



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DA LECTINA DE *Cratylia*
mollis EM CAMUNDONGOS NORMAIS E IMUNODEPRIMIDOS
EXPERIMENTALMENTE

Recife, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – MESTRADO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Dissertação apresentada à banca
avaliadora do Programa de Pós-
graduação do Centro de Ciências
Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco como um
dos requisitos para a obtenção do

Mestranda: CRISTIANE MOUTINHO LAGOS DE MELO

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia

Melo, Cristiane Moutinho Lagos de
Avaliação da atividade cicatrizante da Lectina de *Cratylia mollis* em
camundongos normais e imunodeprimidos experimentalmente / Cristiane
Moutinho Lagos de Melo . – Recife : O Autor, 2007.

72 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) – Ciências Biológicas - Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. 2007.

Inclui bibliografia e anexo.

1. *Cratylia mollis* 2. Cramoll. 3. Imunosupressão. Feridas
I. Título.

577.112

CDU (2.ed.)

UFPE

583.76

CDD (22.ed.)

CCB – 2007-050

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - MESTRADO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DA LECTINA DE *Cratylia mollis* EM
CAMUNDONGOS NORMAIS E IMUNODEPRIMIDOS EXPERIMENTALMENTE

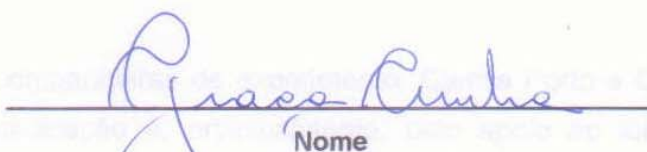
Cristiane Moutinho Lagos de Melo

Dissertação defendida para a Banca Examinadora composta pelas seguintes professoras:



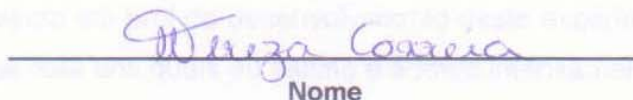
Nome

Prof.^a Dr.^a Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
(AVALIADORA INTERNA)



Nome

Prof.^a Dr.^a Maria das Graças Carneiro da Cunha
(AVALIADORA EXTERNA)



Nome

Prof.^a Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia
(ORIENTADORA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os meus familiares que em muito contribuíram para a realização de mais uma etapa na minha formação. Ao meu pai pela presença ao longo de minha vida, à minha mãe por ser o meu pilar e à minha filha tão amada que cresce participando do esforço de sua mãe.

À Prof.^a Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia por sua imensurável ajuda ao longo de todos esses anos de minha vida acadêmica, a essa profissional exemplar, admirável e que muito contribuiu para a elaboração e finalização desse experimento meus sinceros agradecimentos.

À Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Figueiredo Porto, pela ajuda material, pelas dicas e sugestões muito pertinentes ao longo do experimento e, principalmente pelos conselhos pessoais sempre edificantes.

À Prof.^a Dr.^a Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, por estar sempre disponível para ajudar seja profissional ou pessoalmente, meus sinceros agradecimentos a esta notável mulher que ao longo dos anos sempre esteve disposta a colaborar com o meu crescimento.

À Prof.^a Dr.^a Luana Cassandra pelo incentivo e ajuda, principalmente nas últimas etapas do experimento.

Às minhas companheiras de experimento, Camila Porto e Chirleanny Maciel pelo incentivo, ajuda, dedicação e, principalmente, pelo apoio ao longo deste ano. Duas profissionais exemplares, competentes e com um futuro promissor.

Aos colegas de laboratório, Mário Ribeiro, Carmelita Bezerra, Felipe Viegas e Maria Helena por toda a ajuda em prol do desenvolvimento deste experimento. Posso dizer que são amigos de longa data aos quais eu estimo e admiro intensamente.

Agradeço a duas pessoas especiais, que passaram a fazer parte do meu dia-a-dia neste ano, Prof.^a Dr.^a Vera Della Santa, uma mulher incrível e Daniela Vieira, por toda amizade e respeito.

Aos amigos de laboratório e Mestrado: Flávio, Dani Viana, Veridiana, Germana, Jorge, Carol, Marília, Renata, Alessandra, Torquato, Gustavo, Amaro, entre tantos outros que tornaram meus dias mais agradáveis ao longo do experimento.

Agradeço ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, sua secretária Isabel, Moisés - Almoxarifado, Paulo – Biotério, e a todos os profissionais do LIKA pela ajuda e carinho.

Agradeço à Adenilda, secretária do CCB pela ajuda, e à Neide e Miron pela prestatividade de sempre.

Ao colega Edgar Silveira pela essencial contribuição no meu estatístico.

“Sempre há algo para aprender e conceitos a reciclar. A mudança para melhor não implica em destruir o que fomos, mas dar nova direção e maior aproveitamento a tudo que conquistamos, inclusive nossos erros”.

Ermance Dufaux

Aos maiores exemplos de minha vida,
exemplos esses de luta, coragem,
simplicidade e caráter. Aos meus pais
dedico.

LISTA DE ABREVIATURAS

MTX	Metotrexato
PMNs	Células Polimorfonucleares
TGF- β 1	Fator de Crescimento Transformante
Cramoll 1,4	Lectina de <i>Cratylia mollis</i> isoformas 1 e 4 associadas

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Mediadores bioquímicos e fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial (sigla), fonte de origem e forma de atividade biológica.	17
-----------------	---	-----------

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	Representação de ferida tratada por primeira intenção. a – ferida incisa com bordas regulares sem perda tecidual e b – ferida com as bordas fechadas através de suturada com fio cirúrgico.	14
FIGURA 02	Representação de feridas tratadas por segunda intenção.	15
FIGURA 03	Representação da fase de fibroplasia. Em evidência observa-se o tecido de granulação.	20
FIGURA 04	Representação do processo de formação e remodelagem da fibrila de colágeno.	23
FIGURA 05	Exemplo de microrganismos patógenos e patologias que ocasionam.	26
FIGURA 06	Sistema do complemento, sua ativação e ação.	27
FIGURA 07	Ação quimiotóxica dos fatores do complemento.	28
FIGURA 08	Caracterização da <i>Cratylia mollis</i> . a – formação arbustiva do feijão camaratu; b – sementes de <i>C. mollis</i> e c – estrutura terciária da Cramoll 1.	37

RESUMO

Um organismo imunocomprometido tem dificuldade de restabelecimento após uma injúria. Sementes da lectina de *Cratylia mollis*, experimentalmente chamada Cramoll 1,4, foi usada no tratamento de feridas cutâneas em camundongos normais e imunodeprimidos, com o objetivo de desenvolver uma terapia que pudesse superar a condição imunodeprimida do organismo. A droga imunossupressora utilizada foi Metotrexato (0.8 mg/kg/semana). Feridas cirúrgicas (1 cm de diâmetro) foram produzidas em camundongos fêmeas normais e imunodeprimidas. As lesões foram tratadas com administração tópica (T) e intraperitoneal (Ip), como segue: grupos controle – NaCl T; NaCl Ip; NaCl Immunod T e NaCl Immunod Ip (0,15 M NaCl) e grupos tratados – Cramoll T; Cramoll Ip; Cramoll Immunod T e Cramoll Immunod Ip ($10 \mu\text{g}, \text{ml}^{-1}$ Cramoll 1,4). Parâmetros como edema, hiperemia, crosta, tecidos de granulação e cicatricial como também a contração das feridas foi analisada por 12 dias. O edema foi pouco observado nos grupos Cramoll Ip e Cramoll Immunod Ip, a hiperemia se mostrou em grande parte pálida em todos os grupos. O infiltrado inflamatório, proliferação de fibroblastos e deposição de fibras colágenas foram observados com maior intensidade em todas as feridas tratadas com a Cramoll, especialmente o grupo Cramoll T. Estes últimos aspectos favoreceram um excelente fechamento e reparo das lesões tratadas com a Cramoll 1,4. Nos animais experimentais o fechamento de todas as lesões foi observado no dia 10 para o grupo Cramoll Immunod Ip e dia 11 para os grupos Cramoll T, Cramoll Ip e Cramoll Immunod T. Os grupos controle obtiveram fechamento das feridas no dia 12 para o grupo NaCl Immunod T e 90% dos grupos NaCl T, NaCl Ip e NaCl Immunod Ip. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que animais saudáveis ou imunocomprometidos tratados com Cramoll 1,4 têm suas lesões eficientemente reparadas e em menor tempo.

Palavras-chave: *Cratylia mollis*, lectina, imunodepressão, feridas.

ABSTRACT

An immunocompromised organism has difficulty for re-establish after any injury. *Cratylia mollis* seed lectin, experimental called Cramoll 1,4, was used as a treatment of normal and immunocompromised cutaneous wounds of mice, with the aim to develop therapeutics that surpass immunosuppression condition of the organism. Methotrexate (0.8 mg/kg/week) was used as the immunosuppressive drug. Surgical wounds (1 cm of diameter) were produced aseptically in health and immunocompromised female mice. The wounds were daily treated with topical (T) and intraperitoneal (Ip) administration, as follows: control groups – NaCl T; NaCl Ip; NaCl Immunod T and NaCl Immunod Ip (0.15 M NaCl) and treated groups – Cramoll T; Cramoll Ip; Cramoll Immunod T and Cramoll Immunod Ip (10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ Cramoll 1,4). Parameters such as edema, hiperemy, scab, granulation and cicatricial tissues as well as contraction of wounds were analyzed for 12 days. The edema was less observed on Cramoll Ip and Cramoll Immunod Ip groups; hiperemy showed pale at all groups. Inflammatory infiltrate, fibroblast proliferation and collagen fiber deposition were observed with higher intensity on all Cramoll treated wounds, especially on Cramoll T group. The latter aspects favored an excellent closing and repair of lesions treated with Cramoll 1,4. In experimental mice, closing of all injuries was obtained in day 10 for Cramoll Immunod Ip and day 11 for Cramoll T, Cramoll Ip and Cramoll Immunod T groups. The control groups had wounds closed in day 12 for NaCl Immunod T group and 90% of NaCl T, NaCl Ip and NaCl Immunod Ip groups. In accordance with examined aspects, normal or immunocompromised animals treated with Cramoll 1,4 had injuries efficiently repaired, in less time.

