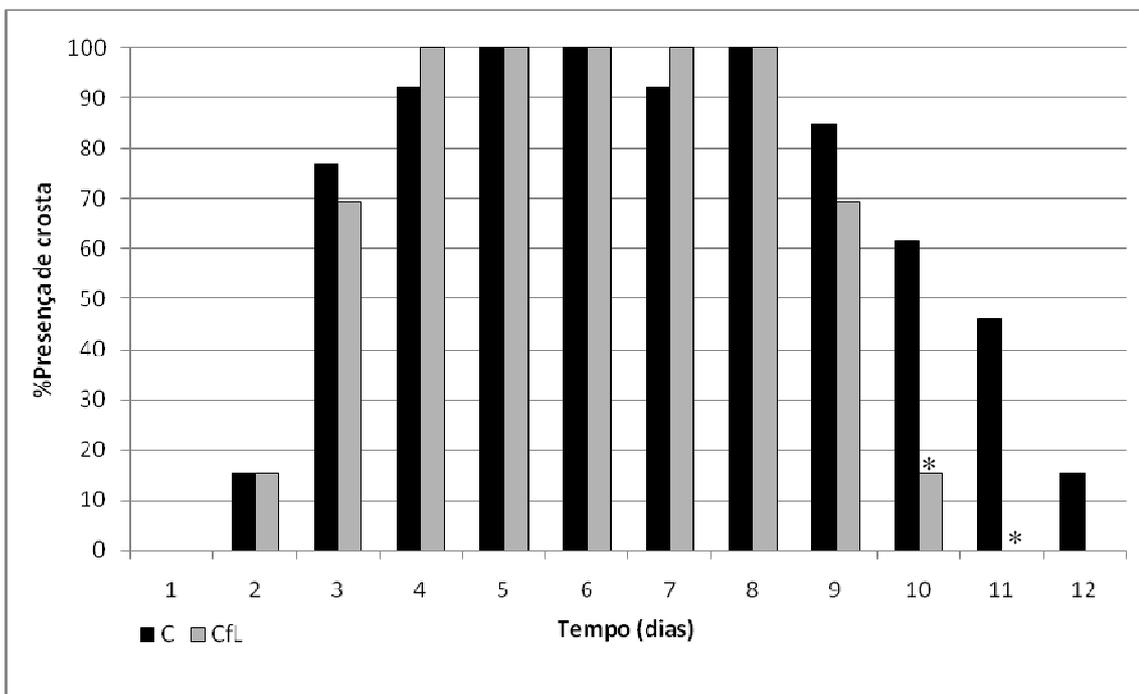


Figura 10 - Lectina de sementes de *Cratylia floribunda* (CFL) diminui a freqüência de crosta em feridas cutâneas experimentais. As lesões foram tratadas topicamente durante 12 dias com 0,1mL de salina (C) ou CFL em salina (CFL; 10µg/0,1mL). A presença de crosta foi avaliada em cada dia de PO e expressa como percentual médio (%) da freqüência em cada grupo (n=13/grupo). * $P < 0,05$ comparado ao controle (teste qui-quadrado).

5.1.2 CFL antecipa a formação de tecido de granulação em maior percentual das lesões cutâneas

A Figura 11 representa a frequência em que foi visualizado o tecido de granulação nas feridas. Em ambos os grupos notaram-se a presença deste tecido somente do 4° ao 7° dia PO. Porém, no 4° dia de PO foi demonstrado que 31% das lesões tratadas com a CFL já apresentavam tecido de granulação, e somente em 8% daquelas tratadas com salina.

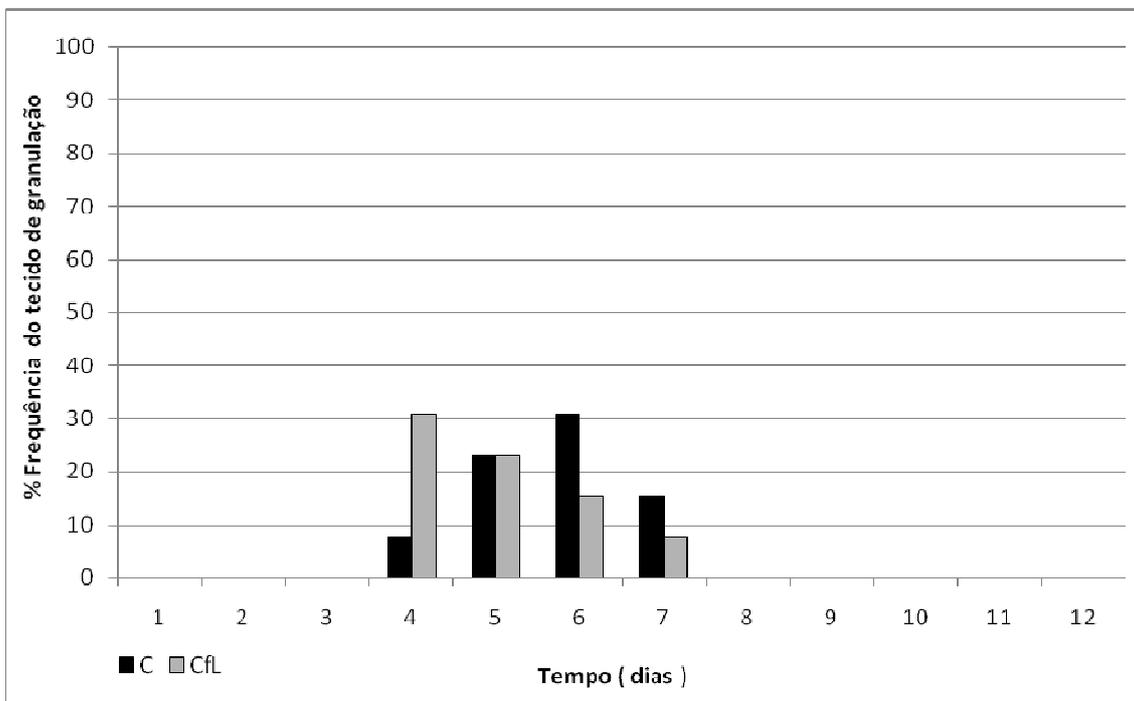


Figura 11 - Lectina de sementes de *Cratylia floribunda* (CFL) antecipa a formação de tecido de granulação em feridas cutâneas. As lesões foram tratadas topicamente durante 12 dias com 0,1mL de salina (C) ou CFL em salina (CFL; 10µg/0,1mL). A presença de tecido de granulação foi avaliada em cada dia de PO e expressa como percentual médio (%) da frequência em cada grupo (n=13/grupo). * P<0,05 comparado ao controle (teste qui-quadrado).

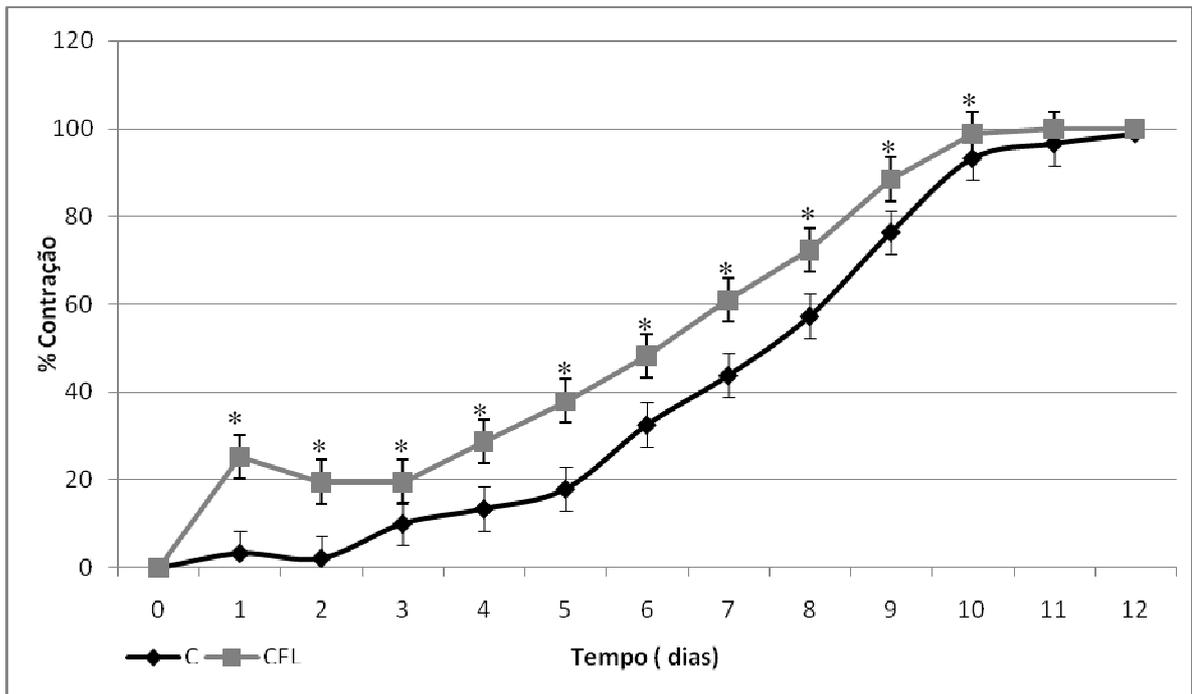
5.1.3 CFL favoreceu a contração das lesões cutâneas

A evolução do processo cicatricial foi acompanhada pela mensuração das lesões ao longo de 12 dias pós-cirúrgicos (Figuras 12 A e B). Observou-se um retardo na redução da área média das feridas do grupo C, uma vez que aquelas tratadas com CFL demonstraram significativa retração cicatricial desde os primeiros dias, o que se manteve durante os 12 dias de PO.

As maiores diferenças entre os percentuais de contração dos grupos ocorreram no 1º dia PO, quando o percentual médio de contração da área das lesões no grupo CFL foi 25% e o do Controle foi 2,6% (diferença de 22,5%) e no 5º dia PO, percentual de contração no grupo CFL: 37%, e do grupo Controle: 16,5% (diferença de 20,5%).

As áreas compreendidas pelas curvas de evolução de ambos os grupos puderam ser calculadas e comparadas estatisticamente. O resultado desta análise demonstrou diferença estatística entre os grupos ($p < 0.05$), sendo a média \pm desvio-padrão da área sob a curva (ASC) das áreas do grupo Controle e Lectina: $6,27 \pm 0,85$ e $4,00 \pm 1,28$, respectivamente.

