



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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DAS LECTINAS
DE SEMENTES DE *Canavalia brasiliensis* E *Dioclea violacea*
EM LESÕES CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS**

GIULIANA VIEGAS SCHIRATO

**RECIFE
2006**

GIULIANA VIEGAS SCHIRATO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DAS LECTINAS
DE SEMENTES DE *Canavalia brasiliensis* E *Dioclea violacea*
EM LESÕES CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS**

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

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

CO-ORIENTADORA:

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

RECIFE

Fevereiro de 2006

Schirato, Giuliana Viegas

Avaliação da atividade cicatrizante das lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea violacea* em camundongos / Giuliana Viegas Schirato. – Recife : O Autor, 2006.

xvii, 122 folhas : il., tab., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Ciências biológicas – Microbiologia. 2. *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea violácea* – Lectinas – Avaliação da atividade cicatrizante e antimicrobiana. 3. Lesões cutâneas em camundongos – Avaliação clínica e tratamento tópico. I. Título.

**579.62
579**

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

**UFPE
BC2006-180**

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, NÍVEL MESTRADO, DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Aos dez dias do mês de fevereiro de dois mil e seis, às nove horas, no Auditório do Centro de Ciências Biológicas, realizou-se a defesa de dissertação apresentada pela Mestranda **Giuliana Viegas Schirato**, intitulada: "**Avaliação da atividade cicatrizante das Lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea violacea* em lesões cutâneas em camundongos**". A Banca Examinadora foi homologada em vinte e quatro de janeiro de dois mil e seis, pela PROPESQ, tendo como membros titulares, os Professores: **Ana Lúcia Figueiredo Porto** (orientadora), Doutora em Engenharia Química, pela Universidade Estadual de Campinas/SP, **Benildo Sousa Cavada**, Doutor em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade de Toulouse, França, **Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão**, Doutora em Ciências, pela Universidade Federal do Paraná, **José Luiz de Lima Filho**, Doutor em Bioquímica, pela Universidade da Saint. Andrews, Escócia, e **Valéria Régio Alves Pereira**, Doutora em Biologia Celular e Molecular, pela Fundação Oswaldo Cruz, suplentes. A Prof.^a Ana Porto deu início à Sessão, para apresentação de defesa a **quarta** do ano e a **quarta** do Mestrado. Agradeceu a presença de todos e passou a palavra à Mestranda que efetuou a apresentação de sua tese durante trinta e cinco minutos. Continuando, a Prof.^a Ana Porto solicitou à Comissão Examinadora a ocupar seus lugares. A seguir, procedeu-se à arguição na seguinte ordem: Dr. Benildo Cavada (1º examinador); Dr.^a Ana Carneiro Leão (2º examinador); Dr.^a Ana Porto (3º examinador). Continuando, a presidenta fez agradecimentos e em seguida solicitou dos convidados que se retirassem por alguns minutos a fim proceder a avaliação. A Banca Examinadora atribuiu a **Giuliana Viegas Schirato** a seguinte menção: "**Aprovada com Distinção**" por unanimidade. Face ao resultado a mesma está apta a colar o grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área **Microbiologia**, pela Universidade Federal de Pernambuco. Nada mais havendo a tratar a sessão foi encerrada e para constar eu, Adenilda Eugênia de Lima, Secretária, lavrei, datei e assinei a presente ata que também assinam os demais presentes. Recife, 10 de fevereiro de 2006.

Ana Maria C. Silva, Valéria Régio Alves Pereira, Giuliana Viegas Schirato, Maria de S. Bualcantti, Luiz Carlos Almeida, Fernando Adalberto Filho, Rosângela de S. Monteiro, Flávia Silva, Rosângela de S. Monteiro, Flávia de S. Monteiro, Mariana Viegas Schirato

Dedico à Maria Valderez Viegas, minha mãe, pela força, incentivo, paciência e amor por mim durante todas as etapas de minha vida.

A Flávio de Oliveira Silva, meu grande amigo, o meu muito obrigada por seu auxílio na elaboração deste trabalho e por sua amizade.

Agradecimentos

A Deus, por minha saúde, família e amigos.

À Dra. Suely Galdino, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da UFPE e à Adenilda Eugênia, secretária, pela dedicação e competência.

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

Às minhas orientadoras Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto e Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, por terem me dado a oportunidade de trabalhar neste projeto; dispensando-me inestimável colaboração, apoio e paciência.

Ao Dr. Benildo de Sousa Cavada, pela colaboração científica e fornecimento das lectinas utilizadas neste trabalho.

A Mário Melo Júnior, Carmelita de Lima Cavalcante e Jorge Luiz Araújo Filho, pela colaboração nas análises histopatológicas.

À Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha, pelo fornecimentos dos microrganismos utilizados nos ensaios *in vitro*.

A Roni Evêncio, pela colaboração técnica e apoio.

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

À Flaviane Monteiro, Juciene Rodrigues e Joana Firmino, pela colaboração neste trabalho, incentivo e sugestões.

Aos Professores Dr. Paulo Andrade e Dr. Luiz Bezerra de Carvalho, pelos conhecimentos fornecidos durante as disciplinas ministradas.

À minha grande amiga Daniela Karina de Souza, pela sua amizade e seu apoio constante em minha vida.

Aos Pesquisadores do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – CPqAM, Dra. Norma Lucena, Dra. Valéria Pereira, Dr. Luiz Carlos Alves e Dr. Fábio Brayner, por confiarem em meu trabalho como médica veterinária e pelo apoio em mais esta etapa de minha vida.

À Dra. Elizabeth Malagueño de Santana, coordenadora do Biotério do CPqAM, por sua compreensão em meus momentos de ausência do trabalho para elaboração da dissertação.

Aos meus grandes amigos e colegas de trabalho Eduardo Farias, Aline Cândido, Maria da Conceição Batista, Maria Fernandes, Fábio Mendonça, Mineo Nakazawa, Renata Ramos, Camila Melo, Karla Barbosa, Priscila Santos, Elizângela Dias, Fábica Lira, Karina Saraiva, Andréia Barros, Cláudia Lopes e Fabiana Letícia pela amizade, companheirismo e solidariedade.

A todos meus colegas de turma, em especial: Manuel Messias, Morse Júnior, Juliana Luna, Jaciana Aguiar e Adriana Antunes.

A todos do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, em especial aos estagiários do setor de Biotecnologia.

A todos que colaboraram de forma direta ou indiretamente na concretização deste trabalho, com certeza, sem a ajuda de todos vocês não seria possível realizá-lo.

Meus sinceros agradecimentos.

Sumário

Lista de Tabelas e Figuras.....	I
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	III
Resumo	IV
Abstract.....	VI
<i>1. INTRODUÇÃO</i>	1
<i>2. JUSTIFICATIVA</i>	4
<i>3. OBJETIVOS</i>	6
3.1. Objetivo geral.....	7
3.2. Objetivos Específicos.....	7
<i>4. REVISÃO DE LITERATURA</i>	8
4.1. Cicatrização.....	9
4.2. Tratamento de lesões cutâneas.....	19
4.3. Lectinas	22
<i>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	32
<i>6. ARTIGO</i>	52
<i>7. CONCLUSÕES</i>	79
<i>8. ANEXOS</i>	81

Lista de Tabelas e Figuras

- Tabela 1:** Fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial de lesões cutâneas (extraído de AUKHIL, 2000). 12
- Figura 1:** Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas. Fonte: *Experts Reviews in Molecular Medicine* ©, 2003. Cambridge University Press. 10
- Figura 2:** Percentual de edema nos grupos experimentais. Grupo C (NaCl 150mM); grupo ConBr50 (lectina ConBr 50 µg/mL); grupo ConBr100 (lectina ConBr 100µg/mL); grupo DVioL50 (lectina DVioL 50 µg/mL); grupo DVioL 100 (lectina DVioL 100µg/mL). 71
- Figura 3:** Percentual de hiperemia nos grupos experimentais. Grupo C (NaCl 150mM); grupo ConBr50 (lectina ConBr 50 µg/mL); grupo ConBr100 (lectina ConBr 100µg/mL); grupo DVioL50 (lectina DVioL 50 µg/mL); grupo DVioL 100 (lectina DVioL 100µg/mL). 72
- Figura 4:** Aspectos macroscópicos das lesões experimentais. Segundo dia pós-operatório (PO): **A**, grupo C (NaCl 150mM); **B**, grupo ConBr50 (lectina ConBr 50 µg/mL); **C**, grupo ConBr100 (lectina ConBr 100µg/mL); **D**, grupo DVioL50 (lectina DVioL 50 µg/mL); **E**, grupo DVioL100 (lectina DVioL 100µg/mL). Sétimo dia PO: **F**, grupo C; **G** ConBr50; **H**, ConBr100; **I**, DVioL50; **J**, DVioL100. Décimo segundo dia PO: **K**, grupo C; **L** ConBr50; **M**, ConBr100; **N**, DVioL50; **O**, DVioL100. 73
- Figura 5:** Área da lesão (cm²) e tempo (dias) após o tratamento tópico utilizando NaCl, lectina de *Canavalia brasiliensis* (50 mg/mL e 100 mg/mL), lectina de *Dioclea violacea* (50 mg/mL e 100 mg/mL). 74
- Figura 6:** Presença de *Staphylococcus* sp. nas feridas cirúrgicas experimentais. Grupo C (NaCl 150mM); grupo ConBr50 (lectina ConBr 50 µg/mL); grupo ConBr100 (lectina

ConBr 100µg/mL); grupo DVioL50 (lectina DVioL 50 µg/mL); grupo DVioL 100 (lectina DVioL 100µg/mL)..... 75

Figura 7: Aspectos histopatológicos das lesões experimentais, 2º dia de pós-operatório:

Tricrômico de Masson. **A** (100X), grupo C (NaCl 150mM); **B** (100X), grupo ConBr50 (lectina de *Canavalia brasiliensis* 50µg/mL); **C** (400X), grupo ConBr50, **D** (100X), grupo ConBr100 (lectina ConBr 100µg/mL), **E** (100X), grupo DVioL50 (lectina de *Dioclea violacea* 50µg/mL); **F** (100X), grupo DVioL100 (lectina DVioL 100µg/mL). c – crosta; nf – tecido conjuntivo neo-formado; i – infiltrado de neutrófilos; a – angiogênese. 76

Figura 8: Aspectos histopatológicos das lesões experimentais, 7º dia de pós-operatório:

Tricrômico de Masson. **A** (100X), grupo C (NaCl 150mM); **B** (100X), grupo ConBr50 (lectina de *Canavalia brasiliensis* 50µg/mL); **C** (100X), grupo ConBr100 (lectina ConBr 50µg/mL); **D** (100X), grupo DVioL50 (lectina de *Dioclea violacea* 50µg/mL); **E** (100X), grupo DvioL100 (lectina DVioL 100µg/mL); **F** (400X), grupo DvioL100. c – crosta; fv – tecido de granulação fibrovascular; v – vasos sangüíneos; → - fibroblastos. 77

Figura 9: Aspectos histopatológicos das lesões experimentais, 12º dia de pós-operatório:

Tricrômico de Masson. **A** (100X), grupo C (NaCl 150mM); **B** (100X), grupo ConBr50 (lectina de *Canavalia brasiliensis* 50µg/mL); **C** (100X), grupo ConBr100 (lectina ConBr 50µg/mL); **D** (400X), grupo ConBr100; **E** (100X), grupo DVioL50 (lectina de *Dioclea violacea* 50µg/mL); **F** (100X), grupo DvioL100 (lectina DVioL 100µg/mL). c – crosta; fv – tecido de granulação fibrovascular; v – vasos sangüíneos; d – derme; ep – epiderme; k – queratina; ac – anexos cutâneos; tc – tecido cicatricial; r – reepitelização..... 78

Lista de Abreviaturas e Siglas

1. COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
2. Con A – Lectina de semente de *Canavalia ensiformis*
3. ConBr – Lectina de semente de *Canavalia brasiliensis*
4. DVioL – Lectina de semente de *Dioclea violacea*
5. FC – Fator de crescimento
6. IFN- γ – Interferon gama
7. IL-4 – Interleucina 4
8. LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
9. MEC – Matriz extracelular
10. MMP – Metaloproteases de Matriz
11. NO – Óxido Nítrico
12. PO – Período pós-operatório
13. TGF- β - Fator de crescimento transformante beta
14. TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
15. UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

Resumo

Lectinas são proteínas (ou glicoproteínas) não pertencentes ao sistema imunológico, capazes de reconhecer sítios específicos em moléculas e ligar-se a carboidratos, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas desses sítios. *Canavalia brasiliensis* e a *Dioclea violacea* são leguminosas pertencentes à subtribo Diocleinae, das quais são extraídas as lectinas ConBr e DVioL, respectivamente. Com o objetivo de avaliar a influência do tratamento tópico com estas lectinas no processo cicatricial de feridas cutâneas, foi produzida uma ferida na região dorsal torácica (1 cm²) em camundongos (*Mus musculus*) albinos suíços, divididos em cinco grupos (n=15/grupo), segundo o tratamento empregado: Grupo C (NaCl 150 mM); Grupo ConBr50 (ConBr 50 µg/mL); Grupo ConBr 100 (ConBr 100 µg/mL); Grupo DVioL50 (DVioL 50 µg/mL) e Grupo DVioL100 (DVioL 100 µg/mL). Foram aplicados diariamente 100 µL de cada solução e ao longo de todo o período pós-operatório (PO) (até o 12^o dia), as feridas foram submetidas à avaliação clínica. Biópsias para análise histopatológica e exames microbiológicos foram realizados nos 2^o, 7^o e 12^o dias de pós-operatório (PO). A atividade antimicrobiana das lectinas citadas foi testada frente às bactérias *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp. Durante a avaliação clínica, foi observado que os grupos tratados com a lectina apresentaram sinais flogísticos menos intensos quando comparados ao grupo controle (NaCl 150mM). No 12^o dia PO, os animais tratados com a lectina ConBr 100 µg/mL apresentaram um percentual de contração na ordem de 96,40%, superior aos demais grupos estudados. As lectinas testadas não apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* frente aos microrganismos testados, porém durante os testes *in vivo*, no grupo ConBr100, nenhum microrganismo foi isolado das lesões cutâneas. Sob o aspecto histopatológico, o grupo ConBr100 apresentou o processo cicatricial mais avançado no 12^o dia de avaliação,

observando-se reepitelização, tecido de cicatricial de padrão fibroso com fibras colágenas bem organizadas e início de formação dos anexos cutâneos. O presente estudo oferece evidência farmacológica preliminar sobre o uso das lectinas ConBr e DVioL para promover o processo de cicatrização.

Palavras-chave: Lectinas; *Canavalia brasiliensis*; *Dioclea violacea*; atividade antimicrobiana; cicatrização; feridas cutâneas.

Abstract

Lectins are carbohydrate binding proteins or glycoproteins of non-immune origin capable of specific recognition of, and reversible binding to, carbohydrates without altering their covalent structure. The lectins from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) and *Dioclea violacea* (DVioL) seeds are sugar-binding specificity [D-mannose (D-glucose)] proteins. The effect of the topical treatment of ConBr and DVioL was evaluated in the cutaneous wound healing. Surgical wounds (1 cm²) were produced aseptically in the dorsal thoracic region in albino Swiss mice. The mice were divided into five groups (n=15/group), each wound was daily topically treated (100µL) along 12 days, as follows: 150mM NaCl (C group); 50 µg/ml ConBr lectin (ConBr50 group); 100µg/mL ConBr lectin (ConBr100 lectin); 50 µg/ml DVioL lectin (DVioL50 group); 100µg/mL DVioL lectin (DVioL 100 lectin). During the postoperative period (PO), the wounds were submitted to the clinical evaluation until the 12th day. Histopathological and antimicrobial evaluations of the injuries were carried out in 2nd, 7th and 12th days PO. Antibacterial activity *in vitro* tests were carried out against *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp. During the clinical evaluation, it was observed that the groups treated with the lectins had presented less intense inflammatory signs when compared with the control group (NaCl 150mM). At 12th day PO, the animals treated with ConBr 100 µg/mL had presented contraction percentage (96,40%) superior to the other studied groups. The tested lectins did not present antimicrobial activity to the tested microorganisms, however during *in vivo* tests, in the ConBr100 group, any microorganism was isolated from cutaneous injuries. Under the histopathologic aspect, the ConBr100 group presented the more advanced wound healing process at 12th day of evaluation, showing re-epithelialization, cicatricial tissue of fibrous aspect with collagen fibrils well-advanced organization and beginning of formation of the

cutaneous enclosures. These results suggest the possible clinical employment of the ConBr and DVioL lectins.

Keywords: Lectins; *Canavalia Brasiliensis*; *Dioclea violacea*; Antimicrobial Effect; Wound Healing; Cutaneous Wounds

1.INTRODUÇÃO

O processo de reparo ocorre com o objetivo de restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido perdidas, caracterizando-se por uma sucessão complexa de eventos bioquímicos e celulares em resposta à lesão tecidual. Para que um ferimento seja curado com êxito, os eventos devem suceder-se em uma seqüência apropriada e o resultado final é geralmente uma cicatriz de tecido conjuntivo, representando o somatório dessas etapas. Cada processo envolvido no reparo de uma ferida deve ser controlado com precisão, pois em caso contrário, podem ser gerados resultados inadequados (CARVALHO, 2002).

Se as feridas não são adequadamente tratadas, pode surgir infecção. Feridas infectadas cicatrizam mais lentamente e a reepitelização é mais prolongada (INNGJERDINGER et al., 2004). As infecções secundárias de pele são freqüentemente causadas pela flora transitória, composta principalmente por *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* pertencentes ao Grupo A, β -hemolíticos). O rápido diagnóstico e tratamento são essenciais para prevenir o agravamento da lesão local ou em circunstâncias extremas, surgimento de complicações sistêmicas, como *sepsis* que poderia acarretar a morte do paciente (BIKOWSKI, 1999).

Lectinas são proteínas (ou glicoproteínas) capazes de reconhecer sítios específicos em moléculas e ligar-se a carboidratos, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas dos referidos sítios (GRANGEIRO, 1996). A interação das lectinas com receptores glicídicos da membrana celular é a base molecular para várias respostas que essas proteínas são capazes de induzir nos mais diversos sistemas biológicos (ISIDRO et al., 2001).

Canavalia brasiliensis e *Dioclea violacea* são leguminosas pertencentes à subtribo Diocleinae e a partir destas são extraídas as lectinas ConBr e DVioL, respectivamente (BARBOSA et al., 2001). ConBr e DVioL são lectinas com afinidade glicose/manose, homólogas à Concanavalina A (Con A), segundo CAVADA et al. (1993). Estas lectinas

vêm sendo estudadas demonstrando-se a indução da produção de histamina em ratos (GOMES et al., 1994) e de óxido nítrico (ANDRADE et al., 1999), além do 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), estimulação da produção de macrófagos e linfócitos em camundongos C3H/HeJ (RODRIGUEZ et al., 1992).

Objetiva-se com este trabalho avaliar o efeito antimicrobiano *in vivo* e *in vitro* e a atividade cicatrizante do tratamento tópico diário com soluções contendo as lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Dioclea violacea* (DVioL), no processo de reabilitação de lesões cutâneas em camundongos.

2. JUSTIFICATIVA

A proposta deste trabalho é de testar as lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Dioclea violacea* (DVioL) quanto à atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* e o seu efeito cicatrizante em feridas cutâneas, justificada pelos seguintes aspectos:

- Existir interesse da pesquisa de novos agentes antimicrobianos que combatam infecções locais de maneira eficiente, com menores custos e efeitos colaterais.
- O fato dessas lectinas ter demonstrado atividade biológica relacionada à estimulação do células do sistema imune, frente a vários modelos experimentais;
- A biodisponibilidade, visto a *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea violacea* serem plantas nativas da região Nordeste, onde são amplamente cultivadas, sendo um recurso natural que pode ser explorado sem agressões ambientais.

3.OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito antimicrobiano (*in vivo* e *in vitro*) e a atividade cicatrizante cutânea do tratamento tópico diário com soluções contendo as lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Dioclea violacea* (DVioL).

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar *in vitro* o efeito antimicrobiano das lectinas frente aos microrganismos *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp. (padrões para ensaios antimicrobianos);
- Avaliar macroscopicamente as lesões quanto aos sinais clínicos e à área da contração da ferida;
- Avaliação *in vivo* do efeito antimicrobiano das lectinas frente aos microrganismos isolados das feridas cutâneas experimentais, através do isolamento e identificação dos microrganismos;
- Avaliar o processo cicatricial sob o ponto de vista histopatológico.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Cicatrização

A cicatrização de lesões cutâneas é um processo biológico dinâmico bem ordenado, onde a lesão tecidual acarreta a ruptura e o conseqüente extravasamento do conteúdo de vasos sanguíneos. Este processo é didaticamente dividido nas seguintes fases: hemostasia, fase inflamatória, fase proliferativa ou de granulação e de remodelação da matriz extracelular, como ilustrado na Figura 1 (BRANSKI et al., 2005, SHIMIZU, 2005). Logo após o tecido ser lesionado, uma cobertura primária composta por fibrina restabelece a hemostase e fornece um ambiente para as plaquetas secretarem fatores de crescimento (FCs), citocinas e elementos da matriz extracelular (MEC). Estes mediadores do processo inflamatório recrutam macrófagos e neutrófilos, os quais secretam diversos fatores específicos que orquestram as fases seguintes do processo de reparação tecidual (SANTORO e GAUDINO, 2005).

Na fase inflamatória, os neutrófilos aderem-se ao local da lesão poucas horas após ocorrer a injúria, através de quimiotaxia por mediadores liberados por plaquetas, células pertencentes ao sistema imune, microrganismos ou ainda devido à ativação do complemento (PARK e BARBUL, 2004; SZPADERSKA e DIPIETRO, 2005). Os neutrófilos chegam ao local da lesão poucos minutos após a sua formação. Além de sua função fagocitária, os neutrófilos possuem ação pró-inflamatória pela liberação de citocinas que ativam fibroblastos e queratinócitos. Caso a ferida não esteja severamente infectada, em poucos dias o número de neutrófilos diminui devido à fagocitose por macrófagos (MARTIN, 1997; WERNER e GROSE, 2003).

Depois de um ou dois dias, monócitos teciduais se infiltram e entram no local da lesão e se diferenciam em macrófagos que participam e concluem o processo inflamatório, realizando um debridamento no local da lesão. Seu efeito antimicrobiano ocorre através de

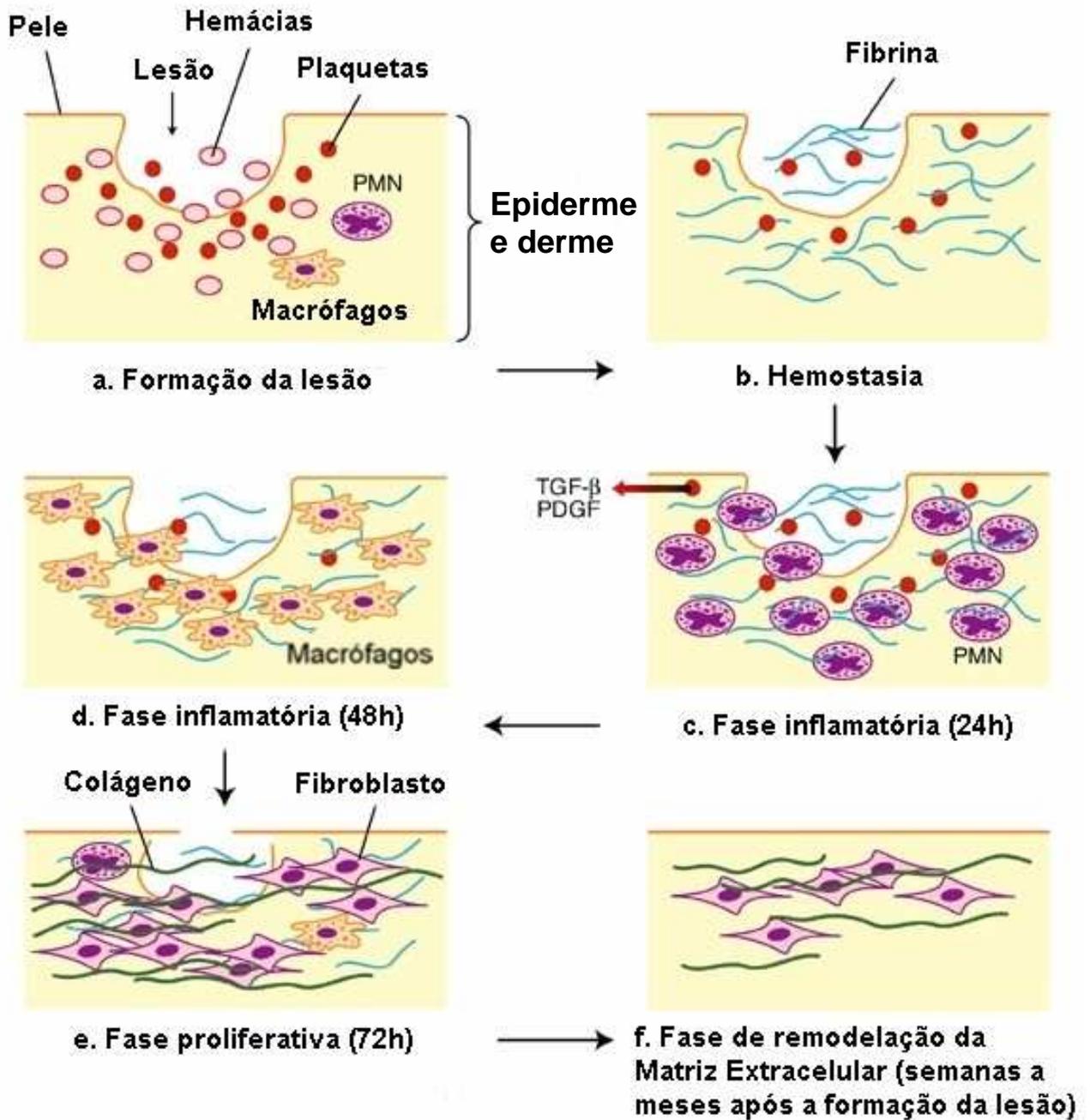


Figura 1: Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas. Fonte: *Experts Reviews in Molecular Medicine* ©, 2003. Cambridge University Press.

fagocitose e pela liberação de oxigênio, óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (SCHÄFFER et al., 1996). O debridamento é facilitado pela fagocitose e pela produção de enzimas como a colagenase e elastase (PARK e BARBUL, 2004; SZPADERSKA e DIPIETRO, 2005).

Os macrófagos expressam o gene da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) e são uma fonte de produção de NO nas primeiras etapas do processo cicatricial (SCHAFFER et al., 1997; REICHNER et al., 1999; LEE et al., 2001). A importância do NO não se deve apenas à sua atividade antimicrobiana em modelos murinos (EFRON, MOST e BARBUL, 2000); deve-se ressaltar que a inibição do iNOS prejudica significativamente o processo de reepitelização (STALLMEYER, 1999), aumenta o tempo de oclusão de feridas abertas (YAMASAKI et al., 1998) e diminui a deposição de colágeno (SCHAFFER et al., 1999; EFRON et al., 2001). Em experimentos *in vivo*, fibroblastos de camundongos *knock out* iNOS demonstraram diminuídas proliferação, síntese de colágeno e contração (SHI et al., 2001).

Os macrófagos possuem função essencial na continuidade do processo cicatricial, por secretarem fatores de crescimento (Tabela 1), promovendo não só a proliferação celular e síntese protéica, como também a produção de componentes da matriz extracelular. Estas células também estimulam a proliferação de linfócitos e liberação de citocinas em resposta a antígenos específicos (IBA et al., 2004; SZPADERSKA e DIPIETRO, 2005). As citocinas liberadas por estas células: Fator de Crescimento Derivados de Plaqueta (PGDF), Fator de Crescimento Transformante β (TGF- β), Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Necrose Tumoral (TNF), Fatores de Crescimento de Fibroblastos (FGF), entre outras, provocam o influxo de neutrófilos, bem como a migração e proliferação de células endoteliais, fibroblastos e células indiferenciadas que começarão a repopular o sítio da lesão (RICHES, 1996; DANTAS, 2000; WERNER e

GROSE, 2003). Sob ação destes fatores são mitogênicos e quimiotáticos, as células endoteliais que circundam a lesão migram até esta para formar novos vasos sanguíneos. A interleucina-4 (IL-4), citocina secretada por macrófagos, é também responsável pela formação do tecido conjuntivo (por exemplo, produção de colágeno por fibroblastos) fazendo com que fibroblastos e outras células presentes migrem através das trabéculas de fibrina presentes na lesão (MUTSAERS et al., 1997; BRANSKI et al., 2005).

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

Fator de Crescimento	Fonte	Efeito
Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF) 1, 2 e 4	Macrófagos, células endoteliais	Proliferação dos fibroblastos e angiogênese
Fator de Crescimento Transformante- α (TGF- α)	Macrófagos e queratinócitos	Reepitelização
Fator de Crescimento Transformante β 1 e β 2 (TGF- β 1 e β 2)	Plaquetas, macrófagos	Quimiotaxia de fibroblastos e macrófagos; síntese da matriz extracelular; secreção de inibidores de protease
Fator de Crescimento Epidermal (EGF)	Plaquetas	Reepitelização
Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PGDF), isoformas AA, AB e BB.	Plaquetas, macrófagos, queratinócitos	Quimiotaxia de fibroblastos e macrófagos, proliferação de fibroblastos e síntese da matriz
Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF)	Fibroblastos presentes na derme	Proliferação de queratinócitos
Interleucina 1 α e β	Neutrófilos	Ativa a expressão do fator de crescimento em macrófagos, queratinócitos e fibroblastos
Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)	Neutrófilos	Ativa a expressão do fator de crescimento em macrófagos, queratinócitos e fibroblastos

Durante a fase proliferativa observam-se o surgimento do tecido de granulação, reepitelização e contração da ferida, os quais desempenham papéis importantes na cicatrização normal. O processo de proliferação de fibroblastos e a atividade sintética de colágeno são denominados de fibroplasia. A fase fibroplásica é caracterizada ainda por um aumento do número de fibroblastos, os quais iniciam a síntese e secreção de componentes da matriz extracelular, como os glicosaminoglicanos e as fibras colágenas tipo I e III, associadas à proliferação e ao crescimento interno dos capilares (angiogênese) (REGAN e BARBUL, 1994; STEED, 1997; KUMAR et al., 2005).