Word-keys: *Cratylia mollis*, lectin, immunodepression, wounds.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	04
EPÍGRAFE	06
DEDICATÓRIA	07
LISTA DE ABREVIATURAS	08
LISTA DE TABELAS	09
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Lesões	14
1.2 Processo Cicatricial	15
1.3 Terapêutica alternativa para lesões	24
1.4 Sistema imune	26
1.5 Imunossupressão	29
1.6 Microrganismos	30
1.7 Lectinas	32
1.8 Cramoll 1,4	36
1.9 Estudo de lectinas no reparo de lesões	38
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	40
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	41
5. ARTIGO	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lesões

As lesões de pele podem ser classificadas de acordo com o processo de reparo, ou seja, como feridas fechadas (de primeira intenção) ou abertas (de segunda intenção). As feridas de primeira intenção (figura 01) são bastante difundidas na área de clínica cirúrgica e consistem em uma incisão de determinada área do corpo causando a morte de um número limitado de células e cujas bordas são aproximadas através de sutura cirúrgica (MOULIN et al., 2000).

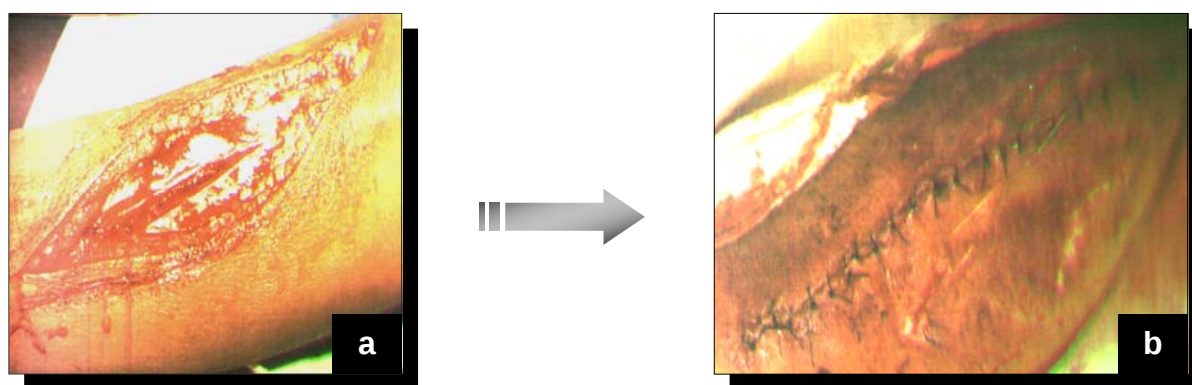


Figura 01: Representação de ferida tratada por primeira intenção. **a** – ferida incisa com bordas regulares sem perda tecidual e **b** – ferida com as bordas fechadas através de suturada com fio cirúrgico.

Fonte: LOMBA, (2002).

Nas feridas de segunda intenção (figura 02) ocorre perda de parte do tecido na área da lesão, há um grande número de células mortas, há a ruptura de muitos vasos sangüíneos locais e não há possibilidade de aproximação das bordas (ROBBINS et al., 2000). As feridas abertas apresentam problemas clínicos inteiramente diferentes das feridas incisadas e suturadas, como fibrose ou contração excessiva (WONG et al., 2002) e estão mais sujeitas à infecção local (BACILA, 2003).

As feridas cutâneas se revestem de importância em função da alta freqüência, do sofrimento que produzem, da proliferação bacteriana verificada em expressivo número de

casos, e também do elevado custo dos tratamentos usualmente ministrados (RIBEIRO e SCHMIDT, 2000).

O processo de reparo existe para restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido, sendo a cura de uma ferida uma sucessão complexa de eventos bioquímicos e celulares em resposta à lesão tecidual. Para que um ferimento seja curado com êxito, os eventos devem se suceder numa seqüência apropriada, e o resultado final, geralmente uma cicatriz de tecido conjuntivo, configura o somatório desse processo (CARVALHO, 2002). Assim, se a ferida constitui a solução de continuidade anátomo-fisiológica da área lesada, a cicatriz corresponde à tentativa biológica a qual o organismo recorre para restaurar sua integridade (PILCHER et al., 1999). Essa tentativa denomina-se processo cicatricial e se divide didaticamente em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação (COELHO, 1998; SCHÄFFER e BARBUL, 1998). Tais fases não constituem processos isolados, e com freqüência sobrepõem-se umas as outras (MARQUES, 2002; FALCÃO, 1999; COELHO, 1998).

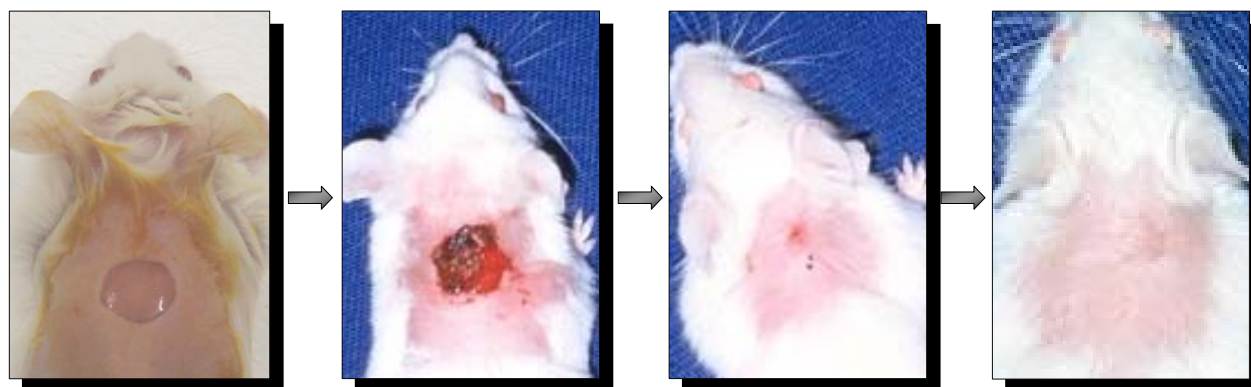


Figura 02: Representação de feridas tratadas por segunda intenção.

Fonte: MELO (2003).

1.2 Processo Cicatricial

A cicatrização das feridas segue uma resposta complexa e organizada após uma lesão tecidual e perda da integridade (SPENCE E WONG, 1997). Essa resposta

compreende uma série de eventos biológicos que começam com a coagulação e findam com a remodelação tecidual local (CALVIN, 1998; HUNT e HOPF, 1997; ROBSON, 1997; ROBINS, 2002; WONG et al., 2002). Cada fase da cicatrização apresenta aspectos e eventos característicos, sem os quais o processo pode não evoluir (ARAÚJO et al., 1998). Embora sejam sucessivas e sobrepostas na clínica, didaticamente as fases do processo cicatricial são subdivididas em três: Fase Inflamatória, Fase Proliferativa e Fase de Maturação.

A fase inflamatória inicia-se logo após a lesão e é caracterizada pela vasoconstrição mediada por fatores neurogênicos e químicos durante um período de segundos a minutos e, em seguida, pela vasodilatação local que, por aumentar a permeabilidade vascular, dá vazão ao fluxo de sangue na área, proteínas séricas, fatores de coagulação e plaquetas. Estas plaquetas ao serem ativadas, iniciam o processo de coagulação e liberam substâncias como: fatores de crescimento, fibrinogênio e fibronectina, que promovem a migração de células para a ferida (ROBINS, 2002; PILCHER et al., 1999).

O aumento do líquido extravascular, caracterizado pela elevação da pressão oncótica na área da lesão, é denominado edema e sua aparência clínica é o “inchaço” ou tumor. Além do tumor, observa-se uma ruborização e aumento da temperatura na lesão, que são caracterizados pelo intenso metabolismo local (CALVIN, 1998). Um outro sintoma observado na fase inflamatória é a dor, ocasionada pela sensibilização das terminações nervosas locais pelas citocinas típicas desse estágio de reparo (GRINNELL, 2003).

Os neutrófilos aderem ao local da lesão poucas horas após a injúria, através de quimiotaxia por mediadores liberados por plaquetas, células pertencentes ao sistema imune, microrganismos ou pela ativação do complemento (PARK e BARBUL, 2004; SZPADERSKA e DIPIETRO, 2005). Depois de 1 ou 2 dias, monócitos teciduais entram no local da lesão e se diferenciam em macrófagos. No sítio do foco inflamatório, neutrófilos e macrófagos se acumulam e tornam-se ativos. Essas células Polimorfonucleares (PMNs)

atuam fagocitando os restos celulares, a fibrina remanescente, a MEC (Matriz Extracelular) danificada e possíveis microrganismos patógenos oportunistas que infectam a área da lesão. Na verdade essas células imunes exercem um papel fundamental na transição entre o processo inflamatório e a fase de fibroplasia, uma vez que possuem fatores de crescimento que atraem fibroblastos para a ferida e estimulam a sua proliferação e posterior síntese de colágeno (WERNER e GROSE, 2003).

Outros mediadores bioquímicos, representados na Tabela 1, são identificados nessa fase, como a leucotaxina, bradicinina, prostaglandinas, e as interleucinas IL-1 e IL-2 (STEED, 1997; DANTAS, 2000).

A duração do estágio inflamatório depende de vários fatores, como a intensidade da contaminação, a extensão do tecido lesado e a presença de infecção. O prolongamento dessa fase influencia a fase de fibroplasia, e assim, quanto mais prolongado o estágio inflamatório, mais tardiamente começa a deposição dos fibroblastos na região (ARAÚJO et al., 1998).