A



B

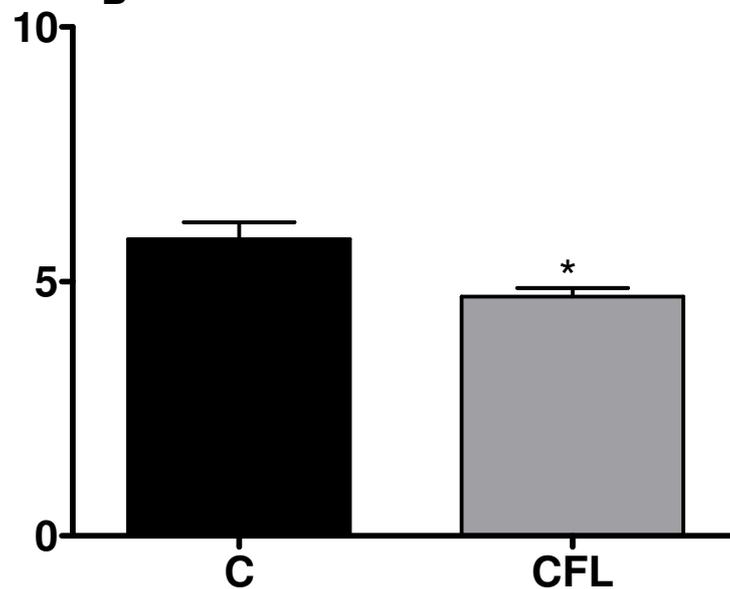
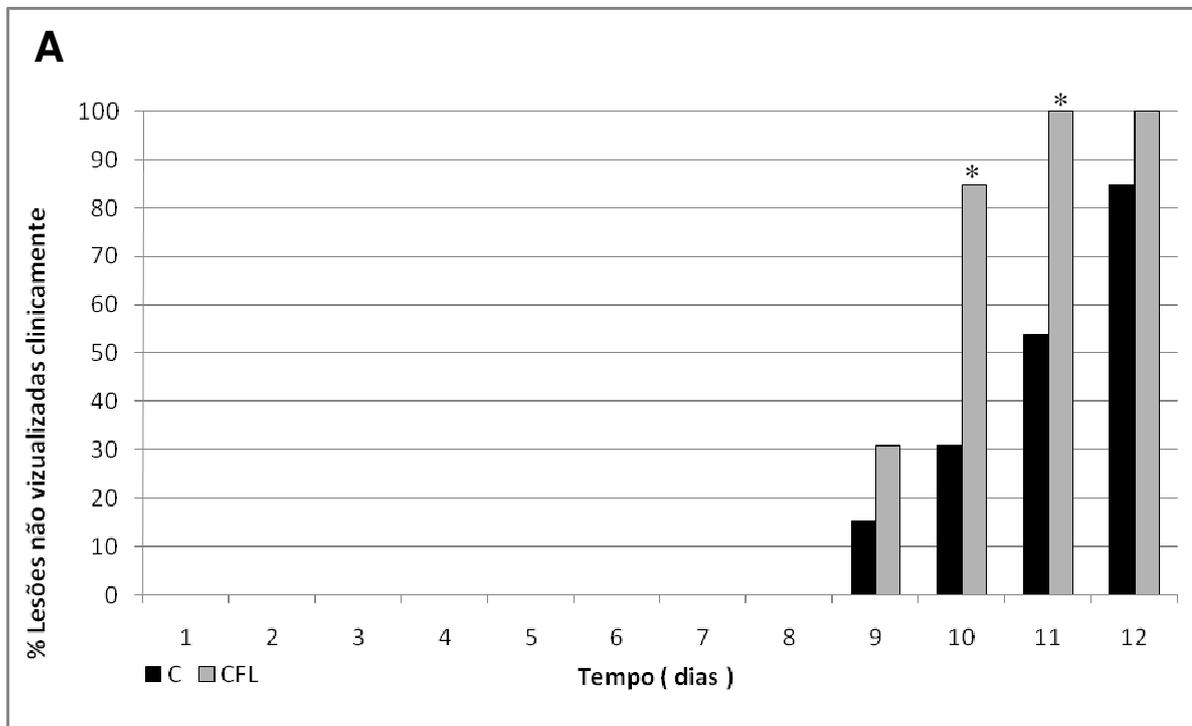


Figura 12 - O tratamento com a lectina de sementes de *Cratylia floribunda* (CFL) aumenta a contração total da área de feridas experimentais. As lesões foram tratadas topicamente durante 12 dias com 0,1mL de salina (C) ou CFL em salina (CFL; 10 μ g/0,1mL). Painei A – as linhas representam a evolução da contração da ferida no grupo C e CFL, em relação ao percentual médio de contração das lesões (%) observado em cada dia de PO, n=13/grupo. *P<0,05 comparado com controle (one-way ANOVA- teste de Tukey). No painei B as barras representam a média \pm E.P.M. das áreas sob as curvas do percentual de contração das áreas das lesões do grupo C e CFL, n=13/grupo. *P<0,05 comparado com controle (Teste t de student não pareado).

5.1.4 CFL aumenta a frequência de lesões não visualizadas clinicamente

A partir do 9º dia de PO haviam feridas cicatrizadas (ausência macroscópica de lesões) em ambos os grupos. Em relação ao grupo C, CFL apresentou de forma significativa ($p < 0,05$) um maior percentual de animais com feridas cicatrizadas no 10º e 11º dia de PO. Verificou-se que no último dia de avaliação (12º dia de PO), todas as feridas tratadas com a lectina haviam cicatrizado, enquanto 15% dos animais no grupo C ainda apresentavam lesões na região dorsal (Figura 13 A e B).



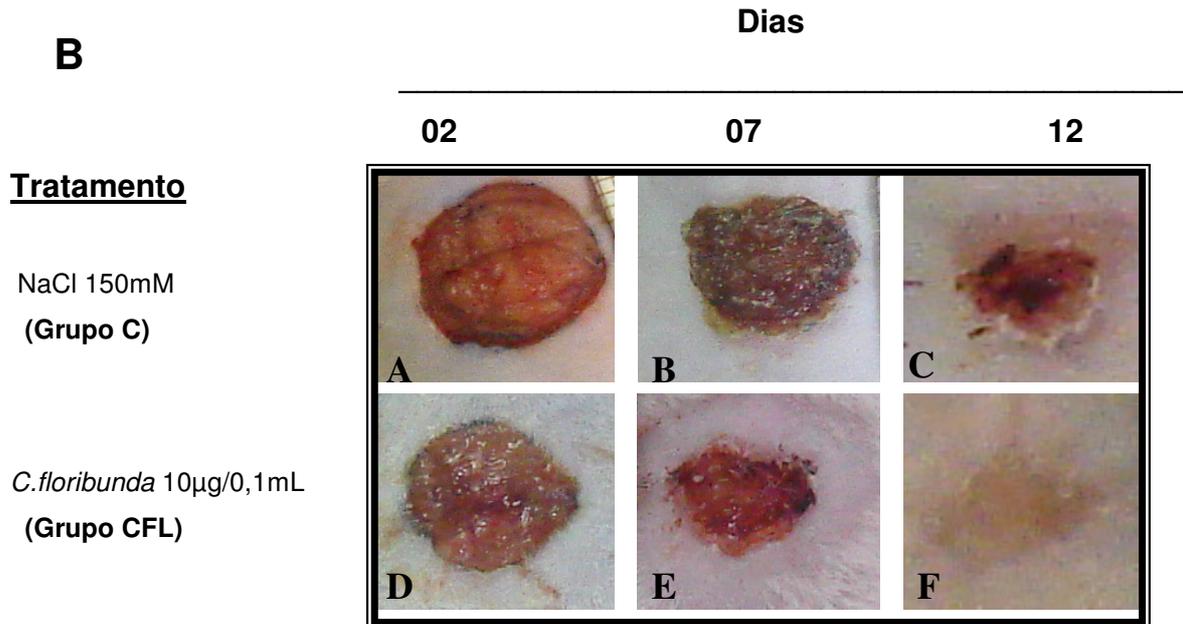


Figura 13 - Lectina de sementes de *Cratylia floribunda* (CFL) aumenta a frequência de lesões não visualizadas clinicamente. Painel A: cada coluna representa percentual médio da presença de feridas cicatrizadas (%) observado em cada dia de PO, n=13/grupo. *P<0,05 comparado com controle (teste qui-quadrado). Painel B: Aspectos macroscópicos das lesões experimentais nos dias do pós-operatório. Grupo Controle: A (2º dia), B (7º dia), C (12º dia); Grupo CFL: D (2º dia), E (7º dia), F (12º dia).

5.1.5 CFL antecipa o surgimento de tecido cicatricial

A frequência de lesões preenchidas por tecido cicatricial está representada na figura 14. Observou-se que esta fase da cicatrização foi antecipada nos animais que receberam tratamento com CFL, já que este tecido foi visualizado desde o 5º dia PO, enquanto que no grupo C teve início somente a partir do 7º dia PO. Além disso, uma maior frequência deste tecido foi visualizada no grupo CFL, uma vez que nos 6º, 7º e 8º dias PO, ocorreu em 54%, 61% e 77% das lesões do grupo CFL contra 0%, 15% e 23% do grupo C, sendo (p<0,05) nos dias 6 e 8.

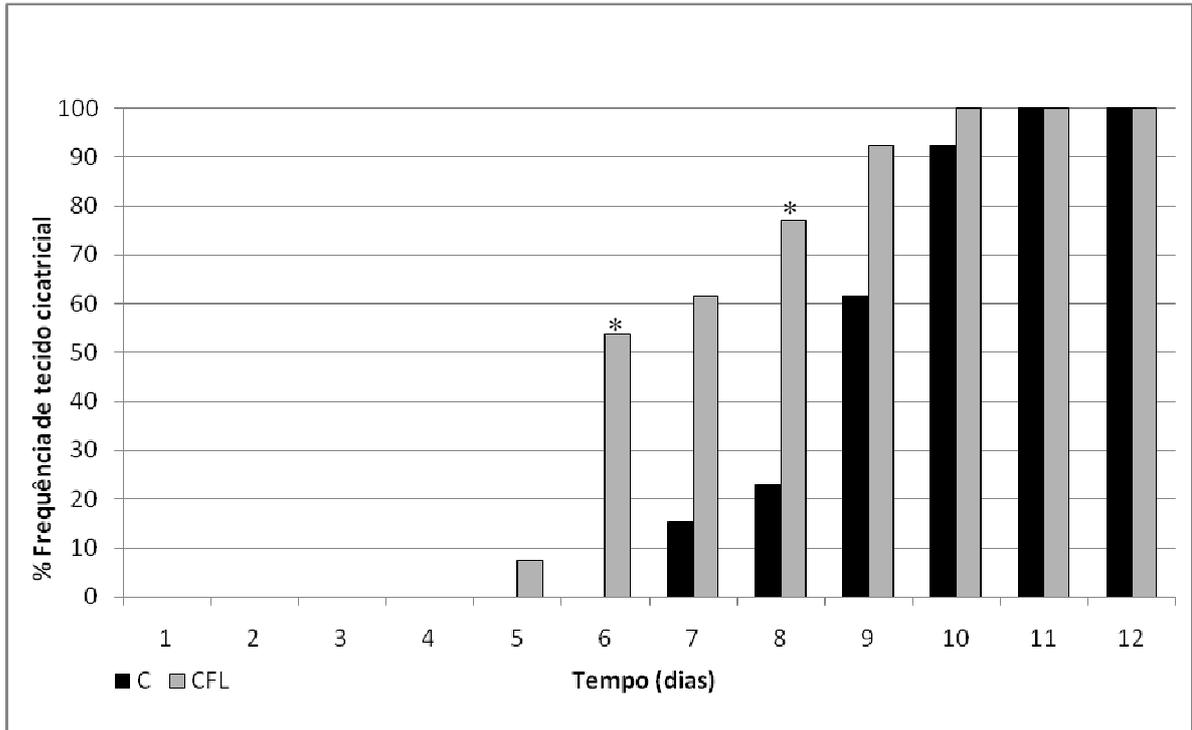


Figura 14- Lectina de sementes de *Cratylia floribunda* (CFL) antecipa o surgimento de tecido cicatricial e aumenta sua frequência em lesões experimentais. Cada coluna representa percentual médio de presença (%) observado em cada dia de PO, n=13/grupo. *P<0,05 comparado com controle (teste qui-quadrado).

5.2 Análise histopatológica

A avaliação microscópica do processo cicatricial foi fundamentada nos seguintes parâmetros, característicos e ilustrativos de cada fase do processo: A) fase inflamatória, presença de crosta e do infiltrado inflamatório; B) Fase de fibroplasia, neoangiogênese e formação do tecido de granulação; e C) Fase de remodelação, reepitelização da área da lesão e presença de fibras colágenas.