Tecido de granulação pode ser compreendido como uma matriz friável de fibronectina, colágeno e ácido hialurônico, onde estão embebidos uma densa população de macrófagos e fibroblastos, associada a vasos sanguíneos neoformados (MUTSAERS et al., 1997). São vários os fatores responsáveis pela formação do tecido de granulação. Embora os fatores de crescimento desempenhem um papel crucial na migração e diferenciação das células necessárias à formação desse tecido, os macrófagos presentes na ferida e as plaquetas capturadas no trombo são, provavelmente, os principais contribuintes para o processo (CARVALHO, 2002).

A angiogênese, ou seja, a neovascularização da ferida, decorre do crescimento de capilares em resposta ao β -FGF e TGF- β secretados por monócitos e possivelmente por queratinócitos (THOMAS et al., 1995; TAKEHARA, 2000; IBA et al., 2004). Além destes fatores, em particular, o FGF1 e FGF2 demonstram estimular o processo em vários modelos experimentais (RISAW, 1990). Como consequência de angiogênese, o tecido conjuntivo (agora denominado tecido de granulação) é formado, recebendo esta denominação devido a sua aparência granular pela presença de inúmeros capilares (WERNER e GROSE, 2003).

O estímulo responsável pela angiogênese está relacionado à liberação de diversos fatores solúveis (peptídeos) no local da lesão. Tais fatores de crescimento têm potentes propriedades biológicas de quimioatração e mitogênese demonstradas através de sistemas experimentais *in vitro* e ensaios *in vivo* (FAZIK, 2000; LABRO, 2000).

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

Os fibroblastos infiltrados na área da lesão desempenham, nesse momento, dois papéis significativos: 1, produzir e depositar grande quantidade de elementos da MEC, principalmente fibras colágenas do tipo I e III, que aumentam a força tênsil da lesão, contribuindo para o fechamento da lesão (CARVALHO, 2002); 2, diferenciar-se em miofibroblastos, cuja função primordial é neoformação dermal e contração das margens da ferida, alinhando-se a elas e unindo-as (THOMAS et al., 1995, MOULIN et al., 2000; GOMATHI et al., 2003). Os miofibroblastos foram inicialmente identificados como um fibroblasto modificado que possuía características de uma célula muscular lisa, através de microscopia eletrônica no tecido de granulação de feridas cicatrizadas (DESMOULIÈRE, CHAONNIER e GABBIANE, 2005). A conversão de fibroblastos em miofibroblastos é realizada por fatores de crescimento como o TGF- β 1, expressando α -actina do músculo liso e tornando-se células musculares lisas capazes de realizar grandes forças contráteis (MARTIN, 1997).

Outro evento importante nesse período é a reepitelização, iniciada pela migração de células epiteliais (queratinócitos), desde as margens da ferida (CARVALHO, 2002). Na pele íntegra, os queratinócitos estão ligados à membrana basal, porém quando ocorre a lesão cutânea, estas células se locomovem através de contração dos filamentos de actina-miosina e se inserem nos novos complexos de adesão (MARTIN, 1997). Concomitantemente à migração, as células sofrem alterações fenotípicas específicas, como a retração dos tonofilamentos intracelulares, dissolução dos desmossomos intercelulares e formação de actina citoplasmáticos na periferia (CARVALHO, 2002; EHRLICH e DIEZ, 2003). Tais alterações liberam as células da membrana basal subjacente e das células epiteliais adjacentes, dando-lhes a capacidade de movimentar-se lateralmente. As células migram sobre uma matriz extracelular provisória, quando a superfície da ferida está umedecida e bem oxigenada, ocorrendo a migração epitelial com maior rapidez (CARVALHO, 2002). O processo de reepitelização é estimulado pelo EGF, TGF α e pelo fator de crescimento de queratinócitos, ocorrendo logo após a ruptura da epiderme, pelo movimento dos queratinócitos da margem da lesão sobre a matriz provisória do tecido de granulação (THOMAS et al., 1995, WERNER e GROSE, 2003).

Se uma escara (crosta) está por cima da ferida, as células migratórias promovem uma dissecação entre a matriz e os restos celulares suprajacentes, mas o processo sofre certo atraso. Tão logo a reepitelização se tenha completado por toda a superfície da ferida, as células epiteliais reverterem ao seu fenótipo normal, a membrana basal é reconstituída pelo novo epitélio, e hemidesmossomos e desmossomos são reformados (CARVALHO, 2002).

O colágeno é a estrutura protéica que compõe 72% da derme. Essa estrutura contribui para a força tensora do corpo, uma vez que o próprio colágeno é capaz de suportar altas forças de tensão. As fibras colágenas são produtos polimerizados das moléculas precursoras solúveis que são secretadas pelos fibroblastos, osteoblastos,

condroblastos e outras células. Esta proteína é composta por três polipeptídios, cadeias α , que são formadas por cerca de 1000 aminoácidos. Cada cadeia α tem um peso molecular aproximado de 95.000. As cadeias α têm uma seqüência repetida de aminoácidos a cada terceiro aminoácido de glicina. O colágeno possui uma quantidade alta de prolina em relação às demais proteínas. A prolina e a hidroxiprolina ocupam cada quarta posição e correspondem a 20-25% dos radicais de aminoácidos. Dois derivados hidroxilados da prolina, a 3-hidroxiprolina e 4-hidroxiprolina, apenas ocorrem no colágeno. A hidroxilisina, embora não um constituinte comum das cadeias α , é significativa por ser o local de adição de carboidratos e o sítio de ligações cruzadas intermoleculares. As cadeias α do tropocolágeno têm uma estrutura secundária única. Cada uma delas é uma hélice de resíduos integrais orientadas para a esquerda, na qual há três resíduos por volta. A ocorrência da glicina em cada terceira posição facilita o enrolamento estreito dos polipeptídios. Três cadeias α se enrolam uma em volta da outra para produzir uma molécula de tripla hélice orientada para a direita, chamada de tropocolágeno. As pontes de hidrogênio estabilizam o padrão helicoidal entres as cadeias α associadas. Existem regiões curtas não-helicoidais nas regiões C e N-terminais das cadeias α . Estas regiões são importantes nas ligações cruzadas intermoleculares (BANKS, 1992; BACILA, 2003; CAMPBELL, 2003).

O processo de remodelagem da cicatriz envolve a contínua produção, digestão, agregação e orientação das fibrilas de colágeno. A princípio, o colágeno é depositado sobre a fibronectina de maneira aleatória; dependendo da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras de colágeno são subseqüentemente digeridas pela enzima collagenase e formadas novamente, em arranjos similares aos observados no tecido não afetado adjacente. À medida que vai ocorrendo a remodelação da cicatriz, as fibras de colágeno ficam orientadas paralelamente às forças direcionais aplicadas sobre elas,

analogamente às fibras de colágeno formadoras de um tendão. Assim sendo, a cicatriz adquire força tênsil e, portanto, integridade funcional. A collagenase é produzida por vários tipos celulares na ferida: leucócitos, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais (CARVALHO, 2002), degradando, especificamente, colágeno dos tipos I, II e III presentes no tecido conjuntivo. Estas enzimas desfazem a estrutura helicoidal das fibras de colágeno, deixando-as susceptíveis à clivagem enzimática por outras metaloproteases de matriz (MMPs) e proteases (WONG et al., 2002).

A remodelação ocorre durante a fase final do processo reparatório e pode continuar durante alguns meses, observando-se síntese, depósito, contração e remodelação da matriz extracelular (MEC) neoformada. Os fibroblastos continuam a ser as “células-chave” neste processo, pois estes migram até o local da lesão de forma dependente da ativação por enzimas proteolíticas e de componentes das enzimas ativadoras de plasmonogênio (PA): sistema plasmina e MMPs. As MMPs facilitam a migração dos fibroblastos através da MEC e leito da lesão (PILCHER et al., 1999; GRINNELL, 2003).

As MMPs são enzimas proteolíticas da família das zinco-endopeptidases e desempenham importante função da remodelação proteolítica da matriz extracelular em vários processos fisiológicos, incluindo a morfogênese tecidual, reparação tecidual e angiogênese (KAHARI e SAARIALHO-KERE, 1997; WONG et al., 2002). A MMP-2 e MMP-9 são duas proteases gelatinolíticas mais atuantes no processo de cicatrização de lesões (KAHARI e SAARIALHO-KERE, 1997; ARMSTRONG e JUDE, 2002).

A clivagem do colágeno pela MMP é relacionada à motilidade celular através das interações célula-matriz. Estas interações geralmente são mediadas pelas integrinas, como a $\alpha_2\beta_1$, que é o maior receptor de superfície celular para o colágeno tipo I. As células são incapazes de se ligarem a fragmentos de colágeno que sofreram ação enzimática da collagenase, e necessitam deste sistema para assegurar a contínua motilidade contínuo sobre

o leito da lesão (MESSET et al., 1998). As integrinas são proteínas de membrana que participam de uma variedade de vias mecânicas-transducionais, realizando a ligação dos filamentos intracelulares de actina com proteínas da matriz extracelular (ALBERTS et al., 2004). As subunidades alfa e beta se dimerizam de maneira não-covalente para mediar a adesão celular de maneira altamente específica aos ligantes da matriz extracelular (KITAMURA et al., 2002; PHILLIPS e BONASSAR, 2005).

Gradativamente os feixes de fibras colágenas tornam-se mais espessos, resultando em uma configuração mais regular, que está diretamente relacionada às forças mecânicas as quais o tecido está sujeito durante a atividade normal. Em resultado ao processo de remodelação, a lesão torna-se mais resistente após o colágeno ter sofrido maturação. O tipo de colágeno secretado inicialmente, na fase proliferativa, era do tipo III que posteriormente, por degradação, é substituído por colágeno do tipo I (STEVENS e LOWE, 1996).

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

Na tentativa de apresentar didaticamente os processos de cura e reparo como fases específicas, caracterizadas por mecanismos precisos, pode-se observar uma sobreposição significativa entre as fases do processo. Também podem ser observadas variações significativas na natureza, composição e duração das fases em diferentes feridas, dependendo do local onde se encontra o tecido, do grau de contaminação e infecção bacterianas, da irrigação sanguínea e da extensão da lesão ao tecido (CARVALHO, 2002).

4.2. Tratamento de lesões cutâneas

A pele possui a função de barreira protetora frente a todos os tipos de fatores externos que possam ser prejudiciais ao organismo. Uma vez que esta barreira é violada, infecções oportunistas podem ocorrer. As bactérias encontradas na pele pertencem a dois tipos de flora: a “Flora Normal”, composta por bactérias comensais que geralmente não provocam infecção, e os microrganismos pertencentes à “Flora Transitória” que podem produzir infecção quando a epiderme estiver lesionada. As infecções secundárias cutâneas são frequentemente causadas pela flora transitória, geralmente por *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* grupo A β -hemolítico). Um diagnóstico imediato e um tratamento eficaz previnem dermatoses e, em situações extremas, a sepsis que pode ocasionar morte do indivíduo (BIKOWSKI, 1998).

É de conhecimento comum, através de séculos de observações clínicas, que a infecção de feridas compromete o processo cicatricial. Feridas infectadas cicatrizam mais lentamente e, se não forem adequadamente tratadas, podem ocasionar infecções sistêmicas. A infecção compromete a reepitelização, aumenta a deposição de colágeno, porém pouco se sabe a respeito da interferência da infecção na migração e na maturação da nova epiderme após a formação da lesão (SINGER e MCCLAIN, 2002; INNGJERDINGER et al., 2004).

As feridas não cicatrizam enquanto estiverem clinicamente infectadas, portanto, esse diagnóstico de infecção exige em alguns casos o desbridamento ou drenagem de exsudatos, com vistas a ocasionar a promoção do suprimento sanguíneo adequado (MORISON et al., 1997). A cicatrização não pode ocorrer até que todo material estranho resultante do processo inflamatório seja removido do leito das feridas (BERGSTROM et al., 1995).

Os tecidos desvitalizados ou necróticos fornecem nutrientes para multiplicação microbiana, fornecendo a instalação de infecção e retardo da cicatrização. O edema é outro fator que dificulta a cicatrização, o excesso de líquido intersticial interfere na proliferação celular e síntese protéica. A manutenção do baixo pH, alta tensão de CO₂ e na baixa concentração de O₂, favorece a necrose e a multiplicação microbiana. A hipóxia dificulta a destruição de microrganismos pelos leucócitos que são dependentes do oxigênio para exercer sua função, particularmente nas feridas infectadas por *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella thiphymurium*, bem como as contaminadas por anaeróbios. O nível crítico de oxigênio parece ser de 30mmHg, entretanto os indivíduos hipertensos, hipovolêmicos ou desidratados, com comprometimento cardiovascular ou pulmonar, doença periférica vascular e angiopatia diabética possivelmente são elementos de risco para a infecção (MORISON et al., 1997; UTYAMA, 2003).

Várias espécies microbianas são comumente encontradas em lesões cutâneas: *Staphylococcus aureus* é o patógeno Gram-positivo mais prevalente e *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* são os microrganismos Gram-negativos mais comuns (DONATI et al., 1993). A infecção por *S. aureus* ocasiona a liberação de diversas exotoxinas protéicas, como: hemolisinas, enterotoxinas estafilocócicas que produzem toxemias sistêmicas, síndrome do choque tóxico e a toxina esfoliativa que provoca a “síndrome da pele escaldada”. Bactérias Gram-negativas produzem endotoxinas lipossacarídicas que podem ocasionar choque toxigênico. A septicemia em decorrência da infecção por estes microrganismos pode ser fatal (ORENSTEIN et al., 1998).

Segundo Singer e McClain (2002), lesões infectadas por *S. aureus* em ratos foram caracterizadas pela presença de secreção purulenta, um aumento do infiltrado por linfócitos e tecido necrosado. As feridas infectadas apresentam força tênsil reduzida e a deposição do

colágeno é prejudicada. Posteriormente, em feridas infectadas, foi observado que estas apresentavam quantidade de colágeno muito maior que lesões não-infectadas, resultando na formação de uma cicatriz exuberante. Esta situação é justificada pelo fato que a maturação da pele lesada é severamente comprometida com a instalação de um processo infeccioso, as relações complexas existentes entre bactérias, neutrófilos, metaloproteinases de matriz (MMPs) comprometem o processo. Proteases bacterianas destroem a matriz, desregulando a atividade das MMPs. (OKATAMOTO et al., 1997; POTEMPA, BANBULA, TRAVIS, 2000).

O processo cicatricial é um processo que depende de inúmeras etapas, a presença de infecção e a formação de radicais livres podem contribuir para o retardamento ou inibição do processo. Os radicais livres podem oxidar os inibidores endógenos de proteases, reduzindo sua habilidade em inibir a elastase e outras proteases responsáveis pela degradação da matriz extracelular (BOSISIO et al., 1997; KUDI et al., 1999). Por estas razões, o tratamento de lesões deve suprimir o crescimento microbiano (SENEL e MCCLURE, 2004).

O emprego de produtos medicinais de origem natural no tratamento de certas doenças tem sido amplamente utilizado pela população, mas poucas pesquisas têm sido realizadas a fim de atribuir a estes os seus efeitos terapêuticos. Alguns estudiosos mencionaram que elementos existentes na natureza poderiam constituir materiais alternativos para o tratamento local das feridas, já que os curativos disponíveis, sintéticos ou biossintéticos, utilizados tanto no homem como em outras espécies são onerosos. (SILVA, 2000).

A ciência moderna e a tecnologia estão oferecendo nova introspecção em direção à cicatrização de feridas e levando a novas maneiras de influenciá-la, incluindo uso tópico de fatores de crescimento, pele artificial, cultura de epitélio com ou sem componentes dermais

e estimulação elétrica. O futuro da cicatrização de feridas reúne um melhor entendimento de eventos fisiológicos complexos que ocorre e tradução em direção aos cuidados da ferida ativa e interativa biologicamente (WALDORF e SMART, 1995).

4.3. Lectinas

Lectinas são (glico) proteínas de origem não-imune que interagem de maneira reversível e específica com carboidratos através de interações hidrofóbicas e são capazes de induzir o fenômeno de aglutinação celular (KENNEDY et al., 1995; LORIS et al., 1998). As lectinas ligam-se aos carboidratos de maneira não-covalente. Esta associação é a primeira etapa em diversos eventos biológicos como infecção, diferenciação celular, interação parasita-hospedeiro, formação de órgãos, metástase e reconhecimento celular (BASZKIN et al., 2000). Este reconhecimento é realizado através dos resíduos de monossacarídeos, ou através da estrutura completa ou parte da molécula (DWECK e BUTTERS, 2002).

As lectinas estão presentes em todas as classes e famílias de organismos, sendo encontradas em vegetais superiores, algas, fungos, animais (vertebrados e invertebrados), bactérias e em vírus. Em vegetais, elas são detectadas em centenas de espécies de plantas. A maioria das lectinas vegetais é obtida de semente, principalmente em leguminosas, onde são acumuladas no período de maturação e desaparecem após a germinação. As lectinas constituem cerca de 10% das proteínas totais de semente, porém a quantidade isolada é pequena: varia entre 0,1-1% deste total (LORIS, 2002; SHARON e LIS, 2004b; ALENCAR et al., 2005).

Lectinas de origem bacteriana, viral e animal possuem a função de mediar inúmeros eventos de reconhecimento biológico, como: defesa do hospedeiro, fertilização, desenvolvimento, infecção parasitária, metástase tumoral e inflamação pela decifração dos

glico-códigos codificados na estrutura das glicanas ligadas aos glicoconjugados da membrana celular. Em contraste, as funções fisiológicas das lectinas vegetais ainda não foram completamente elucidadas. Diversos experimentos indicam que as lectinas vegetais são proteínas de defesa contra animais herbívoros e possuem função na simbiose entre as bactérias fixadoras de nitrogênio (*Rhizobium* spp.) e as raízes de leguminosas (CAVADA et al., 2001). Além de sua função fisiológica, são de interesse biotecnológico, pois possuem habilidade de ligar-se a carboidratos com especificidade considerável, sendo excelentes modelos de estudo de interações proteína-carboidrato em nível atômico (RINI, 1995).

Através do conhecimento da estrutura molecular e especificidade biológica das lectinas, novas definições vêm sendo propostas. Estas proteínas possuem, pelo menos, um domínio não catalítico que se liga de maneira reversível a um mono ou oligossacarídeo específico (PELMANS e VAN DAMME, 1995). Recentes avanços na bioquímica, clonagem molecular e análise estrutural das lectinas têm revelado a ocorrência de famílias, divididas de acordo a estrutura e evolução conhecidas das proteínas. Entre elas podem-se destacar as lectinas de leguminosas (RABIJNS et al., 2000), proteínas inativadoras do ribossomo tipo-2 (VAN DAMME et al., 2000b), lectinas ligadoras de quitina (STOEVA et al., 2001) que contem domínios específicos, lectinas de monocotiledôneas ligadoras de manose (VAN DAMME et al., 2000a) e as lectinas relacionadas à Jacalina (BOURNE et al., 1999).

Em algumas lectinas, as subunidades são capazes de se dissociar e se reassociar, produzindo diferentes formas da mesma molécula. Além disso, cada subunidade pode ser composta por fragmentos polipeptídicos diversos, como no caso da Concanavalina A (Con A). Esta lectina possui estrutura tetramérica que se dissocia em dímeros se o pH for inferior a seis. Mesmo quando cristalizada, a Con A apresenta pelo menos oito bandas com migração eletroforética diferentes, porém quando complexada a qualquer um dos

carboidatos específicos, o número de bandas reduz-se a dois, sendo este fenômeno pouco entendido (CARVALHO, 1990). Outras lectinas também apresentam estrutura quaternária dependente da variação do pH, como observado por CALVETE et al. (1999). A lectina do gérmen do trigo (WGA) possui estrutura dimérica e quatro sítios de ligação com carboidratos. Por outro lado, embora tetramérica, a lectina de *Dilichos biflorus* possui um único sítio de ligação (CARVALHO, 1990).

As interações lectina-carboidrato ocorrem em eventos moleculares modulando a resposta imune. Lectinas são utilizadas como reagentes policlonais para investigar as bases moleculares e controle da ativação e proliferação de linfócitos; para identificar e fracionar células do sistema imune e como drogas (SINGH, SINGH e KAMBOJ, 2004). O primeiro agente mitogênico descrito foi o PHA, lectina de *Phaseolus vulgaris*, por NOWELL (1960). Posteriormente, foram descobertas outras lectinas que possuem efeito estimulatório na proliferação celular: Concanavalina A (HARRIS e ROBSON, 1963), WGA (AUB, SANFORD e WANG, 1965), e PWM (BRITTINGER e KONIG, 1969).

Sabidamente, as lectinas possuem ação pró-inflamatória. Algumas destas induzem a proliferação de linfócitos, atuando como agente mitogênico útil para o estudo da interação da lectina com células linfocitárias *in vitro* (KIPATRICK, 1999). A porção sacarídica do receptor de células T (TCR) é provavelmente um sítio específico de ligação com a lectina, promovendo sua ativação e conseqüente proliferação (MACIEL et al., 2004). A Sm60, lectina ligadora de manose, induz a migração de neutrófilos e desgranulação dos mastócitos, sendo a molécula chave na interação parasito-hospedeiro no processo de infecção por *Schistosoma mansoni* (COELHO-CASTELO et al., 2002).

Os genes para lectinas foram conservados durante a evolução especialmente nas leguminosas. Parece que os genes da lectina do feijão comum evoluíram por duplicação e divergência de um gene ancestral (todos os genes ainda são unidos) e as proteínas

resultantes adquiriram propriedades biológicas diferentes. Isto, provavelmente, também é válido para outras leguminosas. Nos cereais, as lectinas parecem ter se originado por repetições que surgiram por duplicação deste domínio. Esta combinação de fusão e duplicação de genes de defesa pode ter dado para plantas uma vantagem evolutiva criando proteínas novas com especificidade diversa (CHRISPEELS e RAIKHEL, 1991).

As lectinas de plantas são importantes ferramentas em Glicobiologia e Glicobioquímica devido à multiplicidade de eventos que se pode conhecer em função da habilidade de ligarem carboidratos. Esta habilidade só foi devidamente explorada segundo sua importância quando a comunidade científica se deu conta que os oligossacarídeos compreendem um extraordinário sistema de armazenagem de informação de alta densidade, constituindo o chamado código do açúcar. A partir daí, as lectinas têm sido largamente utilizadas na investigação estrutural e funcional de carboidratos complexos, glicoproteínas e para examinar mudanças decorrentes de processos fisiológicos e patológicos na superfície celular. Portanto, o desenvolvimento da Glicociência sempre esteve atrelado às pesquisas com lectinas (RÜDIGER et al., 2000; GABIUS et al., 2002).

A especificidade da grande maioria de lectinas de plantas se dá por carboidratos simples (monossacarídeos) ou complexos (oligossacarídeos e glicanas). Estes podem ser de origem vegetal ou encontrados em outros reinos, com N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, ácido glucurônico, galacturônico, xilurônico, L-idurônico, siálico, e N-acetilmurâmico (TRINDADE, 2005).

Uma aplicação biotecnológica das lectinas vegetais se dá no seu emprego em tipagem sanguínea. Lectinas de *Lotus tetragonolobus* e *Ulex europaeus*, ambas específicas de fucose, são empregadas para identificar células tipo O; a lectina de *Dilichos biflorus* é usada para distinguir entre os subgrupos A1 e A2; a lectina de *Vicia graminea*, específica para sanguetipo N, para diferenciar células N e M e a aglutinina PNA, específica para

Gal(β 1-3)GalNAc é empregada na detecção de poliaglutinação, uma condição que acompanha processos de infecção viral e bacteriana, no qual eritrócitos humanos tornam-se aglutináveis por anticorpos normalmente presentes no soro de indivíduos adultos (LIS e SHARON, 1998).

A lista de aplicações da lectinas vegetais é extensa e algumas das suas aplicações biotecnológicas estão listadas abaixo (SHARON e LIS, 2004a):

- Isolamento e purificação de gliconjugados por cromatografia por afinidade;
- Detecção de epítomos tipo carboidratos de gliconjugados em *blots* ou em placas de cromatografia em camada delgada;
- Quantificação de atividade de glicosiltransferases/glicosidases por detecção dos produtos da reação enzimática com lectinas;
- Análise de glicomas;
- Análise de mecanismos envolvidos na correta glicosilação por variantes celulares;
- Modulação da proliferação e status de ativação celular;
- Detecção de doenças relacionadas com alterações na síntese de glicanas;
- Liberação controlada de drogas;
- Marcador com finalidade diagnóstica (por exemplo, agentes infecciosos);
- Diagnóstico e terapêutica do câncer e doenças auto-imunes;
- Estimulação mitogênica de linfócitos e produção de linfocinas;
- Investigação de estruturas de carboidratos complexos na superfície de células e partículas subcelulares de animais, bactérias e vírus;
- Tipagem, identificação e estudos estruturais dos grupos sanguíneos;
- Agentes defensivos de pragas na Agricultura.

Atualmente proteínas bioativas vêm sendo utilizadas na terapêutica médica (ANDRADE et al., 2004). 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, SINGH e KAMBOJ, 2004). As lectinas de *Viscum album* aumentam a mitogênese de linfócitos de camundongos com tumores induzidos, *in vitro*, indicando o efeito imuno-estimulatório dos linfócitos supressores de células tumorais. Também há inibição na síntese protéica em várias linhagens de células tumorais (ZARKOVIC et al., 2001). Por conta do efeito citostático/ apoptótico e imunomodulatório da lectina de *Viscum album*, o extrato desta planta é geralmente aplicado em pacientes com câncer (HAJTO, HOSTANSKA e SALLER, 1999). A lectina de *Agaricus bisporus* inibe a proliferação de células tumorais em câncer cólon sem causar citotoxicidade (PARSLEW et al., 1999). A aglutinina de *Helix pomatia* (HPA) também vem sendo utilizada na identificação de tumores. Segundo SINGH, SINGH e KAMBOJ (2004), a lectina de *Arisaema flavum* demonstra potente atividade mitogênica em esplenócitos humanos e de camundongos BALB/c e, além desta, apresenta também a função antiproliferativa contra linhagens de células tumorais murinas.

As sementes de leguminosas são fontes ricas de lectinas, mas estas também são encontradas nas partes vegetativas das plantas, geralmente, em concentrações menores que as encontradas nas sementes (PUSZTAI, 1991). Cerca de uma centena delas já foram encontradas e caracterizadas bioquímica e biologicamente (CAVADA, 1997).

As lectinas de leguminosas consistem de 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) (SHARON e LIS, 1990). Apenas a lectina arcelina 5a, isolada de *Phaseolus vulgaris*, apresenta estrutura monomérica. O sítio para ligação ao metal foi descrito em detalhes para a concanavalina A e tem se mostrado bastante conservado em outras lectinas de leguminosas (LORIS et al., 1998).

Na maioria das lectinas de leguminosas a oligomerização se dá pela associação dos domínios de estrutura tipo beta (β sheet). Em Con A e em muitas lectinas de leguminosas a formação do dímero envolve a associação, lado a lado, dos monômeros através da interação entre os seis domínios da estrutura beta com outros seis domínios da outra subunidade, formando uma estrutura de 12 domínios (LIS e SHARON, 1998; LORIS et al., 1998). Esta estrutura é denominada de “canonical legume lectin dimer” (LORIS et al., 1998; VIJAYAN e CHANDRA, 1999).

Em plantas, elas vêm sendo detectadas e isoladas de um grande número de grupos taxonômicos de vegetais, particularmente em sementes de leguminosas são as mais exploradas por conta de sua caracterização estrutural e aplicações biológicas (VAN DAMME et al., 1998; SILVA et al., 2000), possuindo a função de manutenção e armazenamento, interação planta-microrganismo, defesa contra ataque de insetos e fungos, estimulação mitogênica no processo de germinação, transporte de carboidratos, extensão da parede celular (SANTOS, PEIXOTO e COELHO, 2004).

Em algumas sementes de leguminosas, a localização das lectinas está bem caracterizada. A maioria dos estudos indica que as lectinas estão localizadas no parênquima celular, em vacúolos especializados denominados corpos protéicos (MELGAREJO e PÉREZ, 1997). Outros pesquisadores relatam que as lectinas estão presentes no citoplasma e associadas à parede celular (CHRISPEELS e RAIKHEL, 1991). Parte das leguminosas e sementes contêm isolectinas, que são formas moleculares

múltiplas da lectina que exibem diferenças nas propriedades biológicas e estruturais: especificidade de carboidratos, mudanças na seqüência de aminoácidos (LIS e SHARON, 1990).

Lectinas vegetais vêm recebendo atenção particular devido a sua potencial aplicação em análises laboratoriais, já que possuem especificidade por carboidratos diferentes, sendo rapidamente imobilizadas em suportes inertes (BASZKIN et al., 2000). As matrizes comerciais de afinidade contendo lectinas que são amplamente utilizadas na purificação de glicoproteínas de membrana ou glicolípídeos e em estudos de caracterização de enzimas e receptores (LIMA et al., 1997).

Lectinas isoladas de leguminosas pertencentes à subtribo Diocleinae, tribo Phaseoleae, possuem seqüência de aminoácidos semelhantes a Con A, porém com diferente equilíbrio dimérico-tetramérico dependente de pH (CALVETE et al., 1999), além de apresentar atividades biológicas distintas, entre elas: produção de interferon- γ (BARRAL-NETTO et al, 1992), ação pró-inflamatória (RODRIGUEZ et al., 1992) e liberação de histamina por mastócitos peritoniais em ratos (FERREIRA et al., 1996). Várias evidências indicam que diversos fatores podem contribuir nos efeitos biológicos distintos exercidos por estas lectinas. Por exemplo, a liberação de histamina aparentemente está correlacionada com a afinidade relativa entre lectinas de Diocleinae e o complexo oligossacarídico (DAM et al., 1998). Por outro lado, a substituição de um único aminoácido na posição 58 (Asparagina na Con A; Glicina na lectina de *Canavalia brasiliensis* – ConBr) desfaz as pontes de hidrogênio na interface dímero-dímero gerando significativa diferença na orientação relativa dos sítios de ligação a carboidratos na estrutura quaternária da Con A e ConBr (SANZ-APARICIO et al., 1997). Daí, a Con A e ConBr podem-se ligar a estruturas de carboidratos similares ou idênticos em diferentes superfícies celulares, por outro lado, gerando resposta em diferentes populações celulares

ou diferentes efeitos quantitativos. Além disso, uma vez que a estrutura tetravalente é capaz ligar-se com o receptor de superfície celular, as diferentes taxas entre as estruturas divalentes e tetravalentes a um determinado pH podem contribuir para a variabilidade das funções destas lectinas (WAH et al., 2001).

As diferenças na estrutura quaternária podem ser responsáveis pelas diferentes propriedades biológicas apresentadas por lectinas altamente homólogas. A lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*, apesar de alta similaridade na sequência de aminoácidos (99%) com a Con A, apresenta tanto *in vivo* quanto *in vitro* marcantes diferenças. Mudanças na orientação relativa dos sítios de ligação ao carboidrato, produzindo uma estrutura quaternária mais aberta que Con A, pode ser a base para explicar suas distintas atividades biológicas (SANZ-APARICIO et al., 1997).