Tabela 1. Mediadores bioquímicos e fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial (sigla), fonte de origem e forma de atividade biológica

FATOR DE CRESCIMENTO	FONTE	EFEITO
Histamina	Principalmente mastócitos, granulócitos e plaquetas	Aumentar a permeabilidade capilar.
Serotonina	Plaquetas	Aumentar a permeabilidade capilar, ação efêmera e mais potente que a histamina.
Leucotaxinas	Degradação enzimática da albumina	Ação duradoura sobre a permeabilidade capilar substituindo a histamina e serotonina. Talvez quimiotóxica para leucócitos.
Bradicinina	Ação da calicreína sobre a α -2-globulina	Ação sobre a permeabilidade capilar, mediador dos quatro sinais cardeais da inflamação.
Proteases	Plaquetas	Ativam a via alterna do complemento

Prostaglandinas e tromboxanas A2 (PGD-2, PGH-2, PGF-2, PGI-2)	Cascata de ativação iniciada pela agregação plaquetária	São os mediadores bioquímicos mais importantes da cicatrização, pois atuam em todas as fases de maneira efetiva.
Adenosina difosfato (ADP)	Plaquetas	Aumenta a agregação plaquetária.
Fator de Crescimento Epidérmico (EGF)	Células epidérmicas e plaquetas	Tem ação mitogênica para células epidérmicas e fibroblastos, aumenta a síntese de fibronectina, glicosaminoglicanos e colágeno pelos fibroblastos.
Fator de Crescimento Transformante α (TGF- α)	Plaquetas	Tem sequência homóloga ao EGF. Acelera a reepitelização e formação de tecido conectivo.
Fator de Crescimento Transformante $\beta 1$ e $\beta 2$ (TGF- $\beta 1$ e $\beta 2$)	Plaquetas, linfócitos e macrófagos	Quimiotaxia de fibroblastos e macrófagos; síntese da matriz extracelular (colágeno e proteoglicanos); secreção de inibidores de protease.
Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF)	Fibroblastos presentes na derme	Proliferação de queratinócitos.
Interleucina 1α e β	Neutrófilos	Ativa a expressão do fator de crescimento em macrófagos, queratinócitos e fibroblastos.
Fator de Necrose Tumoral-α (TNF- α)	Macrófago ativado e Neutrófilos	Aumenta a resposta inflamatória, é quimiotático para células endoteliais, estimula replicação de fibroblastos e estimula a angiogênese. Ativa a expressão do fator de crescimento em macrófagos.
Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) Isoformas AA, AB e BB	Plaquetas, monócitos e células endoteliais	Estimula a divisão celular; é quimiotático para fibroblastos e células musculares lisas; age sinergicamente com outros fatores de crescimento; estimula a formação do tecido de granulação e aumenta a produção de colágeno.
Fator de Cicatrização Derivado das Plaquetas (PDWHF)	Plaquetas	Acelera a formação do tecido de granulação e a epitelização.
Interleucina 1(IL-1)	Macrófagos	Mitogênica para fibroblastos, estimulação da produção de prostaglandinas e de proteínas no tecido de granulação, induz as células T-helper a secretarem IL-2.
Interleucina 2 (IL-2)	Linfócitos-T	Inicia a proliferação dos linfócitos-T e induz a síntese de outras linfocinas, aumenta a quantidade de colágeno na cicatriz aumentando a força tênsil.

Fator de Crescimento Derivado dos Macrófagos (MDGF)	Macrófagos	Induz a angiogênese, quimiotaxia e proliferação de fibroblastos, estimula a síntese de matriz extracelular e de tecido de granulação.
Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF)	Fibroblastos, Macrófagos e células endoteliais	mitogênico para células endoteliais induzindo a angiogênese e proliferação de fibroblastos.
Chalonas	Células epidérmicas	Inibem a proliferação das células epidérmicas.

(CORSI et al., 1994; AUKHIL, 2000).

A fase proliferativa ou de fibroplasia é caracterizada pela formação do tecido de granulação (Figura 03), reepitelização e contração da ferida. A neovascularização local ocorre a partir de anastomoses dos capilares hipodérmicos em resposta ao β -FGF e TGF- β , que provocam a entrada de células inflamatórias pró-angiogênicas no local da lesão, secretados por monócitos e possivelmente por queratinócitos (THOMAS et al., 1995; TAKEHARA, 2000; IBA et al., 2004). 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 mitogênicas demonstradas através de sistemas experimentais *in vitro* e ensaios *in vivo* (FAZIK, 2000; LABRO, 2000).

Com isso surge um tecido composto por macrófagos, fibroblastos e vasos sangüíneos embebidos em uma matriz de fibronectina, colágeno e ácido hialurônico, o tecido de granulação (WERNER et al., 2003). Esse tecido formado tem um aspecto úmido, é contrátil (pela presença dos fibroblastos), preenche o espaço deixado pela ferida e serve também como barreira a microorganismos (GUIDUGLI-NETO, 1987; MODOLIN, 1992). Quando presentes, as bactérias residem na superfície deste tecido, e raramente causam infecção local ou sistêmica (COELHO, 1998). Os macrófagos sintetizam fatores de crescimento e fatores quimiotáticos que atraem fibroblastos para a ferida e estimulam

sua proliferação e a posterior síntese de colágeno. Os fibroblastos respondem ao estímulo produzindo uma matriz extracelular na qual os macrófagos, vasos sanguíneos e fibroblastos podem migrar e serem supridos de nutrientes e oxigênio (CALVIN, 1998; COTRAN et. al., 2000).

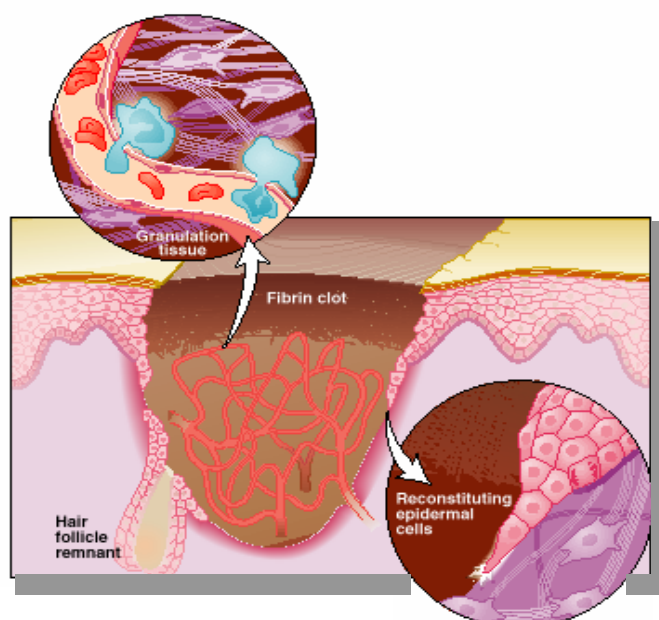


Figura 03: Representação da fase de fibroplasia. Em evidência observa-se o tecido de granulação.

Fonte: COTRAN et. al. (2000).

Os fibroblastos passam por algumas alterações fenotípicas e seus citoplastamas tornam-se mais volumosos por causa da intensa síntese protéica de seus retículos endoplasmáticos rugosos (ROBINS, 2002). Estas células produzem e depositam grande quantidade de matriz protéica, predominantemente composta de colágeno do tipo I e III, que aumenta a força tênsil da lesão e, através da contração dos miofibroblastos irá reduzir o tamanho da lesão até que suas bordas estejam novamente unidas (CARVALHO, 2002). 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 et al. 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).

A reepitelização é iniciada pela migração de células epiteliais basais (queratinócitos), de forma centrípeta, a partir as margens da lesão (COTRAN et. al., 2000). Concomitantemente à migração, as células sofrem alterações fenotípicas específicas, como retração dos tonofilamentos intracelulares, dissolução dos desmossomos intercelulares e formação de actina citoplasmática na periferia (CARVALHO, 2002; EHRLICH et al. 2003).

O processo de reepitelização é estimulado pelo EGF, TGF α e pelo fator de crescimento de queratinócitos que ocorre logo após a ruptura da epiderme, pelo movimento dos queratinócitos da margem da lesão sobre a matriz provisória do tecido de granulação (ROBINS, 2002; WERNER e GROSE, 2003).

Quando a ferida está preenchida pelo tecido de granulação, a angiogênese cessa e muitos dos vasos degeneram-se por apoptose (IBA et al., 2004). Posteriormente a rede linfática começa a se regenerar e o tecido de granulação adquire mais fibras colágenas.

A composição da matriz extracelular é gradualmente substituída por matriz colagenosa. E, uma vez que a matriz colagenosa abundante tenha sido depositada na ferida, os fibroblastos param de produzir colágeno e o tecido de granulação rico em fibroblastos é substituído por uma cicatriz relativamente acelular. Ao final da epitelização da ferida, pela união de suas margens, a fibroplasia e a angiogênese são inibidas pelas células epiteliais (WERNER e GROSE, 2003; SINGER, 1999).

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

No retículo endoplasmático rugoso (RER), durante o processo de biossíntese da microfibrila de colágeno, uma cadeia de procolágeno é sintetizada e hidroxilada com resíduos prolina e lisina, sendo ligadas a galactoses. Posteriormente, três cadeias de procolágeno são unidas através de pontes dissulfeto, formando a estrutura padrão tripla de procolágeno (CAMPBELL, 2003). Os procolágenos são transferidos através do Complexo de Golgi onde glicoses são adicionadas, em seguida, a molécula é transportada por exocitose através de vesículas. Os procolágenos são excretados para o exterior da célula, os pró-peptídios são removidos no espaço extracelular e os tropocolágenos são formados. Finalmente, são formadas cadeias regulares de tropocolágeno, levando a formação da microfibrila de colágeno (Figura 04) (INA et al., 2005).