No 2º dia PO, os aspectos mais representativos do grupo C foram a presenças de infiltrado inflamatório e crosta espessa (Figura 15 A). Observou-se ainda um primórdio de neoformação tecidual, sugerindo o surgimento de um tecido de granulação vascular. Em paralelo, o grupo CFL apresentava um escasso infiltrado inflamatório, rede vascular mais organizada com visíveis fibrilas colágenas

delimitando os vasos neoformados, o que sugere a neoformação de um tecido de granulação fibrovascular (Figura 15 B).

As Figuras 15 C e D ilustram o aspecto das lesões no 7° dia PO. Neste tempo de evolução, infiltrado inflamatório e crostas espessas totalmente aderidas às lesões ainda persistiram no grupo C. Quanto à fibroplasia propriamente dita, um tecido de granulação bastante vascularizado predominou na área das lesões, ainda que se tenha observado alguma formação inicial de um tecido de granulação fibrovascular centrípeta, de características pouco organizadas e com indícios da presença de fibras colágenas. O tratamento com a lectina promoveu uma completa resolução da fase inflamatória, uma vez que não se observou infiltrado celular, além de ter favorecido o desprendimento das crostas que estavam aderidas às lesões. O principal aspecto verificado foi o predomínio de um tecido de granulação fibrovascular no centro da injúria do grupo CFL, organizado por densas fibras colágenas e áreas de vascularização mais organizada. Nas áreas marginais da lesão (área de transição para a pele íntegra circunjacente), a presença de fibras colágenas organizadas em um tecido de granulação fibroso e a regressão do diâmetro dos vasos sanguíneos neoformados foi notável. A reepitelização não foi observada em nenhum dos grupos avaliados.

Feridas tratadas com CFL apresentaram fechamento total, não sendo possível diferenciar área de transição e injúria, além de uma reepitelização completa da epiderme, recoberta com uma fina camada de queratina e um tecido cicatricial com aspecto fibroso com fibras colágenas bem organizadas no 12° PO (Figura 15 F). Paralelamente, notou-se um retardo do processo cicatricial no grupo C, uma vez que ainda se observam regiões na área da injúria com um tecido de granulação vascular, invadida por fibras colágenas, caracterizando um tecido de granulação com aspecto fibrovascular (Figura 15 E).

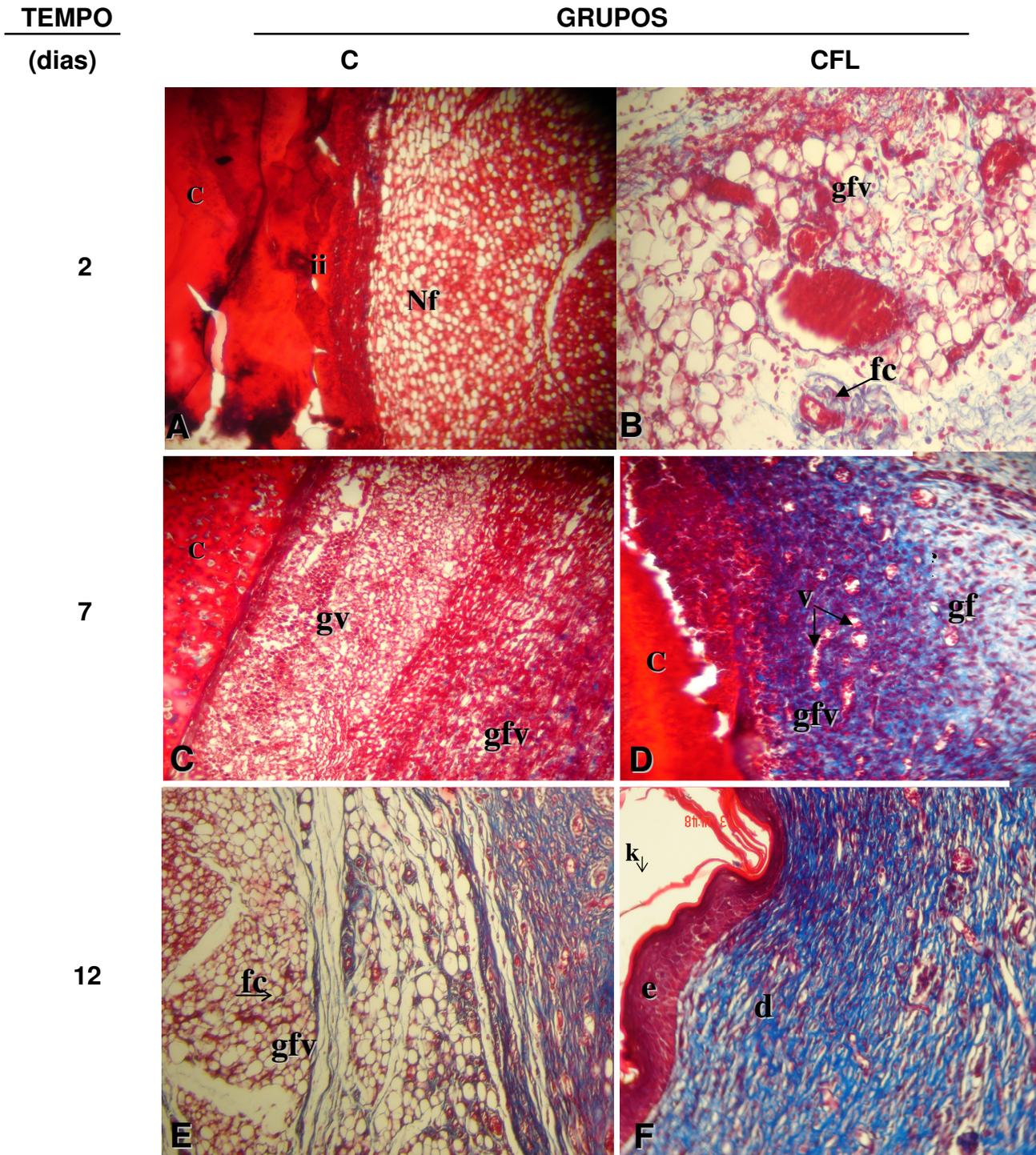


Figura 15 - Evolução temporal dos aspectos histopatológicos representativos das lesões cutâneas experimentais (Tricrômico de Masson) tratadas com salina e CFL. Grupo controle: 2º dia (100x), 7º dia (200x), 12º dia (100x); Grupo CFL: 2º dia (200x), 7º dia (200x), 12º dia (200x); c- crosta; d- derme neoformada; e- epiderme neoformada; fc- fibras colágenas; gf- tecido de granulação fibroso; gfv- tecido de granulação fibrovascular; gv- tecido de granulação vascular; ii- infiltrado inflamatório; k- queratina; Nf- tecido em neoformação; v- vasos sanguíneos.

5.3 Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais

A CFL, quando incubada com cultura de macrófagos peritoneais de camundongos, induziu de forma significativa ($p < 0,05$) aumento da liberação de TNF- α no sobrenadante, quando comparado à liberação por macrófagos não estimulados (incubados apenas com o RPMI). O LPS foi utilizado como controle positivo de estimulação de macrófagos (Figura 16).

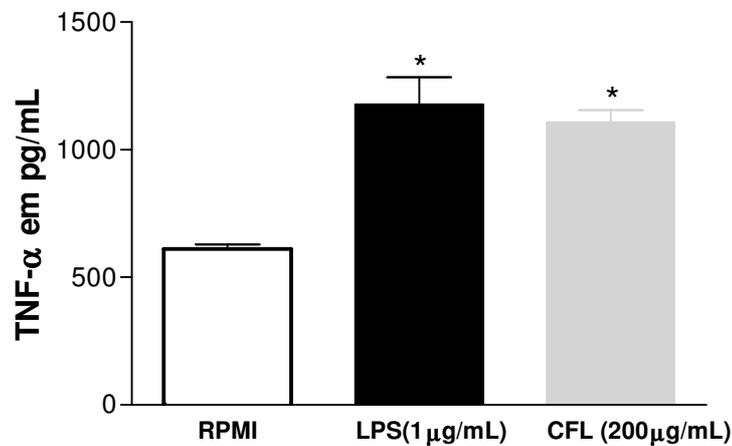


Figura 16 - Lectina de sementes de *Cratylia floribunda* (CFL) induz aumento da liberação de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos. As barras representam as médias \pm EPM dos valores de TNF- α no sobrenadante de macrófagos incubados com RPMI (controle negativo), LPS (1 μ g/mL; controle positivo) e CFL (200 μ g/mL). * $P < 0,05$ representa as diferenças estatísticas em relação ao controle negativo (Teste de Bonferroni- ANOVA).

Discussão

6 DISCUSSÃO

A ferida é algo que leva a dor e ao desconforto, físico e emocional, de modo a fragilizar e incapacitar o indivíduo, deixando marcada uma cicatriz. Em vista disso, o tratamento de feridas vem sendo tema destacado em diversos setores profissionais da área de saúde no mundo todo. Entretanto, não existem na clínica terapias licenciadas, as quais favoreçam de forma satisfatória a deposição de tecido cicatricial em lesões (RHETT *et al.*, 2008). Dessa forma, vêm-se buscando alternativas terapêuticas eficazes, de fácil aplicação e baixo custo, levando assim a um interesse por medicações fitoterápicas e homeopáticas.

A utilização de plantas no tratamento tópico de lesão cutânea fora descrita por Andrade *et al.*, (1999), o qual utilizou o alecrim pimenta (*Lippia sidoides* cham.) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em camundongos. Em adição, outros estudos foram realizados para avaliar o uso de polissacarídeos extraídos da película da cana-de-açúcar (GALEGO; SILVEIRA; D'ACAMPORA, 1997; MONTEIRO *et al.*, 2000), do cajueiro (*Anacardium occidentale*) (GALEGO; SILVEIRA; D'ACAMPORA, 1997; ROCHA, 2000, SCHIRATO *et al.*, 2002), de cogumelos *Pleurotusostreartus* (BONONI *et al.*, 1995), da *Areca catichu* (PADJAMA; BAIRY;, KULKARNI, 1994), e o *Wedelia calendulacea* (HEDGE; KHOSA; CHANSOURIA, 1994) no tratamento de feridas cutâneas.

O processo cicatricial caracteriza-se por ser uma resposta inespecífica às mais diversas agressões ou fatores irritantes, desencadeando-se nos tecidos uma reação inflamatória. Esta reação compreende uma seqüência ordenada de fenômenos, os quais possibilitam a restauração da área lesada, caso haja cessação do fator desencadeante, ou cronificação do processo se tal fator permanecer. A inflamação, portanto, é todo um processo e não apenas uma fase na reparação do tecido. Drogas que interfiram na resposta inflamatória devem modificar o processo de reparação tecidual (PRANDI FILHO *et al.*, 1988).

Segundo Kumar, Wong e Leaper (2004), a reação inflamatória é fundamentalmente um mecanismo de defesa, porém existe a possibilidade de ser prejudicial ao organismo. Evidências moleculares demonstram que os fatores recrutados para prevenir infecções e favorecer os processos de reparo no sítio da lesão podem efetivamente causar danos (BALKWILL; COUSSENS, 2004; GRETEN; KARIN, 2004). Nesse contexto, uma leitura atualizada propõe que os processos

inflamatórios induzidos por injúrias crônicas contribuem para o desenvolvimento em múltiplos estágios das neoplasias (BALKWILL; MANTOVANI, 2001).