A *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea violacea* são leguminosas pertencentes à subtribo Diocleinae e a partir destas são extraídas as lectinas ConBr e DVioL, respectivamente (BARBOSA et al., 2001). A ConBr e DVioL são lectinas com ligação glicose/manose e são homólogas a Concanavalina A (Con A) (CAVADA et al., 1993).

A ConBr, foi primeiramente isolada por Moreira e Cavada (1984). A ConA, a ConBr demonstra a mesma especificidade para ligar-se a resíduos de D-glicose, D-manose e derivados, porém ambas lectinas demonstram afinidade por cadeias ramificadas de trimanosídeo, 3,6-di-O-(α -D-manopiranosil)-D-manose, os quais são encontrados em regiões-núcleo de todos os carboidratos ligados a asparagina (N-ligados). Além disso, a ConBr e ConA reconhecem essencialmente os mesmos epítomos na estrutura do trimanosídeo (NOGUEIRA et al., 2002).

Estas lectinas vêm sendo utilizadas, de maneira satisfatória, em diversas pesquisas, como na indução da produção de histamina em ratos (GOMES et al., 1994), indução na produção de óxido nítrico (ANDRADE et al., 1999), efeito protetor *in vivo* contra infecção

pela *Leishmania amazonensis* em camundongos BALB/c (BARRAL-NETTO et al., 1996), estimulação linfocitária em humanos (BARRAL-NETTO et al., 1992), aumento na produção de macrófago e linfócito em administrações intraperitoneais em camundongos C3H/HeJ (RODRIGUEZ et al., 1992) e, em estudos preliminares, efeito cicatrizante em feridas cutâneas experimentais de camundongos *Swiss Webster* (SCHIRATO et al., 2004).

Lectins extraídas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Dioclea grandiflora* (DGL) and *Dioclea violacea* (DVioL) induzem a produção de interferon-gama por células mononucleadas do sangue periférico, apresentando efeito estimulatório maior que a Concanavalin A (Con A), mesmo apresentando homologia superior a 80% comparadas a estas lectinas. Avaliando o efeito da aplicação destas lectinas, por via subcutânea – “footpads”, nos linfonodos poplíteos em camundongos BALB/c, foi observada presença de inflamação, o efeito estimulatório do sistema imune foi associado à indução de apoptose (BARBOSA et al., 2001).

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. A.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Fundamentos da biologia celular – uma introdução à biologia molecular da célula*, São Paulo: Artmed, 2004. 755 p.

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

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

ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; NASCIMENTO, S. C.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 278, p. 435-445, 2004.

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

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

AUB, J. C.; SANFORD, B. H.; WANG, L. H. Reactions of normal and leukemic cell surfaces to a wheat germ agglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 54, p. 400-40, 1965.

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

BACILA, M. *Bioquímica veterinária*, 2. ed., São Paulo: Robe, 2003. p. 61-64.

BANKS, W. T. *Histologia veterinária aplicada*, 2. ed., São Paulo: Manole, 1992. p. 103-424.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, L. A. R.; BARRAL-NETTO, M. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of Diocleinae subtribe. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 5, p. 673-678, 2001.

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. *Immunological Investigations*, 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 Tropica*, v. 60, n. 4, p. 237-250, 1996.

BASZKLIN, A.; BOISSONNADE, M. M.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; CARVALHO-JÚNIOR, L. B.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. *Cratilya mollis* lectin at the air-aqueous solution interface: adsorption and lectin-lipid interactions. *Colloides and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 17, p. 191-201, 2000.

BERGSTON, N.; ALLMAN, R. M.; ALVAREZ, O. M.; BENNETT, C. E.; CARLSON, C. E.; FRANTZ, R. A.; GARBER, S. L.; GOSNELI, D.; JACKSON, B. S.; KAMINSKI, M. V.; KEMP, M. G.; KROSKOP, T. A.; LEWIS, V. L.; MAKLEBUST, J.; MARGOLIS, D. L.; MARVEL, R. M.; REGER, S. I.; RODEHEAVER, G. T.; SALCIDO, R.;

XAKELLIS, G. C.; YARKONY, G. M.; Pressure ulcer treatment: quick reference guide for clinicians. *Advances in Wound Care*, v. 8, n. 2, p. 22-44, 1995.

BIKOWSKI, J. Antimicrobial wound management in the emergency department: an educational supplement. *The Journal of Emergency Medicine*, v. 17, n.1, p. 197-206, 1999.

BOSISIO, E.; MASCETTI, D.; VEROTTA, L.; ZANI, F.; MAZZA, P.; TALBOR, M. *Guiera senegalensis* J. F. Gmelin (Combretaceae): biological activities and chemical investigation. *Phytomedicine*, v. 3, p. 339-348, 1997.

BOURNE, Y.; ZAMBONI, V.; BARRE, A.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J.; ROUGE, P. *Helianthus tuberosus* lectin reveals a wild-spread scaffold for mannose-binding lectins. *Structure with Folding & Design*, v. 7, p. 1473-1482, 1999.

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

BRITTINGER, G.; KONIG, E. Lymphocyte stimulation by pokeweed mitogen (PWN). *Klinische Wochenschrift*, v. 47, p. 1307-1313, 1969.

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

CAMPBELL, M. K. *Bioquímica*, 3. ed., São Paulo: Artmed, 2003. p. 133.

CARVALHO, H. F. Aspectos moleculares e biológicos das lectinas. *Ciência e Cultura*, v. 42, p. 884-893, 1990.

CARVALHO, P. T. C. *Análise da cicatrização de lesões cutâneas através de espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos*. 2002. 72 f. 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.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; GRANGEIRO, T. B. Primary structures and functions of plant lectins. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 5, p. 193-201, 1993.

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

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 biotechnological uses of Diocleinae Subtribe lectins. *Current Protein and Peptide Science*, v.2, p. 123-135, 2001.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectins genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell*, v. 3, p. 1-9, 1991.

COELHO-CASTELO, A. A. M.; PANUNTO-CASTELO, A.; MORENO, A. N.; DIAS-BARUFFI, M. D.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C.; ROQUE-BARREIRA, M. C.;

RODRIGUES, V. Sm60, a mannose-binding protein from *Schistosoma mansoni* with inflammatory property. *International Journal of Parasitology*, v. 32, p. 1747-1757, 2002.

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. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 12082-12088, 1998.

DANTAS, C. J. S. *Reparação tecidual: mecanismos celulares e musculares da inflamação*. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. p. 197-225.

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

Dioclea guianensis seed lectin. A novel manganese-binding site and structural basis of dimer-tetramer association. *Journal of Molecular Biology*, v. 310, p. 885-894, 2001.

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

DONATI, L.; SCAMAZZO, F.; GERVASONI, M.; MAGLIANO, A.; STANKOV, B.; FRASCHINI, F. Infection and antibiotic therapy in 4000 burned patients treated in Milan, Italy between 1976 and 1988. *Burns*, v. 19, p. 345-348, 1993.

DWEK, R. A.; BUTTERS, T. D.; Introduction: glycobiology – understanding the language and meaning of carbohydrates. *Chemical Reviews*, v. 192, n. 2. 2002.

EFRON, D. T.; MOST, D.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound healing. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic 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. *Journal of Surgical Research*, v. 98, p. 16-20, 2001.

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

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

FERREIRA, R. R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; GOMES, J. C. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells stimulated by lectins from Brazilian beans and Concanavalina A. *Inflammation Research*, v. 45, p. 442-447, 1996.

GABIUS, H.J.; ANDRÉ, S.; KALTNER, H.; SIEBERT, H.C. The sugar code: functional lectinomics. *Biochemica et Biophysica Acta*, v. 1572, p. 165-177, 2002.

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

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

GRANGEIRO, T.B. *Clonagem, seqüenciamento e expressão do gen da lectina (ConBr) de sementes de Canavalia brasiliensis*. 1996. 133f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 1996.

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

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

HAJTO, T.; HOSTANSKA, K.; SALLER, R. Mistletoe therapy from the pharmacologic perspective. *Forschende Komplementarmedizin.*, v. 6, p. 186-194, 1999.

HARRIS, H.; ROBSON, E. B. Precipitin reactions between extracts of seeds of *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) and normal and pathological serum proteins. *Vox Sanguinis*, v. 8, p. 348-355, 1963.

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

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

ISIDRO, R.; SALES, F. J. M.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; MOREIRA, R. A. Ação de lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* mart. sob comportamento da saúva do nordeste (Atta opaciceos Borgmeier, 1939). *Revista da Faculdade de Agronomia de Maracay*, v.25, p.77-86, 2001.

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

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

KENNEDY, J. F.; PALVA, P. M. G.; CAVALCANTI, M. S. M.; COLEHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrates Polymers*, v. 26, p. 219-230, 1995.

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

KITAMURA, A.; KAGAMI, S.; URUSHIHARA, M.; KONDO, S.; YOSHIZUMI, M.; TOMAKI, T.; KURODA, Y. Endothelin-1 is a potent stimulator of $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated collagen matrix remodeling by rat mesangial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 299, p. 555-561, 2002.

KUDI, A. C.; UMOH, J. U.; EDUVIE, L. O.; GEFU, J.; Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 67, p. 225-228, 1999.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Inflamação aguda e crônica. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (eds.) *Robbins e Cotran. Patologia – bases patológicas das doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 49-90, 1592 p.

LABRO, M. T. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immuno-fairy tales”? *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 4, p. 615-650, 2000.

LEE, R. H.; EFRON, D.; TANTRY, U.; BARBUL, A. Nitric oxide in the healing wound: a time-course study. *Journal of Surgical Research*, v. 101, p. 104-108, 2001.

LIMA, V. L. M.; CORREIA, M. T. S.; CECHINEL, Y. M .N.; SAMPAIO, C. A. M.; OWEN, J. S.; COELHO, L. C. B. B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydrates Polymers*, v. 33, p. 27-32, 1997.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrates specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, v. 98, p. 637-674, 1998.

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

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

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

MACIEL, E. V. M.; ARAUJO-FILHO, V. S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y. M.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*, v. 32, p. 57-60, 2004.

MARTIN, P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. *Science*, v. 276, p. 74-81, 1997.

MELGAREJO, L. M.; PÉREZ, G. Immunolocalization of the lectins P2 e P4 from *Dioclea lehmanni* seeds. *Plant Cell Physiology*, v. 38, p. 480-483, 1997.

MESSENT, A. J.; TUCKWELL, D. S.; KNAUPER, V.; HUMPHRIES, M. J.; MURPHY, G.; GAVRILOVIC, J. Effects of collagenase-cleavage of type I collagen alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. *Journal of Cell Science*, v. 111, p. 1127-1135, 1998.

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. *Biologia Plantarum* (Praha), v. 26, p. 113-120, 1984.

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

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

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

NOGUEIRA, N.A.P.; GRANGEIRO, M.B.; CUNHA, R.M.S.; RAMOS, M.V.; ALVES, M.A.O.; TEIXEIRA, E.H.; BARRAL-NETTO, M.; CALVETE, J.J.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B. Expression and purification of the recombinant ConBr (*Canavalia brasiliensis* lectin) produced in *Escherichia coli* cells. *Protein and Peptide Letters*, v.9, n.1, p. 56-66, 2002.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: a inhibitor of mitosis in cultures of normal human leucocytes. *Cancer Research*, v. 20, p. 462-464, 1960.

OKAMOTO, T.; AKAIKE, T.; SUGA, M.; TANASE, S.; MORIE, H.; MAYAJIMA, S.; ANDO, M.; ICHINOSE, Y.; MAEDA, H. Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 6059-6066, 1997.

ORENSTEIN, A.; KLEIN, D.; KOPOLOVIC, J.; WINKLER, E.; MALIK, Z.; KELLER, N.; NITZAN, Y. The use of porphyrins for eradications of *Staphylococcus aureus* in burns wound infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 19, p. 307-314, 1998.

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

PARSLEW, R.; JONES, K. T.; RHODES, J. M.; SHARPE, G. R.; The antiproliferative effect of lectin from the edible mushroom (*Agaricus isporus*) on human keratinocytes: preliminary studies on its use in psoriasis. *The British Journal of Dermatology*, v. 140, p. 56-60, 1999.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, v. 109, p. 347-352, 1995.

PHILLIPS, J. A.; BONASSAR, L. J. Matrix metalloproteinases activity synergizes with $\alpha_2\beta_1$ integrins to enhance collagen remodeling. *Experimental Cell Research*, v. 310, p. 79-97, 2005.

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

POTEMPA, J.; BANULA, A.; TRAVIS, J.; Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontology*, v. 24, p. 53-192, 2000.

PUSZTAI, A. *Plant lectins*. Cambridge: Cambridge University Press. 1991. 263 p.

RABIJNS, A.; VERBOVEN, C.; VAN DAMME, E. J.; PEUMANS, W. J.; DE RANTER, C. J. A legume in two crystal forms: preliminary diffraction analysis. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, v. 56, p. 1638-1640, 2000.

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

REICHNER, J. S.; MESZAROS, A. J.; LOUIS, C. A.; HENRY, W. L. J.; MASTROFRANCESCO, B.; MARTIN, B. A.; ALBINA, J. E. Molecular and metabolic evidence for the restricted expression of inducible nitric oxide synthase in healing wounds. *The American Journal of Pathology*, v. 154, p. 1097-1104, 1999.

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

RINI, J.M. Lectin structure. *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure*, v.34, p. 551-577, 1995.

RISA, W. W. Angiogenic growth factors. *Progress in Growth Factor Research*, v. 2, p. 71-79, 1990.

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. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 25, p. 823-826, 1992.

RÜDIGER, H.; SIELBERT, H.C.; SOLIS, D.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LIETH, C.W.; DIAZ-MAURIÑO, T.; GABIUS, H.J. Medicinal chemistry based on sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. *Current Medicinal Chemistry*, v.7, p. 389-416, 2000.

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

SANTOS, A. C. O.; PEIXOTO, C. A.; COELHO, L. C. B. B. Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds. *Micron*, v. 35, p. 613-618, 2004.

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

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. *The European Journal of Surgery*, v. 165, p. 262-267, 1999.

SCHÄFFER, M. R.; TANTRY, V.; GROSS, S. S.; WASSERKRUG, H. L.; BARBUL, A. Nitric oxide regulates wound healing. *Journal of Surgical Research*, v. 63, p. 237-240, 1996.

SCHÄFFER, M. R.; TANTRY, V.; VAN WESEP, R. A.; BARBUL, A. Nitric oxide metabolism in wounds. *Journal of Surgical Research*, v. 71, p. 25-31, 1997.

SCHIRATO, G. V.; SILVA, F. O.; PORTO, C. S.; CAVADA, B. S.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO-LEÃO, A. M.; PORTO, A. L. F. Efeito da lectina de *Canavalia brasiliensis* no tratamento tópico de feridas cutâneas experimentais de camundongos. In: REUNIÃO REGIONAL DA SBBq – 2nd INTERNATIONAL SYMPOSIUM IN BIOCHEMISTRY OF MACROMOLECULES AND BIOTECHNOLOGY, 7., 2004, Recife. *Anais...* Recife: EDITORA UNIVERSITÁRIA DA UFPE, 2004, p. 159-161.

SENEL, S.; MCCLURE, S. J. Potentials applications pf chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug delivery Reviews*, v. 56, p. 1467-1480, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, v. 14, p. 53R-64R, 2004a.

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

SHARON, N.; LIS, H. Legumes lectins – a large family of homologous proteins. *The FASEB Journal*, 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. *Journal of Dermatological Science*, v. 37, p. 65-73, 2005.

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

SILVA, L. I. M. M.; RAMOS, M. V.; CAJAZEIRAS, J B.; FERREIRA, P. R.; CARVALHO, C. A. V.; GRANJEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SAMPAIO, A. H.; FREITAS, B. T.; SILVEIRA, J. A. G.; CAVADA, B. S. Lectin from *Pisum arvense* seeds behave differently from storage proteins during germination in the darkness. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, n. 3, p. 255-262, 2000.

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

SINGH, J.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S. A novel mitogenic and antiproliferative lectin from a wild cobra lily, *Arisaema flavum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 318, p. 1057-1065, 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. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 113, p. 1090-1098, 1999.

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

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

STOEVA, S.; FRANZ, M.; WACKER, R.; KRAUSPENHAAR, R.; GUTHOHRLEIN, E.; MIKHAILOV, A.; BETZEL, C.; VOELTER, W. Primary structure, isoforms, and molecular modeling of a chitin-binding mistletoe lectin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 392, p. 23-31, 2001.

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

TAKEHARAM, K. Growth regulation of skin fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, v. 24, suppl. 1, p. 570-577, 2000.

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

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.

European Journal of Cancer, v. 37, p. 1910-1920, 2001.

TRINDADE, M.B. *Purificação, caracterização e estudos estruturais de duas novas lectinas ligantes de quitina das sementes do gênero Artocarpus*. 2005. 127f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2005.

UTYAMA, I. K. A. *Avaliação antimicrobiana e citotóxica do vinagre e do ácido acético: perspectiva na terapêutica de feridas*. 2003. 113 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2003.

VAN DAMME, E. J. M.; ASTOUL, C. M.; BARRE, A.; ROUGE, P.; PEUMANS, W. J. Cloning and characterization of a monocot mannose-binding lectin from *Crocus vernus* (family Iridaceae). *European Journal of Biochemistry / FEBS*, v. 267, p. 5067-5077, 2000a.

VAN DAMME, E. J. M.; HAO, Q.; CHARELS, D.; BARRE, A.; ROUGE, P.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. Characterization and molecular cloning of two different type 2 ribosome-inactivating proteins from the monocotyledonous plant *Polygonatum multiflorum*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, v. 267, p. 2746-2759, 2000b.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectin: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological role. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 17, p. 575-692, 1998.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 9, p. 707-714, 1999.

WAH, D. A.; ROMERO, A.; DEL SOL, F. G.; CAVADA, B. S.; RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, A. M.; CALVETE, J. J. Crystal structure of native and Cd/Cd-substituted *Dioclea guianensis* seed lectin. A novel manganese-binding site and structural basis of dimer-tetramer association. *Journal of Molecular Biology*, v. 310, p. 885-894, 2001.

WALDORF, R. L.; SMART, C. L. Wound healing. *Advances in Dermatology*, v. 10, p. 77-96, 1995.

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*. *International Journal of Peptide and Protein Research*, v. 46, p. 508-513, 1996.

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

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

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. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 101, p. 967-971, 1998.

ZARKOVIC, N.; VUKOVIC, T.; LONCARIC, I.; MILETIC, M.; ZARKOVIC, K.; BOROVIC, S.; CIPAK, A.; SABOLOVIC, S.; KONITZER, M.; MANG, S. An overview on anticancer activities of the *Viscum album* extract Isorel. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, v. 16, p. 55-62, 2001.

6. ARTIGO

Efeito cicatrizante e antimicrobiano das lectinas de semente de *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea violacea* em feridas cutâneas experimentais em camundongos

G. V. Schirato ^a, F. O. Silva ^b, F. M. F. Monteiro ^b, M. M. Ribeiro-Júnior ^c, J. L. S. Araújo-Filho ^c, C. L. B. Cavalcanti ^c, B. S. Cavada ^d, J. L. Lima-Filho ^c, A. M. A. Carneiro-Leão ^e,
A. L. F. Porto ^{e,*}

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP: 50670-901

^b Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP: 52171-900

^c Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP: 50670-901

^d Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, C.P. 6033, Fortaleza, Brasil, CEP: 60451-970

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

Resumo

O efeito das lectinas obtidas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Dioclea violacea* (DVioL), nas concentrações 50µg/mL e 100µg/mL foi avaliado no processo cicatricial de feridas cutâneas em camundongos Swiss (*Mus musculus*; n=75). Uma ferida asséptica foi produzida na região dorsal torácica dos animais e tratada diariamente por via tópica com as lectinas ConBr e DVioL (50 e 100µg/mL). Durante o período pós-operatório (PO), as lesões cutâneas foram avaliadas clinicamente até o 12^o dia. As análises histopatológicas e antimicrobianas foram realizadas no 2^o, 7^o e 12^o dias PO. A atividade antimicrobiana *in*

* Corresponding author: Tel.: + 55 81 21268484; fax: +55 81 21268485

E-mail address: analuporto@yahoo.com.br (A.L.F. Porto).

in vitro foi testada frente às bactérias *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp. As lectinas testadas aceleraram o processo cicatricial, especialmente a ConBr 100µg/mL, observando-se os aspectos clínicos (sinais inflamatórios e decréscimo da área das lesões) e histopatológicos (tecido de granulação e reepitelização). Os resultados obtidos sugerem a possível utilização clínica das lectinas ConBr e DVioL.

Palavras-chave: *Canavalia brasiliensis*; *Dioclea violacea*; Lectinas; Cicatrização; Atividade antimicrobiana; Pele; Camundongo.

1. Introdução

A pele é um órgão complexo, sendo passível de ser severamente afetado por ferimentos. Este órgão possui função no regulamento térmico, impedindo a desidratação por perda de água através de evaporação e age como uma barreira mecânica contra agentes químicos e infecciosos. Histologicamente, a pele é composta por três camadas: epiderme, a camada mais externa, constituída por epitélio pavimentoso estratificado; derme, situada sob a epiderme, variando de tecido conjuntivo frouxo a denso; e hipoderme ou subcútis, que consiste em tecido conjuntivo frouxo que une a derme ao periósteo, ao pericôndrio ou à fáscia profunda subjacente (Balasubramani et al., 2001).

O processo cicatricial é uma seqüência regulada por eventos celulares e bioquímicos ordenados com objetivo de restaurar a integridade do tecido lesado. A participação de células do sistema imune ocorre pela migração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos ao local da lesão. Estas células participam na fase inflamatória e no processo de defesa do hospedeiro, sendo vitais para regular o processo cicatricial pela secreção de sinalizadores moleculares, como citocinas e fatores do crescimento (Park e Barbul, 2004). Após estes eventos, fibroblastos e capilares invadem a lesão formando tecido de

granulação contrátil que mantém as bordas da lesão unidas. Além disso, os queratinócitos migram em direção ao centro da ferida, restaurando a integridade da epiderme (Martin, 1997). A remodelação do colágeno ocorre na última fase da cicatrização, perdurando por diversos meses. Neste período, a matriz extracelular é sintetizada, depositada, contraída e remodelada. As enzimas proteolíticas, como as metaloproteases de matriz (MMPs), possuem fundamental importância neste processo (Pilcher et al., 1999; Grinnell, 2003; Phillips e Bonassar, 2005).

Caso as feridas não recebam um tratamento adequado, elas podem tornar-se infectadas. Em feridas infectadas, o processo cicatricial é mais lento, a reepitelização é mais prolongada, havendo risco de infecção sistêmica (Inngjerdinger et al., 2004). A flora bacteriana encontrada na pele pode ser classificada em dois tipos: “Flora normal”, composta por bactérias não patogênicas e a “flora transitória” que podem causar infecções caso a epiderme esteja lesionada. As infecções cutâneas secundárias são frequentemente causadas por *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pyogenes* (Streptococcus do grupo A, β -hemolítico). O diagnóstico preciso e um tratamento adequado das feridas cutâneas são essenciais para prevenir o agravamento da dermatose inicial que pode ocasionar, em circunstâncias extremas, complicações sistêmicas como a sepsis e a morte do indivíduo (Bikowski, 1999).

As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos de maneira específica e reversível sem alterar a estrutura covalente destes (Singh et al., 2004), associando-se a mono ou oligossacarídeos livres em solução ou aderidos à superfície celular (Alencar et al., 2003).

As lectinas de vegetais pertencentes à família Leguminosae são as proteínas ligadas a carboidratos mais estudadas. As lectinas de sementes isoladas de leguminosas pertencentes à subtribo Diocleinae e tribo Phaseoleae possuem uma estrutura primária

semelhante e sítios de ligação para trimanosídeos N-ligados, porém apresentam especificidade distinta para ligação com carboidratos complexos (Calvete et al., 1999). As lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Dioclea violacea* (DVioL) ligam-se de maneira específica a D-manose e D-glicose (Moreira et al., 1997), possuindo homologia estrutural de cerca de 99% à Concanavalina A (ConA), segundo Sanz-Aparicio et al. (1997). A ConA e ConBr podem-se ligar a estruturas semelhantes ou idênticas de carboidratos expostos nas superfícies celulares, ativando a resposta celular ou expressando efeitos quantitativos diferentes. Além disso, uma vez que apenas a estrutura tetravalente é capaz de ligar-se ao receptor presente na superfície, a proporção entre as formas bivalentes e tetravalentes de uma determinada lectina são dependentes de pH e ocasionam diferentes respostas funcionais destas lectinas (Wah et al., 2001).

Objetivou-se com este trabalho investigar o efeito do tratamento tópico diário utilizando as lectinas de *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea violacea* no processo cicatricial em camundongos e avaliar a atividade de antimicrobiana *in vivo* e *in vitro* destas lectinas.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais

Camundongos *Swiss* machos, com 10 semanas de idade, pesando $35,0 \pm 2,0$ g foram criados e mantidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram locados em gaiolas individuais, permanecendo em macroambiente controlado (fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade $55 \pm 10\%$) com fornecimento *ad libitum* de água e ração.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Pernambuco.

2.2. Lectinas

As lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Dioclea violacea* (DVioL) foram obtidas das sementes destas leguminosas e purificadas pelo método de Moreira e Cavada (1984) e Moreira et al. (1996), respectivamente. As lectinas liofilizadas foram ressuspensas em solução NaCl 150mM até obter as concentrações finais 50µg/mL e 100µg/mL. Após a dissolução, as soluções foram filtradas em membranas 0,22µm e, posteriormente, armazenadas em frascos esterilizados a -4°C.

2.3. Avaliação da atividade cicatrizante

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais (n=15/grupo), anestesiados por via intramuscular com cloridrato de xilazina 2% (10 mg/Kg) e cloridrato de cetamina 10% (115 mg/Kg), segundo Hall et al. (2001). Após o procedimento anestésico, cada animal foi submetido à tricotomia da região dorsal e posterior antisepsia utilizando iodopovidona 1%. Com auxílio de um molde metálico vazado ($\varnothing=0,8\text{cm}$), a pele foi demarcada com caneta dermatográfica. A ferida cutânea foi produzida pela incisão da pele através de lâmina de bisturi número 15 e a tela subcutânea divulsionada com tesoura de pontas tipo fina/fina e pinça de dissecação, até sua ressecção.

Cada lesão recebeu diariamente 100µL das soluções testadas e os grupos foram divididos de acordo com o tratamento experimental empregado: NaCl 150mM (Grupo C); lectina ConBr 50 µg/ml (Grupo ConBr50); lectina ConBr 100µg/mL (Grupo ConBr100); lectina DVioL 50 µg/ml (Grupo DVioL50); lectina DVioL 100µg/mL (Grupo DVioL 100).

Diariamente, cada lesão foi avaliada clinicamente e mensurada por auxílio de um paquímetro. A redução da área da lesão foi calculada pela equação formulada por Prata et

al. (1988): $A = \pi.R.r$, onde “A” representa a área (cm²); “R”, o raio maior; “r”, o raio menor.

2.4. Atividade antimicrobiana

Os ensaios *in vivo* foram realizados através da coleta de material das lesões experimentais por meio de *swabs* esterilizados, nos tempos 0, 2^o, 7^o e 12^o dias de pós-operatório. O material foi semeado em placas de Petri contendo ágar sangue 5% e ágar Levine, e posteriormente, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C durante 24 horas. As bactérias foram classificadas através dos aspectos morfológicos das colônias e morfotintoriais ao Gram.

A atividade antimicrobiana *in vitro* foi realizada frente às bactérias *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp. obtidas do Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. O ensaio foi executado de acordo com o método modificado de Hufford et al. (1975). O inóculo de microorganismos foi preparado em caldo Nutriente em agitador orbital (150 x g, 24h, 37°C) e posteriormente padronizado de modo a apresentar absorbância inicial de 0,5 a 600nm. Uma alíquota da cultura bacteriana (10⁵-10⁶ colônias/mL) foi adicionada a placas de Petri esterilizadas contendo 10 mL de meio ágar nutriente. Após a solidificação do ágar, poços ($\varnothing=7$ mm) foram confeccionados com auxílio de um perfurador esterilizado. Cada solução (15 μ L) foi colocada separadamente nos poços: ConBr 50 μ g/mL; ConBr 100 μ g/mL; DVioL 50 μ g/mL; DVioL 100 μ g/mL; NaCl 150 mM (controle negativo) e Nitrofurazona 0,2% (controle positivo) e as placas foram incubadas durante 24 h, a 37°C. Os testes foram realizados em duplicata. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela mensuração do diâmetro (mm) do halo de inibição formado.

2.5. Análises histopatológicas

Com os camundongos anestesiados conforme previamente descrito, amostras do tecido lesionado foram coletadas nos tempos 2^o, 7^o e 12^o dias PO, com objetivo de realizar a análise histopatológica. Nestes tempos, cinco animais eram retirados dos grupos experimentais e após a realização das biópsias, eram submetidos à eutanásia por superdosagem de Pentobarbital sódico (200 mg/Kg) por via intraperitoneal. As amostras de tecido foram fixadas em formaldeído 4% (v/v) preparado em PBS 0,01M, pH 7,2. Estas amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina e incluídas em parafina. Após microtomia, os cortes foram corados pela Hematoxilina-Eosiana e por Tricrômico de Masson (Banks, 1992).

2.6. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão ($M \pm sd$), submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, aceitando como estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de 5%.

3. Resultados

3.1. Avaliação clínica

A avaliação clínica foi realizada até 12^o dia PO. A avaliação macroscópica do processo cicatricial foi acompanhada pela presença de hiperemia, edema, formação de crosta, características exsudativas e parâmetros morfométricos pela medida da área das lesões.

Durante o período inflamatório, a presença de edema foi observada em todos os grupos (Figura 2). As lesões pertencentes ao grupo ConBr100 apenas apresentaram este sinal nos três primeiros dias de pós-operatório (PO), em 100%, 33,33% e 10% das lesões

(1^o, 2^o e 3^o dia, respectivamente). O grupo tratado com a lectina de *Dioclea violacea* em maior concentração (DVioL100), apresentou edema até 4^o dia PO (10%), enquanto DVioL50 até o quinto dia PO (10%). No 6^o dia PO, apenas as lesões do grupo C e ConBr50 apresentaram este sinal, em 20% e 40% dos animais, respectivamente.