A princípio, o colágeno é depositado em fibronectina de maneira aleatória; dependendo da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido, essas fibras de colágeno são subsequenteiramente digeridas pela enzima collagenase e formadas novamente, em arranjos similares aos ocorrentes 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). As collagenases degradam, especificamente, colágeno tipos I, II e III presente no tecido conjuntivo, estas enzimas desfazem a estrutura helicoidal das fibras de colágeno, resultando na desnaturação protéica, deixando-a em forma de gelatina que é susceptível a clivagem enzimática por outras metaloproteases de matriz (MMPs) e proteases (WONG et al., 2002).

O tipo de colágeno secretado inicialmente, na fase proliferativa, é do tipo III que posteriormente, por degradação, é substituído por colágeno do tipo I (PHILLIPS e

BONASSAR, 2005). O resultado normal da fase de remodelação da cicatrização é uma cicatriz com aproximadamente 80% da força de tensão da pele íntegra (FAZIK et al., 2000).

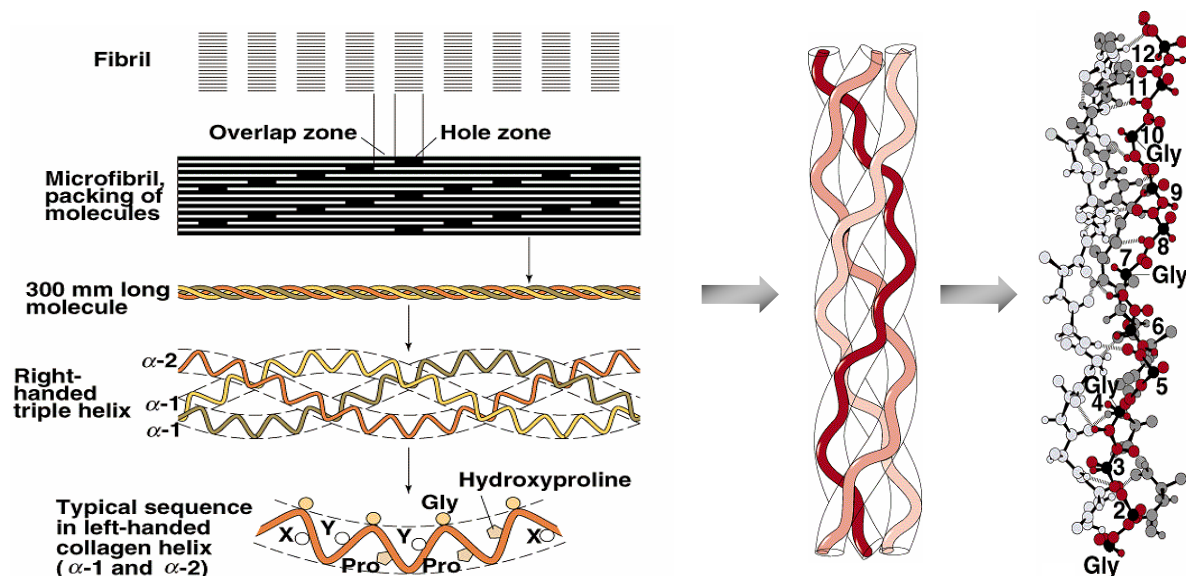


Figura 04: Representação do processo de formação e remodelagem da fibrila de colágeno.

Fonte: SINGER, (1999).

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, presumindo que possam estar ligados a fatores de crescimento. Os anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz é pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficitária (DIPIETRO e BURNS, 2003).

1.3 Terapêutica alternativa para Lesões

As perdas teciduais são freqüentes e têm como agravantes as diferentes etiologias e extensões. Dessa forma, é de suma importância ter alternativas de escolha para o tratamento adequando, sempre que possível, ao tipo de lesão.

Os tratamentos preconizados para lesões cutâneas apresentam no decorrer do processo cicatricial limitações quanto ao desenvolvimento do processo de reparo e têm como fatores limitantes a posologia, a praticidade de uso e o custo.

O tratamento das feridas, objetivando melhores resultados cicatriciais, modificou-se ao longo dos séculos (MODOLIN, 1992), onde várias substâncias têm sido utilizadas na tentativa de acelerar o processo cicatricial (BIONDO-SIMÕES, 1993), como o emprego de diferentes materiais sintéticos, biológicos ou biossintéticos, no intuito de suprir as deficiências do tratamento convencional (COELHO, 1998; PEREIRA et al., 1993).

O tratamento de lesões usualmente é conduzido de dois modos: através de métodos cirúrgicos entre os quais exérese de tecido de granulação ou enxertos de pele e através de meios clínicos como o uso de pomadas, anti-sépticos, bandagens compressivas, emprego de membranas amnióticas (BIGBIE et al., 1990; HOWARD et al., 2000) e substâncias tópicas que dinamizem o processo de cicatricial (MADISON et al., 1991; BAXTER, 1991 apud COLAHAN et al., 1992).

O estudo do processo cicatricial tem permitido conhecer muitos fatores que influenciam o reparo como a infecção, presença de tecidos desvitalizados, anemia, deficiências de vitaminas (A, B, C, D e E), de minerais (Zn, Fe e Cu), nutricionais, utilização de corticóides, antiinflamatórios e anti-sépticos (BARBOSA e SOUZA, 1986; FIORAVANTI, 1988; EHRLICHMAN et al., 1991; MADDEW e AREM, 1991; CORSI et al., 1995; EAGLSTAN e FALANGA, 1997).

Em vista disso, vêm-se buscando alternativas terapêuticas eficazes, de fácil aplicação e custo, levando assim a um interesse por medicações fitoterápicas e homeopáticas.

A utilização de plantas no tratamento tópico de lesões cutâneas é descrita por Andrade et al. (1999) que utilizou o alecrim pimenta (*Lippia sidoides* cham.) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em camundongos. Experimentos foram realizados para estudar uso de polissacarídeos extraídos da película da cana-de-açúcar (GALEGO et. al., 1997; MONTEIRO et al, 2000), do cajueiro (*Anacardium occidentale*) (GALEGO et. al. 1997; ROCHA, 2000, SCHIRATO et al., 2002; PAIVA, 2003), de cogumelos *Pleurotusostreartus* (BONONI et al, 1995), da *Areca catichu* (PADJAMA et al, 1994), e o *Wedelia calendulacea* (HEDGE et al, 1994) no tratamento de feridas cutâneas.

Óleos do caule e das flores de *Buddleja asiatica* e *Buddleja officinalis* que pertencem à Família Loganiaceae foram testadas no tratamento da artrite (LIAO et al., 1999), baixas doses da *Buddleja globosa* estimularam os fatores de crescimento típicos do processo inflamatório (Fibroblastos, KGF-1, PDGF e TGF-B) (MENSAH et al., 2001; SAMPSON et al., 2000) e o extrato das leguminosas *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. e *Stryphnodendron obovatum* Benth. demonstraram bastante eficácia no reparo de lesões e como agentes antimicrobianos (LOPES et al., 2005).

A *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) que pertencente à Família Liliaceae demonstrou atividade antiinflamatória, antifúngica e cicatricial (CHOI e CHUNG, 2003) e *Plantago major* L. pertencente à Família Plantaginaceae tem demonstrado em vários estudos atividade antiinflamatória, analgésica, antioxidante e cicatricial (YESILADA et al., 1995; RUIZ et al., 1996; GUILLÉN et al., 1997).

1.4 Sistema Imune

A pele é a primeira defesa do corpo humano contra a infecção armando uma barreira resistente e impenetrável de epitélio protegido por camadas de células queratinizadas (PARHAM, 2001). Os epitélios que revestem os tratos respiratório, gastrintestinal e urogenital, constituem as mucosas banhadas em um muco que elaboram. Este muco, formado por glicoproteínas, proteoglicanos e enzimas, protege as células epiteliais de lesões e ajuda a limitar a infecção através da autolimpeza, ou seja, indução de tosse ou espirro. (ROITT, 1998; PARHAM, 2001).

Quando esta barreira física é rompida e os patógenos (Figura 06) penetram nos tecidos moles do corpo, entra em ação a imunidade inata, que utiliza mecanismos de reconhecimento molecular geral para detectar a presença de bactérias e de vírus e não leva à imunidade prolongada contra aquele patógeno em particular. A resposta imune adaptativa, que é mais tardia, em contraste, focaliza especificamente o invasor em questão gerando memória imunológica para o mesmo, através da seleção clonal de células imunes para esse patógeno.

Tipo de patógenos	Exemplos	Doenças
Bactérias extracelulares, parasitas, fungos	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Clostridium tetani</i> <i>Trypanosoma brucei</i> <i>Pneumocystis carinii</i>	Pneumonia Tétano Doença do sono Pneumonia por PC
Bactérias intracelulares, parasitas	<i>Mycobacterium leprae</i> <i>Leishmania donovani</i> <i>Plasmodium falciparum</i>	Lepra Malária Leishmaniose
Vírus (intracelulares)	Varíola Influenza Varicela	Varíola Gripe Varicela
Vermes parasitas (extracelulares)	<i>Ascaris</i> <i>Schistosoma</i>	Ascaridíase Esquistossomose

Figura 05: Exemplo de microrganismos patógenos e patologias que ocasionam.

Fonte: Janeway (2005).

As células responsáveis por ambas as respostas imunes, inata e adaptativa, são principalmente os leucócitos e as células teciduais relacionadas a eles (BENJAMINE et al.2002; PARHAM, 2001).

A “complementação” da resposta inata à invasão por patógenos oportunistas é caracterizada por uma cascata protéica denominada sistema do complemento. Esse sistema é formado por proteínas plasmáticas que reagem entre si para opsonizar os patógenos e induzir uma série de respostas inflamatórias que ajudam a combater a infecção (Figura 05) (JANEWAY et al., 2002).