A resposta inflamatória consiste em dois componentes principais: uma reação vascular e uma reação celular. Edema e hiperemia são sinais característicos do processo inflamatório, diretamente relacionado com o efeito de mediadores vasoativos que alteram o calibre vascular (BADYLAK, 2002).

Os neutrófilos são as primeiras células que migram dos vasos sanguíneos para o tecido lesionado no intuito de conferir um papel protetor, através da fagocitose, além de favorecer o debridamento da lesão (MALECH; GALLIN, 1987). Entretanto, estudos indicam a participação dos neutrófilos e de suas proteases como mediadores de dano tecidual, estando associados às doenças inflamatórias crônicas, tais como a artrite reumatóide, doença periodontal e a fibrose cística (MALENCH; GALLIN, 1987; SANDHOLM, 1986)

Yager e Nwomeh (1999) relatam a necessidade em investigar agentes antiinflamatórios que possam bloquear de alguma forma a participação dos neutrófilos (quimiotaxia, aderência, infiltração ou degranulação) na fase inflamatória do processo cicatricial. Os glicocorticóides poderiam, inclusive, representar uma categoria de drogas para modular a função neutrofílica, mas é bem esclarecida a capacidade destas drogas em reduzir a fibroplasia, deposição de tecido conectivo e contração da lesão (KELLEY; FELIX; ERLICH, 1990), o que resulta em complicações no processo de reparo.

Lectinas são moléculas valiosas com potencial farmacológico já demonstrado em vários modelos experimentais, apresentando excelentes resultados principalmente em relação à modulação das respostas inflamatórias. Entretanto, a caracterização de possíveis efeitos destas proteínas na cicatrização de feridas tem sido pouco explorada.

Efeitos de lectinas de leguminosas frente a processos inflamatórios, têm sido demonstrados, principalmente pelo nosso grupo de pesquisa. Interessantemente, estas proteínas podem apresentar atividade anti- ou pro-inflamatória dependendo da via de administração utilizada. Além disso, na maioria dos trabalhos têm-se indicado a importância do sítio de ligação à carboidratos de lectinas na sua atividade biológica (ALENCAR *et al.*, 2003, 2004, 2005)

Aparados pelos resultados anteriores os quais demonstram efeitos moduladores da resposta inflamatória para as lectinas, e acreditando na

fundamental importância da modulação da fase inflamatória no processo de cicatrização de feridas, resolvemos investir no estudo do efeito da lectina de *Cratylia floribunda* (CFL), com propriedade antiinflamatória anteriormente descrita (ASSREUY *et al.*, 1997) no modelo de cicatrização de lesões cutâneas.

Neste trabalho, demonstramos que o tratamento tópico com a CFL modulou a fase inflamatória do processo de cicatrização de feridas em camundongos, uma vez que os sinais flogísticos edema e hiperemia ocorreram no grupo CFL por um menor período de tempo, de forma menos frequente e com menor intensidade quando comparado ao grupo controle. De forma menos marcante, o grupo tratado com a lectina apresentou nesta fase uma menor frequência lesões com características exsudativas.

As análises histopatológicas corroboram com as observações macroscópicas em relação à atividade antiinflamatória da lectina neste modelo, uma vez que as amostras do 2º dia de PO já evidenciavam um escasso infiltrado inflamatório em relação ao grupo controle e no 7º dia de PO nenhum infiltrado celular foi observado, enquanto que neste mesmo período, o grupo C ainda apresentava infiltrado celular e crostas espessas totalmente aderidas às lesões.

A adesão ao endotélio é um pré-requisito para a infiltração dos neutrófilos no local da inflamação. Este processo é mediado por um grupo de lectinas denominada selectinas. Estas lectinas que interagem com açúcares e/ou glicoproteínas e são responsáveis pela adesão de leucócitos ao endotélio vascular na cascata precoce de eventos que levam aos processos de inflamação. Elas são necessárias para a migração de leucócitos, sendo o passo inicial na seqüência dos eventos que resultará no extravasamento dos neutrófilos nos sítios de injúria (CRONSTEIN; WEISSMAN, 1993; ROSSITER; ALON; KUPPER, 1997).

A hipótese de que o efeito antiinflamatório das lectinas ocorra através da competição destas com moléculas de adesão pelos seus glico-receptores, inibindo, assim, o rolamento e a adesão dos leucócitos no endotélio vascular, tem sido comprovada por estudos com microscopia intravital (COELHO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006; NAPIMOGA *et al.*, 2007;).

Neste sentido, acreditamos que o efeito da CFL sobre os sinais inflamatórios no modelo de cicatrização aqui estudado, possa está ocorrendo por sua ação no endotélio vascular. Apesar do tratamento por via tópica, acreditamos também que a CFL esteja alcançando os vasos sanguíneos locais pelas seguintes

razões: 1) O trauma tecidual favorece uma exposição da rede capilar, facilitando assim uma melhor absorção da lectina desde o primeiro dia de tratamento. Neste período se observou a maior diferença entre os percentuais de contração das lesões entre os grupos estudados, o que pode ser atribuído à ação anti-edematogênica da lectina; 2) Nos dias subsequentes, apesar da presença da crosta, a sua espessura delgada associada à presença de fissuras permitiram a penetração da lectina em solução; alcançando os vasos delgados em neo-formação que compõe o tecido de granulação.

A crosta começa a ser formada com o exsudato filtrado da ferida que aparece na superfície da pele. Ela proporciona uma proteção limitada contra a contaminação externa, uma manutenção da hemostasia interna e uma superfície sob a qual pode ocorrer a migração de células e o movimento das bordas da lesão (PEACOCK, 1985).

Nossos resultados mostraram que houve formação crostosa de forma semelhante em ambos os grupos a partir de 48 horas de PO. Entretanto, curiosamente notou-se macroscopicamente um prolongamento no tempo de permanência da crosta nas feridas do grupo controle comparado ao grupo tratado com a lectina, tanto que no penúltimo dia de avaliação, 46% dos animais do controle ainda apresentavam esta proteção sobre as lesões, em contraste com a ausência desta sobre as lesões do grupo CFL. Junto aos dados macroscópicos, as análises histopatológicas do 7º dia de pós-operatório evidenciaram o desprendimento precoce das crostas no grupo CFL. Além disso, uma maior frequência de lesões não visualizadas clinicamente a partir do 10º dia de pós-operatório no grupo tratado com a lectina, bem como a visualização precoce e crescente do tecido cicatricial desde o 5º dia de PO.

Desta forma, hipotetizamos que as crostas permaneceram por mais tempo sobre as lesões do grupo controle no intuito de proteger um tecido de granulação ainda imaturo, ocorrendo o desprendimento somente quando o tecido encontrava-se reepitelizado. Seguindo esta mesma linha de raciocínio, acreditamos que uma maior frequência de crostas desprendidas precocemente no grupo CFL possam ser atribuídas à ocorrência antecipada da reepitelização induzida pelo tratamento com a lectina.

Carrel (*apud* Prandi Filho *et al*, 1988) em 1921 mostrou que a inflamação é necessária para que ocorra a cicatrização normal. Por outro lado, reação

inflamatória exagerada, como observada em feridas infectadas, retarda a cicatrização. Deve haver, então, algum grau de inflamação ótimo para o processo de cicatrização, inclusive tem sido aceito que existe um processo de reação inflamatória em feridas limpas com pouco grau de dano tecidual (BRUNIUS *et al.*, 1965). Neste contexto e de acordo com os resultados expostos acima, acreditamos que a CFL ao modular a fase inflamatória do processo cicatricial, contribuiu para uma antecipação da fase de fibroplasia.

O sistema imune desempenha um papel fundamental no processo da cicatrização de lesões cutâneas, pois além de participar da função inflamatória e de defesa do hospedeiro, as células deste sistema liberam citocinas, linfocinas e fatores de crescimento indispensáveis pela continuidade do processo (PARK; BARBUL, 2004). Assim, os macrófagos representam um papel fundamental (RICHES, 1996), ao ponto que, a depleção destas células, bem como a repressão da sua ativação estão associadas a distúrbios na cicatrização (BARBUL, 1990; MOORE; THOMAS; HARDING, 1997). Sua importância não está implicada apenas na degradação tecidual e prevenção de infecções, mas por regular a cicatrização através da liberação de várias citocinas, como TNF- α que parece ser fundamental especialmente durante os estágios iniciais da cicatrização.

O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de feridas que não cicatrizam tem sido focado no estudo dos fatores de crescimento, dentre os quais, o TNF- α , que influencia a reepitelização e especialmente a angiogênese. Esta proteína é uma citocina pró-inflamatória com habilidade de interferir em quase todos os tecidos e sistemas orgânicos. Na cicatrização, confere quimiotaxia para macrófagos, ativando-os, estimulando a angiogênese, proliferação de fibroblastos (SUGARMAN *et al.*, 1985; FAHEY; SHERRY; TRACEY, 1990), aumenta a síntese de prostaglandinas e collagenases pelos fibroblastos (DAYER; BEUTLER; CERAMI, 1985). Na literatura, alguns estudos experimentais demonstram a participação benéfica desta citocina na cicatrização de feridas.

A expressão genética do TNF- α encontra-se reduzido na cicatrização anormal de ferimentos tratados com corticóides em camundongos (HUBNER *et al.*, 1996); o seu efeito na angiogênese foi observado durante a cicatrização de feridas excisionais no dorso de porcos (ROESEL; NANNEY, 1995). Outros estudos evidenciaram concentrações crescentes de TNF- α em tecido de granulação e no fluido de lesões (APPLETON *et al.*, 1993; FORD; HOFFMAN; WING, 1989).

Curiosamente, o TNF- α favorece a reepitelização e a neovascularização quando administrado em baixas doses, tanto por via subcutânea (PIGUET; GRAU; VASSALLI, 1990) como por via tópica (FRANK *et al.*, 2003). Neste mesmo estudo, Frank e colaboradores, demonstraram que o tratamento tópico com TNF- α após a depleção de macrófagos compensa no efeito negativo na reepitelização e na angiogênese.

Outra citocina com significativo impacto na cicatrização é a IL-6, a qual confere diferentes efeitos, dentre os quais, mitogenicidade para queratinócitos (WATANABE; OSAKI; AKAIKE, 1997) e indução da expressão de receptores KGF em fibroblastos (CHEDID *et al.*, 1994), ressaltando, também, que sua contribuição na reepitelização tem sido demonstrada em estudos com camundongos transgênicos para deficiência em IL-6, nos quais a cicatrização foi retardada (CHOI *et al.*, 1994).

Segundo Satoh e Yamazaki (1993), estímulos para a produção de TNF- α aumentam a produção de IL-6, como em queratinócitos, indicando uma relação sinérgica entre estas duas citocinas (ANDREWS; SNYDER, 1991) tão relevante que, a importância desta relação é descrita em estudos, os quais mostram que TNF- α , possivelmente por induzir a produção de IL-6, favorece a regeneração hepática nas hepatectomias e após exposição ao tetracloreto de carbono (CCl₄) (AKERMAN *et al.*, 1992; TAUB, 1996; YAMADA; KIRILLOVA; PESCHON, 1997; BRUCCOLERI *et al.*, 1997).

Durante os últimos anos foi demonstrado que uma grande quantidade de lectinas vegetais é capaz de ativar células do sistema imune (Alencar *et al.*, 2004; Cavada *et al.*, 2001). Segundo Cavada (2001), diversas lectinas extraídas de leguminosas pertencentes à subtribo Diocleinae estimulam a proliferação de linfócitos *in vitro*, dentre elas a lectina de ConBr, DVioL e CFL. Além disso, induzem a produção *in vitro* de várias citocinas por células mononucleares de humanos, tais como TNF- α pela ConBr e DVioL; lectinas estas, que em estudos recentes foram capazes de estimular o processo de reparação de lesões cutâneas em camundongos normais (SCHIRATO, 2006).