A hiperemia, devido à dilatação dos leitos vasculares presentes na região lesionada, foi observada nos grupos experimentais até o 6^o dia PO, sendo mais intensa no grupo controle (Grupo C) (Figura 3). Especialmente no 5^o dia PO, apenas 10% das feridas de ConBr100 apresentaram hiperemia. Neste mesmo período, 100%; 70%; 80% e 90% de das lesões dos grupos C, ConBr50, DVioL50 e DVioL100, respectivamente, apresentaram este sinal inflamatório.

As características exsudativas da fase inflamatória foram acompanhadas durante o experimento; sendo visualizado no grupo ConBr 50 no 1^o e 5^o dia PO (6,67% e 10%, respectivamente) e no grupo DVioL100 no 2^o e 4^o dias PO (6,67% e 10%, respectivamente). A exsudação visualizada é característica de fase inflamatória, possuindo aspecto sero-sanguinolento; nenhuma lesão experimental apresentou infecção com secreção purulenta.

A primeira crosta foi observada a partir do primeiro dia de pós-operatório em todos os grupos experimentais, principalmente no grupo de ConBr100 em 73,33% das lesões. No mesmo período, apenas 6,63% das lesões do grupo DVioL100 e 20% das feridas cutâneas dos demais grupos apresentaram crosta. Entre 4^o e 5^o dias PO, 100% dos animais apresentaram crostas no leito da lesão. No 9^o dia PO, 100% das crostas do grupo ConBr100 haviam se desprendido. Apenas os grupos C e DVioL50 apresentaram crostas nas feridas no 11^o e 12^o dias PO. Durante o período avaliado, as crostas dos grupos experimentais apresentaram-se finas, secas e com aspecto uniforme (Figura 4).

A evolução macroscópica do processo cicatricial foi acompanhada pela mensuração das lesões ao longo de 12 dias pós-cirúrgicos (Figura 5). No 1^o dia PO, era possível observar uma significativa redução da área nas lesões tratadas com as lectinas em relação ao grupo controle. Durante os três primeiros dias PO, o grupo ConBr 100 apresentou redução estatisticamente significativa de área das feridas na ordem de 0,42 cm²/dia. Este comportamento não foi observado nos demais grupos estudados. Até 7^o dia PO os grupos ConBr100, DVioL50 e DVioL100 mostraram perfil semelhante de contração de ferida. No 8^o dia PO, a área média dos grupos estudados foi: 1,39 ± 0,26 cm² (grupo C); 0,88 ± 0,61 cm² (grupo ConBr50); 0,58 ± 0,06 cm² (grupo ConBr100); 1,00 ± 0,13 cm² (grupo DVioL50); 0,71 ± 0,23 cm² (grupo DVioL100). No último dia de avaliação, as lesões tratadas com a lectina de *Canavalia brasiliensis* 100µg/mL apresentaram maior percentual de contração: 96,40%. Neste mesmo período, a área média das lesões deste era 0,11 ± 0,08 cm².

A eficácia do tratamento com as lectinas ConBr e DVioL foi estatisticamente significativo comparado ao grupo controle. O tratamento utilizando a lectina ConBr demonstrou ser dose-dependente, porém o tratamento com DVioL não apresentou esta característica. Não houve diferenças significantes na resposta do tratamento utilizando as lectinas com mesmas concentrações (ConBr50 = DVioL50, ConBr100 = DVioL100).

3.2. Atividade antimicrobiana

Os ensaios antimicrobianos *in vivo* foram realizados nos tempos 0, 2^o, 7^o e 12^o dias PO (Figura 6). No tempo zero, não houve crescimento microbiano nas lesões experimentais, certificando que estas foram realizadas em condições assépticas. Durante o período avaliado, nenhum microorganismo foi isolado do grupo ConBr100. Nos demais grupos estudados, apenas a bactéria comensal *Staphylococcus* sp. foi identificada. As

lesões do grupo controle (grupo C) apresentaram-se mais contaminadas. Nos grupos tratados com as lectinas ConBr e DVioL com a concentração 50µg/mL apresentaram *Staphylococcus* sp. durante o período avaliado, especialmente no 7^o dia PO em 81,82% das lesões dos grupos ConBr50 e no 12^o dia PO em 60% das lesões do grupo DVioL50. O grupo DVioL100 apenas apresentou contaminação bacteriana no 2^o dia PO (33,33%).

Os ensaios *in vitro* revelaram que as lectinas de *Canavalia brasiliensis* e de *Dioclea violacea* não possuem atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados. Apenas o controle positivo (Nitrofurazona 0,2%) apresentou formação de halo de inibição medindo: $19,4 \pm 0,04$ mm para *Bacillus* sp.; $11,95 \pm 0,04$ mm para *Escherichia coli*; $20,1 \pm 0,07$ mm para *Streptococcus* sp. e $19,65 \pm 0,26$ mm para *Staphylococcus aureus*.

3.3. Análises histopatológicas

Durante a avaliação histopatológica, as análises do grupo C (NaCl 150mM) demonstraram a evolução normal do processo reparativo. Durante o 2^o dia PO (Figura 7), os grupos tratados apresentaram as mesmas características histopatológicas do grupo controle, apresentando crosta, exsudato, infiltração de neutrófilos e angiogênese. Os grupos tratados com a lectina de *Canavalia brasiliensis* menor quantidade de exsudato inflamatório comparados aos demais grupos estudados.

Durante o 7^o dia pós-operatório (Figura 8), as lesões apresentaram tecido de granulação com padrão fibro-vascular. O grupo ConBr50 apresentou reepitelização abaixo da crosta, porém o tecido de granulação encontrava-se bem organizado. Os grupos tratados com as lectinas apresentavam uma grande quantidade de fibroblastos na derme; nos grupos ConBr100, DVioL50 e DVioL100 foi evidenciado início de regeneração epitelial nas bordas das lesões.

No 12^o dia (Figura 9), o grupo tratado com NaCl ainda permanecia com tecido de granulação com padrão fibro-vascular, crosta e a reepitelização não completa. Os camundongos tratados com a lectina de *Dioclea violacea* (DVioL50 e DVioL100), apresentaram características histopatológicas semelhantes: reepitelização incompleta, presença de fibroplasia e angiogênese. Do ponto de vista histopatológico, o processo reparativo apresentou-se mais avançado nos grupos tratados com a lectina de *Canavalia brasiliensis*, principalmente em ConBr100. Neste grupo, as lesões apresentavam-se completamente reepitelizadas com uma fina camada de queratina. As análises revelaram que o tecido de cicatricial apresentava-se com aspecto fibroso com fibrilas de colágeno bem organizadas e início de formação de anexos cutâneos.

4. Discussão

O sistema imune desempenha papel fundamental no processo de cicatrização de lesões cutâneas pois, além de participarem na função inflamatória e de defesa do hospedeiro, as células pertencentes ao sistema imune liberam citocinas, linfocinas e fatores de crescimento indispensáveis pela continuidade do processo (Park e Barbul, 2004). Durante os últimos anos, foi demonstrado que uma grande quantidade de lectinas vegetais são capazes de ativar células do sistema imune (Alencar et al., 2004; Cavada et al., 2001). Lectinas vegetais, especialmente as que são homólogas a ConA (glicose/manose) são capazes de modular o recrutamento de neutrófilos por mecanismos indiretos (Assreuy et al., 2003). Alencar et al. (2005) demonstraram que a lectina de *Arum maculatum* possui efeito pró-inflamatório quando administrada intraperitonealmente em ratos (80, 200 e 500 µg/mL/cavidade), induzindo a migração de neutrófilos e macrófagos de maneira significativa e dose-dependente.

O processo reparativo é regulado também por fatores de crescimento e citocinas (Werner e Grose, 2003). Diversas lectinas extraídas de leguminosas pertencentes à subtribo Diocleinae induzem a produção de citocinas por células mononucleares de humanos; as lectinas testadas induzem a liberação de grande quantidade de TNF- α e IFN- γ . As lectinas de DRL e ConBr induzem a produção de níveis elevados de IFN- γ e a produção de TNF- α é aumentada de maneira significativa pelas lectinas ConBr, DVioL e DvirL (Cavada et al., 2001).

As lectinas possuem ação mitogênica (Cavada et al., 1996). Os carboidratos presentes na superfície celular possuem papel regulador no processo de reconhecimento celular. Lectinas vegetais interagem com resíduos específicos de carboidratos de glicoproteínas da membrana celular e executam função mitogênica mimética (Kulkarne e McCulloch, 1995). Em ensaios *in vivo*, foi demonstrado que a lectina de *Abrus precatorius* induz resposta mitogênica em macrófagos murinos, potencializando a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, aumentando também a sua ação fagocitária e bactericida (Tripathi e Maiti, 2003). 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* em concentrações superiores a 20 μ g/mL. Como visualizado em nossas análises histopatológicas, as lesões tratadas com ConBr e DVioL mostraram um grande número de fibroblastos na derme quando comparadas com o grupo controle (NaCl).

As lectinas ConBr e DVioL possuem a mesma especificidade por resíduos de glicose e manose, possuindo grande afinidade pela cadeia de trimanosídeo 3,6-di-O-(α -D-manopiranosil)-D-manose (Dam et al., 1998), sendo característica das regiões núcleo de carboidratos N-ligados a asparagina. Além disso, estas lectinas reconhecem os mesmos epítomos na estrutura do trimanosídeo. Apesar da grande homologia entre as estruturas das lectinas de Diocleinae, estas proteínas podem induzir respostas biológicas distintas. Em

nosso trabalho, a diferença na resposta entre os tratamentos com as lectinas ConBr e DVioL pode ser atribuída ao fato que estas apresentam especificidade distinta a carboidratos complexos (Gupta et al., 1996; Dam et al., 1998). Além disso, elas possuem diferente equilíbrio dimérico-tetramérico dependentes de pH (Grangeiro et al., 1997; Calvete et al., 1999). Apenas a conformação tetravalente interage com receptores da superfície celular, ativando vias de transcrição. Por exemplo, a diferença encontrada na intensidade do processo inflamatório das lesões tratadas com ConBr e DVioL pode ser ocasionada em resposta a pequenas diferenças na estrutura primária destas proteínas as quais interferem na afinidade por carboidratos complexos e na relação entre as conformações diméricas e tetraméricas.

O efeito antimicrobiano das lectinas testadas pode ser atribuído por estas proteínas formarem canais iônicos na membrana celular microbiana ou por inibição competitiva da adesão de proteínas microbianas aos receptores polissacarídicos do hospedeiro (Cowan, 1999). Além disso, as lectinas estimulam o processo de fagocitose e a lise celular por ativação do sistema complemento (Ottinger et al., 1999).

Os carboidratos glicoconjugados demonstram habilidade em destruir bactérias e vírus, prevenindo infecções em mamíferos. Por exemplo, a manose atua prevenindo a infecção bacteriana. Em sua superfície, as bactérias possuem lectinas que se unem a receptores glicoconjugados da superfície de células hospedeiras de mamíferos, ocasionando a adesão e infecção. A manose se liga competitivamente com as lectinas bacterianas, ocupando os sítios que normalmente se ligariam a receptores, prevenindo desta forma, a infecção. *In vitro*, a manose vem demonstrado prevenir a infecção bacteriana de diversas cepas de *Aeromonas* nas células intestinais de humanos. Em animais, a manose demonstrou, *in vitro*, impedir a aderência da *Salmonella typhimurium*

no intestino de frangos, reduzindo de maneira significativa (aproximadamente 50 a 100%), a incidência de infecção (Gardiger, 2000).

O presente trabalho demonstrou que as lectinas ConBr e DVioL aceleram o processo cicatricial de lesões cutâneas. Este efeito pode ser observado especialmente no grupo tratado com a lectina de *Canavalia brasiliensis* 100 µg/mL. Os resultados presentes oferecem evidência farmacológica preliminar no uso destas lectinas no processo de reparação de feridas cutâneas.

Agradecimentos

À Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha pelo fornecimento dos microrganismos utilizados nos ensaios *in vitro*, à Dra. Maria Helena Madruga e Luiz Felipe Viegas pela produção e auxílio na utilização dos animais de laboratório.

Referências

- 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., 2003. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **35**, 1674-1681.
- Alencar, N.M.N., Assreuy, A.M.S., Criddle, D.N., Souza, E.P., Soares, P.M.G., Havt, A.T., Aragão, K.S., Bezerra, D.P., Ribeiro, R.A., Cavada, B.S., 2004. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. Protein and Peptide Letters **11**, 195-200.
- Alencar, V.B.M., Alencar, N.M.N., Assreuy, A.M.S., Mota, L.M., Brito, G.A.C., Aragão, K.S., Bittencourt, F.S., Pinto, V.P.T., Debray, M., Ribeiro, R.A., Cavada, B.S., 2005.

- Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **37**, 1805-1814.
- Assreuy, A.M., Alencar, N.M.N., Cavada, B.S., Rocha-Filho, D.R., Feitosa, R.F.G., Cunha, Q.F., Calvete, J.J., Ribeiro, R.A., 2003. Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. Biology of Reproduction **68**, 1836-1841.
- Balasubramani, M., Kumar, T.R., Babu, M., 2001. Skin substitutes: a review. Burns **27**, 534-544.
- Banks, W.J., 1992. Histologia veterinária aplicada. 2. ed., Manole, São Paulo, pp. 5-14.
- Bikowski, J., 1999. Antimicrobial management in the emergency department: an educational supplement. The Journal of Emergency Medicine **17**, 197-206.
- Calvete, J.J., Thole, H.H., Raida, M., Urbanke, C., Romero, A., Grangeiro, T.B., Ramos, M.V., Rocha, I.M.A., Guimarães, F.N., Cavada, B.S., 1999. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. Biochimica et Biophysica Acta **1430**, 367-375.
- Cavada, B.S., Barbosa, T., Arruda, S., Grangeiro, T.B., Barral-Netto, M., 2001. Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnology uses of the Diocleinae subtribe lectins. Current Protein and Peptide Sciences **2**, 123-135.
- Cavada, B.S., Ramos, M.V., Cordeiro, E.F., Grangeiro, T.B., Oliveira, J.T.A, Carvalho, A.F.F.V., Moreira, R.A., 1996. Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal **1**, 37-42.
- Dam, T.K., Cavada, B.S., Grangeiro, T.B., Santos, C.F., De Sousa, F.A., Oscarson, S., Brewer, C.F., 1998. 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. The Journal of Biological Chemistry **273**, 12082-12088.
- Gardiner, T., 2000. Actividades biológicas de los ocho monosacáridos alimenticios conocidos que se requieren para la síntesis de las glicoproteínas y los procesos de reconocimiento celular. Glycoscience and Nutrition **1**, 1-7.
- Grangeiro, T.B., Schriefer, A., Calvete, J.J., Raida, M., Urbanke, C., Barral-Netto, M., Cavada, B.S., 1997. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia braziliensis* seeds. European Journal of Biochemistry / FEBS **248**, 43-48.
- Grinnell, F., 2003. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. Trends in Cell Biology **13**, 264-269.
- Gupta, D., Oscarson, S., Raju, T.S., Stanley, P., Toone, E.J., Brewer, C.F., 1996. A comparison of the fine saccharide binding specificity of *Dioclea grandiflora* lectin and concanavalin A. European Journal of Biochemistry / FEBS **242**, 320-326.
- Hall, L.W., Clarke, K.W., Trim, C.M., 2001. Veterinary anesthesia. 10. ed., Saunders, London, pp. 468.
- Hufford, C.D., Funderburk, J.M., Morgan, J.M., Robertson, L.W., 1975. Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liriodendron tulipifera* L. Journal of Pharmaceutical Sciences **64**, 789-792.
- Inngjerdinger, K., Nergard, C.S., Diallo, D., Monoro, P.P., Paulsin, B.S., 2004. An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dongoland, Mali, West Africa. Journal of Ethnopharmacology **92**, 233-244.
- Kulkarni, G.V., McCulloch, C.A., 1995. Concanavalin A induced apoptosis in fibroblasts: the role of cell surface carbohydrates in lectin mediated cytotoxicity. Journal of Cellular Physiology **165**, 119-133.
- Martin, P., 1997. Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. Science **276**, 75-81.

-
- Moreira, R.A., Cavada, B.S., 1984. Lectins from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. *Biologia Plantarum* (Praha) **26**, 113-120.
- Moreira, R.A., Cordeiro, E.F., Grangeiro, T.B., Martins, J.L., Ramos, M.V., Oliveira, J.T.A., Cavada, B.S., 1996. Isolation and parcial characterization of a lectin from *Dioclea violacea* Benth seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **8**, 23-29.
- Moreira, R.A., Monteiro, A.C.O., Horta, A.C.G., Oliveira, J.T.A., Cavada, B.S., 1997. Isolation and characterization of *Dioclea altissima* var. *Megacarpa* seed lectin. *Phytochemistry* **46**, 139-144.
- Ottinger, C.A., Johnson, S.C., Ewart, K.V., Brown, L.L., Ross, N.W., 1999. Enhancement of anti-*Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo solar*) macrophages by a mannose-binding lectin. *Comparative Biochemistry and Phisiology Part C* **123**, 53-59.
- Park, J.E., Barbul, A.B., 2004. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery* **187**, 11S-16S.
- Phillips, J.A., Bonassar, L.J., 2005. Matrix metalloproteinases activity synergizes with $\alpha_2\beta_1$ integrins to enhance collagen remodeling. *Experimental Cell Research* **310**, 79-97.
- Pilcher, B.K., Wang, M., Qin, X.J., Parks, W.C., Senior, K.M., Welgus, H.G., 1999. Role of matrix metalloproteinases and their inhibition in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity. *Annal of the New York Academy of Sciences* **878**, 12-24.
- Prata, M., Haddad, C., Goldenberg, S., 1988. Uso do açúcar em feridas cutâneas, estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira* **3**, 43-48.
- Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J., Granjeiro, T.B., Calvete, J.J., Cavada, B.S., 1997. The cristal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its

- quaternary conformation and is distinct biological properties from Concanavaline A. FESB Letters **405**, 114-118.
- Sell, A.M., Costa, C.P., 2003. Effects of plant lectins on *in vitro* fibroblast proliferation. Brazilian Archives of Biology Technology **46**, 349-354.
- Singh, J., Singh, J., Kamboj, S.S., 2004. A novel mitogenic and aniproliferative lectin from wild cobra lily, *Arisaema flavum*. Biochemical and Biophysical Research Communications **318**, 1057-1065.
- Tripathi, S., Maiti, T.K., 2003. Stimulation of murine macrophages by native and heat-denatured lectin from *Abrus precatorius*. International Immunopharmacology **3**, 375-381.
- Wah, D.A., Romero, A., Del Sol, F.G., Cavada, B.S., Ramos, M.V., Grangeiro, T.B., Sampaio, A.H., Calvete, J.J., 2001. Crystal structure of native and Cd/Cd-substituted *Dioclea guianensis* seed lectin. A novel manganese-binding site and structural basis of dimer-tetramer association. Journal of Molecular Biology **310**, 885-894.
- Werner, S., Grose, R., 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiological Reviews **83**, 835-870.

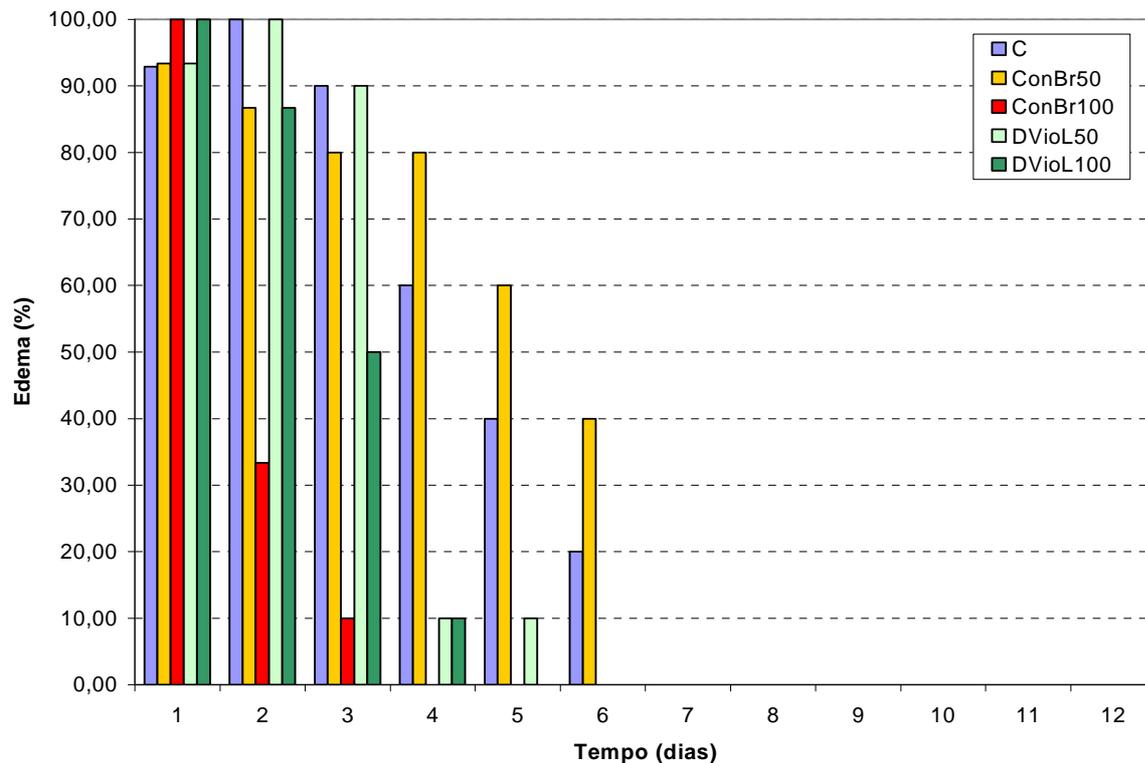


Figura 2: Percentual de edema nos grupos experimentais. Grupo C (NaCl 150mM); grupo ConBr50 (lectina ConBr 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); grupo ConBr100 (lectina ConBr 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); grupo DVioL50 (lectina DVioL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); grupo DVioL 100 (lectina DVioL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

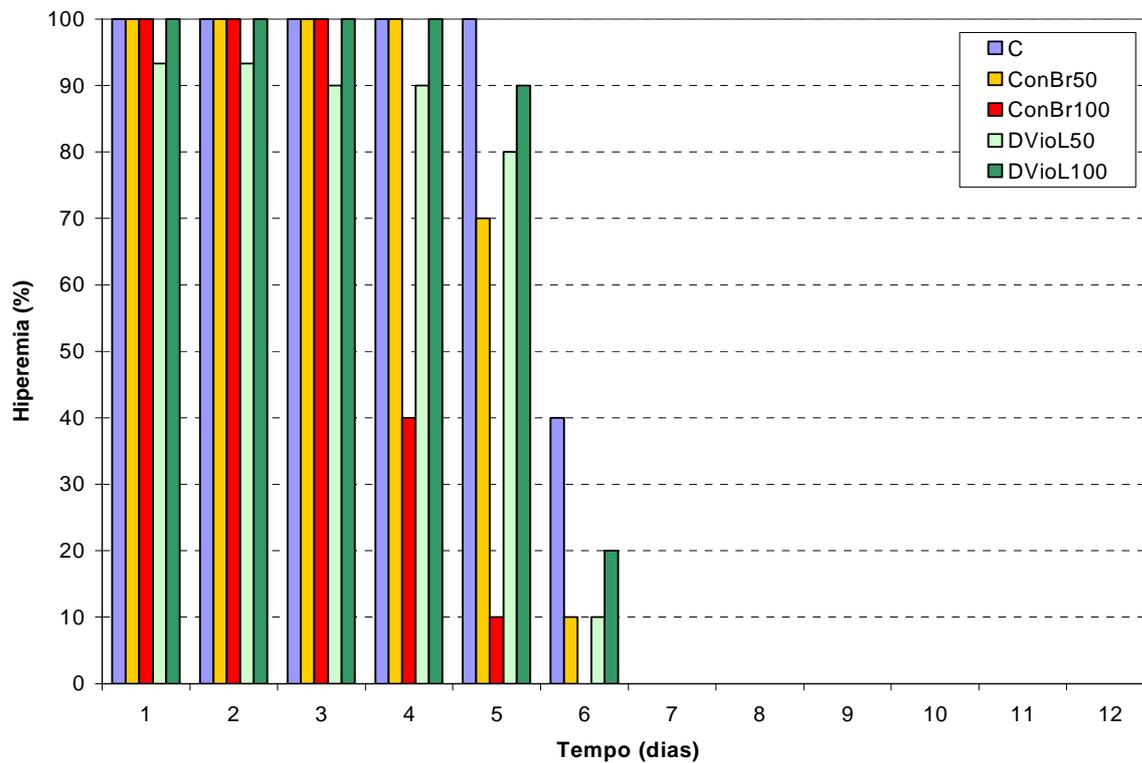


Figura 3: Percentual de hiperemia nos grupos experimentais. Grupo C (NaCl 150mM); grupo ConBr50 (lectina ConBr 50 µg/mL); grupo ConBr100 (lectina ConBr 100µg/mL); grupo DVioL50 (lectina DVioL 50 µg/mL); grupo DVioL 100 (lectina DVioL 100µg/mL).

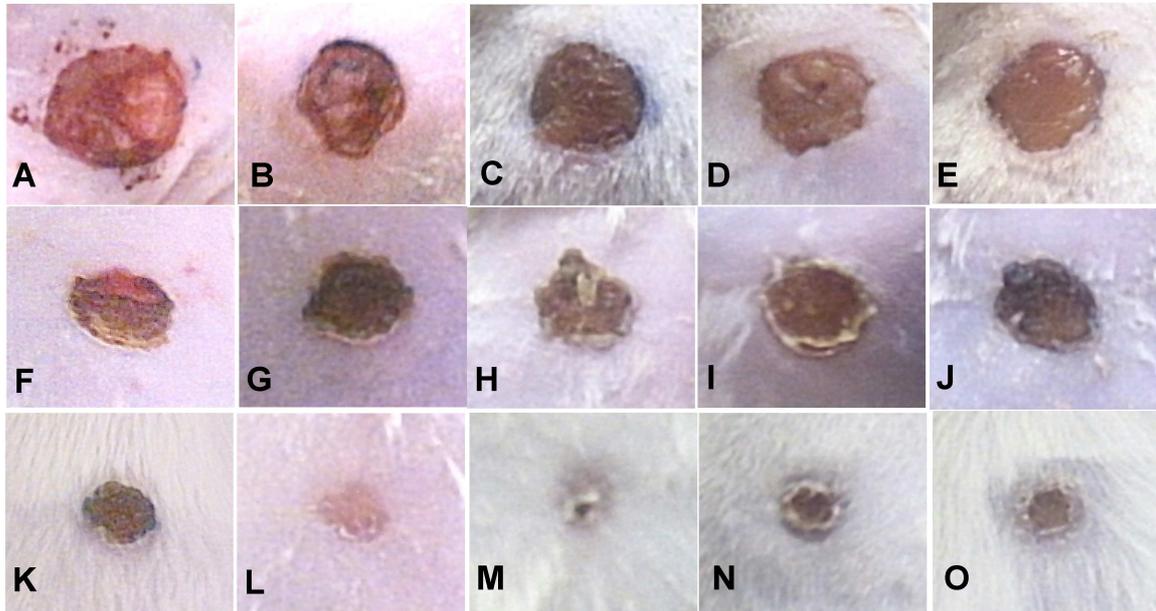


Figura 4: Aspectos macroscópicos das lesões experimentais. Segundo dia pós-operatório (PO): **A**, grupo C (NaCl 150mM); **B**, grupo ConBr50 (lectina ConBr 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); **C**, grupo ConBr100 (lectina ConBr 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); **D**, grupo DVioL50 (lectina DVioL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); **E**, grupo DVioL100 (lectina DVioL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sétimo dia PO: **F**, grupo C; **G** ConBr50; **H**, ConBr100; **I**, DVioL50; **J**, DVioL100. Décimo segundo dia PO: **K**, grupo C; **L** ConBr50; **M**, ConBr100; **N**, DVioL50; **O**, DVioL100.

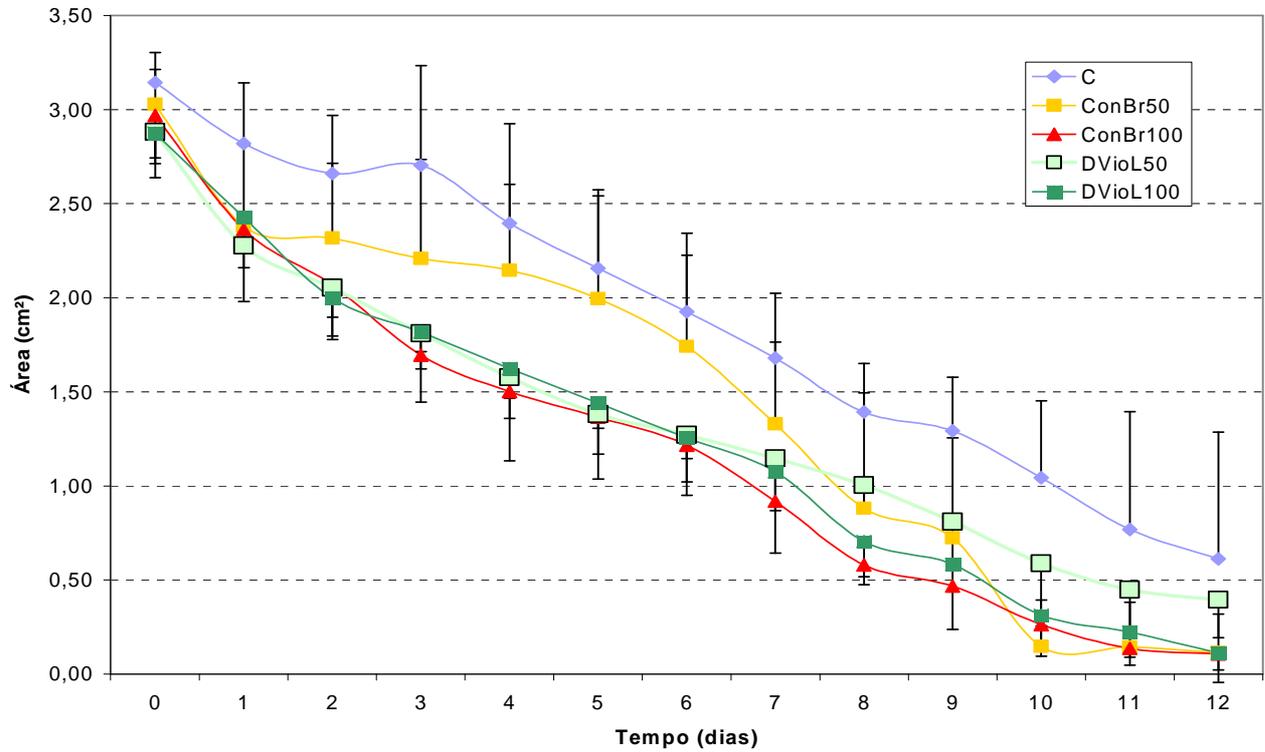


Figura 5: Área da lesão (cm²) e tempo (dias) após o tratamento tópico utilizando NaCl, lectina de *Canavalia brasiliensis* (50 mg/mL e 100 mg/mL), lectina de *Dioclea violacea* (50 mg/mL e 100 mg/mL).