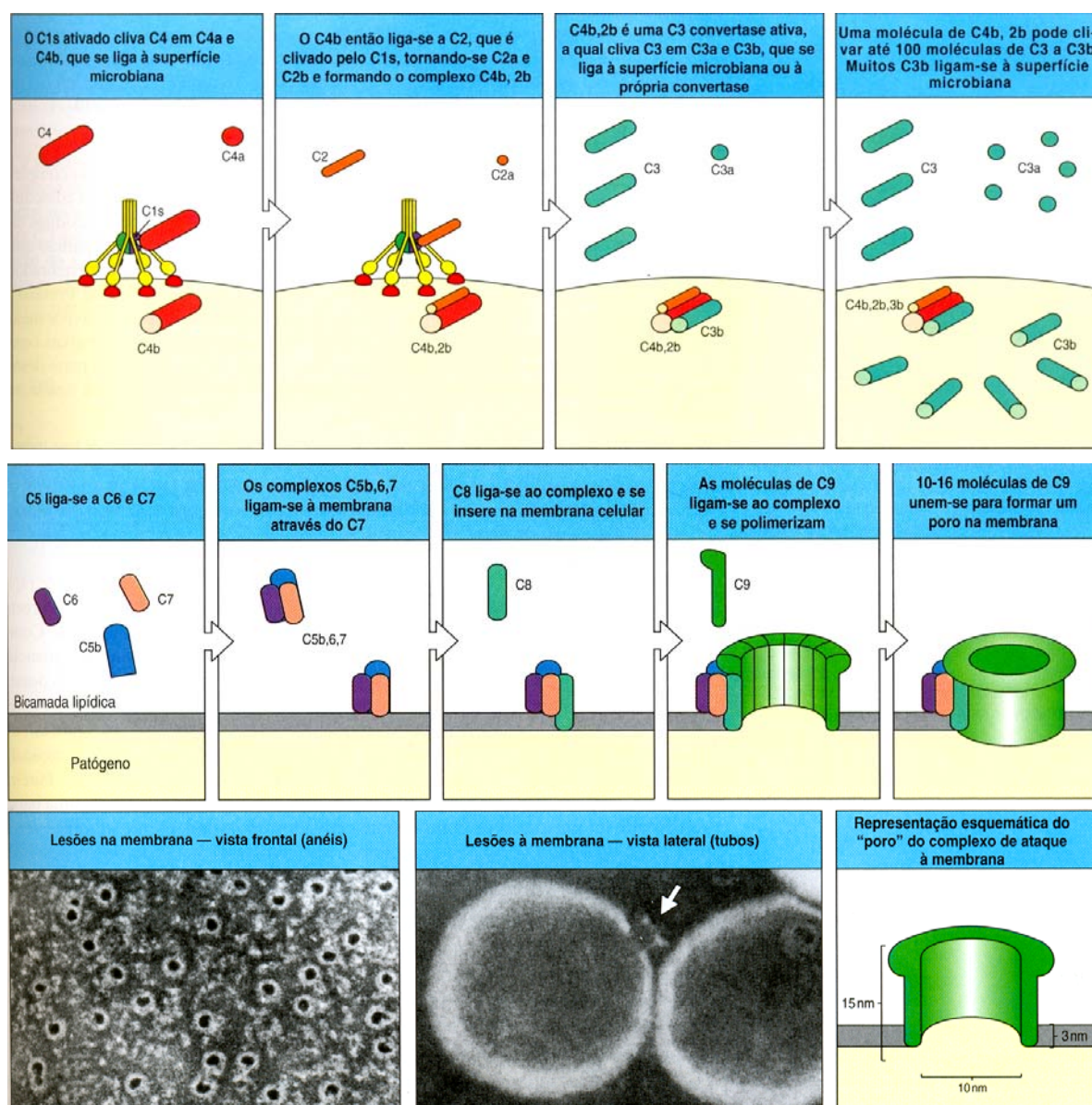


Figura 06: Sistema do complemento, sua ativação e ação.

Fonte: Janeway (2005).

Existem três vias pelas quais o complemento pode ser ativado na superfície dos patógenos. Essas vias dependem de diferentes moléculas para o início, porém convergem para gerar o mesmo grupo de moléculas efetoras.

As maneiras pelas quais o complemento atua são: 1. opsonizando os patógenos (ligações covalentes) sinalizando-os para os fagócitos; 2. através da ação quimiotática de pequenos fragmentos peptídicos que atraem mais fagócitos para o sítio inflamatório (Figura 06) e 3. criando poros na membrana dos patógenos (PARHAM, 2001; ABBAS et al., 2002).

Uma vez que a resposta imune inata não consegue resolver a invasão microbiana oportunista, ou ainda que esta se prolongue por vários dias, o organismo lesado passa a desenvolver uma resposta mais elaborada e complexa que a anterior. Essa resposta é denominada adaptativa e gera memória imunológica para o patógeno invasor. Há, com isso, a seleção clonal de anticorpos específicos para o microrganismo em questão (JANEWAY et al., 2002).

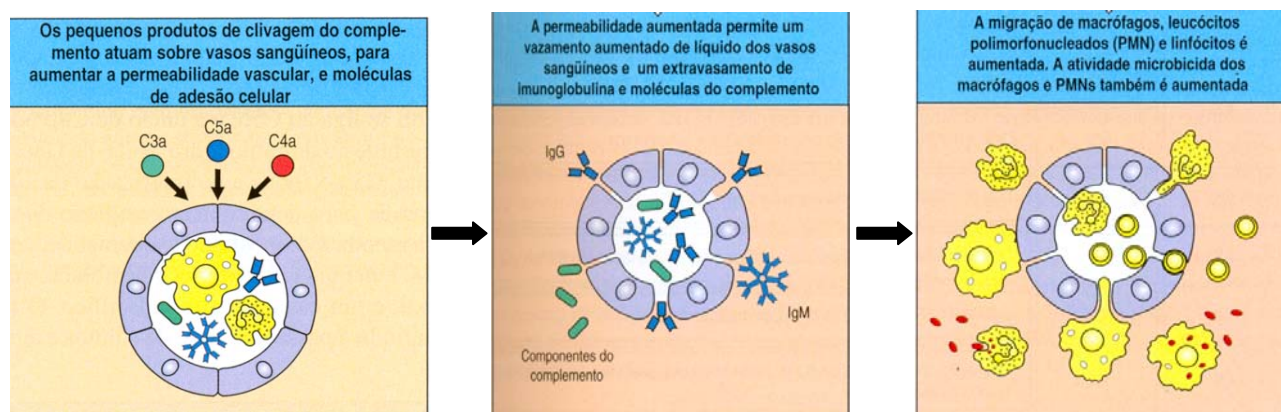


Figura 07: Ação quimiotática dos fatores do complemento.

Fonte: Janeway (2005).

1.5 Imunossupressão

Segundo Janeway (2002) muitos organismos patógenos causam imunossupressão leve ou transitória durante a infecção aguda. Essas formas de imunidade suprimida são pouco compreendidas, mas importantes, pois frequentemente tornam o hospedeiro suscetível a infecções secundárias por microrganismos comuns do ambiente. Um exemplo de supressão imune é o que se segue aos traumatismos, queimaduras e mesmo grandes intervenções cirúrgicas.

Abstraindo-se as doenças auto-imunes e aquelas ocasionadas por patógenos diversos que imunossuprimem o indivíduo portador como sarampo, lepra e HIV, uma das formas mais evidentes de se observar a imunodepressão de um organismo é após um procedimento de enxertia ou de transplante. A rejeição é causada por respostas imunes a aloantígenos presentes no enxerto, que são proteínas que variam entre indivíduos e são, portanto, percebidas como estranhas pelos receptor. Essas respostas podem ser mediadas por células T CD8 citotóxicas, por células T_H1 ou por ambas (ABBAS et al., 2002).

Em controversa, os enxertos de tecido colocados em certos locais do corpo não provocam respostas imunes, ou seja, não induzem rejeição. Esses locais são denominados sítios imunologicamente privilegiados e compreendem o cérebro, os olhos, os testículos, o útero e a bolsa da bochecha do hamster. O que se observa é que os antígenos saem desses sítios e interagem com as células T, mas em vez de provocar uma resposta imune destrutiva, eles induzem tolerância ou uma resposta que não é lesiva ao tecido (JANEWAY et al., 2002).

Azatioprina, ciclosporina, metotrexato, prednisolona, tacrolimo são conhecidos como drogas de ação imunodepressiva. Seus mecanismos de ação principais são a redução da função, da proliferação e da resposta das células T e os efeitos adversos mais

comuns observados são nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hipertensão, anorexia e distúrbios gastrointestinais (BEREL et al., 1996; MORIS, 1995; BONDENSON, 1997).

Muitos estudos utilizam a imunossupressão experimental e/ou da casualística clínica para responder questões como a prevalência de parasitas intestinais e do protozoário *Cryptosporidium* sp. (muito comum em HIV positivos) em pacientes imunocomprometidos (BOTERO et al., 2003; CHIEFFI, 2005), a indução de T_H1 em camundongos imunodeprimidos (YOUNG et al., 2002), efeito da ciclofosfamida no sistema imune de carneiros (GARCIA et al., 2004) e o efeito do metotrexato na migração transendotelial de fagócitos (CIESIELSKI et al., 1998).

1.6 Microrganismos

A pele possui a função de barreira protetora para 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 produzem infecção quando a epiderme encontra-se lesionada. As infecções secundárias cutâneas são freqüentemente 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 (TORTORA, 2005).

Observa-se na prática clínica que feridas infectadas cicatrizam mais lentamente e se não foram adequadamente tratadas pode 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; BIKOWSKI, 1998). 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 (UTYAMA, 2003; TORTORA, 2005).