Assim, considerando o importante papel do TNF- α no processo cicatricial de feridas, delineamos investigar o possível efeito da lectina de *Cratylia floribunda* em estimular macrófagos *in vitro* à liberação desta citocina. Este estudo nos revelou

que a CFL, quando incubada com cultura de macrófagos peritoneais de camundongos estimula a liberação de TNF- α .

Diante estes resultados e conforme os achados na literatura, hipotetizamos que o tratamento tópico com a lectina possa conferir um estímulo *in vivo* para que macrófagos residentes no tecido lesionado liberem TNF- α , possivelmente favorecendo as seguintes respostas no processo cicatricial: 1) Formação de novos vasos (angiogênese), onde, segundo Stashak (1994), a neovascularização favorece a cicatrização por aumentar o aporte de nutrientes e de células na região afetada, reduzindo o tempo de retração da ferida. Neste contexto, observamos através dos resultados histopatológicos que o tratamento com a lectina favoreceu a formação de uma rede vascular mais organizada desde o 2º dia de PO; 2) Proliferação de fibroblastos e produção de um novo colágeno. A rede vascular desde o 2º dia de PO apresentava-se com aspecto mais resistente, conferido pela presença das fibras colágenas, consistindo um tecido de granulação fibrovascular; este padrão fibroso evoluiu ao longo do tratamento, uma vez que foi evidenciado este aspecto de forma mais consistente nas análises do 7º dia e 12º dia de PO; 3) Possivelmente contribuindo para a produção de IL-6, citocina mitogênica para queratinócitos e que induz a expressão de receptores KGF em fibroblastos; tanto que no 12º dia, as amostras histopatológicas revelaram que as lesões do grupo CFL além de completamente reepitelizadas, estavam recobertas por queratina.

A real evolução do processo cicatricial foi demonstrada pela redução da área das lesões, representado pelo percentual de contração. Nossos resultados mostraram que o grupo CFL apresentou retração das lesões de forma superior ao grupo controle desde os primeiros dias de tratamento. As diferenças entre os percentuais de contração dos grupos no 1º dia PO (diferença de 22,5%) pode ser atribuída à ação anti-edematogênica nas feridas tratadas, reduzindo assim o volume da lesão. Ao passo que no 5º dia de PO (diferença de 20,5%), podemos atribuir ao surgimento de maior quantidade de fibras colágenas fornecida pelos fibroblastos, o que contribui para a contração da lesão; tanto que nas biópsias do 7º dia de PO o principal aspecto verificado foi o predomínio de um tecido de granulação fibrovascular, composto de densas fibras colágenas, enquanto que no grupo controle apenas indícios destas fibras estavam presentes, o qual nos leva a acreditar em uma menor quantidade dos fibroblastos nas lesões sem tratamento. Esta hipótese é

baseada na capacidade do TNF- α em induzir a proliferação de fibroblastos, como também em estudos que demonstram a ação mitogênica de lectinas.

Segundo Cavada *et al.*, (1996), as lectinas possuem ação mitogênica. Lectinas vegetais interagem com resíduos específicos de carboidratos de glicoproteínas da membrana celular e executam função mitogênica mimética (KULKAMI; MCCULLOCH, 1995). Sell e Costa (2003) demonstraram que as lectinas de *Phaseolus vulgaris* (PHA) e a aglutinina do germe de trigo (WGA) induzem a proliferação de fibroblastos *in vitro*.

Assreuy *et al.*, (1997) demonstraram que algumas lectinas pertencentes à subtribo Diocleinae e com especificidade de ligação glicose-manose, apresentam atividade antiinflamatória, entre elas *Dioclea violacea* (DVioL) e *Cratylia floribunda* (CFL). Entretanto, esta atividade biológica não foi observada pela lectina de *Canavalia brasilienses* (ConBr), embora apresente a mesma especificidade de ligação à carboidratos.

Schirato (2006), demonstrou que DVioL e ConBr na mesma dose que a utilizada para a CFL no nosso estudo, favorece a cicatrização de lesões cutâneas, interferindo na fase inflamatória deste processo. Nossos resultados revelaram também este perfil antiinflamatório, inclusive de forma precoce, uma vez que desde o 1° dia de PO apenas 46% dos animais apresentavam edema em contraste com a totalidade do grupo no estudo com a ConBr e DVioL.

Em alguns aspectos, as análises histopatológicas das lesões tratadas pela ConBr e DVioL no 2° dia de PO assemelham-se aos nossos resultados, como a presença de excesso infiltrado inflamatório, porém, neste mesmo período, as lesões tratadas com CFL já apresentavam visíveis fibrilas colágenas, e este padrão somente foi alcançado pelo tratamento com as lectinas ConBr e DVioL no 7° dia de PO.

Entre as lectinas: ConBr, DVioL e CFL, o processo reparativo das lesões apresentou-se mais avançado nos grupos tratados com as lectinas de ConBr e CFL, uma vez que as análises histopatológicas no 12° dia de PO revelaram lesões completamente reepitelizadas, enquanto que neste mesmo período, evidenciou-se uma incompleta reepitelização nas lesões tratadas com DVioL.

Lectinas de sementes da subtribo Diocleinae exibem alta homologia (80-90%) no que diz respeito às suas estruturas primárias (SHARON; LIS, 1990), conferindo a mesma especificidade por resíduos de glicose e manose, além da

grande afinidade pela cadeia de trimanosídeo 3,6-di-O- α -D-manopiranosil)-D-manose (DAM *et al.*, 1998). Além disso, estas lectinas reconhecem os mesmos epítomos na estrutura do trimanosídeo.

Apesar da grande homologia entre as lectinas Diocleinae, estas glicoproteínas podem induzir respostas biológicas distintas. Segundo Cavada *et al.*, (2001) as diferenças observadas entre as propriedades biológicas de lectinas ocorrem devido alterações em três principais parâmetros físico-químicos: Especificidade distinta à carboidratos complexos (GUPTA *et al.*, 1996; DAM *et al.*, 1998); Estado de oligomerização dependente de pH (equilíbrio dimérico-tetramérico), onde apenas a conformação tetravalente interage com receptores da superfície celular, ativando vias de transcrição (GRANGEIRO *et al.*, 1997; CALVETE *et al.*, 1999) e orientação relativa dos sítios de ligação à carboidratos.

O equilíbrio dimérico-tetramérico dependente de pH, modula a capacidade das lectinas ligar-se e agregar de forma específica à determinadas glicoproteínas e glicolipídeos na superfície celular, deflagrando distintas respostas celulares. Pequenas diferenças na estrutura primária têm um impacto no equilíbrio dimérico-tetramérico, resultando nas diferentes conseqüências biológicas (CALVETE *et al.*, 1999).

Sabe-se que a lesão endotelial na área da lesão cutânea compromete o aporte de oxigênio em função da formação do trombo hemostático, ativando o influxo de macrófagos para a área da injúria. Estas células no intuito de conferir uma ação antimicrobiana local liberam radicais de oxigênio, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (LI *et al.*, 2007; PARK; BARBUL, 2004) que conseqüentemente eleva as concentrações de ácido láctico e queda do pH (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Neste contexto, postulamos que as alterações no ambiente da lesão possam alterar o pH local, podendo de alguma forma interferir no estado de oligomerização dependente de pH da lectina. Adicionalmente, não sabemos em que pH a solução com a lectina se mantém após o preparo. Desta forma, hipotetizamos que cada lectina possa apresentar um comportamento distinto neste modelo estudado, deflagrando inesperadas propriedades biológicas após o tratamento.

Baseado nestas hipóteses acreditamos que as diferenças encontradas no nosso estudo em relação ao de Schirato (2006), possam ser ocasionadas em resposta aos seguintes aspectos: 1) pequenas diferenças na estrutura primária de cada lectina, as quais interferem na especificidade por carboidratos complexos; 2)

Estado de oligomerização da lectina em virtude das alterações do pH no ambiente da lesão, além do seu desconhecido comportamento após o preparo da solução, que pode resultar em inesperadas propriedades biológicas.

Grandes desafios ainda permanecem no tratamento de feridas. Muitos produtos estão disponíveis no mercado farmacêutico sem que se conheçam resultados confiáveis sobre a sua utilização. Assim, tendo em vista o crescente interesse em buscar na natureza moléculas com potencial terapêutico, acreditamos que lectina de *Cratylia floribunda* habilita-se como uma alternativa viável na elaboração de drogas para o tratamento lesões cutâneas. Entretanto, são necessários estudos adicionais no sentido de melhor investigar seu mecanismo de ação e potencial alergênico, bem como uma melhor forma farmacêutica para o uso de lectinas em lesões cutâneas.

Considerações Finais

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Lesões tratadas com a lectina de *Cratylia floribunda* (CFL) apresentaram por um menor período de tempo os sinais flogísticos edema e hiperemia, além de terem ocorridos com uma menor frequência e intensidade;
- Acreditamos que o efeito da CFL sobre os sinais inflamatórios no modelo de cicatrização aqui estudado, possa está ocorrendo por sua ação no endotélio vascular.
- A CFL favoreceu o desprendimento espontâneo das crostas de forma antecipada, evidenciando a presença de um tecido cicatricial sobre a área lesionada;
- A presença de tecido cicatricial sobre a área lesionada foi observada de forma precoce e crescente no grupo CFL a partir do 5° dia de PO.
- Notou-se a partir do 10° dia de PO, uma maior frequência de lesões não visualizadas clinicamente no grupo CFL;
- Uma maior retração das lesões desde os primeiros dias de tratamento foi conferida com a utilização tópica da CFL;
- A deposição de um tecido de granulação fibrovascular foi evidenciada de forma antecipada nas análises histopatológicas das lesões tratadas com CFL;
- Estudos *in vitro* demonstraram a capacidade da CFL em estimular a liberação de TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos, sugerindo que *in vivo* este estímulo possa estar ocorrendo.

Conclusões

8 CONCLUSÕES

Os resultados observados neste estudo nos permitem concluir que a lectina de *Cratylia floribunda* modula a fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos, favorecendo uma antecipação da cicatrização. Pode-se postular que o efeito modulatório da CFL sobre a inflamação no modelo estudado ocorra no endotélio vascular local, via inibição da migração de neutrófilos para o tecido lesionado. A estimulação *in vitro* de células residentes (macrófagos) pela CFL favoreceu a liberação de TNF- α . Hipotetizamos que *in vivo* este processo possa estar acontecendo, já que neste estudo evidenciaram-se aspectos favoráveis à fase de fibroplasia (angiogênese e deposição de colágeno) possivelmente conferido pelo TNF- α e que contribuiu para o reparo tecidual. Entretanto, outras abordagens precisam ser realizadas no sentido de melhor caracterizar os efeitos da CFL sobre o processo de cicatrização de feridas, bem como seu mecanismo de ação.

Referências

REFERÊNCIAS

AINOUZ, I.L.; SAMPAIO, A.H.; FREITAS, A.L.P.; BENEVIDES, N.M.B.; MAPURUNGA, S. Comparative study oh hemagglutinins from the red algae *Bryothamniom seaforthii* and *Bryothamniom triquetrum*. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.7, p.15-19, 1995.