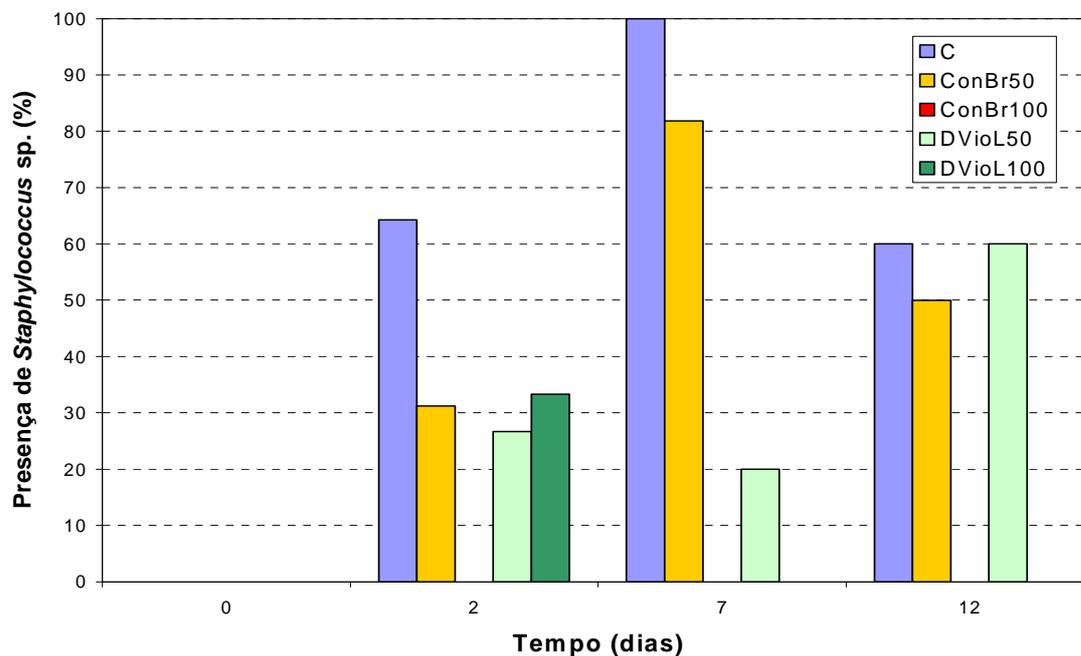


Figura 6: Presença de *Staphylococcus* sp. nas feridas cirúrgicas experimentais. Grupo C (NaCl 150mM); grupo ConBr50 (lectina ConBr 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); grupo ConBr100 (lectina ConBr 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); grupo DVioL50 (lectina DVioL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); grupo DVioL 100 (lectina DVioL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

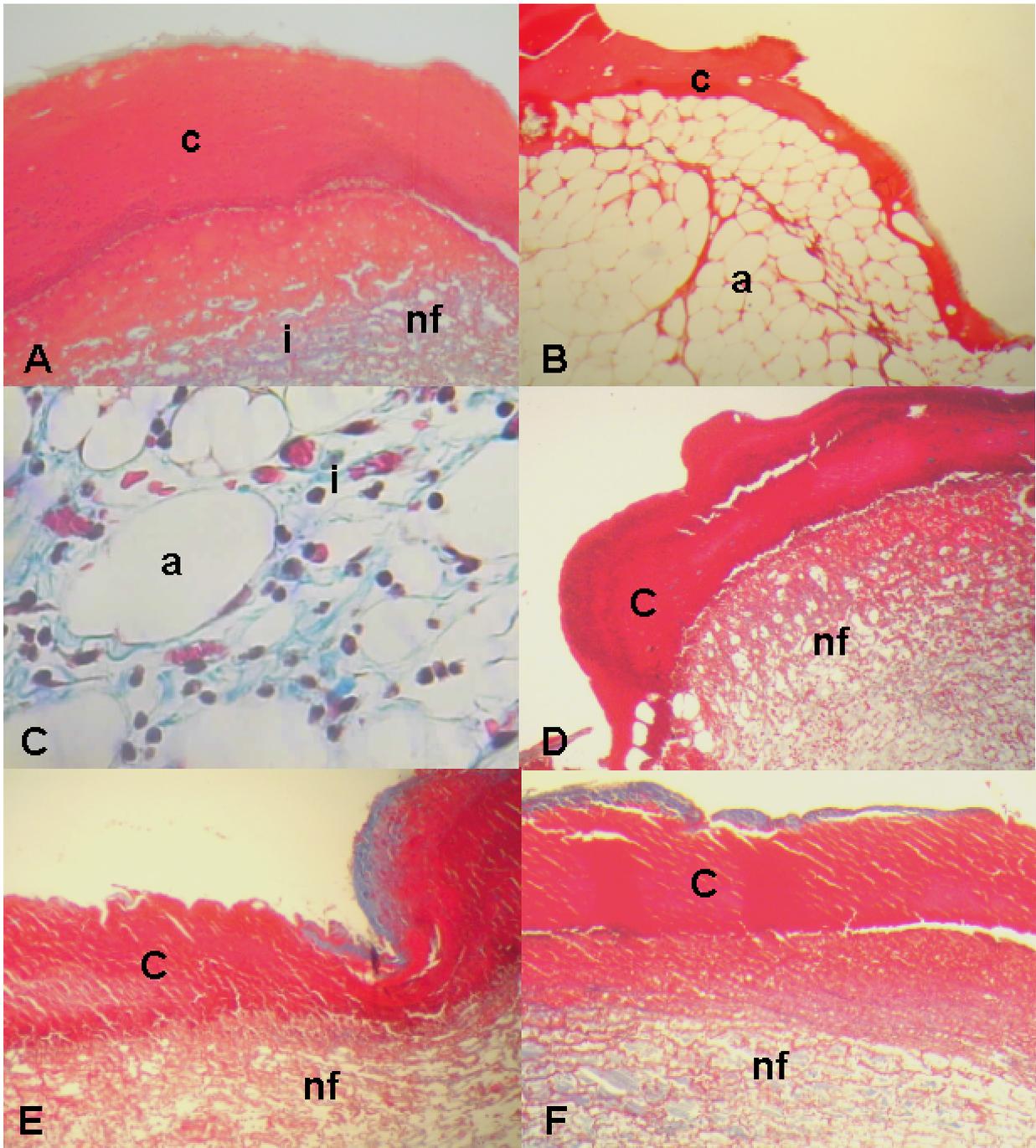


Figura 7: Aspectos histopatológicos das lesões experimentais, 2^o dia de pós-operatório: Tricrômico de Masson. **A** (100X), grupo C (NaCl 150mM); **B** (100X), grupo ConBr50 (lectina de *Canavalia brasiliensis* 50µg/mL); **C** (400X), grupo ConBr50, **D** (100X), grupo ConBr100 (lectina ConBr 100µg/mL), **E** (100X), grupo DVioL50 (lectina de *Dioclea violacea* 50µg/mL); **F** (100X), grupo DVioL100 (lectina DVioL 100µg/mL). c – crosta; nf – tecido conjuntivo neo-formado; i – infiltrado de neutrófilos; a – angiogênese.

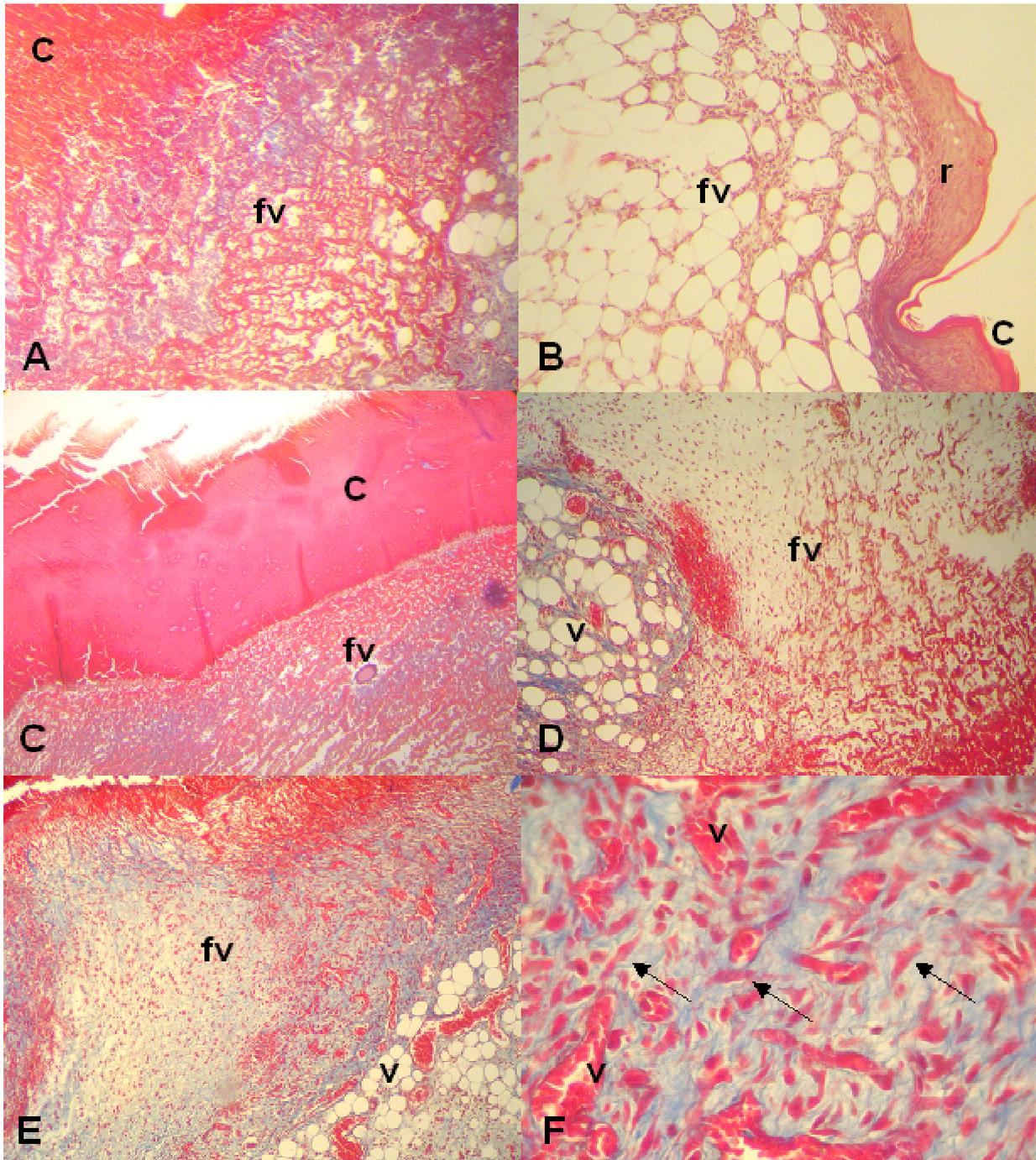


Figura 8: Aspectos histopatológicos das lesões experimentais, 7^o dia de pós-operatório: Tricrômico de Masson. **A** (100X), grupo C (NaCl 150mM); **B** (100X), grupo ConBr50 (lectina de *Canavalia brasiliensis* 50µg/mL); **C** (100X), grupo ConBr100 (lectina ConBr 50µg/mL); **D** (100X), grupo DVioL50 (lectina de *Dioclea violacea* 50µg/mL); **E** (100X), grupo DvioL100 (lectina DVioL 100µg/mL); **F** (400X), grupo DvioL100. c – crosta; fv – tecido de granulação fibrovascular; v – vasos sanguíneos; → - fibroblastos; r – reepitelização.

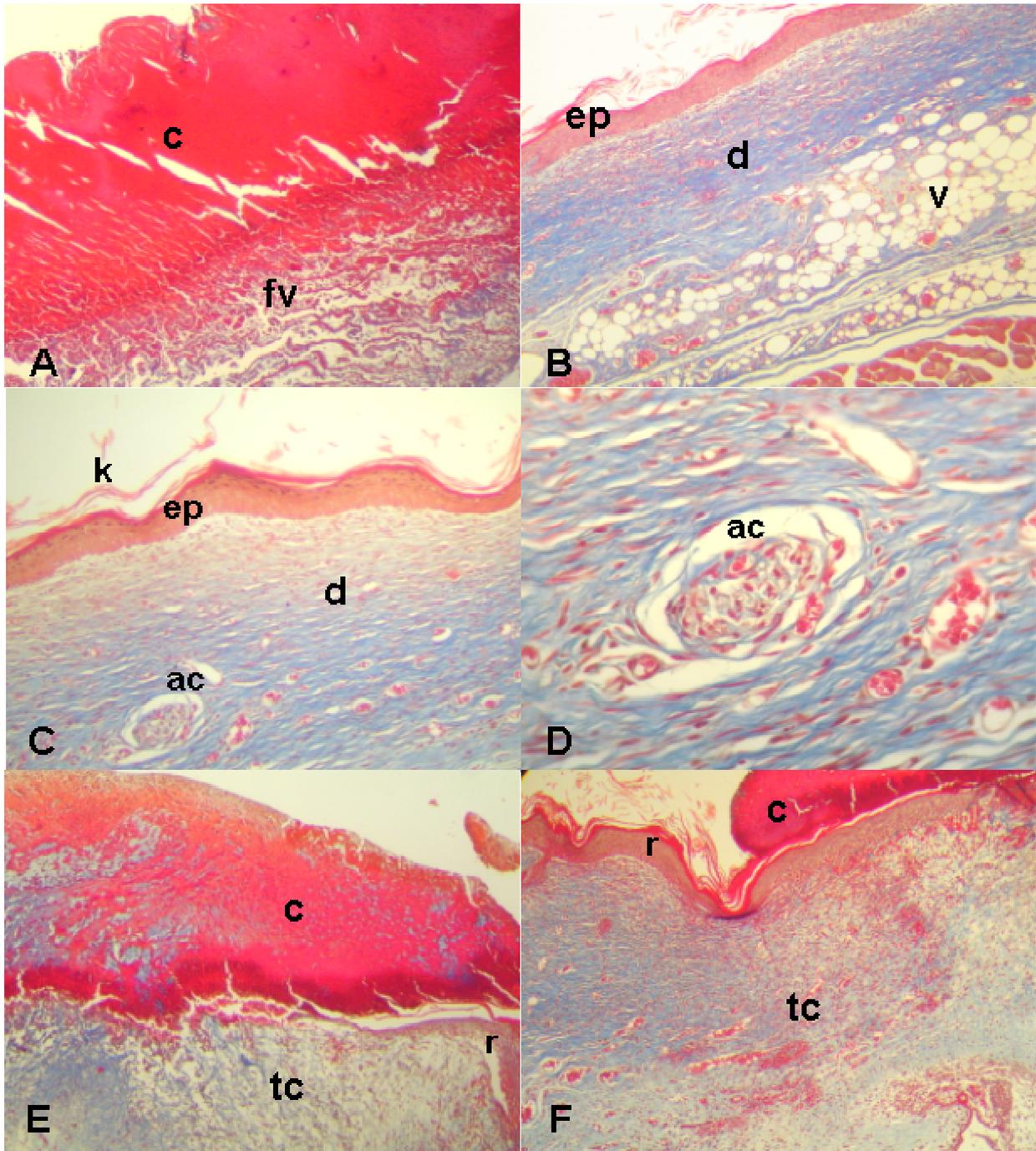


Figura 9: Aspectos histopatológicos das lesões experimentais, 12^o dia de pós-operatório: Tricrômico de Masson. **A** (100X), grupo C (NaCl 150mM); **B** (100X), grupo ConBr50 (lectina de *Canavalia brasiliensis* 50µg/mL); **C** (100X), grupo ConBr100 (lectina ConBr 50µg/mL); **D** (400X), grupo ConBr100; **E** (100X), grupo DVioL50 (lectina de *Dioclea violacea* 50µg/mL); **F** (100X), grupo DvioL100 (lectina DVioL 100µg/mL). c – crosta; fv – tecido de granulação fibrovascular; v – vasos sanguíneos; d – derme; ep – epiderme; k – queratina; ac – anexos cutâneos; tc – tecido cicatricial; r – reepitelização.

7. CONCLUSÕES

- O presente trabalho demonstrou que as lectinas ConBr e DVioL são capazes de estimular o processo de reparação de lesões cutâneas, tanto no ponto de vista clínico e histopatológico.
- O grupo tratado com a lectina de *Canavalia brasiliensis* 100 µg/mL apresentou o processo cicatricial mais avançado quando comparado com os demais grupos estudados.
- As lectinas testadas não apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* frente aos microrganismos testados, porém durante os testes *in vivo*, no grupo ConBr100, nenhum microrganismo foi isolado das lesões cutâneas.
- O presente estudo oferece evidência farmacológica preliminar sobre o uso destas lectinas para promover o processo de cicatrização.

8. ANEXOS

- **Anexo 01:** Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal.
- **Anexo 02:** Ficha de avaliação clínica.
- **Anexo 03:** Normas da Revista para onde o artigo será submetido.

Trabalhos gerados do trabalho de dissertação de mestrado

- **Anexo 04:** Resumo expandido apresentado em anais de evento

Título: Efeito da lectina de *Canavalia brasiliensis* no tratamento tópico de feridas cutâneas experimentais em camundongos.

Autores: SCHIRATO, G. V.; SILVA, F. O.; PORTO, C. S.; CAVADA, B. S.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; PORTO, A. L. F.

Fonte de publicação: VII Reunião Regional da SBBq e 2nd International Symposium in Biochemistry of Macromolecules Biotechnology, 2004, Recife. Anais da VII Reunião Regional da SBBq/ 2nd International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology – SBBq, p. 159-161, 2004.

Trabalhos realizados no período de execução do mestrado

- **Anexo 05:** Artigo completo publicado em periódico

Título: O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas.

Autores: SCHIRATO, G. V.; MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. O.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; PORTO, A. L. F.

Fonte de publicação: Revista Ciência Rural, v. 36, n. 1, p. 149-154, 2006.

- **Anexo 06:** Resumo expandido apresentado em anais de evento

Título: Avaliação da atividade cicatrizante do filme polimérico produzido com o polissacarídeo obtido da goma do *Anacardium occidentale* L.

Autores: MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. O.; SCHIRATO, G. V.; SILVA, G. M.; ARAÚJO, J. P. F.; SILVA, J. B. R.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO-CUNHA, M.

G.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; PORTO, A. L. F.

Fonte de publicação: V Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão - VI Simpósio de Pós-Graduação, 2005, Recife. Anais da V Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão, 1CD.

- **Anexo 07:** Resumo expandido apresentado em anais de evento

Título: Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana das soluções utilizadas na confecção de curativos dérmicos testados como agentes cicatrizantes.

Autores: MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. O.; SCHIRATO, G. V.; SILVA, G. M.; ARAÚJO, J. P. F.; SILVA, J. B. R.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO-CUNHA, M. G.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; PORTO, A. L. F.

Fonte de publicação: V Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão - VI Simpósio de Pós-Graduação, 2005, Recife. Anais da V Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão, 1CD.

- **Anexo 08:** Resumo expandido apresentado em anais de evento

Título:Atividade antimicrobiana *In vitro* e *In vivo* do heteropolissacarídeo obtido da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*).

Autores: SCHIRATO, G. V.; SILVA, F. O.; PORTO, C. S.; SILVA, L. B. G.; MOTTA, R. A.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; PORTO, A.L.F.

Fonte de publicação: VII Reunião Regional da SBBq e 2nd International Symposium in Biochemistry of Macromolecules Biotechnology, 2004, Recife. Anais da VII Reunião Regional da SBBq/ 2nd International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology – SBBq, p. 162-164, 2004.

- **Anexo 09:** Resumo expandido apresentado em anais de evento

Título: Efeito do tratamento de feridas cutâneas em camundongos tratadas com o pó

da raiz de *Jacaratia corumbensis*.

Autores: SILVA, F. O.; SCHIRATO, G. V.; PORTO, C. S.; CAVADA, B. S.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; PORTO, A. L. F.

Fonte de publicação: VII Reunião Regional da SBBq e 2nd International Symposium in Biochemistry of Macromolecules Biotechnology, 2004, Recife. Anais da VII Reunião Regional da SBBq/ 2nd International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology – SBBq, p. 171-173, 2004.

- **Anexo 10:** Resumo expandido apresentado em anais de evento

Título: Avaliação clínica e da contração de feridas tratadas com membranas de látex natural impregnadas com a fração alcoólica de *Jacaratia corumbensis*.

Autores: PORTO, C. S.; SCHIRATO, G. V.; SILVA, F. O.; CANEDO, M. A.; ARRUDA, E. J.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.

Fonte de publicação: IV Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da UFRPE, 2004, Recife. Anais da IV Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da UFRPE, 1CD.

- **Anexo 11:** Resumo expandido apresentado em anais de evento

Título: Avaliação microbiológica de feridas tratadas com membranas de látex natural impregnadas com a fração alcoólica de *Jacaratia corumbensis*.

Autores: PORTO, C. S.; SCHIRATO, G. V.; SILVA, F. O.; CANEDO, M. A.; ARRUDA, E. J.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.

Fonte de publicação: IV Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da UFRPE, 2004, Recife. Anais da IV Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da UFRPE, 1CD.

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
52070-420, Recife - PE - (Brasil)
fones: (51) 3210 2226 (R40) | 2100 0151
fax: (51) 3210 0150
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 3^o1/05

Recife, 05 de julho de 2005

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: Profa. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA - UFPE

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado **“Avaliação da Atividade Antimicrobiana in vitro e in vivo e da Atividade Cicatrizante das Lectinas de *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea violácea* em Lesões Cutâneas em Camundongos”**.

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

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

Diante do exposto, emitimos um **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Silene Carneiro do Nascimento
Presidente CEEA



Área de retração da ferida

Dias	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Cranial												
Caudal												
Leito + junção												
Central												
Lateral D												
Lateral E												

Evolução da área e percentual de contração das lesões

Dias	0	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Raio maior													
Raio menor													
Área da lesão													
Percentual de Contração													

Observações

Dia 0	
Dia 01	
Dia 02	
Dia 03	
Dia 04	
Dia 05	
Dia 06	
Dia 07	
Dia 08	
Dia 09	
Dia 10	
Dia 11	
Dia 12	

Guide for Authors

Research in Veterinary Science publishes original contributions and review articles on research concerning the health and disease of animals, including studies in comparative medicine.

Short Communications

Short communications should not exceed 1600 words and include no more than two tables or figures. They should have an abstract but no other divisions. Typescripts should be clearly marked Short Communication.

Review Articles Review articles on veterinary topics are invited for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4000 words.

Submission of manuscripts

Submission to *Research in Veterinary Science* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/rvsc>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to <mailto:AuthorSupport@elsevier.com>. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

Language Editing: [Elsevier's Author Gateway](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Ethics

Before papers describing animal studies are accepted for publication in *Research in Veterinary Science*, the authors must satisfy the editors that the work conformed to appropriate ethical standards. Whether or not a particular piece of work is accepted for publication will be decided by the editors whose decision will be final.

The authors should provide written assurances that: (i) The project underwent ethical review and was given approval by an institutional animal care and use committee or by appropriately qualified scientific and lay colleagues. (ii) The care and use of experimental animals complied with local animal welfare laws, guidelines and policies.

The editors expect authors to have adhered to the following general principles: (i) Alternative procedures that replace the use of animals should be used if possible. Where this is not possible, the

animals used should be carefully selected to be the least sentient species possible and of an appropriate strain. (ii) The minimum number of animals should be used consistent with achieving the scientific objectives of the study. (iii) Pain and distress should be minimised by the use of humane endpoints, sedation, anaesthesia, analgesia and post-operative care. (iv) Access to veterinary care must be available at all times. (v) Investigators and personnel that care for and use animals must be trained and possess relevant expertise and training that should be updated regularly. (vi) If animals have to be killed, this should be done humanely according to local euthanasia regulations, such as the Home Office guidelines in the UK or guidelines of the American Veterinary Association Panel on Euthanasia.

Title

Papers should be headed with the full title, the initials and surnames of the authors, and the name and address of the institution where the work was carried out. The full telephone number, Fax number and e-mail address of the corresponding author should also be provided.

Form of Papers

- a) Abstract (not more than 150 words), self-contained and embodying the main conclusions. It should note the relevance to veterinary science as well as the aims and objectives of the work. Sentences such as 'the results are discussed', which merely describe the paper, are not allowed.
- b) Keywords. Please supply a list of up to six keywords that describe the paper.
- c) Introduction.
- d) Materials and methods employed.
- e) Results, as concise as possible. Text, tables and figures illustrating the same data will rarely be permitted.
- f) Discussion and conclusions.
- g) Acknowledgements.
- h) References.
- i) Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing**, throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscripts, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Abbreviation and symbols: Authors are asked to explain each scientific abbreviation at its first occurrence in their papers; for example, complement fixation test (CFT). The policy of the journal with respect to units and symbols is that SI (System International) symbols should be used.

Reference Format

Only papers closely related to the author's work should be mentioned; exhaustive lists should be avoided. References should be cited in the text thus: Brown and Smith (1985), Jones (1987a), Jones (1987b), or Smith *et al* (1988). The list of references at the end of the paper should be given in alphabetical order and should appear in the form: - Torgerson, P.R., Budke, C.M., 2003 *Echinococcosis* - an international public health challenge. *Research in Veterinary Science* **74**, 191-202. References to books and monographs should include: (1) author(s) or editor(s); (2) year of publication; (3) title; (4) edition; (5) place of publication and publisher; (6) beginning and final page numbers.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.

4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL:
<http://www.authors.elsevier.com/artwork>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com/>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit the [journal's home page](#) and click on the right-hand side link to the Author Gateway.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted

forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: phone (+1) 215 239 3804, fax (+1) 215 239 3805, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/locate/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy.

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH

request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Proofs

Proofs will be sent to the author (first-named author if no corresponding author is identified on multi-authored papers) by PDF wherever possible and should be returned within 48 hours of receipt, preferably by e-mail. Corrections should be restricted to typesetting errors; any other amendments made may be charged to the author. Any queries should be answered in full. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are returned to us in one all-inclusive e-mail or fax. Subsequent additional corrections will not be possible, so please ensure that your first communication is complete. Should you choose to mail your corrections, please return them to: *Log-in Department, Elsevier, Stover Court, Bampfylde Street, Exeter, Devon EX1 2AH, UK.*

Author Enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the Author Gateway from Elsevier at <http://www.authors.elsevier.com>. The Author Gateway also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Offprints

A total of 25 free offprints of each paper will be made available to its author(s). Additional copies can be ordered at proof stage when a scale of costs will be supplied.

Research in Veterinary Science has no page charges



EFEITO DA LECTINA DE *Canavalia brasiliensis* NO TRATAMENTO TÓPICO DE FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM CAMUNDONGOS



Giuliana V. Schirato^{2,4,6}, Flávio de O. Silva⁴, Camila de S. Porto^{1,4,7}, Benildo de S. Cavada³, José L. Lima-Filho⁴, Ana M. A. Carneiro-Leão^{1,4}, *Ana L. F. Porto^{1,4,5}

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE; ²Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/ FIOCRUZ; ³ Universidade Federal do Ceará; ⁴ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/ UFPE – Rua Profº Moraes Rego s/n – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil. CEP: 50670-190; ⁵ analuporto@yahoo.com.br; ⁶ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – CCB/ UFPE; ⁷Bolsista PIBIC/ CNPq – UFRPE.

Effect of the Lectin from Canavalia brasiliensis in the topical treatment of experimental cutaneous lesions in mice

Lectins form an important class of carbohydrate-binding proteins. ConBr, the lectin from *Canavalia brasiliensis*, is homologous to Con A, differing from it in only three residues. The aim of this work is to evaluate the topical treatment of cutaneous wounds using ConBr lectin. Surgical wounds (1 cm²) were produced aseptically in the dorsal thoracic region in albino Swiss mice. Each wound was topically treated daily along 12 days, as follows: 150 mM NaCl (C Group) and ConBr 50µg/ml (T Group). Wounds were daily evaluated through the measurement of the area, presence of oedema, hyperemia, presence of scab. Hyperemia were less intense in T Group, specially after 5th day (70% and 100% in Groups T and C, respectively). At the 12th day, 33.33% of C Group and 66.67% of T Group showed re-epithelization. At 12th day, the average area was 0.12 ± 0.2cm² and 0.61 ± 0.67cm² (T and C Groups, respectively). Only *Staphylococcus* sp. was isolated from the wounds but in less percentile in T Group. These results suggest a potential use of ConBr to improve wound healing.

Introdução

O processo de reparo tecidual caracteriza-se por uma sucessão complexa de eventos bioquímicos e celulares em resposta à lesão. Para que um ferimento seja curado com êxito, os eventos devem suceder-se em uma seqüência apropriada e o resultado final é geralmente uma cicatriz de tecido conjuntivo, representando o somatório dessas etapas. (Carvalho, 2002). Caso as feridas não sejam adequadamente tratadas, pode surgir infecção. Feridas infectadas cicatrizam mais lentamente e a reepitelização é mais prolongada (Inngjerdinger et al., 2004).

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas não pertencentes ao sistema imunológico, capazes de reconhecer sítios específicos em moléculas e ligar-se a carboidratos, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas dos sítios (Grangeiro, 1996). A *Canavalia brasiliensis* é uma leguminosa pertencente à subfamília Diocleinae e a partir desta é extraída a lectina ConBr (Barbosa et al., 2001). A ConBr possui ligação glicose/manose e é homóloga a Concanavalina A (ConA) (Cavada et al., 1993).

Objetiva-se com este trabalho testar o efeito terapêutico do tratamento tópico da lectina ConBr em feridas cutâneas experimentais em

camundongos sob o ponto de vista clínico e microbiológico.