Várias espécies microbianas são comumente encontradas em lesões cutâneas: o *Staphylococcus aureus* é o patógeno Gram-positivo mais prevalente e a *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella* 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 por haver um prejuízo na deposição de colágeno no local ou ainda por estas apresentarem quantidade de colágeno muito maior que lesões não-infectadas, resultando na formação de uma cicatriz exuberante. Esta situação é justificada pelo fato de que a maturação da pele lesada é severamente comprometida com a instalação de um processo infeccioso, as relações complexas existentes entre bactérias, neutrófilos e metaloproteinases de matriz (MMPs) comprometem o processo (OKATAMOTO et al., 1997; POTEPA, BANBULA, TRAVIS, 2000).

1.7 Lectinas

Um potencial biomaterial são as lectinas, cujo estudo teve início em 1888 por Stillmark, avaliando a toxicidade de *Ricinus communis* (mamona) e observando pela primeira vez que extratos de plantas apresentavam a capacidade de aglutinar eritrócitos (SHARON & LIS, 1987). Em 1889, Hellin obteve um resultado de hemaglutinação similar, utilizando o extrato de *Abrus precatorius* (jequiriti), chamando a proteína de abrina (SHARON & LIS, 1987). Na década de 60, relataram-se as descobertas acerca da mitogenicidade da lectina de *Phaseolus vulgaris* - PHA (NOWELL, 1960) e da intensa aglutinação de células transformadas pela lectina de germe de trigo, *Triticum vulgaris* - WGA (AUB et al., 1963). Estas observações aumentaram o interesse pela atividade

biológica das lectinas e, principalmente pelo estudo da Concavalina A, *Canavalia ensiformes* por Inbar & Sanchs em 1969, verificando-se também a aglutinação preferencial de células malignas. Ocorreu, assim, um impulso nas pesquisas básicas e aplicadas sobre as lectinas, o que se mantém até os dias atuais.

Primeiramente Sharon e Lis (1972) incluíram no conceito de lectina todas as proteínas obtidas de plantas, microorganismos ou animais de origem não imunológica, que se ligam a carboidratos, sendo específicas ou não para um determinado grupo sanguíneo. Já em 1980, Golstein e colaboradores conceituaram lectinas como sendo proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, ligantes de carboidratos, capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. O fato de existirem lectinas que são monovalentes, dotadas da capacidade de aglutinar células cria a necessidade de ampliar este conceito. Ultimamente o conceito de lectinas tem-se tornado cada vez menos restritivo, com definições como a de Peumans & Van Damme (1995) de que lectinas são proteínas que possuem ao menos um domínio não catalítico que se liga reversível e especificamente a um monossacarídeo ou oligossacarídeo. Segundo Grangeiro (1997), lectinas são proteínas ou glicoproteínas amplamente distribuídas na natureza, e que se combinam, especificamente, com receptores da superfície celular, ligando-se às células e chegando, eventualmente, a provocar a aglutinação das mesmas. As proteínas classificadas como lectinas possuem como propriedade comum a habilidade de reconhecer e se ligar reversivelmente e com alta especificidade a resíduos de carboidratos, sem, contudo, alterar a estrutura química dos ligantes (CAVADA, 1980).

Um grande número de lectinas com características e especificidades distintas tem ampliado a sua utilização em processos médicos e biológicos. As lectinas podem ser utilizadas na identificação dos grupos sanguíneos, caracterização de diferentes estágios de desenvolvimento de parasitas (KENNEDY et al., 1995), estimulação mitogênica de células imunes, detecção e isolamento de carboidratos em solução, ou em superfície

celular (BEUTH et al., 1995) e na produção de interferon gama em leucócitos humanos (SHIBUYA et al., 1986). A utilização de lectinas em histoquímica para diagnóstico de tecidos malignos tem sido de grande valia em diagnósticos histopatológicos, como marcadores de tecidos tumorais (BELTRÃO et al., 1998).

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 & 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).

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).

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). 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).

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)

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 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, 2001).

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 & LIS, 1990).

1.8 Cramoll 1,4

Cratylia mollis Mart., popularmente conhecida como feijão camaratu ou camaratuba, é uma planta forrageira da região semi-árida do estado de Pernambuco. É perene, de grande resistência à seca e serve de alimentação para o gado tanto no período chuvoso quanto no da estiagem (SILVA et al. 1986). Esta planta pertence à família Fabaceae, tribo Phaseoleae, subtribo Dioclineae, que contém os gêneros *Canavalia* e *Dioclea*, botanicamente relacionados com a *C. mollis*.

Vegeta desde as Guianas até Minas Gerais, encontra-se em cultivo sistemático em canteiros do Banco Ativo de Germoplasma de forrageiras do Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico do Semi-Árido (BAG/CPATSA) como banco de proteínas e as sementes de *C. mollis* são atualmente obtidas por coleta em Ibimirim, município de Pernambuco. A classificação botânica da forrageira foi realizada pelo Dr. Marcelo Ataíde e encontra-se catalogada sob o número 51.130, na coleção do Departamento de Botânica Sistemática da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), Recife – PE.

Seu teor de proteína bruta é em torno de 20% da matéria seca e sua escala de macronutrientes e micronutrientes é definida como $N > Ca > K > Mg > P$ e $Fe > Mn > Zn > Cu > Na$, respectivamente (SILVA, 1992).

A partir das sementes da *C. mollis* foram purificadas proteínas pertencentes à classe das lectinas que se ligam à glicose/manose. Tem-se encontrado similaridades com a Concanavalina A (Con A), uma lectina extraída de sementes de *Canavalia ensiformis*, sendo uma das mais estudadas, constituindo um padrão de comparação por excelência para lectinas glicose/manose (HONG et al. 2001).

Das sementes de *C. mollis* (Figura 07), foram obtidas quatro forma múltiplas de lectinas (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4) e uma preparação contendo as formas 1 e 4 associadas denominada Cramoll Sephadex ou Cramoll 1,4 (Paiva & Coelho, 1992; Correia & Coelho, 1995).

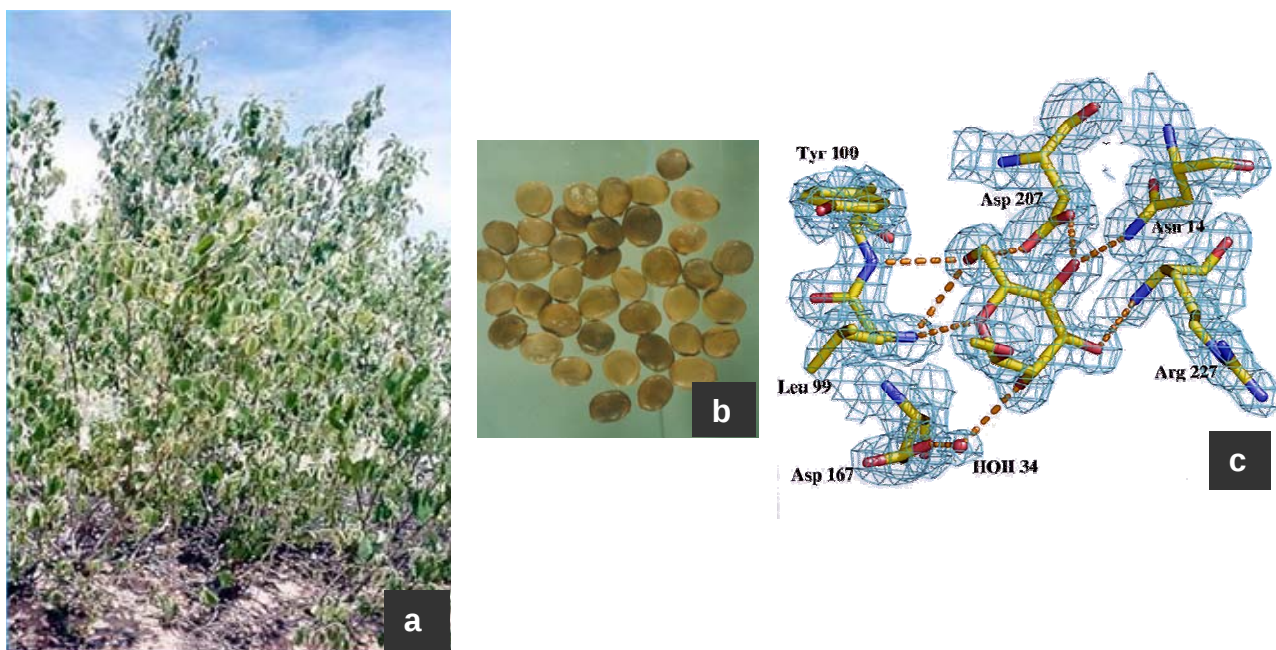


Figura 08: Caracterização da *Cratylia mollis*. **a** – formação arbustiva do feijão camaratu; **b** – sementes de *C. mollis* e **c** – estrutura terciária da Cramoll 1.

Fonte: Correia e Coelho (1995).

A Cramoll 1,4 apresenta certa estabilidade até 80° C, ponto isoelétrico em torno de 8,6 e caráter básico . Possui ainda uma banda principal de 31 kDa e dois fragmentos da banda principal de 16 e 14 kDa.

Formas moleculares múltiplas de *Cratylia mollis* têm sido estudadas para avaliar as suas diversas funções na natureza, para análises estruturais e para as mais diversas aplicações biotecnológicas. A Cramoll mostra forte ligação a tecidos neoplásicos malignos humanos, particularmente aqueles derivados de glândulas mamárias, útero e cérebro e inibiu o crescimento acelerado do carcinoma de células epidermóides (Hep-2) (BELTRÃO et al. 1998).

Experimentos envolvendo atividade antiinflamatória (CECHINEL et al., 2001), utilização da Cramoll livre e encapsulada em lipossomas para atividade antitumoral (ANDRADE et al., 2004) e atividade mitogênica de linfócitos (MACIEL et al. 2004), mostraram um alto desempenho da lectina de *C. mollis*.