AKERMAN, P.P.; COTE, S.Q.; YANG, C.; MCCLAIN, S.; NELSON, G. J.; BAGBY, A. M.; DIEHL. Antibodies to tumor necrosis factor- α inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p.579, 1992.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.; HAVT, A.; BENEVIDES, R.G.; DE MOURA, T.R.; DE SOUSA, R.B.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S.; *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 374, p. 275-282, 2007.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.; CRIDDLE, D.N.; SOUZA, E.P.; SOARES, P.M.; HAVT, A.; ARAGAO, K.S.; BEZERRA, D.P.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. **Prot. Pept. Lett.**, v. 11, p. 195-200, 2004.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, V.B.M.; MELO, S.C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 35, p. 1674-1681, 2003.

ALENCAR, N.M.N.; CAVALCANTE, C.F.; VASCONCELOS, M.P.; LEITE, K.B.; ARAGÃO, K.S.; ASSREUY, A.M.S.; NOGUEIRA, N.A.P.; CAVADA, B.S.; VALE, M.R. Anti-inflammatory and anti-microbial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, p. 919-922, 2005.

ALENCAR, V.B.M.; ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; MOTA, M.L.; BRITO, G.A.C.; ARAGÃO, K.S.; BITENCOURT, F.S.; PINTO, V.P.T.; DEBRAY, H.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 37, p. 1805-1814, 2005a.

ALENCAR, V.B.M.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, N.M.N.; MEIRELES, A.V.P.; MOTA, M.R.L.; ARAGÃO, K.S.; CAJAZEIRAS, J.B.; NAGANO, C S.; BRITO, G A C; SILVA, L I M M; PINTO, V P T; SAMPAIO, A H; DEBRAY, H; CAVADA, B.S.;

RIBEIRO, R.A. Lectin of *Pisum arvense* seeds induces in vivo and in vitro neutrophil migration. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, p. 375-381, 2005b.

ALENCAR, V.B.M.; BRITO, G.A.C.; ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; PINTO, V.P.T.; TEIXEIRA, E.H.; SOUZA, E.P.; DEBRAY, H.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. *Helianthus tuberosus* agglutinin directly induces neutrophil migration, which can be modulated/inhibited by resident mast cells. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 83, p. 659-666, 2005c.

ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T. Lectin induced nitric oxide production. **Cell. Immunol.**, v. 194, n. 1, p. 98-102, 1999.

ANDREWS, L. S.; SNYDER, R. Toxic effects of solvents and vapors. In: AMDUR, M.O.; DOULL, J.; KLAASEN, C.D. (Ed.). **Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons**. Pergamon: New York, 1991.

APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; COLVILLE-NASH, P.R. Temporal and spatial immunolocalization of cytokines in murine chronic granulomatous tissue. Implications for their role in tissue development and repair processes. **Lab. Invest.**, v. 69, p. 405–414, 1993.

ARNOLD Jr, H.L.; ODOM, R.B.; JAMES, W.D. A pele: estrutura básica e função. In: Doença de pele de Andrews. Dermatologia clínica. 8. ed. São Paulo: Malone, 1994. p. 1-14.

ASHTON, J. Managing leg and foot ulcers: the role of Kerraboot. **Br. J. Comm. Nurs.**, v. 9, p. 26-30, 2004.

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

ASSREUY, A.M.; CALVETE, J.J.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S.; ROCHA-FILHO, D.R.; MELO, S.C.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 1796-1803, 2002.

ASSREUY, A.M.S.; MARTINS, G.J.; MOREIRA, E.E.F.; BRITO, G.A.C.; CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Prevention of cyclophosphamide-induced

hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **J. Urol.**, v. 161, p. 1988-1993, 1999.

ASSREUY, A.M.S.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G.J.; SOUZA, M.L.P.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators Inflamm.**, v. 6, p. 201-210, 1997.

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

AZULAY, R.D.; AZULAY D.R. Fisiologia da Reparação tecidual e algumas implicações terapêuticas. In: _____. **Dermatologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. cap 52, p. 816-818.

BADYLAK, S. F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, v.13, p. 377-383, 2002.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.**, v. 41, p. 28-51, 2005.

BALKWILL, F.; COUSSENS, L. M. An inflammatory link. **Nature**, v. 431, p. 405-406, 2004.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, p. 539-545, 2001.

BANKS, W. T. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1 992. p.103-424.

BARAUNA, 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. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 85, p. 160-169, 2006.

BARBUL, A. Immune aspects of wound repair. **Clin. Plast. Surg.**, v. 17, p. 433-442, 1990.

_____. Role of T-cell-dependent immune system in wound healing. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 266, p. 161-175. 1988.

BARBUL, A.; PURTILL, W.A. Nutrition in wound healing. **Clin. Dermatol.**, v. 12, p. 133-140, 1994.

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S. B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L. I. M.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T.; CAVADA, B. S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunol. Investig.**, v. 21, p. 297-303, 1992.

BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R. L.; TEIXEIRA, M.; SANTOS, W. L.; POMPEU, M. L.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T.; CAVADA, B. S.; FALCOFF, E.; BARRAL, A. *In vivo* protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on Balb/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Trop.**, v. 60, n. 4, p. 237-250, 1996.

BARRE, A.; LAUCA, J.; ROUGÉ, P. The three-dimensional structure of lectins: a phonetic and phylogenetic tool for the Leguminosae. **Biochem. Sistem. Ecology**, v. 22, n. 4, p. 401-407, 1994.

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

BEUTH, J.; KO, H.L.; PULVERER, G.; UHLENBRUCK, G. Importance of lectins for the prevention of bacterial infection and cancer metastases. **Glycoconjugate J.**, v. 12, p. 1-6, 1995.

BOOTH, B.A.; POLAK, K.L.; UITTO, J. Collagen biosynthesis by human skin fibroblasts: I. Optimization of the culture conditions for synthesis of type I and type III procollagens. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 607, p.145- 160, 1980.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.

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

BRUCCOLERI, A.R.; GALLUCCI, D.R.; GERMOLEC, P.; BLACKSHEAR, P.; SIMEONOVA, R.G.; THURMAN, M.I.; LUSTER. Induction of early-immediate genes by tumor necrosis factor α contribute to liver repair following chemical-induced hepatotoxicity. **Hepatology**, v. 25, p.133, 1997.

BRUNIUS, U.; ZEDERFELDT, B. Effects of Antiinflammatory treatment on wound healing. **Acta Chir. Scand.**, v. 129, p. 462-467, 1965.

BYERS, P.H. Disorders of collagen biosynthesis and structure. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D.; CHILDS, B.; VOGELSTEIN, B. **The metabolic & molecular basis of inherited disease**. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 5241-5249.

CALVETE, J.J.; COSTA, F.H.F.; SAKER-SAMPAIO, S.; MURCIANO, M.P.M.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; BLOCH, JR.C.; SILVEIRA, S.B.; FREITAS, B.T.; SAMPAIO, A.H. The amino acid of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **Cell. Moll. Life Sci.**, v. 57, p. 343-350, 2000.

CALVETE, J.J.; MORENO-MURCIANO, M.P.; THEAKSTON, R.D.; KISIEL, D.G.; MARCINKIEWICZ, C. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochem J.**, v. 15, p.725-34, 2003.

CALVETE, J.J.; THOLE, H.H.; RAIDÁ, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; ROCHA, I.M.A.; GUIMARÃES, F.N.; CAVADA, B.S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1430, p. 367-375, 1999.

CALVIN, M. Cutaneous wound repair. **Heal. Manag. Public.**, v. 10, n. 1, p.12-32, 1998.

CANTURK, N.Z.; ESEN, N.; VURAL, B. The relationship between neutrophils and incisional wound healing. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v.14, p.108–116, 2001.

CARRINGTON, D.M.; AUFFRET, A.; HANKE, D.E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature**, v. 313, p. 64-67, 1985.

CARVALHO, P. T. C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através de espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos**. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnology uses of the diocleinae subtribe lectins. **Curr. Prot. Pept. Scienc.**, v. 2, p.123-135, 2001.

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*. **Horm. Metab. Res.**, v. 35, p.125-127, 2003.

CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; GRANGEIRO, T.B. Primary structures and functions of plant lectins. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 5, n. 2, p.193-202, 1993.

CAVADA, B.S.; RAMOS, M.V.; CORDEIRO, E.F.; GRANGEIRO, T.B.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.F.V.; MOREIRA, R.A. Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 1, p. 37-42, 1996.

CAVADA, B.S.; SANTOS, C.F.; GRANGEIRO, T.B.; NUNES, E.P.; SALES, P.V.P.; RAMOS, R.L.; DE SOUSA, 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.

CHANG, J.G.; CROWSTON, M.; FRANCESCA CORDEIRO, A.N.; AKBAR, P.T. The Role of the immune system in conjunctival wound healing after glaucoma surgery. **Surv. Ophthalmol.**, v. 45, n. 1, p. 49-68, 2000.

CHEDID, M.; RUBIN, J.S.; CSAKY, KG.; AARONSON, S.A. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p.10753-10757, 1994.

CHOI, I.H.S.; KANG, Y.; YANG, K.; PYUN, H. IL-6 induces hepatic inflammation and collagen synthesis *in vivo*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 95, p. 530, 1994.

CLARK, R.A.F. Wound repair overview and general considerations. In: CLARK, R.A.F. (Ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1996. p. 95-141.

COELHO, M.B.; DE SOUZA, I.A.; FREIRE, M.G.M.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; MACEDO, M.L.R. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. **Toxicon**, v. 48, p. 529-535, 2006.

CORSI, R.C.C. Cicatrização das feridas. Revisão da literatura. **Rev. Bras. Cir.**, v. 84, n. 1, p. 17-24, 1995.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Pathologic basis of disease: neoplasia**. 6. ed. Philadelphia: Saunders, 2000.

CRATYLIA argentea. Disponível em:
<http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Cratylia_argentea.htm>. Acesso em: 19 maio 2008.

CRESSMAN, D. E. L. E.; GREENBAUM, R. A.; DEANGELIS, G.; CILIBERTO, E. E.; FURTH, V.; POLI, R.; TAUB. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. **Science**, v. 274, p.1379, 1996.

CRONSTEIN, B.N.; WEISSMAN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis Rheum.**, v. 136, p.147-157, 1993.

CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: Inhibition by glucocorticoids. **Eur. J. Pharmacol.**, v.129, p. 65-76, 1986.

DAM, T. K.; CAVADA, B. S.; GRANJEIRO, T. B.; SANTOS, C. F.; DE SOUSA, F. A. M.; OSCARSON, S.; BREWER, C. F. Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 12082-12088, 1998.

DAVIS, P. A.; CORLESS, D. J.; ASPINALL, R.; WASTELL, C. Effect of CD4(+) and CD8(+) cell depletion on wound healing. **Br. J. Surg.**, v. 88, p. 298-304, 2001.

DAYER, J.M.; BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. **J. Exp. Med.**, v. 162, p.2163–2168, 1985.

DEODHAR, A.K.; RANA, R.E. Surgical physiology of wound healing: a review. **J. Postgrad. Med.**, v. 43, p. 52-56, 1997.

DETMAR, M.; BROWN, L.F.; BERSE, B. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/ VEGF) and its receptors in human skin. **J. Invest. Dermatol.**, v.108, p. 263-268,1997.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M.C. Wound healing: an overview of acute, Fibrotic and delayed healing. **Front Biosci.**, v. 9, p. 283-289, 2004.

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

DRICKAMER, K. Multiplicity of carbohydrate interactions. **Nature Struct. Biol.**, v. 2, p. 437-439, 1995.

EFRON, D. T.; MOST, D.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound healing. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, v. 3, p. 197-204, 2000.