Experimental

A lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) foi purificada pelo método de Moreira et al. (1983) e cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Benildo de Sousa Cavada do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará – UFC. Foi produzida uma ferida na região dorsal torácica em 30 camundongos (*Mus musculus*) albinos suíços (machos, com 8 semanas de idade, pesando 33,0 ± 2,0g) divididos em dois grupos iguais, segundo o tratamento empregado: Grupo C (NaCl 150 mM), Grupo T (ConBr 50µg/ml). Foram aplicados diariamente 100 µl de cada solução após a realização das lesões. As lesões foram submetidas à avaliação clínica até o 12^o dia de pós-operatório (PO). A área da lesão foi calculada pela equação formulada por Prata et al. (1988). Os resultados obtidos foram expressos como média ± desvio padrão (M ± dp). A avaliação microbiológica das feridas cirúrgicas experimentais foi realizada nos tempos 0h, 48h, 7 e 12 dias de pós-operatório antes da realização

de biópsia. Para realização desta, 5 animais eram retirados de cada grupo experimental e, posteriormente, eutanasiados por deslocamento cervical com os animais previamente anestesiados com cloridrato de xilazina (dosagem de 10 mg/Kg) e cloridrato de cetamina (dosagem de 115 mg/Kg) (Hall e Clarke, 2001). O material para exame microbiológico foi coletado através de “swabs” esterilizados e semeado em placas de Petri contendo ágar sangue e ágar Levine. As placas foram incubadas em estufa microbiológica durante 24 horas e após este período as bactérias foram classificadas através dos aspectos morfológicos das colônias, morfotintoriais ao Gram.

Resultados e Discussões

Os animais foram avaliados clinicamente, diariamente até o 12º de pós-operatório (PO), os sinais clínicos observados neste período foram: presença de edema, hiperemia, formação de crosta além do acompanhamento da evolução da área das feridas.

Em relação à presença de edema, este sinal flogístico foi observado em ambos os grupos até o 6º dia PO. No 2º dia PO, 100% dos animais do grupo C apresentaram edema nas lesões, porém, neste mesmo período, 86,67% das lesões dos animais do grupo T apresentaram o sinal. Já no 6º dia PO o percentual de edema nas feridas experimentais foi 20% e 40% nos Grupos C e T, respectivamente (Figura 01).

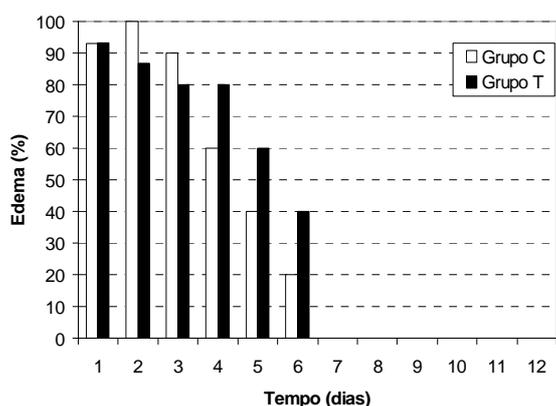


Figura 01 – Percentual de Edema nas lesões experimentais dos Grupos C e T.

A Hiperemia foi observada até o 5º dia PO no Grupo T e até o 6º dia PO no Grupo C. Até o 5º dia PO, 100% das lesões do Grupo C apresentaram hiperemia, enquanto o Grupo T, no 5º dia PO 70% das lesões permaneciam com este sinal flogístico. Através do acompanhamento da evolução clínica, pode-se evidenciar que a hiperemia das feridas tratadas com a lectina ConBr demonstrou-se leve, enquanto nas feridas

controle foi moderada em relação a intensidade deste sinal flogístico (Figura 02).

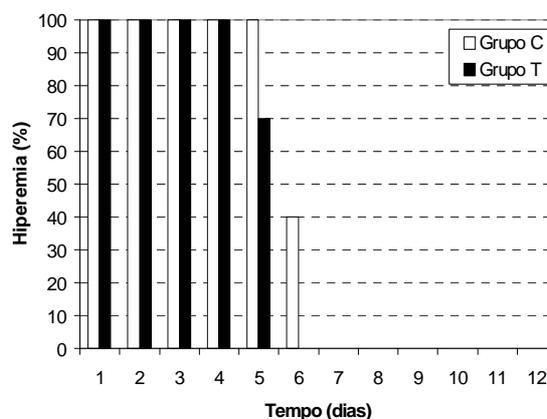


Figura 02– Percentual de Hiperemia nas lesões experimentais dos Grupos C e T.

A partir das 24h de experimento, houve formação de crosta nas feridas de ambos os grupos e pode-se observar a presença desta até do 12º dia de experimento. Do 10º até o 12º dia PO, 60% dos animais do Grupo C permaneceram com crosta em suas lesões, neste mesmo período, apenas 16,66% das lesões do Grupo T ainda permaneciam com crosta (Figura 03).

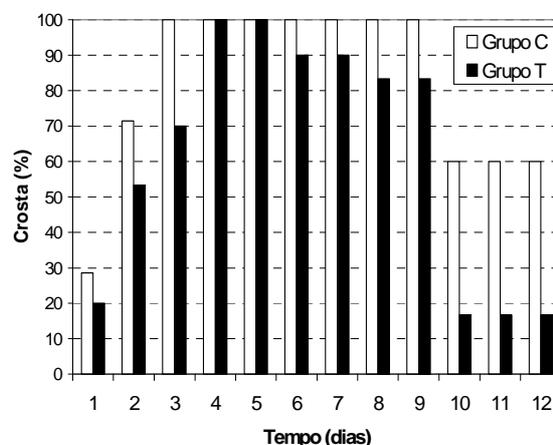


Figura 03 – Percentual de presença de Crosta nas lesões experimentais dos Grupos C e T.

Em relação à evolução da área das lesões (Figura 04 e 05), durante a fase inflamatória do processo cicatricial (até 6º dia PO), foi possível observar uma maior redução da área das lesões do Grupo T em relação ao Grupo C até o 4º dia PO. Durante o 5º e 6º dia PO esta diferença não foi significativa. No 12º dia PO, 66,67% das lesões experimentais do Grupo T estavam completamente reepitelizadas, enquanto apenas 33,33% das lesões do Grupo C apresentavam esta característica. A área média neste tempo foi

de $0,12 \pm 0,20 \text{ cm}^2$ e $0,61 \pm 0,67 \text{ cm}^2$ para os Grupo T e C, respectivamente.

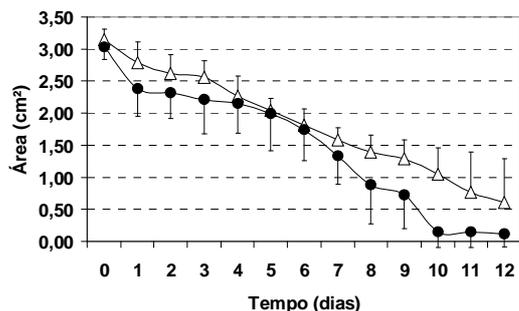


Figura 04 – Área média das lesões experimentais. Δ , Grupo C; \bullet , Grupo T.

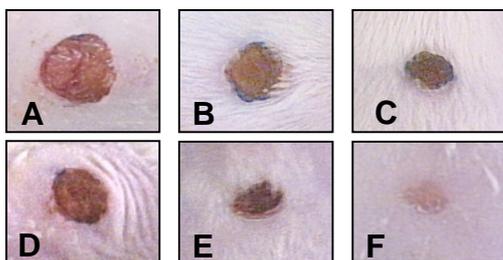


Figura 05 – Aspecto das lesões. Grupo C: (a), 2º dia PO; (b) 7º dia PO; (c) 12º dia PO. Grupo T: (d), 2º dia PO; (e), 7º dia PO; (f), 12º dia PO.

As lectinas isoladas de *Dioclea grandiflora*, *Canavalia brasiliensis* e *Soybean agglutinin* induzem a resposta inflamatória típica em ratos, caracterizada pela exsudação dose-dependente de proteínas plasmáticas e pela migração de neutrófilos. A migração de neutrófilos também pode ser evidenciada pela ação da lectina obtida de sementes de *Artocarpus integrifolia*. Em camundongos, a lectina isolada de *D. grandiflora* induz a resposta inflamatória cutânea acompanhada pelo influxo de leucócitos polimorfonucleares (Freire, et al., 2003). Albuquerque et al. (2003), avaliando o efeito do tratamento tópico de feridas cutâneas com lectinas de *Cratylia mollis* e Concanavalina A verificou que estas promovem a aceleração do processo cicatricial.

Apenas o microrganismo *Staphylococcus* sp. foi isolado das lesões experimentais. Porém, em menor percentual no Grupo T em relação ao Grupo C (Figura 06).

O efeito antimicrobiano da lectina pode ser atribuído pelo mecanismo de ação desta em formar canais iônicos na membrana celular bacteriana ou pela inibição competitiva da adesão de proteínas microbianas aos receptores polissacarídicos das células do hospedeiro (Cowan, 1999).

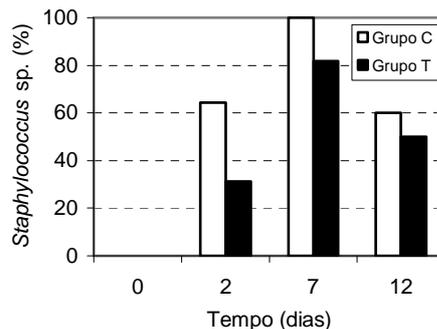


Figura 06 – Percentual de lesões com *Staphylococcus* sp. nas lesões experimentais dos Grupos C e T.

Conclusões

O tratamento utilizando a lectina ConBr favoreceu a evolução do processo cicatricial das lesões experimentais. As feridas tratadas com esta proteína apresentaram menor freqüência de contaminação microbiana em relação ao Grupo controle.

Agradecimentos

Aos órgãos de fomento BNB, FACEPE, CNPq, FINEP e CAPES pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

- B. S. Cavada; R. A. Moreira; J. T. A. Oliveira; T. B. Grangeiro **Rev. Bras. Fisiol. Vegetal.** **1993**, 5, 193 – 201.
- E. R. C. Albuquerque; C. M. L. Melo; F. F. B. Araújo; L. C. B. B. Coelho; M. C. C. O. Coelho; M. T. S. Correia; A. M. A. Carneiro-Leão in IV SIMPÓS, Recife, 2003.
- K. Inngjerdinger; C. S. Nergard; D. Diallo; P. P. Mounkoro; B. S. Paulsen **Journal of Ethnopharmacology.** **2004**, 92, 233 – 244.
- L. W. Hall; K. W. Clarke, **Veterinary Anesthesia**, Ballière Tindall, London, 1991.
- M. G. M. Freire; M. L. R. Macedo; E. Antunes; I. Desouza; S. Marangoni **Toxicon.** **2003**, 42, 275 – 280.
- M. M. Cowan **Clinical Microbiology Reviews,** **1999**, 12, 564 – 582.
- M. Prata; C. Haddad; S. Goldenberg, **Acta. Cir. Bras.** **1988**, 3, 43 – 48.
- P. T. C. Carvalho, Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2002.**
- R. A. Moreira; A. C. H. Barros; J. C. Stewart; A. Pusztai **Planta.** **1983**, 158, 63 – 69.
- T. B. Grangeiro, Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, 1996.

O polissacarídeo de *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas

The polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. in the inflammatory phase of the cutaneous wound healing.

Giuliana Viegas Schirato¹ Flaviane Maria Florêncio Monteiro² Flávio de Oliveira Silva²
José Luis de Lima Filho³ Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão⁴
Ana Lúcia Figueiredo Porto⁴

RESUMO

O efeito do polissacarídeo de *Anacardium occidentale* L. (POLICAJU) foi avaliado na fase inflamatória do processo cicatricial em camundongos (*Mus musculus*) Swiss (n=90), organizados de acordo com o tratamento empregado: Grupo I (NaCl 150mM), Grupo II (ácido ascórbico 75mg.ml⁻¹) e Grupo III (emulsão contendo POLICAJU 150mg.ml⁻¹ preparado em ácido ascórbico 75mg.ml⁻¹). As lesões cutâneas foram realizadas assepticamente na região torácica dorsal e cada ferida foi tratada em dose única (200µl) imediatamente após a cirurgia. As feridas foram avaliadas diariamente sob o ponto de vista clínico e histopatológico até o 6º dia de pós-operatório (PO). No 5º dia PO, observou-se um menor percentual de edema e hiperemia no Grupo III em relação aos grupos controle, ao passo que os valores de área da ferida e do percentual de contração não foram estatisticamente significativos. A avaliação histopatológica do grupo tratado com POLICAJU demonstrou a presença de tecido de granulação fibrovascular no 6º dia PO, enquanto os grupos controle apresentavam tecido de granulação com padrão vascular. O tratamento proposto propiciou sinais flogísticos menos acentuados (edema e hiperemia) durante o período inflamatório, compatível com o processo de reparação mais avançado do ponto de vista histopatológico, sugerindo a possível utilização clínica da emulsão contendo POLICAJU.

Palavras-chave: cicatrização, inflamação, biomateriais, polissacarídeo, *Anacardium occidentale* L., goma do cajueiro.

ABSTRACT

The effect of the polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. gum (POLICAJU) was evaluated in the

inflammatory phase of the wound healing in Swiss mice (*Mus musculus*) (n=90), divided according to the employed treatment: Group I (NaCl 150mM), Group II (75mg.ml⁻¹ ascorbic acid) and Group III (emulsion containing 150mg.ml⁻¹ POLICAJU prepared in 75mg.ml⁻¹ ascorbic acid). An aseptic wound was produced in the dorsal thoracic area and each wound was treated in a single dose (200µl) soon after the accomplishment of the lesions. Daily, the wounds were submitted to the clinical and histopathological evaluation until the 6th day of postoperative (PO). In the 5th day PO, the Group III presented the signs oedema and hyperemia, in smaller percentile than the control groups. The results of area of the wound and percentile of contraction didn't obtain statistical significance. The histopathological evaluation revealed, in the 6th day PO, that the Group III presented fibrovascular granulation tissue, while the control groups presented vascular granulation tissue. The use of POLICAJU propitiated to the animals of the treated group inflammatory signs less accentuated (oedema and hyperemia) in the inflammatory period, compatible with the normal wound healing process under the point of view histopathological, suggesting the possible clinical employment of the POLICAJU emulsion.

Key words: wound healing, inflammation, biomaterials, polysaccharide, *Anacardium occidentale* L., cashew gum.

INTRODUÇÃO

O processo cicatricial envolve uma complexa seqüência de eventos celulares e bioquímicos com o objetivo de restaurar a integridade tecidual após o trauma. Este processo caracteriza-se pela homeostase,

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

³Departamento de Bioquímica/ Laboratório Imunopatologia Keizo Asami – LIKA (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

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

inflamação, formação de tecido de granulação, reepitelização e remodelação da matriz extracelular. Durante a fase inflamatória, são observados infiltrados celulares (neutrófilos, linfócitos e macrófagos), cuja participação é fundamental para regular o processo de reparação, pois secretam citocinas, linfocinas e fatores de crescimento, que atuam como sinalizadores moleculares. Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas, aparecendo aproximadamente 24 horas após a lesão, com funções de fagocitose e debridamento de tecidos necrosados, para minimizar a possibilidade de infecção ocasionada por patógenos (STEENKAMP, et al., 2004; PARK & BARBUL, 2004).

Os macrófagos migram ao local da ferida em cerca de 48 a 96 horas, tornando-se a população celular predominante antes da migração e proliferação dos fibroblastos. Sua ação antimicrobiana ocorre devido à geração de radicais reativos, como óxido nítrico e peróxido de oxigênio. Uma importante contribuição dos macrófagos para o processo cicatricial é a secreção de citocinas e fatores de crescimento, os quais ativam e recrutam outras células envolvidas no processo cicatricial (outros macrófagos e linfócitos), regulam a quimiotaxia e a proliferação de fibroblastos, a síntese de colágeno, além da migração e replicação das células endoteliais, também envolvidas no processo de reparação tecidual (STEENKAMP, et al., 2004; PARK & BARBUL, 2004).

Para otimizar a reabilitação de lesões, pode-se utilizar biomateriais, compreendidos como materiais interativos capazes de estabelecer uma afinidade apropriada com o tecido vizinho sem indução de uma resposta adversa do hospedeiro (RATNER & BRYANT, 2004). Os polissacarídeos estimulam o sistema imune *in vitro* e *in vivo* e contribuem favoravelmente no processo cicatricial, podendo ser utilizados como biomateriais (DIALLO, et al., 2001; UENO, et al., 2001; KWEON, et al., 2003; SENEL & McCLURE, 2004). O heteropolissacarídeo proveniente da goma de *Anacardium occidentale* L. (POLICAJU) vem sendo utilizado em diversas pesquisas e tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios, potencializando, em estudos preliminares, o processo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos (SCHIRATO et al., 2003; PAIVA, 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento tópico de lesões cutâneas, em dose única, utilizando-se a emulsão contendo POLICAJU na evolução da fase inflamatória do processo cicatricial cutâneo, do ponto de vista clínico e histopatológico.

MATERIAL E MÉTODOS

A goma de *Anacardium occidentale* L. foi coletada no litoral sul do Estado de Pernambuco (Praia de Tamandaré), Brasil. O POLICAJU foi obtido de acordo

com o método de MENESTRINA et al. (1998). A emulsão foi formulada adicionando-se ácido ascórbico (1500mg) e POLICAJU (3000mg) à água destilada estéril (10ml) e mantida sob agitação até completa solubilização. O pH da emulsão foi ajustado em pH 5,0 adicionando-se NaOH 1N. O volume final foi aferido, obtendo a emulsão de concentração final de 150mg.ml⁻¹ de POLICAJU.

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas preconizadas pelo Canadian Council Animal Care (CCAC) e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização Animal do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Foram utilizados 90 camundongos (*Mus musculus*) Swiss, fêmeas, com 8 a 10 semanas de vida e pesando 30,0 ± 5,0g, procedentes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE), onde os mesmos foram mantidos e acompanhados durante os 6 dias de experimento em ambiente com temperatura, umidade e luminosidade controlados. Os animais foram alimentados com ração específica para roedores e água *ad libitum*.

Para realização do procedimento cirúrgico experimental, os camundongos foram previamente anestesiados com cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de cetamina 10% (10mg.Kg⁻¹ e 115mg.Kg⁻¹, respectivamente), por via subcutânea (HALL & CLARKE, 1991). Após a anestesia, realizaram-se a tricotomia e a anti-sepsia da região dorsal torácica com iodopovidona e solução salina estéril NaCl 150 mM. A pele foi demarcada usando-se um molde de papel adesivo (1cm²), previamente esterilizado e a ferida cutânea asséptica foi produzida por incisão da pele com lâmina de bisturi número 15 e a divisão da tela subcutânea foi realizada com tesoura de pontas tipo romba/romba e pinça de dissecação, até sua total ressecção.

Após a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram aleatoriamente organizados em grupos (n = 30/grupo), de acordo com o tratamento: Grupo I (NaCl 150 mM), Grupo II (ácido ascórbico 75mg.ml⁻¹) e Grupo III (emulsão contendo POLICAJU 150mg.ml⁻¹). Imediatamente após a cirurgia cada ferida de cada grupo foi tratada, com aplicação tópica, em dose única de 200 µl da substância de acordo com o grupo, e o processo cicatricial ocorreu por segunda intenção.

As feridas foram avaliadas diariamente até o 6º dia de pós-operatório (PO) sob o ponto de vista clínico, evidenciando-se os sinais flogísticos edema, hiperemia, presença de crosta e exsudato, além da mensuração da área, com auxílio de um paquímetro. A contração da lesão foi avaliada através do cálculo da área da ferida, utilizando-se da equação descrita por PRATA et al. (1988): A= p. R. r, onde "A" representa a área, "R" o raio maior e "r" o raio menor da ferida. O

cálculo do grau de contração da ferida foi expresso como percentual, assim como o índice de cicatrização, utilizando-se as equações propostas por 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 da ferida no dia da biópsia (1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a e 6^a dias).

Para realização de estudo histopatológico, os fragmentos de pele foram coletados diariamente e, a cada dia de biópsia, cinco animais foram retirados dos grupos experimentais e, posteriormente, submetidos à eutanásia por superdosagem com Pentobarbital sódico (200mg.Kg⁻¹), via intra-peritoneal. As amostras foram submetidas ao processamento histopatológico, incluídas em parafina e, após microtomia, os cortes foram corados por Hematoxilina Eosina e, alternativamente, pelo Tricrômico de Masson (MICHALANY, 1990).

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão ($M \pm dp$), submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, aceitando-se como estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lesões experimentais dos camundongos foram avaliadas do ponto de vista clínico ao longo de seis dias de experimento. A avaliação macroscópica das feridas permitiu evidenciar sinais flogísticos menos acentuados no grupo tratado quando comparados aos dos grupos controle. O edema, conseqüente ao acúmulo de fluido e proteínas plasmáticas no espaço extravascular em resposta à ação de citocinas, foi observado em todos os grupos estudados. Entretanto, a sua frequência foi menor nas lesões tratadas com POLICAJU (33%), especialmente no 4^a dia de avaliação clínica, comparada aos Grupos I e II (86,67% e 86,67%, respectivamente). De forma semelhante, a hiperemia foi observada ao longo de todo o período avaliado. Vale ressaltar que, no 5^a e 6^a dias de pós-operatório, foi evidenciado um menor percentual no Grupo III (60% e 40%, respectivamente). No mesmo período, as lesões nos camundongos do Grupo I, tratadas com solução salina, apresentaram hiperemia em 100% deles.

A partir de 24 horas após a realização das lesões experimentais, 100% das feridas em todos os grupos apresentaram formação de crosta. No último dia de avaliação, observou-se desprendimento de crosta em 20% dos animais pertencentes ao Grupo I, porém as lesões não se encontravam reepitelizadas, o que não foi evidenciado nos demais grupos estudados. No processo de reparação tecidual, normalmente, ocorre desprendimento da crosta quando a cobertura epitelial

está completa. No caso do Grupo I, o desprendimento pode ser atribuído a algum fator extrínseco, já que não havia reepitelização completa do local da lesão.

As características exsudativas da fase inflamatória também foram acompanhadas durante o experimento. No 1^a dia de pós-operatório, observou-se exsudato de característica serosangüinolenta em 24,14%; 13,79% e 20% das feridas dos animais pertencentes aos Grupos I, II e III, respectivamente. As feridas tratadas com solução salina apresentaram exsudato em suas lesões ao longo dos primeiros cinco dias de pós-operatório. No entanto, no 6^a dia de pós-operatório, apenas 20% dos animais do Grupo II (tratado com ácido ascórbico) apresentaram este sinal flogístico. É importante ressaltar que não foi observada secreção purulenta em 100% das feridas estudadas, já que foram feridas limpas e realizadas cirurgicamente.

A utilização dos polissacarídeos como biomateriais é vantajosa, pois interferem favoravelmente na resposta imune, assim como no processo cicatricial. Quando a atividade antitumoral de polissacarídeos (α -glucana de *Ramalina celastri* nativa e sulfatada quimicamente) foi testada *in vivo* frente ao Sarcoma 180, observou-se que o esquema de tratamento em doses fracionadas por 10 dias causou perda da atividade biológica, por desenvolvimento de tolerância ao princípio ativo (STUELP-CAMPELO, et al., 2002). Por esta razão, optou-se por utilizar uma única aplicação da emulsão de POLICAJU. Deve-se ainda ressaltar que o polissacarídeo ácido obtido de *Vernonia kotschyana* possui efeito estimulante dose-dependente da fixação do complemento em humanos, além de possuir efeito mitogênico *in vitro* (NERGARD, et al., 2004). KWEON, et al. (2003) avaliando o efeito do tratamento com o complexo hidrossolúvel quitosana/heparina em feridas cutâneas em ratos, observaram que no 15^a dia de pós-operatório, as feridas estavam completamente cicatrizadas com aspecto similar à pele normal. Entre outros fatores, o efeito da quitosana pode ser atribuído à estimulação de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) que auxiliam no processo de reparação tecidual (UENO, et al., 2001). Foi relatado também que o polissacarídeo de *Angelica sinensis* possui efeito cicatrizante em úlceras gástricas experimentais em ratos Sprague-Dawley, além de possuir efeito estimulante *in vitro* de proliferação de células epiteliais gástricas (YE, et al., 2003).

Alguns polissacarídeos, como a quitina e a quitosana, vêm sendo utilizados com fins terapêuticos em medicina veterinária, pois atuam como agente cicatrizante, antimicrobiano e hemostático, além de possuir efeito analgésico (SENEL & McCLURE, 2004). Produtos obtidos do cajueiro (*Anacardium*

occidentale) são bastante populares na medicina popular, sendo amplamente empregado no tratamento de doenças inflamatórias na Nigéria, causando redução da síntese de prostaglandinas (90%) na vesícula seminal em bovinos (OLAJIDE et al., 2004).

Quanto à evolução da área das lesões (Figura 1), no 1º dia de pós-operatório, as feridas dos animais dos Grupos I, II e III apresentavam a área média de $2,29 \pm 0,41 \text{ cm}^2$; $2,32 \pm 0,56 \text{ cm}^2$ e $2,45 \pm 0,43 \text{ cm}^2$, respectivamente. Entre o 2º e 3º dias de pós-operatório, foi observado aumento da área das lesões dos animais pertencentes a todos os grupos, possivelmente devido ao aparecimento de crosta e edema. A partir do 4º dia, observou-se redução gradativa das áreas das lesões. No 6º dia de pós-operatório, a área média das lesões dos animais dos Grupos I, II e III foi respectivamente; $2,15 \pm 0,82 \text{ cm}^2$; $2,07 \pm 0,57 \text{ cm}^2$ e $2,14 \pm 0,48 \text{ cm}^2$.

Quando os percentuais de contração das lesões foram analisados, observa-se não haver contração nas feridas do Grupo I (solução salina) entre o 1º e 4º dias de pós-operatório. Nesse grupo, 5 e 6 dias após a realização das lesões, o percentual de contração

foi, respectivamente, 2,20% e 15,10%. Nas lesões tratadas com ácido ascórbico (Grupo II), até o 5º dia de pós-operatório, não ocorreu contração; apenas no 6º dia de experimento foi evidenciada contração neste grupo (7,15%). Quando as lesões foram tratadas com a emulsão de POLICAJU, observou-se contração nos 5º e 6º dias de experimento, apresentando percentuais de 5,41% e 15,56%, respectivamente.

Os resultados de área da ferida e percentual de contração obtidos neste experimento não foram estatisticamente significativos (teste de Tukey), em relação ao tratamento utilizado nos grupos experimentais, o que pode ser explicado pela contração da área do tecido de granulação, a qual ocorre, em parte, devido aos miofibroblastos, reduzindo assim o tamanho da área lesada. (STEVENS & LOWE, 1996). SCHIRATO et al. (2002) não verificaram diferenças significativas de área das feridas tratadas com a emulsão contendo diferentes concentrações de POLICAJU até o 7º dia de pós-operatório. Tal fenômeno é esperado, pois na fase inflamatória do processo cicatricial não ocorre redução significativa de área e do percentual de contração da

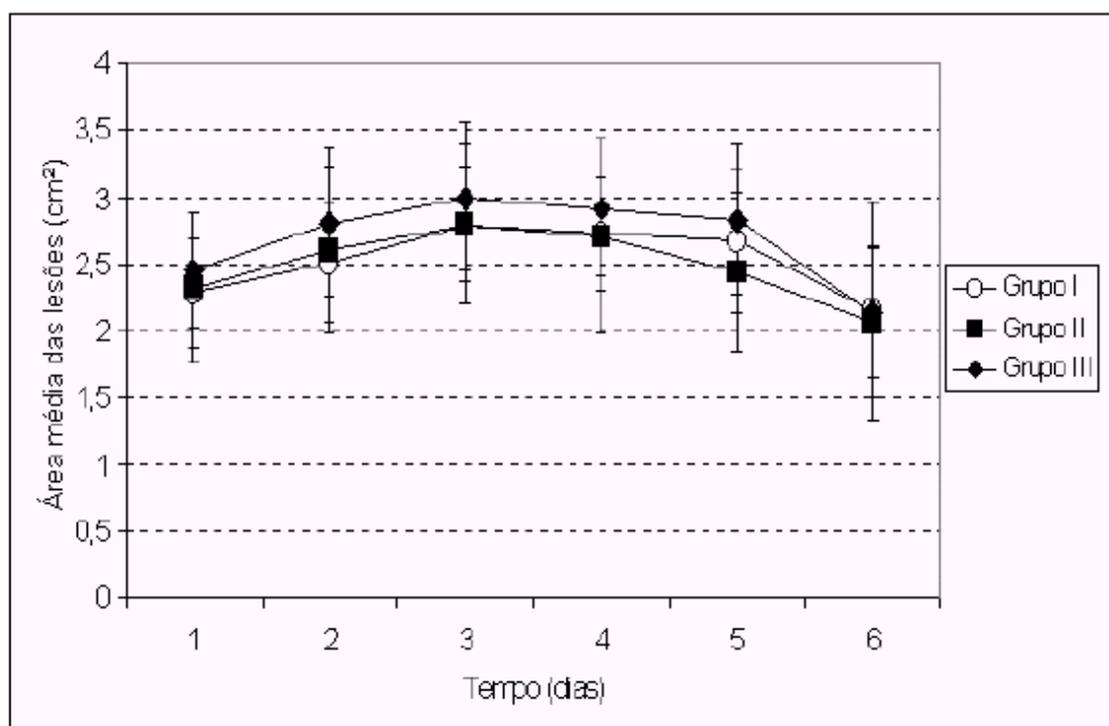


Figura 1 - Área média das feridas experimentais em camundongos dos grupos I (tratado com NaCl), II (tratado com ácido ascórbico 75 mg.ml⁻¹) e III (tratado com POLICAJU 150mg.ml⁻¹).

lesão, devido ao pequeno número de miofibroblastos no local da ferida.

O aspecto histopatológico das feridas foi semelhante em todos os grupos entre o 1^a e 5^a dias. O 1^a dia foi caracterizado pela presença de infiltrados polimorfonucleares, ocorrência de angiogênese, além da existência de exsudato e da formação de crosta, ressaltando-se que as crostas dos animais tratados com a emulsão de POLICAJU eram mais delgadas se comparadas às crostas dos grupos controle (solução salina e ácido ascórbico) (Figuras 2A e 2B). No 2^a dia

de pós-operatório (Figura 2C), evidenciou-se a presença de tecido de granulação vascular, presença de infiltrado de leucócitos polimorfonucleares, neovascularização e crosta. Entre o 3^a e o 5^a dias de pós-operatório, verificaram-se ainda inúmeros fibroblastos na derme e presença de neovascularização (Figura 2D).