A Cramoll já foi cristalizada (TAVARES et al. 1996) e suas propriedades físico-químicas e potencial eletroquímico já foram descritos (BASZKIN et al. 2000; SOUZA et al. 2002).

1.9 Estudo de lectinas no reparo de lesões

A aplicabilidade das lectinas no reparo de lesões tem estimulado muitos estudos nessa área como os que avaliaram efeito cicatrizante das lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Dioclea violácea* (Dviol), *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) e *Parkea pendula* (Ppel) em feridas cutâneas experimentais em camundongos (SCHIRATO et al., 2005; MELO et al., 2003; PORTO et al., 2005).

2. JUSTIFICATIVA

Vários estudos têm sido desenvolvidos utilizando-se princípios ativos obtidos de plantas no reparo de lesões (LOPES et al., 2005b; CHOI & CHUNG, 2003). Os resultados eficazes obtidos com Cramoll 1,4 no estudo de reparo de lesões cutâneas (MELO, 2003) e na estimulação mitogênica de linfócitos (MACIEL et al., 2004) justificam a sua utilização em um novo modelo experimental que testará seu efeito na cicatrização de feridas cutâneas em animais saudáveis e imunodeprimidos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tratamento tópico e intraperitoneal utilizando a Cramoll 1,4 frente a lesões cutâneas experimentais em camundongos normais e imunodeprimidos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Induzir e acompanhar a imunodepressão nos animais experimentais.

3.2.2 Realizar o tratamento das lesões cutâneas experimentais utilizando Cramoll 1,4 e respectivos controles.

3.2.3 Acompanhar a evolução do processo de reparo do ponto de vista clínico e histopatológico durante 12 dias.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

ALENCAR, V.B.M., ALENCAR, M.N.N., ASSREUY, A.M.S. et al. 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.

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.

ANDRADE, C.A.S., CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B. B. et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmacology**, v. 278, p.435-445, 2004.

ANDRADE, J. L., ARRUDA, S., BARBOSA, T. et al. Lectin induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, v. 194, n. 1, p.98-102, 1999.

ARAÚJO, C.F.R.; SOUZA FILHO, Z.A. de; GRECA, F.H. et al. Efeitos do Agarol® e do Trigliceril® sobre a cicatrização de pele, estudo experimental em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.13, n. 4, p.232 – 237, 1998.

AUB, J.C., TIESLAU, C. E., LANKESTER, A. Reactions of normal end tumor cell surfaces to enzymes, I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. **Proc. Natural Academy Science**, v.50, p. 613-619, 1963.

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

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

BARBOSA, H., SOUZA, J.A.G. A ferida operatória. In: BARBOSA, H. **Controle Clínico do Paciente Cirúrgico**. 5 ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, p.99-112, 1986.

BARRAL-NETTO, M., SANTOS, S. B., BARRAL, A., et al. 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., et al. *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.

BASZKIN, A., BOISSONNADE, M. M., SANTOS-MAGALHÃES, N.S., et al. *Cratylia mollis* lectin at the air-aqueous solution interface: adsorption and lectin-lipid interactions. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v.17, p.191-201, 2000.

BAXTER, G.M. in COLAHAN, P.T. et al. **Equine Medicine and Surgery**. 4. ed. Goleta: American Veterinary Publications. p.1584-1590, 1992.

- BELTRÃO, E.I.C., CORREIA, M.T.S., FIGUEREDO-SILVA, J., et al. Binding avaluation of isoform 1 from Cratylia mollis lectin to human mammary tissues. **Appl. Biochem. Biotech.** v.74, p.125-134, 1998.
- BENJAMINE, E., COICO, R., SUNCHINE, G. **Imunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 288p. 2002.
- BEREL, J. F. et al. In vivo pharmacological effects of ciclosporin and some analogues. **Gene. Pharmacol.** v.29, p.42, 1996.
- BERGSTON, N., ALLMAN, R. M., ALVAREZ, O. M. et al. Pressure ulcer treatment: quick reference guide for clinicians. **Advances in Wound Care**, v. 8, n. 2, p. 22-44, 1995.
- BEUTH, J. et al. Importance of lectins for the prevention of bacterial infections and cancer matastases. **Glycoconj. J.**, v.12, p.1-6, 1995.
- BIGBIE, R. et al. The effects of amnion and live yeast cell derivative on the second intention healing of wounds of the distallimbs in horses. **Scientific Meeting Abstracts-AVCS**, p.58, 1990.
- BIKOWSKI, J. Antimicrobial wound management in the emergency department: an educational supplement. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n.1, p.197-206, 1998.
- BIONDO-SIMÕES, M. L. P. et al. Açúcar e ácido acexâmico na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 8, n. 2, p.83-86, 1993.
- BONDENSON, J. The mechanisms of action of diseases-modifying antirheumatic drugs: a review with emphasis on macrophage signal transduction and the induction of proinflammatory cytokines. **Gene. Pharmacol.** v.29, p.127-150, 1997.
- BONONI, V. L., CAPELARI, M., MAZIERO, R. et al. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. São Paulo: Ícone, 206p, 1995.
- BOTERO, J. H., CASTAÑO, A., MONTTOYA, M. N., et al. A preliminary study of the prevalence of intestinal parasites in immunocompromised patients with and without gastrointestinal manifestations. **Revista Institucional de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 45, p.197-200, 2003.
- BOURNE, Y., ZAMBONI, V., BARRE, A., et al. *Helianthus tuberosus* lectin reveals a wild-spread scaffold for mannosebinding lectins. **Structure with Folding & Design**, v. 7, p. 1473-1482, 1999.
- CALVIN, M. Cutaneous wound repair. **Heal. Manag. Public.**, v. 10, n. 1, p.12-32, 1998.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**, 3.ed., São Paulo: Artmed, 2003.
- CARVALHO, P. T. C. Análise da cicatrização de lesões cutâneas através de espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos. 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. Lectinas de *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolamento, caracterização parcial e comportamento durante a germinação. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. p.87, 1980.

CAVADA, B.S., BARBOSA, T., ARRUDA, S., et al. 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.

CECHINEL, Y.M.N., CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B., et al. Evaluation of anti-inflammatory activity from *Cratylia mollis* lectin in mice. VI PHARMATEC. Recife-PE 01: 167-168, 2001.

CHIEFFI, P. P., PASCHOALOTTI, M. A., VERGUEIRO, C. S., et al. Infection by *Cryptosporidium* sp. In immunocompromised haematological patients. **Revista Institucional de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 47, p.301-302, 2005.

CHOI, SEONGWON e CHUNG, MYUNG-HEE. a review on the relationship between aloe vera components and their biologic effects *Seminars in Integrative Medicine*, v.1, n.1 pp. 53-62, 2003.

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

CIESIELSKI, C. J., MEI, J., PICCININI, L. A. Effects of Cyclosporine A and methotrexate on CD18 expression in recipients of rat cardiac allografts. **Transplant Immunology**, n.6, p.122-133, 1998.

COELHO, M.C.O.C. Substitutos temporários de pele no processo cicatricial de falhas cutâneas: estudo experimental em cães (*Canis familiaris*), 1998. 102 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1998.

CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B. Purification of glucose/manose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean) **Appl. Biochem. Biotech.** v.55, p.261-273, 1995.

CORSI, R.C.C. et al. Cicatrização das feridas - Revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v.84, n.1, p.17-24, 1995.

COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. Neoplasia. In: COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. (Eds.). **Pathologic basis of disease**. 6. ed. Philadelphia: Sauders, 2000.

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

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

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

DONATI, L., SCAMAZZO, F., GERVASONI, M., et al. Infection and antibiotic therapy in 4000 burned patients treated in Milan, Italy between 1976 and 1988. **Burns**, v.19, p.345-348, 1993.

EAGLSTEIN, W.H., FALANGA, V. Feridas crônicas. In: BARBUL, A. **Clínica Cirúrgica da América do Norte**, Rio de Janeiro: Interlivros, v.3, p.685-696, 1997.

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

EHRlichMAN, R. J., SECKEL, B. R., BRYAN, D. J., et al. Complicações comuns da cicatrização da ferida. **Clínica Cirúrgica da América do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros, v.6, p.1405-1434, 1991.

FALCÃO, S. C. Estudo experimental sobre o uso da pele de rã (*Rana catesbiana*) como curativo biológico oclusivo em feridas cutâneas produzidas em cães, 1999, 87 f. Tese (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1999.

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

FIORAVANTI, M. C. S. Uso de açúcar no tratamento de feridas. **Seminário de clínica. Escola de Veterinária UFMG** – Belo Horizonte, p.1-10, 1988.

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

GARCIA, M., SILVIO, P. S., ALVES, G. J., et al. Uso da ciclofosfamida em modelo de imunodepressão experimental em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n.24, p.115-119, 2004.

GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T. et al. What should be called a lectin? **Nature**, v.285, p.66, 1980.

GOMES, J.C., FERREIRA, R.R., CAVADA, B.S., et al. 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., SCHRIEFER, A., CALVETE, J.J., et al. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia braziliensis* seeds. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v.248, p.43-48, 1997.

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

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue in quantitative study of the vascular volume. **Rev. odontol. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.1, p.6-8, 1987.

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

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

HONG, M., CASSELY, A., MECHREF, Y., et al. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. **J. Chromatogr.** v.752, p.207-216, 2001.

HOWARD, C. A., NICHOLAS, G.P., LOYD, V.A. **Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6.ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

HUNT, T. K., HOPF, H. W. Cicatrização e infecção das feridas. **Clínica Cirúrgica da América do Norte**. v. 3, Rio de Janeiro: Interlivros, p.583-602, 1997.

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

INA, K., KITAMURA, H., TATSUKAWA, S., et al. Intracellular formation of collagen microfibrils in granulation tissue. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 79, n. 1, p. 244-248, 2005.