EFRON, D. T.; MOST, D.; SHI, H. P.; TANTRY, U. S.; BARBUL, A. A novel method of studying wound healing. **J. Surg. Res.**, v. 98, p. 16-20, 2001.

ENOCH, S.; LEAPER, D.J. Basic science of wound healing. **Surgery**, v. 23, p. 37-42, 2007.

FAHEY, T.J.; SHERRY, B.; TRACEY, K.J. Cytokine production in a model of wound healing: the appearance of MIP-1, MIP-2, cachectin/TNF and IL-1. **Cytokine**, v. 2, p. 92-99, 1990.

FLORIAN, R.G.; LARS, E.; TIM, F.G.; JIN, M.P.; ZHI-WEI, LI.; LAURENCE, J. E.; MARTIN, F.K.; MICHAEL,K. IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. **Cell**, v. 118, p. 285-296, 2004.

FORD, H.R.; HOFFMAN, R.A.; WING, E.J. Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model. **Arch. Surg.**, v. 124, p.1422-1428, 1989.

FRANK, J.; BORN, K.; BARKER, J.H.; MARZI, I. In vivo effect of tumor necrosis Factor Alpha on Wound Angiogenesis and Epithelialization. **Eur. J. Trauma**, v. 29, p. 208-219, 2003.

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.

GAILIT, J.; XU ,J.; BUELLER, H.; CLARK, R.A. Platelet-derived growth factor and inflammatory cytokines have differential effects on the expression of integrins alpha 1 beta 1 and alpha 5 beta 1 by human dermal fibroblasts *in vitro*. **J. Cell. Physiol.**, v. 169, p. 281-289, 1996.

GALEGO, G. N.; SILVEIRA, P.; D'ACAMPORA, A. J. Avaliação da glicemia no tratamento de feridas cirúrgicas com açúcar em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 12, n. 2, p.174-177, 1997.

GALLEGO, DEL SOL F.; CAVADA, B.S.; CALVETE, J.J. Crystal structures of *Cratylia foribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer–tetramer transition. **J. Struct. Biol.**, v. 158, p. 1-9, 2007.

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

GOMES, J. C.; FERREIRA, R. R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavaline A. **Agent. Act.**, v. 41, p. 132-135, 1994.

GRANGEIRO, T.B.; GATEHOUSE, J.A.; PEREIRA, M.N.; CAVADA, B.S. Investigation of the origin of the naturally occurring fragments of *Cratylia floribunda* lectin. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 9 , p. 9-13, 1997.

GRETEN, F.R.; KARIN, M. The IKK/NF- κ B activation pathway—a target for prevention and treatment of cancer. **Cancer Lett.**, v. 206, p. 193-199, 2004.

GRINNELL, F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. **Trends Cell Biol.**, v.13, n. 5, p. 264-269, 2003.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue II: ultrastructural aspects. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 6, 66-71, 1992.

GUPTA, D.; OSCARSON, S.; RAJU, T.S.; STANLEY, P.; TOONE, E.J.; BREWER, C.F. A comparison of the fine saccharide binding specificity of *Dioclea grandiflora* lectin and Concanavalin A. **Eur. J. Biochem.**, v. 242, p. 320-326, 1996.

HAAS, H.; FALCONE, F. H.; SCHRAMM, G.; HAISCH, K.; GIBBS, B. F.; KLAUCKE, J.; PÖPPELMANN, M.; BECKER, W. M.; GABIUS, H. J.; SCHAACK, M. Dietary lectins can induce *in vitro* release of IL-4 and IL-13 from human basophiles. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 918-927, 1999.

HALL, L.W.; CLARKE, K.W. **Veterinary anaesthesia**. 9. ed. London: Ballière Tindall, 1991. p.132.

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

HUBNER, G.; BRAUCHLE, M.; SMOLA, H.; MADLENER, M.; FASSLER, R.; WERNER, S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. **Cytokine**, v. 8, p. 548-556, 1996.

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

IRION, G. Anatomia e fisiologia da pele. In: _____. **Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 1, p. 4-25.

JOHNSTON, D. E. Wound healing in skin. **Vet. Clin. North Am.**, v. 20, n. 1, p. 1-25, 1990.

JONES, A.K.; AL-JANABI, M.A.; SOLANKI, K.; SOBNACK, R.; GREENWOOD, A.; DOYLE, D.V.; BRITTON, K.E.; HUSKISSON, E.C. In vivo leukocyte migration in arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 34, p. 270-275, 1991.

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

KELLEY, S.F.; FELIX, A.M.; ERLICH, H.P. Antagonism of glucocorticoid inhibition of wound healing in rats by growth hormone-releasing factor. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 194, p. 320-326, 1990.

KULKAMI, G.V.; MCCULLOCH, C.A. Concanavalin A induced apoptosis in fibroblasts: the role of cell surface carbohydrates in lectin mediated cytotoxicity. **J. Cell. Physiol.**, v. 165, p. 119-133, 1995.

KUMAR, S.; WONG, P.F.; LEAPER, D.J. What's New in Wound Healing? **Turk. J. Med. Sci.**, v. 34, p. 147-160, 2004.

KURAKONDA, S.R.; FLYNN, T.C.; BOH, E.E.; MCBURNEY, E.I.; RUSSO, G.C.; MILLIKAN, L.E. The effects of drugs on wound healing: Part 1. **Int. J. Dermatol.**, v. 39, p. 250-257, 2000.

LAEMMLI, U, K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 227-280, 1970.

LAPLANTE, A.F.; GERMAIN, L.; AUGER, F.A.; MOULIN, V. Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. **FASEB J.**, v.15, p. 2377- 2389, 2001.

LEFKOVITS, J.; PLOW, E.F.; TOPOL, E.J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 1553-1559, 1995.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin. Dermatol.**, v. 25, p. 9-18, 2007.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev.**, v. 98, p. 637-674, 1998.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1572, p.198-208, 2002.

MÄKELÄ, J.T.; KIVINIEMI, H.; JUVONEN, T.; LAITINEN, S. Factors influencing wound dehiscence after midline laparotomy. **Am. J. Surg.**, v. 170, p. 387-390, 1995.

MALECH, H.L.; GALLIN, J.I. Neutrophils in human diseases. Current concepts: immunology. **N. Engl. J. Med.**, v. 317, p. 687-694, 1987.

MANDAI, R.; EGUCHI, Y.; TANAKA, M. SAI, Y.; NOSAKA, S. Effects of profound hemodilution on small-intestinal wound healing in rabbits. **J. Surg. Res.**, v. 99, p. 107-113, 2001.

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

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S.J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol.**, v. 15, n. 11, p. 599-607, 2005.

MARTIN, C.W.; MUIR, I.F. The role of lymphocytes in wound healing. **Br. J. Plast. Surg.**, v. 43, p. 655-662, 1990.

MARX, M.; PERLMUTTER, R.A.; MADRI, J.A. Modulation of platelet-derived growth factor receptor expression in microvascular endothelial cells during *in vitro* angiogenesis. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p.131- 139, 1994.

MILEWICZ, D.M.; URBAN, Z.; BOYD, C. Genetic disorders of the elastic fiber system. **Matrix Biol.**, v.19, p. 471, 2000.

MONTEIRO, V. L. C. Avaliações microbiológicas e histopatológicas de feridas infectadas utilizando-se película de cana-de-açúcar e tratadas por 2a ou 3a intenção. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., Recife, 2000. p. 169-170.

MOORE, K.; THOMAS, A.; HARDING, K.G. Iodine released from the wound dressing Iodosorb modulates the secretion of cytokines by human macrophages responding to bacterial lipopolysaccharide. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 29, p.163-171,1997.

MOREIRA, R.A.; AINOUS, I.L.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 211-218, 1991.

MOREIRA, R.A.; CORDEIRO, E.F.; CAVADA, B.S.; NUNES, E.P.; FERNADES, A.G.; OLIVEIRA, J.T.A. Lectins and the chemotaxonomy of the sub-tribe Diocleinae (Leguminosa-Phaseoleae). **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 7, n. 1, p. 7-14, 1995.

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

MUDERA, V.; EASTWOOD, M.; MCFARLAND, C.; BROWN R.A. Evidence for sequential utilization of fibronectin, vitronectin, and collagen during fibroblast-mediated collagen contraction. **Wound Repair Regen.**, v.10, n. 6, p. 397-408, 2002.

MULLER, W.A. Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends Immunol.**, v. 24, p. 327-334, 2003.

NAPIMOGA, M.H.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.N.; MOTA, M.R.L.; BITENCOURT, F.S.; ALVES-FILHO, J.C.; GRESPAN, R.; GONÇALVES, R.B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; FREITAS, A.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **Int. Immunopharmacol.**, v. 7, p. 824-835, 2007.

NEWMAN, S. L.; HENSON, J. E.; HENSON, P. M. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 156, p. 430-442, 1992.

OLIVEIRA, J.T; CAVADA, B.S; MOREIRA, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart seeds. **Rev. Bras. Bot.**, v.14, p. 61-66, 1991.

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

PANÉS, J.; PERRY, M.; GRANGER, D.N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **Br. J. Pharmacol.**, v. 126, p. 537-550, 1999.

PARK, J.E.; BARBUL, A.B. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **Am. J. Surg.**, v. 187, p. 11S-16S, 2004.

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

PEACOCK JR, E. E. **The wound repair**. Philadelphia: W B Saunders, 1985. p. 76-85.

PEREIRA, G.A. **Dermatologia clínica**. Entendendo a pele. Disponível em: <http://www.gustavoalonso.com.br/dermatoclinica/entendendo_a_pele.php>. Acesso em: 19 maio 2008.

PETERSON, J.M; BARBUL, A; BRESLIN, R. J; WASSERKRUG, H.L; EFRON, G. Significance of T-lymphocytes in wound healing. **Surgery**, v.102, p.300-305, 1987.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectin as plant defence proteins. **Plant Physiol.**, v. 109, p. 347-352, 1995.

_____. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotech. Genet. Eng. Rev.**, v. 15, p. 199-228, 1998.

PIGUET, P.F.; GRAU, G.E.; VASSALLI, J-D. Subcutaneous perfusion of tumor necrosis factor induces local proliferation of fibroblasts, capillaries and epidermal cells, or massive tissue necrosis. **Am. J. Pathol.**, v. 136, p.103-110, 1990.

PIZARRO, E. A.; CARVALHO, M. A.; RAMOS, A. K. B. Introdução y evaluación de leguminosas forrajeras arbustivas en el cerrado brasileño. In: PIZARRO, E. A.; CORADIN, L. (Ed.). **Potencial del género *Cratylia* como leguminosa forrajera: Memorias del Taller sobre *Cratylia***. Brasilia: EMBRAPA/CENARGEN/CPAC/CIAT, 1995. p. 40-49.

POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H.; STIRTON, C.H. Revolution and systematics of the Leguminosae. In: POLHILL, R.M.; RA, P.H. (Ed.). **Advancis in legumes systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. part. 1, p.1-26.

PRANDI FILHO, W.; SIMÕES, M.J.; KULAY JR., L.; GONDENBERG, S. Aspectos morfológicos e morfométricos do processo inflamatório provocado por fio de algodão no subcutâneo de ratos tratados com diclofenaco sódico. **Acta Cir. Bras.**, v. 3, p. 32-37, 1988.

PRATA, M.B.; HADDAD, C.M.; GOLDENBERG, S. Uso tópico do açúcar em feridas cutâneas, estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 3, n. 2, p. 43-48, 1998.