As principais diferenças foram observadas no 6^a dia quanto às características do tecido de granulação, o qual apresentava um padrão vascular nas feridas dos Grupos I e II. Nas feridas tratadas com emulsão contendo POLICAJU (Grupo III) observou-se a

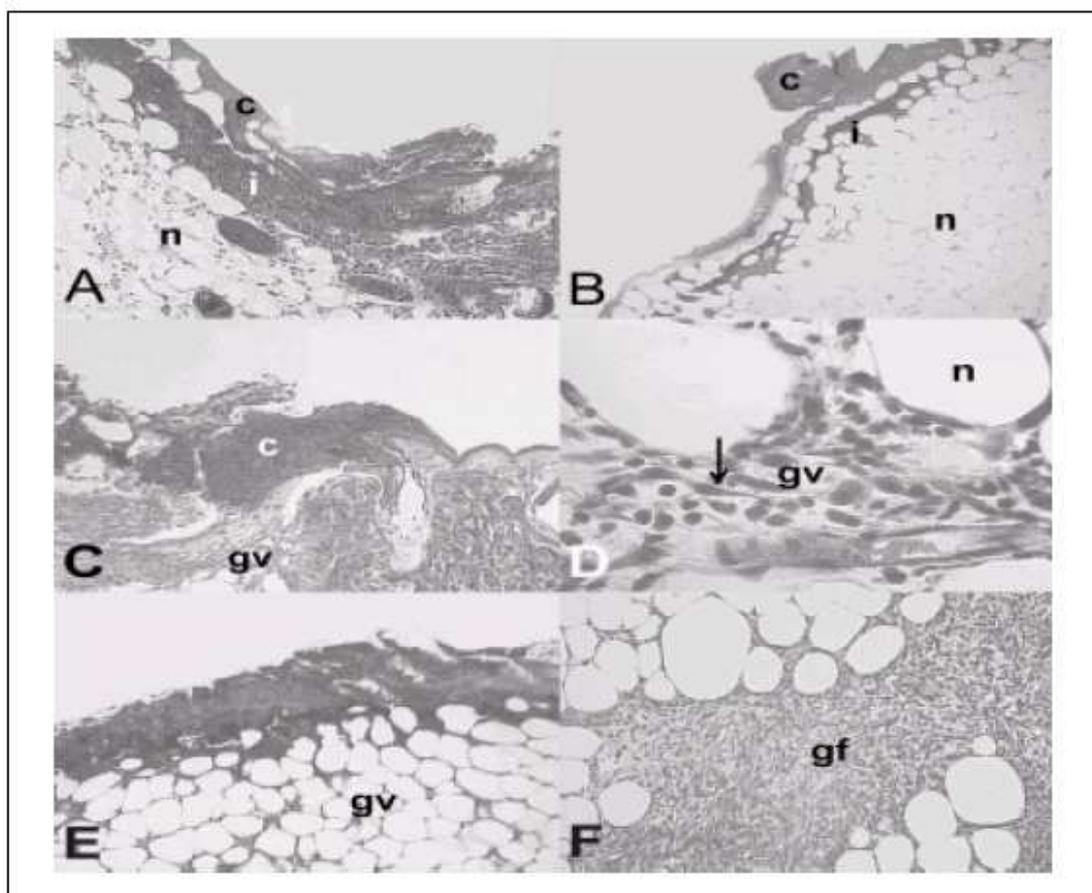


Figura 2 – Aspectos histopatológicos das feridas em camundongos. Tricrômico de Masson. A (100X), Grupo I (tratado com NaCl), 1^a dia de pós-operatório (PO); B (40X), Grupo III (tratado com POLICAJU 150 mg.ml⁻¹), 1^a dia de PO; C (100X), Grupo I, 2^a dia de PO; D (400X), Grupo I, 3^a dia de (PO); E (40X), Grupo II (tratado com ácido ascórbico 75 mg.ml⁻¹), 6^a dia de PO e F (100X), Grupo III, 6^a dia de PO. Percebe-se em A e B presença de neovascularização, crosta e infiltrado de leucócitos polimorfonucleares. Em C, há tecido de granulação de padrão vascular e crosta espessa. Em D e E evidencia-se tecido de granulação de padrão vascular, inúmeros fibroblastos na derme e neovascularização. Em F, nota-se presença de tecido de granulação fibrovascular, presença de trabéculas de tecido conjuntivo ocasionando áreas de tração no tecido. c - crosta; gv - tecido de granulação vascular; n - neovascularização; gf - tecido de granulação fibrovascular; i - infiltrado de leucócitos polimorfonucleares; → - fibroblasto.

existência de tecido de granulação fibrovascular e presença de trabéculas de tecido conjuntivo, ocasionando áreas de tensão no tecido (Figuras 2E e 2F).

PAIVA (2003), utilizando emulsões aplicadas de forma tópica, contendo diferentes concentrações de POLICAJU em lesões experimentais em camundongos, para avaliar a progressão do processo reparativo (até o 12^a dia), evidenciou sinais flogísticos menos intensos nos grupos tratados comparados aos controles. No 7^a dia de pós-operatório, também observou a presença de tecido de granulação de padrão fibrovascular e intensa angiogênese especialmente no grupo tratado com a emulsão contendo POLICAJU na concentração de 150 mg.ml⁻¹. No 12^a dia de pós-operatório, foi observada a formação de tecido de granulação fibrovascular e a presença de tecido fibroso com pobre organização de fibras colágenas nos grupos tratados com solução salina e ácido ascórbico (controles). Já as feridas tratadas com a emulsão POLICAJU 150mg.ml⁻¹, demonstraram, neste período, tecido de granulação com fibras colágenas bem organizadas e total reepitelização.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a emulsão contendo POLICAJU 150mg.ml⁻¹ favorece a resolução do período inflamatório, considerando as características de sinais flogísticos menos intensos e a presença de tecido granulação fibrovascular e fibras colágenas, em relação aos grupos controle (tratados com NaCl e ácido ascórbico 75mg.ml⁻¹).

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento BNB, FACEPE, CNPq, FINEP e CAPES, pelo suporte financeiro.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC/ CNPq), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), por conceder a bolsa de iniciação científica a Giuliana Viegas Schirato no período de execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- DIALLO, D. et al. Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.74, p.159-171, 2001.
- HALL, L.W.; CLARKE, K.W. *Veterinary anaesthesia*. London: Ballière Tindall, 1991. 410p.
- KWEON, D.K. et al. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. *Biomaterials*, v.24, p.1595-1601, 2003.
- MENESTRINA, J.M. et al. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structure in gum of *Anacardium occidentale* L. *Phytochemistry*, v.47, p.714-721, 1998.
- MICHALANY, J. *Técnica histológica em anatomia patológica*. 2.ed. São Paulo: Michalany, 1990. 277p.
- NERGARD, C.S. et al. Isolation, partial characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. *Journal of Ethnopharmacology*, v.91, p.141-152, 2004.
- OLAJIDE, O.A. et al. Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on *in vivo* inflammatory models. *Journal of Ethnopharmacology*, v.95, p.139-142, 2004.
- PAIVA, M.G. *Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em cicatrização experimental*. 2003. 56f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco.
- PARK, J.E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American Journal of Surgery*, v.187, p.11S-16S, 2004.
- PRATA, M. et al. Uso tópico do açúcar em feridas cutâneas, estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.3, n.2, p.43-48, 1988.
- RAMSEY, D.T. et al. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.56, n.7, p.941-949, 1995.
- RATNER, B.D.; BRYANT, S.J. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v.6, p.41-75, 2004.
- SCHIRATO, G.V. et al. Application of the polysaccharide from cashew gum in the rehabilitation of experimental cutaneous lesions in mice. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 32., 2003, Caxambu, Minas Gerais. *Anais...* São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003. p. 100.
- SCHIRATO, G.V. et al. 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., 2002, Recife, PE. *Anais...* Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2002. 1 CD.
- SENEL, S.; McCLURE, S.J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p.1467-1480, 2004.
- STEENKAMP, V. et al. Studies on antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of wound healing remedies from South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, v.94, p.353-357, 2004.
- STEVENS, A.; LOWE, J. *Patologia*. São Paulo: Manole, 1996. 535p.
- STUELP-CAMPELO, P.M. et al. Effect of a soluble alfa-D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. *International Immunopharmacology*, v.2, p.691-698, 2002.
- UENO, H. et al. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.52, p.105-115, 2001.
- YE, Y.N. et al. Effect of polysaccharide from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing. *Life Sciences*, v.72, p.925-932, 2003.

V Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – VI Simpósio de Pós-Graduação

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO FILME POLIMÉRICO PRODUZIDO COM O POLISSACARÍDEO OBTIDO DA GOMA DO *Anacardium occidentale* L.

Flaviane Maria Florêncio Monteiro¹; Flávio Oliveira Silva²; Giuliana Viegas Schirato³; Germana Michelle Silva⁴; Joana Paula Firmino de Araújo⁴; Juciene Bezerra Rodrigues da Silva⁴; José Luiz de Lima Filho⁵; Maria das Graças Carneiro da Cunha⁶; Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão⁷; Ana Lúcia Figueiredo Porto⁸.

Introdução

A cicatrização é um processo biológico dinâmico de reparação de lesões que compreende as fases inflamatórias, proliferativas e de maturação. Fatores locais (sangramento, tensão de oxigênio), além de fatores extrínsecos (técnica cirúrgica, anti-sépticos tópicos e curativos) podem interferir neste processo, comprometendo seu resultado final (ARAÚJO et al., 1998). Assim, a evolução do processo cicatricial envolve uma série de eventos que, em conjunto, representam uma tentativa de manter a estrutura anatômica e a função normal da região (COELHO, 2001). Feridas abertas, que cicatrizam por segunda intenção produzem um tecido cicatricial que permite sua quantificação. Elas permitem o estudo do colágeno, glicosaminoglicanos, células inflamatórias e tecido de granulação. Além disso, esses componentes podem ser avaliados quando se quer saber a influência de drogas de ação tópica. Este tipo de ferida também permite o estudo de contração da lesão (ARAÚJO et al., 1998). Sinais flogísticos (edema, hiperemia, presença de exsudato e formação de crosta) característicos do processo cicatricial podem ser avaliados clinicamente através de observações macroscópicas das lesões. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de curativos contendo filme com o polissacarídeo proveniente da goma do *Anacardium occidentale* L. (POLICAJU) sobre o processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos.

Material e Métodos

O POLICAJU foi obtido de acordo com o método de Millas et al. (1991). As membranas foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Carneiro-da-Cunha et al. (1999), modificada, em que uma solução de POLICAJU 10% (p/v) foi preparada em ácido acético 0,7M, sob agitação constante durante 16 horas a 25°C, e seu pH ajustado para 5,0 com solução de NaOH 3M. A solução foi então adicionada a fragmentos de celulose (1cm²), para a formação do biofilme, sendo mantidos em estufa a 50°C até secagem total. Camundongos Albinos suíços fêmeas (n=15), com 12 a 13 semanas de vida, pesando 35,0 ± 5,0g foram submetidos à ressecção cirúrgica de um fragmento de pele de aproximadamente 1,0 cm² da região dorsal. As feridas do grupo controle (C) foram cobertas com curativos impregnados com ácido acético 0,7M e nas lesões do grupo Teste (T) foram aplicados curativos contendo o filme POLICAJU 10%. Estas lesões foram analisadas diariamente durante o período pós-operatório, avaliando-se os aspectos clínicos, a área das lesões e o percentual de contração. As bordas das lesões foram medidas empregando-se régua milimetrada (paquímetro) no T₀ (ao realizar a falha cutânea), e nos dias 2, 7 e 12 do pós-operatório. A contração da lesão foi determinada através do cálculo da área da ferida, utilizando-se da equação matemática descrita por Prata et al. (1988): $A = \pi \cdot r \cdot r$. O cálculo do grau de contração da ferida foi expresso em percentual, assim como o índice de cicatrização, utilizando-se as equações matemáticas propostas por 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 da ferida no dia da biópsia (2^o, 7^o, e 12^o dias).

Resultados e Discussão

A avaliação clínica dos sinais flogísticos (edema, presença de exsudato e formação de crosta), durante o período de 12 dias, do grupo controle (Figura 1) e experimental (Figura 2) revelou a persistência de edema no grupo T até o 10^o dia de avaliação, havendo uma diminuição progressiva do edema do 7^o ao 10^o dia; no entanto, no grupo C o edema persistiu até o 12^o dia. Foi evidenciado o aparecimento de crosta no 2^o dia em 100% dos animais do grupo C e no 3^o dia no grupo T, as quais começaram a desprender a partir do 8^o dia de observação em ambos os grupos, período no qual foi melhor visualizado também o tecido de granulação. Secreções serossanguinolentas foram observadas até o 7^o dia de pós-operatório, em ambos os grupos com valores percentuais de 10,0 % no grupo C e 8,3% no T, não sendo visualmente detectado indicio de contaminação das lesões com agentes patogênicos no período observado. Paiva (2003) realizou avaliação clínica de camundongos tratados com

¹ Doutoranda / Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

² Mestrando/ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

³ Mestranda/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas/ CCB/ UFPE

⁴ Estagiária/ LIKA/ UFPE

⁵ Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA/UFPE

⁶ Co-orientadora / Departamento de Bioquímica /UFPE

⁷ Co-orientadora / Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

⁸ Orientadora / Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

emulsões formuladas com o POLICAJU nas concentrações 75, 150 e 214,3 mg/ml e ácido ascórbico, observando sinais flogísticos mais intensos nos grupos controle e POLICAJU 75mg/ml. Schirato (2003), testando a emulsão de POLICAJU na concentração de 150 mg/mL, durante a fase inflamatória, observou que os sinais flogísticos eram menos intensos nos grupos tratados com exceção do edema que foi menor no grupo controle até o 3º dia de observação. Esses resultados clínicos comparados à aplicação tópica de curativos contendo filme com POLICAJU 10%, demonstram uma minimização dos sinais flogísticos do processo cicatricial. A análise morfométrica das feridas nos dias 0, 2, 7 e 12 do pós-operatório mostrou não haver diferenças nas área das feridas e nos percentuais de contração dos tratados em relação aos controles (Figuras 3 e 4), no entanto, foi possível observar que houve a manutenção das área das feridas até o 7º dia, a partir do qual, observou-se uma grande diminuição dessas áreas em ambos os grupos. A análise desses dados, no 12º dia, revelou uma parcial reepitelização das feridas em ambos os grupos. Resultados semelhante foram obtidos por Schirato (2003).

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram a possível utilização clínica do filme do POLICAJU no processo cicatricial de lesões cutâneas.

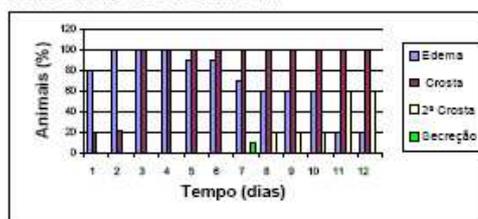


Figura 1: Análise percentual dos sinais flogísticos (edema, presença de exsudato e formação de crosta), durante o período de 12 dias, no grupo Controle.

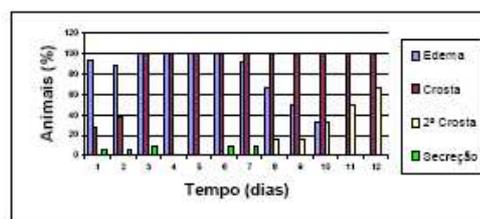


Figura 2: Análise percentual dos sinais flogísticos (edema, presença de exsudato e formação de crosta), durante o período de 12 dias, no grupo Teste.

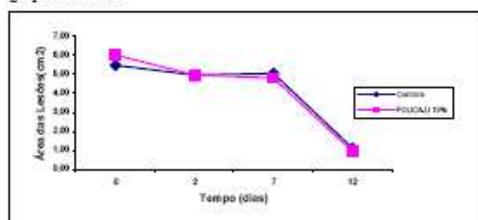


Figura 3: Área média das feridas experimentais dos grupos C e T.

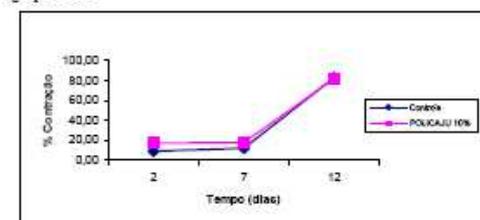


Figura 4: Percentual médio de contração das feridas experimentais dos

Referências Bibliográficas

- ARAÚJO, C.F.R.; SOUZA FILHO, Z.A. de; GRECA, F.H.; GUERREIRO, M.M.C.P.M.; LEITE, L.A.; MANSUR, A.E.C.; KANTOR, D.C.; NASSIF, A.E. Efeitos do Agarol® e do Trigliceril® sobre a cicatrização de pele, estudo experimental em ratos. *Acta Cir. Bras.*, v.13, n.4, p.232 – 237, 1998.
- CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; ROCHA, J.M.S.; GARCIA, F.A.P.; GIL, M.H. lipase immobilisation on to polymeric membranes. *Biotechnology Techniques* 13: 403-409, 1999.
- COELHO, C.O.C., CARRAZONI, P.G., MONTEIRO, V.L.C, MELO F.A.D, MOTA A., Filho F.T. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cir Bras*; v.17 (supl. 1), p.11-13, 2001.
- MILLAS, M.; GROOTE, R.A.M.C.; CURVELLO, A.A.S. *Polieletrólitos*. São Carlos: USP, 1991.
- PAIVA, M.G. *Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (Anacardium occidentale L.) em cicatrização experimental*. 2003. 56p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2003.
- PRATA, M.; HADDAD, C.; GOLDENBERG, S. Uso tópico do açúcar em feridas cutâneas, estudo experimental em ratos, *Acta. Cir. Bras.*, v.3, n. 2, p. 43 - 48, 1988.
- RAMSEY, D. T., POPE, E. R., WAGNER-MANN, C., BERG, J. N., SWAIM, S. F. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. *American journal of veterinary research*, v.56, n.7, p. 941-949, 1995.
- SCHIRATO, G.V. *Efeito do polissacarídeo da goma de Anacardium occidentale L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos*. 2003. 63p. Monografia/Estágio Supervisionado Obrigatório (Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2003.

V Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – VI Simpósio de Pós-Graduação
**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS
 NA CONFEÇÃO DE CURATIVOS DÉRMICOS TESTADOS COMO AGENTES
 CICATRIZANTES**

Flaviane Maria Florêncio Monteiro¹¹; Flávio Oliveira Silva²; Giuliana Viegas Schirato³; Germana Michelle Silva⁴; Joana Paula Firmino de Araújo⁴; Juciene Bezerra Rodrigues da Silva⁴; José Luiz de Lima Filho⁵; Maria das Graças Carneiro da Cunha⁶; Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão⁷; Ana Lúcia Figueiredo Porto⁸.

Introdução

A cicatrização é um processo biológico dinâmico de reparação de lesões que objetiva restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido lesado. O organismo pode sofrer injúrias causadas por agentes físicos, químicos ou por outros organismos, como vírus, bactérias, fungos e protozoários, podendo interferir no processo cicatricial (CALVIN, 1998). Na reabilitação de lesões podem ser utilizados biomateriais, que são materiais interativos apresentando afinidade apropriada com o tecido vizinho sem indução de uma resposta adversa do hospedeiro. Os biomateriais são objeto de pesquisa científica pela disponibilidade na natureza e sua biodegradabilidade, e muitos podem ser conformados para utilização como dispositivos dérmicos impregnados ou não com princípios ativos com objetivo de repor tecidos doentes, lesados ou ausentes congenitamente, ou ainda, restaurar a função tecidual (SPECTOR, 2001). O heteropolissacarídeo proveniente de *Anacardium occidentale* L. (POLICAJU) vem sendo utilizado em diversas pesquisas e tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios em relação ao processo cicatricial em camundongos (SCHIRATO, 2003; PAIVA, 2003). O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* das soluções de POLICAJU e tripsina, solubilizadas em ácido acético, utilizadas na preparação de curativos aplicados como agentes cicatrizantes de lesões experimentais em camundongos.

Material e Métodos

A goma de *A. occidentale* L. foi coletada na Praia de Tamandaré, litoral sul do Estado de Pernambuco. O POLICAJU foi obtido de acordo com o método de Millas et al. (1991). As soluções utilizadas foram respectivamente: C1 (Ácido acético 0,7M); C2 (ácido acético 0,7M/ tripsina 1mg/ml); solução padrão N (Nitrofurazona 0,2%), T1 (POLICAJU 10% /ac acético 0,7M); T2 (POLICAJU 10%/tripsina 1mg/ml). A solução de POLICAJU 10% (p/v) foi preparada em ácido acético 0,7M, sob agitação constante durante 16 horas a 25°C, e seu pH ajustado para 5,0 com solução de NaOH 3M. As soluções C2 e T2 foi adicionado 1mg/ml de tripsina comercial (Sigma), mantendo-se a solução sob agitação constante por mais 1h. O método Grove e Randall (1995) foi empregado para determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*. Bactérias dos gêneros *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, e *Streptococcus* sp., cresceram em caldo nutriente, em um agitador orbital (150 rpm) à temperatura de 37°C por 24h. O inóculo inicial de todos os microrganismos testes foi padronizado de modo a iniciar com a leitura de D.O. (600nm) igual a 0,5, os quais foram homogeneizados em meio de cultura (Agar nutriente) e distribuído em placas de Petri (10ml). Após solidificação, foram feitos poços de 0,7 cm no meio de cultura com auxílio de um perfurador esterilizado onde foram colocados 20 µl das soluções Controle: C1 e C2; solução padrão, e Testes: T1 e T2. As placas foram incubadas durante 24h em estufa microbiológica a 37°C e, após este período, a avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através da medição do halo de inibição nos tempos de 24h, 48h e 72h.

Resultados e Discussão

As placas contendo as soluções C2, T1 e T2 não apresentaram formação de halo de inibição. No entanto, as placas contendo a solução C1 apresentaram um discreto halo, com um diâmetro de 1,0 cm. A nitrofurazona apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias dos gêneros *E. coli* (1,19cm) e *Bacillus* sp (1,97cm) após 24 horas. Monteiro et al. (2003) também testaram emulsões obtidas com o POLICAJU e ácido ascórbico com concentrações finais de 75, 150 e 214,3 mg/ml de POLICAJU, as quais não apresentaram atividade antimicrobiana frente bactérias dos gêneros *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Bacillus* sp. A

¹¹ Doutoranda / Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

² Mestrando/ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

³ Mestranda/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas/ CCB/ UFPE

⁴ Estagiaria/ LIKA/ UFPE

⁵ Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA/UFPE

⁶ Co-orientadora / Departamento de Bioquímica /UFPE

⁷ Co-orientadora / Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

⁸ Orientadora / Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

avaliação microbiológica *in vivo*, da emulsão de POLICAJU e ácido ascórbico, em dose única de 150mg/ml, sobre a evolução da fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos foi realizada por Schirato (2003). Neste estudo foi evidenciada ausência de microorganismos patógenos, sendo isolado das lesões apenas bactérias pertencentes à flora normal, observando-se menor contaminação das feridas tratadas em relação aos grupos controle, os quais receberam soluções de NaCl (150mM) e Ácido Ascórbico (75 mg/ml). Resultados semelhantes foram obtidos por Monteiro (2003), em feridas de caprinos tratados com o POLICAJU. Contudo, este observou que nos animais tratados com o POLICAJU formava-se uma película sobre a ferida. Este fato pode explicar as diferenças nos resultados *in vivo* e *in vitro* frente à droga testada, uma vez que a película de POLICAJU pode estar formando uma barreira física protetora dificultando a contaminação das feridas com agentes patógenos. A atividade antimicrobiana da solução de 20mg/ml do extrato da casca do *A. occidentale* foi testada por Akinpelu (2001), o qual evidenciou largo espectro de atividade antimicrobiana sobre as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomona*, *Shigella* e *Staphylococcus*. A diferença entre a atividade antimicrobiana do POLICAJU e dos extratos da casca do *Anacardium occidentale* pode estar relacionada à variedade do cajueiro utilizado, à época da colheita da casca, ou ainda estar relacionada com a parte da planta utilizada; este comportamento pode ser explicado uma vez que o extrato é composto por diferentes substâncias químicas. A atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) foi estudada por Lima et al. (2000), sobre os microorganismos da cavidade bucal *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida utilis*. Os ácidos anacárdicos obtidos dos extratos etílicos do CNSL apresentaram atividade antibacteriana contra os microorganismos citados, porém a maior atividade inibitória ocorreu sobre a bactéria Gram positiva *Streptococcus mutans*, considerada predominante na cárie dentária. Segundo dados da literatura, estes pesquisadores relatam que os ácidos anacárdicos apresentam potente atividade antibacteriana sobre bactérias Gram positiva, principalmente *Streptococcus mutans*, maior do que em bactérias Gram negativas. Este fator pode estar relacionado aos ácidos anacárdicos poderem apresentar uma maior ou menor dificuldade em penetrar na membrana das células dos diferentes microorganismos.

Conclusões

As soluções de POLICAJU e tripsina, solubilizadas em ácido acético e utilizadas no preparo de curativos dérmicos, não apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* frente às bactérias dos gêneros testados.

Referências Bibliográficas

- AKINPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. **Fitoterapia**, v. 72, p. 286 - 287, 2001.
- CALVIN, M. Cutaneous wound repair. **Journal of Public Health Management**, v. 10, n. 1, p. 12-32, 1998.
- GROVE, D.C.; RANDDAL, W. **Medical Enciclopedia**, p. 76-81, 1995.
- LIMA, C.A.A.; PASTORE, G.M.; LIMA, E.D.P.A. Estudo da Atividade Antimicrobiana dos Ácidos Anacárdicos do Óleo da Casca da Castanha de Caju (CNSL) dos clones de Cajueiro-Anão-Precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco Estágios de Maturação sobre Microorganismos da Cavidade Bucal. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.20 n.3, p. 358-362 2000.
- MONTEIRO, F.M.F.; SILVA, F.O.; PAIVA, M.G.; SCHIRATO, G.V.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; PORTO, A.L.F. **Avaliação In Vitro da Atividade Antimicrobiana de diferentes concentrações do Polissacarídeo obtido da Goma do *Anacardium occidentale* L.** IV Simpósio de Pesquisa e Pós-graduação, dez. 2003, UFRPE.
- MONTEIRO, V.L.C. **Reparação Tecidual de Feridas cutâneas de caprinos tratados com polissacarídeo do cajueiro *Anacardium occidentale* L.** Estudo Clínico, Bacteriológico e Histopatológico. 2003. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2003.
- MILLAS, M.; GROOTE, R.A.M.C.; CURVELLO, A.A.S. **Polieletrólitos**. São Carlos: USP, 1991.
- PAIVA, M.G. **Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em cicatrização experimental.** 2003. 56p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2003.
- SCHIRATO, G.V. Efeito do polissacarídeo da goma de *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos. **ESO**, UFRPE, Recife. 2003.
- SPECTOR, M. **Biomaterials**. In: **Plastic Surgery: Indications, Operations, Outcomes**. Achauer B., Eriksson E, Guyuron B, et al. Mosby Year Book, Inc. St.Louis, 2001. Cap. 19, p 239-259.



ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *In vitro* E *In vivo* DO HETEROPOLISSACARÍDEO OBTIDO DA GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale*)



Giuliana V. Schirato^{1,2,4}; Flávio de O. Silva⁴; Camila de S. Porto^{2,3,4}; Leonildo B. G. Silva⁵; Rinaldo A. Motta⁵; José L. Lima-Filho⁴; Ana M. A. Carneiro-Leão^{2,4}; Ana L. F.

¹Programa PIBIC/ CNPq UFRPE; ²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal UFRPE; ³Programa PIC/ UFRPE; ⁴Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/ UFPE – Rua Profº Moraes Rego s/n – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil. CEP: 50670-190; ⁵Departamento de Medicina Veterinária UFRPE; ⁶analuporto@yahoo.com.br

In vivo and *in vitro* antimicrobial activity of the heteropolysaccharide from cashew (*Anacardium occidentale*) gum

The antimicrobial activity *in vivo* tests was performed using a single dose of 150 mg/ml PJU-ascorbic acid, immediately after surgery, in experimental surgical wounds (1 cm²) produced in albino Swiss mice. The control groups were: 150mM NaCl (B Group) and 75 mg/ml ascorbic acid (C Group). The evaluation of *in vivo* activity was determined by the absence of pathogenic microorganisms in swabs grown in blood agar and levine agar. In order to evaluate *in vitro* antimicrobial activity, was performed using well agar Müller Hinton plates (15 µl) against *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus* sp., isolated from cutaneous wounds of dogs. From *in vivo* PJU treated wounds, one could isolate only commensal bacteria. From B and C groups, respectively, there were isolated pathogenic bacteria (*Enterobacter* sp. and *Proteus* sp.). However, no *in vitro* antimicrobial activity was detected. These results suggest the use of P-JU emulsion develops a protective effect against microbial infection is only due to physical barrier.

Introdução

O polissacarídeo proveniente de *Anacardium occidentale* L. (PJU) apresenta massa molecular de 1,1 x 10⁵ Da, uma cadeia principal formada por unidades de D-Galp unidas por ligações glicosídicas β-(1→3), substituídos em O-6 (Menestrina et al., 1998).

O heteropolissacarídeo proveniente de *Anacardium occidentale* L. (PJU) vem sendo utilizado em diversas pesquisas e tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios, potencializando, em estudos preliminares, o processo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos (Schirato et al., 2002; Paiva, 2003), apresentando atividade antitumoral *in vitro* frente às células Hela (Stevan et al., 2000) e inibindo o crescimento do Sarcoma 180 (Menestrina et al., 1996).

Se as feridas não são adequadamente tratadas, pode surgir infecção. Feridas infectadas cicatrizam mais lentamente e a reepitelização é mais prolongada (Inngjerdinger et al., 2004). As infecções secundárias de pele são frequentemente causadas pela flora transitória, composta

principalmente por *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pyogenes* (Streptococcus pertencentes ao Grupo A, β-hemolíticos). O rápido diagnóstico e tratamento são essenciais para prevenir o agravamento da lesão local ou em circunstâncias extremas, surgimento de complicações sistêmicas, como sepsis que poderia acarretar a morte do paciente (Bikowski, 1999).

Objetivou-se com este trabalho avaliar a atividade antimicrobiana *in vivo* e *in vitro* da emulsão contendo o polissacarídeo de *Anacardium occidentale* (P-JU).

Experimental

O polissacarídeo da goma do cajueiro isenta de casca de árvore foi obtido de acordo com o método de Millas, et al. (1991). A emulsão foi preparada adicionando-se 3000 mg de PJU a 1500mg de ácido ascórbico em 10 ml de água destilada estéril. Esta solução permaneceu sob agitação até solubilizar-se completamente, após

esta etapa, o pH foi aferido e ajustado para 5,0 com solução de NaOH 1N. Com objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana *in vivo*, foi produzida uma ferida na região dorsal torácica em 90 camundongos (*Mus musculus*) albinos suíços, divididos em três grupos iguais, segundo o tratamento empregado: grupo B (NaCl 150 mM), grupo C (ácido ascórbico) e grupo T (emulsão contendo PJU). Foram aplicados 200 µl de cada solução uma única vez logo após a realização das lesões.

A atividade antimicrobiana do PJU foi determinada pela avaliação microbiológica das feridas cirúrgicas experimentais até o 6^o dia de pós-operatório (P.O.) O material para avaliação antimicrobiana *in vivo* foi coletado através de “swabs” esterilizados e semeado em placas de Petri contendo ágar sangue e ágar Levine. As placas foram incubadas em estufa microbiológica 37°C durante 24 horas. A resposta da atividade antimicrobiana foi obtida pela ausência de microrganismos patogênicos nas lesões experimentais. Os isolados foram classificados através dos aspectos morfológicos das colônias, morfotintoriais ao Gram e provas bioquímicas. As provas bioquímicas realizadas para enterobactérias foram: Indol (TSI – Triplice Sugar Iron e SIM – Indol Motilidade, H₂S), VM (Vermelho Metila), VP (Vogues Proskaer), citrato, uréia, lisina, lactose e manitol.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*, as bactérias *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., isoladas de feridas cutâneas de cães cedidas gentilmente por Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE. Uma alçada destas bactérias foi transferida para um tubo de ensaio estéril com 2 ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion). Após este procedimento, os tubos foram incubados em estufa microbiológica a 37°C, durante 24h. Após este tempo, as bactérias foram transferidas do caldo BHI e foram semeadas, através de “swabs” esterilizados, em placas de Petri contendo ágar Müller Hinton. Foram feitos poços de 0,7 cm no meio de cultura com auxílio de um perfurador esterilizado e onde foram colocados 15 µl da emulsão 150 mg/ml de PJU. Os controles utilizados nesta avaliação foram os mesmos da avaliação *in vivo*, com a adição da solução 0,2% (p/v) de nitrofurazona.

As placas foram incubadas em estufa microbiológica e a avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através de leituras

diárias da medida do halo de inibição durante 72h.

Resultados e Discussões

A maioria dos microrganismos da pele são encontrados nas camadas mais superficiais da epiderme e partes superiores dos folículos pilosos. Encontram-se normalmente nesses locais micrococcos (*Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus* spp.) e corinebactérias. Estes microrganismos geralmente não são patogênicos e são considerados comensais (Silva, 1999).

Foi observado que tratamento com a emulsão contendo o PJU propiciou a formação de um filme sobre o leito das lesões que ocasionou um efeito protetor contra a infecção microbiana devido a esta barreira física. Neste grupo (Tabelas 1), foram isoladas apenas bactérias constituintes da microbiota normal da pele. Já nos grupos controle (B e C), além destes microrganismos, as bactérias patogênicas *Proteus* sp. e *Enterobacter* sp. foram isoladas (Tabela 2). Estes microrganismos não são encontrados normalmente na epiderme e a presença destes microrganismos indica contaminação das lesões.

Os controles (NaCl 150 mM, solução 75 mg/ml de ácido ascórbico) e a emulsão 150 mg/ml de P-JU não apresetram atividade antimicrobiana *in vitro*. A solução de Nitrofurazona 0,2% (p/v) apresetrou atividade antimicrobiana para *Enterobacter* sp., *Escherichia coli* e *Bacillus* sp.

Segundo Spicer (2000) existe patogenicidade oportunista, onde microrganismos invadem e infectam o organismo quando as defesas estão enfraquecidas. De forma semelhante, uma ferida cirúrgica pode permitir a entrada da microbiota cutânea do paciente nos tecidos mais profundos, causando uma infecção da ferida cirúrgica.

Akinpelu (2001) em seus estudos verificando a atividade antimicrobiana do *Anacardium occidentale* L. utilizando a solução 20mg/ml do extrato da casca do *A. occidentale*, verificou significativa atividade antimicrobiana sobre bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomona*, *Shigella* e *Staphylococcus*. Semelhante aos nos nossos resultados, o autor não verificou atividade antimicrobiana do *A. occidentale* sobre a *Escherichia coli*.

Tabela 1 – Avaliação da atividade antimicrobiana *in vivo* do PJU (T) e grupos controle (B e C) após isolamento em ágar sangue.

Dia de pós-operatório	Ágar Sangue		
	Grupo B	Grupo C	Grupo T
1	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp.
2	Sem crescimento	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.
3	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.
4	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. <i>Proteus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.
5	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.
6	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.

Tabela 2 - Avaliação da atividade antimicrobiana *in vivo* do PJU (T) e grupos controle (B e C) após isolamento em ágar Lenine.

Dia de pós-operatório	Ágar Levine		
	Grupo B	Grupo C	Grupo T
1	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento
2	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento
3	<i>Enterobacter</i> sp.	Sem crescimento	Sem crescimento
4	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento
5	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento
6	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento

Conclusões

A avaliação *in vivo* demonstrou atividade antimicrobiana da emulsão contendo PJU, o que não foi observado nos ensaios *in vitro*.

Agradecimentos

Aos órgãos de fomento BNB, FACEPE, CNPq, FINEP e CAPES pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

- C. H. P. M. Silva, **Bacteriologia, um texto ilustrado**, Eventos, Teresópolis, 1999.
 D. A. Akinpelu **Fitoterapia**, **2001**, 72, 286 – 287.
 F. R. Stevan; J. M. Menestrina; S. Veiga; M. Iacomini; M. B. M. Oliveira in Anais da

XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, 2000.

- G. V. Schirato; M. G. Paiva; F. M. F. Monteiro; F. O. Silva; J. L. Lima-Filho; A. M. Carneiro Leão; A. L. F. Porto in Anais da II Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, Recife, 2002.
 J. Bikowski **The Journal of Emergency Medicine**, **1999**, 17, 197 – 206.
 J. M. Menestrina; A. M. A. Carneiro Leão; P. M. Stuelp; M. J. Machado; M. Iacomini; P. A. Gorin in Anais da XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biológica Molecular, Caxambu, 1996.
 J. M. Menestrina; M. Iacomini; P. A. Gorin **Phytochemistry**, **1998**, 47, 715 – 721.
 J. W. Spicer, **Bacteriologia, Micologia e Parasitologia Clínicas**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.
 K. Inngjerdinger; C. S. Nergard; D. Diallo; P. P. Mounkoro; B. S. Paulsen **Journal of Ethnopharmacology**, **2004**, 92, 233 – 244.
 M. G. Paiva, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.
 M. Millas; R. A. M. C. Groote; A. A. S. Curvello, **Polieletrólitos**, USP, São Carlos, 1991. b) M. Rinaudo, Comunicação pessoal.



EFEITO DO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS TRATADAS COM O PÓ DA RAIZ DE *Jacaratia corumbensis*



Flávio de O. Silva⁴, Giuliana V. Schirato^{2,4,6}, Camila de S. Porto^{1,4,7}, Benildo de S. Cavada³, José L. Lima-Filho⁴, Ana L. F. Porto^{1,4}, *Ana M. A. Carneiro-Leão^{1,4,5}

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE; ²Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/ FIOCRUZ; ³ Universidade Federal do Ceará; ⁴ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/ UFPE – Rua Prof^o Moraes Rego s/n – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil. CEP: 50670-190; ⁵ amanjos2001@yahoo.com.br; ⁶ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – CCB/ UFPE; ⁷ Bolsista PIBIC/ CNPq – UFRPE.

Histopathological analysis of cutaneous wounds in mice treated with Jacaratia corumbensis root powder

With the objective to evaluate the influence of the topical treatment with the *Jacaratia corumbensis* root powder (PJC) in the wound healing, surgical wounds (1 cm²) were produced aseptically in the dorsal thoracic region in albino Swiss mice. Each wound was topically treated daily along 11 days, as follows: 150 mM NaCl (C Group) and 9mg PJC/ cm² of lesion (T Group). Histopathological evaluations of the injuries been carried in 2nd, 7th and 12th days of postoperative (PO). At 2nd day PO, was observed in C and T Groups presence of polimorfonuclear infiltrate associated to neoangiogenesis. In this time, in T Group, conjunctive tissue was observed. At 7th day PO, had a presence of fibrovascular and vascular conjunctive tissue in T and C Groups, respectively. Finally, at 12th day PO, the wounds showed re-epithelization. These results suggest a potential use of PJC to improve wound healing.

Introdução

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que evoluem de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular (Mandelbaum et al., 2003).

Apesar dos recentes avanços em tecnologia farmacêutica, química sintética e biotecnologia promoverem o desenvolvimento de drogas novas e potentes, os produtos naturais, como plantas e minerais, continuam sendo a maior fonte para a obtenção de medicamentos para os mais diversos fins (Noormohamed et al. 1994).

O mamãozinho-de-veado (*Jacaratia corumbensis*) é um arbusto que ocorre na região semi-árida do Nordeste brasileiro (Araújo & Brito, 1998), sendo suas raízes utilizadas na alimentação humana e animal.

Este trabalho teve como objetivo avaliar histopatologicamente o efeito cicatrizante do pó obtido de *Jacaratia corumbensis* em lesões cutâneas experimentais em camundongos.

Experimental

O pó de *Jacaratia corumbensis* foi obtido a partir da túbera que após a lavagem em água corrente, foi descascada e finamente laminada

para posterior secagem à temperatura ambiente e trituração com gral e pistilo, obtendo-se assim, o PJC. Foi produzida uma ferida na região dorsal torácica em 30 camundongos (*Mus musculus*) albinos suíços (fêmeas, com 8 semanas de idade, pesando 30,0 ± 2,0g) divididos em dois grupos iguais, segundo o tratamento empregado: Grupo C (NaCl 150 mM), Grupo T (9mg de PJC por cm² de lesão). As feridas foram tratadas diariamente, até o 11^o dia de experimento, tendo início imediatamente após o procedimento cirúrgico. A retirada dos fragmentos de pele foi realizada no 2^o, 7^o e 12^o dias de pós-operatório (PO) e os mesmos foram submetidos ao processamento histopatológico de rotina (Michalany, 1991). Para realização desta, 5 animais foram retirados de cada grupo experimental e, posteriormente, anestesiados com cloridrato de xilazina (dosagem de 10 mg/Kg) e cloridrato de cetamina (dosagem de 115 mg/Kg) (Hall e Clarke, 2001). Após a realização da biópsia, os animais, ainda anestesiados, foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Resultados e Discussões

Na avaliação histopatológica observou-se no 2^o dia pós-operatório a presença de crosta,

infiltrado polimorfonuclear e neoangiogênese em ambos os grupos. Além desses achados, as lesões do Grupo T apresentaram presença de tecido conjuntivo neoformado e início de produção de colágeno (Figura 01).

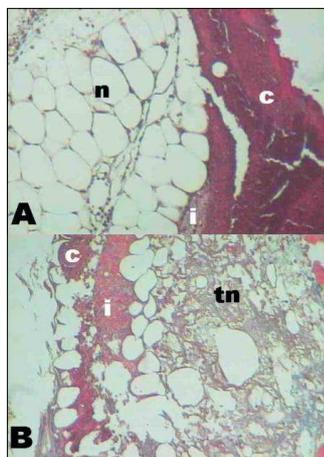


Figura 01 – Aspectos histopatológicos do processo cicatricial no 2º dia de evolução. Tricrômico de Masson (100X). A, Grupo C (NaCl 150mM); B, Grupo T (PJC). n – neovascularização; c – crosta; i – infiltrado polimorfonuclear; tn – tecido conjuntivo neoformado.

No 7º dia, no Grupo Controle verificou-se a presença de infiltrado polimorfonuclear, neovascularização, neoformação de matriz extracelular e tecido de granulação de padrão vascular, e ainda, reepitelização das margens da lesão. No Grupo Teste havia, além da reepitelização das bordas da ferida, tecido de granulação de padrão fibrovascular e deposição de matriz extracelular em torno dos vasos (Figura 02).

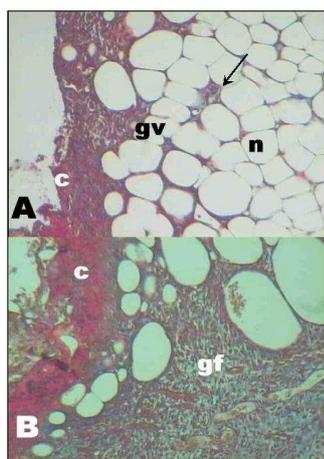


Figura 02 – Aspectos histopatológicos do processo cicatricial no 7º dia de evolução. Tricrômico de Masson (100X). A, Grupo C (NaCl 150 mM); B, Grupo T (PJC). n – neovascularização; c – crosta; gv – tecido de granulação vascular; gf – tecido de granulação fibrovascular; → - neoformação de matriz extracelular.

No 12º dia, as análises histopatológicas revelaram, no Grupo Controle, a presença de crosta, tecido de granulação de padrão fibroso, presença de colágeno não organizado e grande quantidade de fibroblastos. No Grupo Teste, constatou-se a presença de fibras colágenas mais organizadas e reepitelização de grande área da lesão (Figura 03).

Andrade (2003), utilizando topicamente pomada contendo extrato da raiz de *J. corumbensis* em feridas cutâneas em cabras, verificou no 7º dia de evolução pós-cirúrgica, a presença de crosta em ambos os grupos, infiltrado polimorfonuclear mais evidente no Grupo Controle, tecido de granulação e fibras colágenas mais modeladas no Grupo Controle.

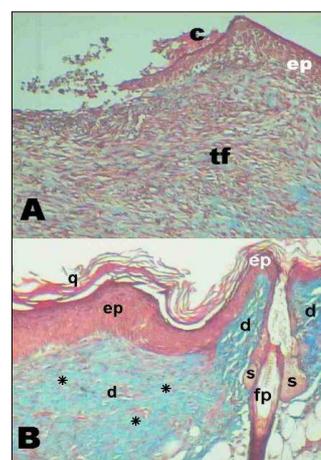


Figura 03: Aspectos histopatológicos do processo cicatricial no 12º dia de evolução. Tricrômico de Masson (100X). A, Grupo C (NaCl 150mM); B, Grupo T (PJC). c – crosta; ep – epitélio; tf – tecido de granulação fibroso; d – derme; s – glândula sebácea; fp – folículo piloso; q – extrato córneo; * - fibras colágenas.

Conclusões

Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que uso tópico do extrato em pó da raiz de *Jacaratia corumbensis* contribuiu no o processo cicatricial das feridas.

Agradecimentos

Aos órgãos de fomento BNB, FACEPE, CNPq, FINEP e CAPES pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

G. G. L. Araújo; N. C. Brito in: Congresso da Sociedade Nordestina de Produção Animal, Fortaleza, 1998.

- J. Michalany, **Técnica histológica em anatomia patológica**, Michalany, São Paulo, 1991.
- L. S. S Andrade, Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2003.
- L. W. Hall; K. W. Clarke, **Veterinary Anesthesia**, Ballière Tindall, London, 1991.
- S. E. Noormohamed; V. Kumar; D. I. Min **Journal of Burn & care Rehabilitation**. **1994**, 15, 519 – 522.
- S. H. Mandelbaum; E. P. Di Stasi; M. H. S. Mandelbaum **Anais Brasileiros de Dermatologia**. **2003**, 78, 393 – 408.

AVALIAÇÃO CLÍNICA E DA CONTRAÇÃO DE FERIDAS TRATADAS COM MEMBRANAS DE LÁTEX NATURAL IMPREGNADAS COM A FRAÇÃO ALCOÓLICA DE *Jacaratia corumbensis*

Camila S. Porto^{1,2,3}; Giuliana V. Schirato^{3,4}; Flávio de O. Silva³; Marco A. Canedo⁴; Eduardo J. Arruda⁵; José L. Lima-Filho³; Ana L. F. Porto^{2,3}; Ana M. A. Carneiro-Leão^{2,3}

¹Programa PIBIC/UFRPE; ²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal UFRPE; ³Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami LIKA/ UFPE; ⁴Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães CPqAM/ FIOCRUZ; ⁵Departamento de Farmácia/Programa de Mestrado de Desenvolvimento Local/Universidade Católica Dom Bosco UCDB-Campo Grande MS

Introdução

As lesões de pele por trauma ou cirurgia provocam uma série de efeitos fisiológicos interdependentes que resultam na reparação tecidual, em graus variados. Na reabilitação de lesões podem-se utilizar biomateriais, entendidos como materiais interativos capazes de estabelecer uma afinidade apropriada com o tecido vizinho sem indução de uma resposta adversa do hospedeiro (HUBBEL, 1995).

Diversas plantas são utilizadas na prevenção e tratamento de doenças de animais e algumas, por serem dotadas de ação cicatrizante, são usadas no tratamento de feridas (ANDRADE, 2003). O mamãozinho-de-veado (*Jacaratia corumbensis*) é um arbusto que ocorre na região semi-árida do Nordeste brasileiro (ARAÚJO & BRITO, 1998), sendo suas raízes utilizadas na alimentação humana e animal. O uso de membranas contendo princípios ativos favorecem a cicatrização, pois liberam o princípio ativo que favorece a cicatrização e desempenham uma função protetora da lesão estabelecendo uma barreira mecânica.

Objetivou-se com este trabalho avaliar os aspectos clínicos e área média das lesões cirúrgicas experimentais tratadas com membranas de látex natural impregnadas com a fração alcoólica de *J. corumbensis*.

Material e Métodos

As membranas de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* impregnadas pela fração alcoólica do extrato da raiz de *J. corumbensis* (Látex-J) foram preparadas pelo Prof^o Dr. Eduardo José Arruda do Departamento de Farmácia da Universidade Católica Dom Bosco - Campo Grande - MS.

Foram realizadas duas lesões cirúrgicas circulares (0,85 cm diâmetro) na região dorsal torácica em 15 ratos (*Rattus norvegicus* Wistar, fêmeas, 90 dias de idade, 200-230g). A lesão cranial foi tratada diariamente utilizando 50µl de NaCl 150mM (Lesão C) e a lesão caudal foi submetida ao tratamento com a membrana Látex-J (Lesão T).

Após o procedimento cirúrgico experimental, as lesões foram avaliadas clinicamente durante 14 dias. Os parâmetros observados foram presença de hiperemia, edema, exsudação e formação de crosta. As lesões foram mensuradas diariamente com auxílio de um paquímetro e suas áreas foram calculadas utilizando-se a equação formulada por Prata et al. (1988).

Nos tempos 2, 7 e 14 dias, cinco animais foram retirados do experimento para realização de biópsia. Os animais foram anestesiados, por via intramuscular, com a associação de cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina 2%, com as respectivas dosagens: 90mg/kg e 10mg/kg (FLECKNELL, 1987). Após a retirada do fragmento de pele, os animais foram eutanasiados pela aplicação intraperitonal de superdosagem de Tiopental Sódico.

Os fragmentos de pele coletados foram submetidos ao processamento histopatológico de rotina (MICHALANY, 1991) e corados pela Hematoxilina Eosina e, alternativamente, pelo Tricromico de Masson.

Resultados e Discussão

Os animais foram avaliados diariamente até o 14º dia de pós-operatório (P.O.). Durante a avaliação clínica, observou-se que as Lesões T mantiveram-se úmidas durante a fase inflamatória, comparadas às lesões controle, retardando assim o surgimento de crosta (sinal este observado a partir do 3º dia de avaliação), enquanto as Lesões C apresentaram este sinal a partir do 1º dia.

A hiperemia é mais um dos sinais inflamatórios caracterizado pelo aumento do volume sanguíneo na área lesionada (ROBBINS, 2000). As lesões tratadas com Látex-J apresentaram menor frequência de hiperemia, em especial no 5º dia (27,27% e 63,63% para as lesões T e C, respectivamente).

Essas observações estão de acordo com as descritas por Aceto (2002), que tratou feridas cutâneas de animais com membranas amnióticas. O grupo tratado com a membrana amniótica demonstrou menos intenso (leve a moderado), enquanto o seu controle, tratado com curativo não

aderente, revelou a característica mais intensa (leve a intensa). Já Oliveira et al. (2003), que utilizou a membrana de látex no tratamento de perfurações timpânicas, observaram uma exuberante hiperemia na membrana timpânica remanescente como também no enxerto.

Após o procedimento cirúrgico, as lesões foram mensuradas obtendo-se a área média das lesões C e T (2,95 e 2,75 cm², respectivamente). Ocorre uma maior diminuição da área nas lesões T quando comparadas às Lesões C, durante os sete primeiros dias de avaliação, caracterizados pela fase inflamatória. Nos dias seguintes de evolução, as Lesões C e T apresentaram um comportamento semelhante. Uma explicação para tal fenômeno, deve-se possivelmente ao desprendimento da crosta juntamente com a membrana Látex-J, partir do 7^o dia de P.O. (Figura 01).

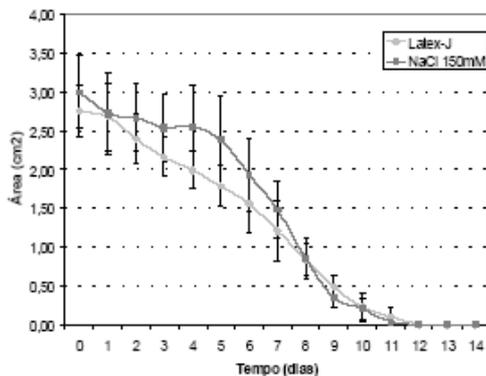


Figura 01- Área média das lesões Tratadas e Controle.

Durante a avaliação histopatológica, observou-se ao 14^o dia de P. O. que as lesões controle sugerem um padrão de grande quantidade de fibroblastos, vasos, colágeno ainda desorganizado, ainda apresentando crosta e com tecido de granulação de padrão fibrovascular. Nas lesões tratadas com Látex-J no mesmo período, foi observada a presença de poucos vasos, reepitelização, além de colágeno bem organizado e de tecido de granulação com padrão fibroso.

Conclusão

O conjunto de resultados obtidos (diminuição da área da ferida, retardamento da formação de crosta e as demais avaliações) sugere que a membrana de Látex-J é um biomaterial com potencial uso como substituinte temporário de pele.

Referências Bibliográficas

- ACETO, M. L. Uso de membrana amniótica e pericárdio canino como curativo biológico e na preparação do leito receptor para enxertia cutânea autóloga: estudo experimental em cães. 2002, 98f. Tese (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- ANDRADE, L. S. S. Extrato de *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze para tratamento tópico de feridas cutâneas produzidas experimentalmente em caprinos (*Capra hircus*), 2003, 42f. Tese (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- ARAÚJO, G.G.L.; BRITO, N.C. Composição química da parte aérea e da raiz do mamãozinho - de-veado (*Jacaratia corumbensis* O. Kuntze) em diferentes idades. In: Congresso da Sociedade Nordestina de Produção Animal. 1. 1998. Fortaleza - CE. Anais... Fortaleza: SNPA, 280p, 1998.
- FLECKNELL, P.A. Laboratory animal anesthesia. Academic, London, p. 380-3921, 987.
- HUBBEL, J. A. Biomaterials in tissue engineering. *Bio/Technology*, v. 13, n. 6, p. 565 - 576, 1995.
- MICHALANY, J. Técnica histológica em anatomia patológica. 2. ed. São Paulo: Michalany, 276p, 1991.
- OLIVEIRA, J. A. A. et al. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 69, n. 5, cap. 1, 2003.
- PRATA, M.; HADDAD, C.; GOLDENBERG, S. Uso tópico do açúcar em feridas cutâneas, estudo experimental em ratos, *Acta Cirurgia Brasileira*, v.3, n. 2, p. 43 - 48, 1988.
- ROBBINS, S.L. et al. *Patologia Estrutural e Funcional*. 6^o ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 4, p. 79-100, 2000.

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE FERIDAS TRATADAS COM MEMBRANAS DE LÁTEX NATURAL IMPREGNADAS COM A FRAÇÃO ALCOÓLICA DE *Jacaratia corumbensis*

Camila S. Porto^{1,2,3}; Giuliana V. Schirato^{3,4}; Flávio de O. Silva³; Marco A. Canedo⁴; Eduardo J. Arruda⁵;
José L. Lima-Filho³; Ana L. F. Porto^{2,3}; Ana M. A. Carneiro-Leão^{2,3}

¹Programa PIBIC/UFRPE; ² Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal UFRPE; ³ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami LIKA/ UFPE; ⁴ Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães CPqAM/ FIOCRUZ; ⁵ Departamento de Farmácia/Programa de Mestrado de Desenvolvimento Local/Universidade Católica Dom Bosco UCDB-Campo Grande MS

Introdução

A pele é uma barreira efetiva contra a maioria dos microorganismos e, devido a isso, é frequentemente denominada como "primeira linha de defesa". Embora cortes, abrasões e queimaduras permitam a penetração de micróbios nesta camada, normalmente ela é impermeável a microorganismos. A pele varia amplamente a sua estrutura e função, dependendo da localização do corpo. Estas diferenças determinam os tipos e o número de microorganismos que ocorrem em cada região da pele (PELCZAR Jr., 1997).

A maioria das bactérias da pele reside na superfície do extrato córneo e na parte superior dos folículos pilosos. Algumas, entretanto, residem mais profundamente, pois têm a função de recolonizar a pele quando as bactérias mais superficiais são removidas, como por exemplo, após uma lavagem cuidadosa (TRABULSI et al., 1999).

Predominam na pele as bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*. Menos frequentemente e em menor quantidade são encontrados *Streptococcus* e outras bactérias (TRABULSI et al., 1999).

Se as feridas não são adequadamente tratadas, pode surgir infecção. Feridas infectadas cicatrizam mais lentamente e a reepitelização é mais prolongada (INNGJERDINGER et al., 2004). As infecções secundárias de pele são frequentemente causadas pela flora transitória, composta principalmente por *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* pertencentes ao Grupo A, β -hemolíticos). O rápido diagnóstico e tratamento são essenciais para prevenir o agravamento da lesão local ou, em circunstâncias extremas, o surgimento de complicações sistêmicas, como sepsis que poderia acarretar a morte do paciente (BIKOWSKI, 1999).

Material e Métodos

As membranas de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* impregnadas pela fração alcoólica do extrato da raiz de *Jacaratia corumbensis* (Látex-J) foram preparadas pelo

Prof^o Dr. Eduardo José Arruda do Departamento de Farmácia da Universidade Católica Dom Bosco - Campo Grande - MS.

Os animais foram anestesiados, por via intramuscular, com a associação de cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina 2%, com as respectivas dosagens: 90mg/kg e 10mg/kg (FLECKNELL, 1987), subsequentemente realizadas duas lesões cirúrgicas circulares (0,85 cm diâmetro) na região dorsal torácica em 15 ratos (*Rattus norvegicus* Wistar, fêmeas, 90 dias de idade, 200-230g). A lesão cranial foi tratada diariamente utilizando 50 μ l de NaCl 150mM (Lesão C) e a lesão caudal foi submetida ao tratamento com a membrana Látex-J (Lesão T).

A avaliação microbiológica das feridas cirúrgicas experimentais foi realizada nos tempos 0h, 48h, 7 e 14 dias de pós-operatório antes da realização de biópsia, posteriormente eutanasiados por aplicação intraperitoneal superdosagem de Tiopental Sódico. O material para exame microbiológico foi coletado através de "swabs" esterilizados e semeado em placas de Petri contendo ágar sangue e ágar Levine. As placas foram incubadas em estufa microbiológica durante 24 horas e, após este período, as bactérias foram classificadas através dos aspectos morfológicos das colônias e morfotintoriais ao Gram.

Resultados e Discussão

A análise microbiológica das lesões T e C permitiu o isolamento apenas de colônias bacterianas pertencentes a microbiota normal da pele (*Staphylococcus* sp.). As lesões C apresentaram uma frequência relativa de 80%, 60% e 50%, no 2^o, 7^o e 14^o dia de pós-operatório (P.O.), respectivamente. Entretanto, as frequências observadas para as Lesões T, foram de 60%, 40% e 20% para o 2^o, 7^o e 14^o dia de P.O., respectivamente. É possível que os resultados obtidos sejam explicados pelo efeito físico do Látex-J, dificultando a colonização de microorganismos *in vivo* (Figura 01).

Segundo Spicer (2000) existe a patogenicidade oportunista, onde microrganismos invadem e infectam o organismo quando as

defesas estão enfraquecidas. De forma semelhante, uma ferida cirúrgica pode permitir a entrada da microbiota cutânea do paciente nos tecidos mais profundos, causando uma infecção da ferida cirúrgica.

O resultado qualitativo obtido pelo isolamento bacteriano realizado no presente estudo, ainda é insuficiente para avaliar sua influência sobre o processo cicatricial. Segundo Swyer & Pruett (1994) e Ehrlichman et al. (1991) esta avaliação só poderá ser realizada se quantificarmos o número de bactérias por grama de tecido, que de acordo com Wisemam et al. (1992) é de mais de 10^5 bactérias por grama de tecido para designar se houve ou não uma infecção estabelecida.

aplicações. 2 ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, v. 2, p.517, 1997.

SPICER, J. W. **Bacteriologia, Micologia e Parasitologia Clínicas**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.16-18, 2000.

SWYER, R. G.; PRUETT, T. L. Infecções das feridas. **Clinica Cirúrgica da América do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros, v.3, p. 561-580, 1994.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo, Atheneu, p. 123-235, 1999.

WISEMAM, D. M. et al. Wound Dressings: design and use. In: COHEN, I. K.; DIEGELMANN, R. F.; LINDBLAD, W. J. **Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 563-580, 1992.

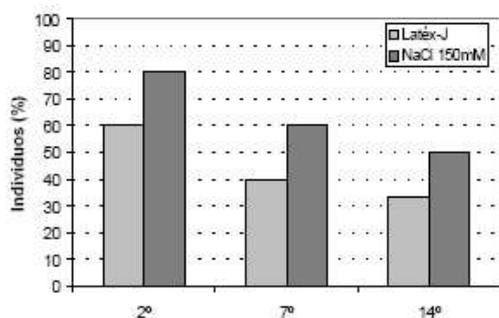


Figura 01- Frequência relativa de microorganismos presentes em feridas cutâneas tratadas com Látex-J e NaCl 150mM.

Conclusão

O efeito antimicrobiano da membrana Látex-J pode ser atribuído pela barreira física causada por esta, dificultando, desta forma, a colonização de microorganismos na lesão experimental.

Referências Bibliográficas

BIKOWSKI, J. Antimicrobial wound management in the Emergency Department: An educational supplement. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 1, p. 197-206, 1999.

EHRlichMAN, R. J. et al. Complicações comuns da cicatrização de feridas. **Clinica Cirúrgica da América do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros, v.6, p. 1405-1434, 1991

INNGJERDINGER, K. et al. An ethopharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland, Mali, West Africa. **Journal of Ethonopharmacology**, v. 92, p. 233-244, 2004.

PELCZAR JR, J. M.; CHAM, E. C. S.; KRIEG, N. R. et al. **Microbiologia: conceitos e**