PRATHIBA, V.; GUPTA, P.D. Cutaneous wound healing: significance of proteoglycans in scar formation. **Curr. Sci. Indian**, v. 78, p. 1-5, 2000.

QUEIROZ, L. P. ; CORADIN, L. Biogeografia de *cratylia* e áreas prioritárias para coleta. In: PIZARRO, E. A.; CORADIN, L. (Ed.). **Potencial del género *cratylia* como leguminosa forrajera**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, CPAC y CIAT, 1995. p. 1-28.

RAMOS, M.V.; BOMFIM, L.R.; BANDEIRA, G.P.; DEBRAY, H. Evidence of an endogenous lectin receptor in seeds of the legume *Cratylia floribunda*. **Braz. J. Plant Physiol.**, v.14, p. 195-202, 2002.

RAMOS, M.V; MOREIRA, R.A; CAVADA, B.S; OLIVEIRA, J.T.A; ROUGÉ, P. T. Interaction of lectins from sub-tribe Diocleinae with specific ligands. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 8, p.193-199, 1999.

RAMSEY, D.T.; POPE, E.R.; WAGNER, C.; BERG, J.N.; SWAIM, SF. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 56, n. 7, p. 941-949, 1995.

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

RHETT, J.M.; GAUTAM, S.G.; JOSEPH, A.P.; MICHAEL, O.; MICHAEL, J. Y.; ROBERT, G.G. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. **Trends Biotechnol.**, v. 26, p.173-180, 2008.

RICHES, D.W. Macrophage involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: CLARKE, R, (Ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum Press, 1996. p. 95–141.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. Tecido de renovação e reparação: regeneração, cicatrização e fibrose. In: _____. **Patologia**. Bases patológicas das doenças.: 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. cap. 3, p.112-123.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B. S.; OLIVEITA, J. T. A.; MOREIRA, R. A.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intra-peritoneal administration of glucose/mannose-binding lectins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 25, p. 823-826, 1992.

ROESEL, J.F.; NANNEY, L.B. Assessment of differential cytokine effects on angiogenesis using an in vivo model of cutaneous wound repair. **J. Surg. Res.**, v. 58, p.449–59, 1995.

ROSSITER, H.; ALON, R.; KUPPER, T.S. Selectins, T-cell rolling and inflammation. **Mol. Med. Today**, v. 3, n. 5, p. 214-222, 1997.

RUIZ, A.R.; De la TORRE, R.A.; ALONSO, N.; VILLAESCUSA, A.; BETANCOURT, J.; VIZOSO, A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 52, p. 123–127, 1996.

SACCHENETTI, J.C.; BREWER, C.F. Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm of supermolecular assembly and signal transduction. **Biochemistry**, v. 40, p. 3009-3015, 2001.

SANDHOLM, L. Proteases and their inhibitors in chronic and inflammatory periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 13, p. 19-26, 1986.

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

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

SATOH, M.; YAMAZAKI, M. In vitro DNA synthesis of mouse hepatocytes stimulated by tumor necrosis factor is inhibited by glucocorticoids and prostaglandin D₂ but enhanced by retinoic acid. **J. Cell. Physiol.**, v. 157, n. 1, p. 104, 1993.

SCHÄFFER, M. R.; TANTRY, U.; THORNTON, F. J.; BARBUL, A. Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice. **Eur. J. Surg.**, v. 165, p. 262-267, 1999.

SCHAFFER, M.; BARBUL, A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. **Br. J. Surg.**, v. 85, p. 444-460, 1998.

SCHIRATO, G.V. **Avaliação da atividade cicatrização das lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea violacea* em lesões cutâneas em camundongos.** 2006. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

SCHIRATO, G.V.; PAIVA, M.G.; MONTEIRO, F.M.F.; SILVA, F.O.; LIMA-FILHO, J.L.; CARNEIRO LEÃO, A.M.; PORTO, A.L.F. **Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) como biomaterial na reepitelização de lesões cutâneas experimentais em camundongos** In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2., Recife, 2002.

SELL, A.M.; COSTA, C.P. Effects of plant lectins on in vitro fibroblast proliferation. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 46, p. 349-354, 2003.

SENGER, D.R.; CLAFFEY, K.P.; BENES, J.E.; PERRUZZI, C.A.; SERGIOU, A.P.; DETMAR, M. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 94, n. 25, p. 13612-13617, 1997.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemmagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, p. 53-62, 2004.

_____. Legume lectins- a large family of homologous proteins. **FASEB J.**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SHI, H. P.; MOST, D.; TANTRY, U.; FISCHER, M. H.; BARBUL, A. The role of iNOS in wound healing. **Surgery**, v. 130, p. 225-229, 2001.

SHIMIZU, T. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. **J. Dermatol. Sci.**, v. 37, p. 65-73, 2005.

SILVA, G.P.; MORENO, A.N.; MARQUES, F.; OLIVER, C.; JAMUR, M.C.; CASTELO, A.P.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1760, p. 86-94, 2006.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Mechanisms of disease: cutaneous wound healing. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, p. 738-746, 1999.

SINGH, J.; KAMBOJ, S. S. A novel mitogenic and antiproliferative lectin from a wild cobra lily, *Arisaema flavum*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 318, p. 1057-1065, 2004.

SINGH, R.S.; TIWARY, K.; KENNEDY, J. F. Lectins: sources, activities and applications. **Crit. Rev. Biotech.**, v. 19, n. 2, p. 145-178, 1999.

SLAVIN, J. The role of cytokines in wound healing. **J. Pathol.**, v. 178, p. 5-10, 1996.

SPRONG, T.; DOMINIC, L.J.; NIGEL, J.K.; TURNER, M.W.; VAN DER LEYD, P.; STEEGHS, L.; JACOBS, L.; VAN DER MEER, J.W.M.; VAN DEUREN, M. Mannose

binding lectin enhances IL-1b and IL-10 induction by non-lipopolysaccharide (LPS) components of *Neisseria meningitidis*. **Cytokine**, v. 28, p. 59-66, 2004.

STALLMEYER, B.; KAMPFER, H.; KOLB, N.; PFEILSCHIFTER, J.; FRANK, S. The function of nitric oxide in wound repair: Inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. **J. Invest. Dermatol.**, v. 113, p. 1090-1098, 1999.

STASHAK, T.S. Principles of wound healing. In: _____. (Ed.). **Equine wound management**. London: Lea & Febinger, 1994. p.1-18.

STOUT, R.D.; SUTTLES, J.T. Cell signaling of macrophage function in inflammatory disease. **Front. Biosci.**, v. 2, p. D197-206, 1997.

SUGARMAN, B.J.; AGGARWAL, B.B.; HASS, P.E.; FIGARI, I.S.; PALLADINO, M.A. JR.; Shepard, H.M. Recombinant human tumor necrosis factor alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. **Science**, v. 230, p. 943-945, 1985.

SUMMER, J.B.; HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with concanavalin A. **J. Bacteriol.**, v. 32, p. 227-237, 1936.

SUN, T.T.; COTSARELIS, G.; LAVKER, R.M. Hair follicular stem cells: the bulge activation hypothesis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 96, p. 77S- 78S, 1991.

SZPADERSKA, A. M.; DIPIETRO, L. A. Inflammation in surgical wound healing: Friend or foe?. **Surgery**, v. 137, p. 571-573, 2005.

TAKTAK, Y.S.; SELKIRK, S.; BRISTOW, A.F.; CARPENTER, A.; BALL, C.; RAFFERTY, B.; POOLE, S. Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 43, p. 578-582, 1991.

TAUB, R. Liver regeneration. IV. Transcriptional control of liver regeneration. **FASEB J.**, v. 10, p. 413, 1996.

TEXEIRA, E.H.; NAPIMONGA, M.H.; CARNEIRO, V.A.; OLIVEIRA, T.M.; CUNHA, R.M.S.; HAVT, A.; MARTINS, J.L.; PINTO, V.P.T.; GONÇALVES, R.B.; CAVADA, B.S. *In vitro* inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **J. Appl. Microbiol.**, v. 101, p. 111–116, 2006.

TIMOSHENKO, A. V.; LAN, Y.; GAIBUS, H. J.; LALA, P. K. Immunotherapy of C3H/HeJ mammary adenocarcinoma with interleukin-2, mistletoe lectin on their combination: effects on tumor growth, capillary leakage and nitric oxide (NO) production. **Eur. J. Cancer**, v. 37, p. 1910-1920, 2001.

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

UITTO, J.; PULKKINEN, L.; MCLEAN, W.H. Epidermolysis bullosa: a spectrum of clinical phenotypes explained by molecular heterogeneity. **Mol. Med. Today**, v. 3, p. 457-465, 1997.

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

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with biological roles. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

VAN PARRIJS, J.; BROEKAERT, W. E.; GOLDSTEIN, J. L.; PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (Hevein brasiliensis) latex. **Planta**, v. 183, n. 2, p. 258-262, 1991.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Cir. Res.**, v. 92, n. 2, p. 827- 839, 2003.

WANG, H. X.; NG, T. B.; LIU, W. K.; OOI, V. E. C.; CHANG, S. T. Isolation and characterization of two distinct lectins with anti-proliferative activity from the cultured mycelia of mushroom *Tricholoma mongolicum*. **Int. J. Peptide Prot. Res.**, v. 46, p. 508-513, 1996.

WATANABE, Y.H.; OSAKI, T.; AKAIKE, T. NF- κ B bifunctionally induces proliferation in primary hepatocytes: role of cell anchorage and spreading. **J. Immunol.**, v.159, n. 10, p. 4840, 1997.

WEIS, W.I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 65, p. 441-473, 1996.

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

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

WITTE, M.B.; BARBUL, A. Princípios gerais da cicatrização de feridas. **Clín. Cir. Am. Norte**, v. 3, p. 509-528, 1997.

_____. Role of nitric oxide in wound repair. **Am. J. Surg.**, v. 183, p. 406-412, 2002.

YAGER, D.R.; NWOMEH, B.C. The proteolytic environment of chronic wounds. **Wound Rep. Reg.**, v. 7, p. 433-441, 1999.

YAMADA, Y., N. FAUSTO. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. **Am. J. Pathol.**, v. 152, p. 157, 1998.

YAMADA, Y.I.; KIRILLOVA, J. J.; PESCHON, N. F. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, n. 4, p.1441-1446, 1997.

YAMASAKI, K.; EDINGTON, H. D.; MSCLOSKEY, C.; TZENG, E.; LIZONOVA, A.; KOVESDI, I.; STEED, D. L.; BILLIAR, T. R. Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 967-971, 1998.

Apêndice

DESTACAMENTO DA CROSTA (1- PRIMEIRA CROSTA, 2- SEGUNDA CROSTA)

DIAS	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
FRAGMENTO												
BLOCO												

EXPOSIÇÃO DO TECIDO DE GRANULAÇÃO (SIM- S, NÃO-N)

DIAS	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12

EXSUDATO INFLAMATÓRIO (A- AUSENTE, L- LEVE, M- MODERADO, I- INTENSO)

DIAS	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12

CARACTERÍSTICA DO EXSUDATO INFLAMATÓRIO (SER- SEROSA, SAN-SANGUENOLENTA, PUR- PURULENTA, PUR/SAN- PURULENTA + SA NGUE)

DIAS	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
AUSENTE												
PRESENTE												

VISUALIZAÇÃO DO TECIDO CICATRICAL (A- AUSENTE, P- PRESENTE)

DIAS	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12

DIÂMETROS DA FERIDA

DIAS	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
HORIZONTAL												
VERTICAL												

DIAGRAMA**COMENTÁRIOS**

0		
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		