INBAR, M. & SACHS, L. Iteration oh the carbohygrate-binding protein concavalina A with normal and transformed cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 63, p.: 1418-25, 1969.

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

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. (1995) Lectins, versatili proteins of recognition: a review. **Carbohydr. Polym.** 26: 219-230.

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

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.

LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. Characterization and molecular cloning of two different type 2 robosome-inactivating proteins from the monocotyledonous plant *Polygonatum multiflorum*. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 267, p. 2746-2759, 2000b.

LIAO, Y.-H., Houghton, P.J., Houlst, J.R.S., 1999. Novel and known constituents of *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. *Journal of Natural Products* 62, 1241–1245.

LOMBA, M. **Resgate Saúde - Medicina Pré-Hospitalar**. 1. ed. Olinda. Grupo Universo. 160 p. 2000.

LOPES, F. C.; CAVADA, B. S.; PINTO, V. P. T.; SAMPAIO, A. H.; GOMES, J. C. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, n. 38, p. 935-94, 2005a.

LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; HERNANDES, L.; MELLO, J. C. P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, n. 99, p. 265–272, 2005b.

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

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

MADDEW, J.; AREM, A. A cicatrização das feridas. Aspectos biológicos e clínicos. In: SABISTON, D. **Tratado de Cirurgia**. 14 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap. 10, v. 1, p. 156-168.

MADISON, J.B. et al. **Effects of a proprietary topical medication on wound healing and collagen deposition in horse**. *American Journal of Veterinary Research*, v.52, n.7. p. 1128-1131. USA. 1991.

MARQUES, S.R. **Efeito do uso tópico de óleo vegetal com elevada concentração de ácido linoléico (óleo de girassol) no processo cicatricial de falhas cutâneas: estudo experimental em ovinos (*ovis aries*)**. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2002.

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

MELO, C. M. L.; ALBUQUERQUE, E. R.; MELO-Jr., M. R.; BEZERRA, C.; et al., (2003) Topical use of *Cratylia mollis* lectin in wound healing in mice. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, XXX SBBq **Anais**, p. 112.

MENSAH, A. Y.; SAMPSON, J.; HOUGHTON, P. J.; HYLANDS, P. J.; DUNN, M.; HUGHES, M.A.; CHERRY, G. W. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 219-226, 2001.

- MODOLIN, M. Biologia da cicatrização dos tecidos. In: Melega, J., Zanini, S., Psillakis, J. **Cirurgia Plástica Reparadora e Estética**. 2 ed. São Paulo: MEDSI, p. 9-25, 1992.
- MONTEIRO, V. L. C. Avaliações microbiológicas e histopatológicas de feridas infectadas utilizando-se película de cana-de-açúcar e tratadas por 2ª ou 3ª intenção. In: **Congresso de Iniciação científica X**, 27 a 30 novembro de 2000, p. 169-170.
- MORIS, R.E. Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs. *Ther Drug Monit* v.17, p. 564-569, 1995.
- MORISON, M.; MOFFATT, C.; BRIDEL-NIXON, J.; BALE, S. A colour guide to the MORRIS, R. E. Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs. *Ther Drug Monit* 17: 564-569.
- 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.
- NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Res.**, v. 20, p.:462-6, 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.
- PADJAMA, P. N. , BAIRY, K. L. , KULKARNI, D. R. Pro-healing effect of betel nut and its polyphenols. **Fitoterapia**. v. 65, n. 4, p. 293-300, 1994.
- PAIVA, M.G. **Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em cicatrização experimental**. 2003. 56 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- PAIVA, P. M. G. & COELHO, L. C. B. B. (1992) Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Appl. Biochem. Biotech.** **36**: 113-119.
- PAIVA, P. M. G. & COELHO, L. C. B. B. (1992) Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Appl. Biochem. Biotech.** **36**: 113-119.
- PARHAM, P. **O Sistema Imune**, Porto Alegre: Artmed, 372p. 2001.
- 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.
- PEREIRA, D. S. et al. Aspectos evolutivos da cicatrização em queimaduras cutâneas tratadas com curativos hidrocolóides – estudo experimental em cobaias. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 108-112, jul/ago/set. 1993.

PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. The role of lectins in plant defense. **Histochem. J.**, v. 27, p.: 253-71, 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.

PORTO, C. S.; MELO, C. M. L.; CORIOLANO, M. C.; BEZERRA, C.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. **Avaliação Clínica e Microbiológica do Tratamento com Lectinas de *Parkia pendula* sobre a Cicatrização Cutânea em camundongos.** IV JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO-JEPEX, Recife-PE, 2005.

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**

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

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

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

ROBINS, S.L. et al. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6º ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 4, p. 79-100, 2000.

ROBINS, S.L. et al. **Patologia Estrutural e Funcional**. 7. ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 4, p. 79-100, 2002

ROBSON, M. C. Infecção das feridas. **Clínica Cirúrgica da America do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros, v. 3, p. 633-645, 1997.

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

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B. S.; OLIVEITA, J. T. A.; MOREIRA, R. A.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to

intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding lectins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, p. 823-826, 1992.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**, 5. ed. London: Mosby, 423p. 1998.

RUIZ, A.R., De la Torre, R.A., Alonso, N., Villaescusa, A., Betancourt, J., Vizoso, A., 1996. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Ethnopharmacology* 52, 123–127.

SAMPSON, J., Houghton, P.J., Westbrook, J., McCormacj, A., Patel, V., Dunn, M.J., Hylands, P.J., 2000. Can proteomics be used to investigate potential modes of action of plant extracts on protein expression in IBR3 human dermal fibroblasts? *Journal of Pharmacy and Pharmacology*

SCHÄFFER, M.; BARBUL, A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. **British Journal of Surgery**. v.85, p.444-460, 1998.

SCHIRATO, G. V. **Efeito cicatrizante e antimicrobiano das lectinas de semente de *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea violacea* em feridas cutâneas experimentais em camundongos**, 100f. Tese (Mestrado em Ciência Biológica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

SCHIRATO, G.V.; PAIVA, M.G.; MONTEIRO, F.M.F.; SILVA, F.O.; LIMA-FILHO, J.L.; CARNEIRO LEÃO, A.M.; PORTO, A.L.F. Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) como biomaterial na reepitelização de lesões cutâneas experimentais em camundongos In: II jornada de ensino, pesquisa e extensão, 2002, Recife. **Anais...** Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2002.

SHARON, N. & LIS, H. A century of lectin research (1888-1988). **Trends. Biochem. Sci.** v. 12, p. 488-91, 1987.

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

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

SHIBUYA, N.; GOLDSTEIN, I.J.; SHAFER, J.A., et al. (1986) Carbohydrates binding properties of the stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizome lectins. **Arch. Biochem. Biof.** 249: 215-224.

SILVA, C. M. M. S.; SOUZA, S. M. (1986) Como produzir mudas de Camaratuba. Comunicado Técnico – **EMBRAPA**. 16: 1-2.

SINGER, A. J. ; CLARK, R. Cutaneous wound healing. **New England J. Med.**, v. 341, p.739-746, 1999.

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.

SOUZA, S. R.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA, M. A. M., et al. (2002) A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu beans) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surface. **Carbohydrate polymers**. **46**: 191-193.

SPENCE, R. J.; WONG, L. The enhancement of wound healing with human skin allograft. **Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 741-775, 1997.

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.

STOEVA, S.; FRANZ, M.; WACKER, R.; KRAUSPENHAAR, R.; GUTHOHRLEIN, E.; MIKHAILOV, A.; BETZEL, C.; VOELTER, W. Primary structure, isoforms, and
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.

TAVARES, G. A. **Estrutura e propriedades físico-químicas da galactomanana de sementes de *Cassia fastuosa* Willd. (Cassia)**. Tese de Mestrado em Bioquímica, UFPR, 1996.

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.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 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

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.

YESILADA, E., Honda, G., Sezik, E., et al., 1995. Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *Journal of Ethnopharmacology* 46, 133–152.

YOUNG, S. L.; O'DONNELL, M. A.; BUCHAN, G. S. IL-2-secreting recombinant bacillus Calmette Guerin can overcome a Type 2 immune response and corticosteroid-induced immunosuppression to elicit a Type 1 immune response. v. 14, n.7, p. 793-800, 2002.

ARTIGO

HEALING ACTIVITY OF *Cratylia mollis* LECTIN IN HEALTH AND IMMUNOCOMPROMISED MICE

¹ Cristiane Moutinho Lagos de Melo, ¹ Camila Souza Porto, ¹ Mário Ribeiro Melo-Júnior, ¹ Chirleanny Maciel Mendes, ¹ Carmelita Bezerra, ¹ José Luiz de Lima Filho, ² Luana Cassandra B. B. Coelho, ¹ Ana Lúcia Figueiredo Porto, ¹ Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, ² Maria Tereza dos Santos Correia

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, UFPE, Pernambuco, Brazil; ² Departamento de Bioquímica, UFPE, Pernambuco, Brazil.

ABSTRACT

An immunocompromised organism has difficulty for re-establish after any injury. *Cratylia mollis* seed lectin, experimental called Cramoll 1,4, was used as a treatment of normal and immunocompromised cutaneous wounds of mice, with the aim to develop therapeutics that surpass immunosuppression condition of the organism. Methotrexate (0.8 mg/kg/week) was used as the immunosuppressive drug. Surgical wounds (1 cm of diameter) were produced aseptically in health and immunocompromised female mice. The wounds were daily treated with topical (T) and intraperitoneal (Ip) administration, as follows: control groups – NaCl T; NaCl Ip; NaCl Immunod T and NaCl Immunod Ip (0.15 M NaCl) and treated groups – Cramoll T; Cramoll Ip; Cramoll Immunod T and Cramoll Immunod Ip (10 µg.mL⁻¹ Cramoll 1,4). Parameters such as edema, hiperemy, scab, granulation and cicatricial tissues as well as contraction of wounds were analyzed for 12 days. The edema was less observed on Cramoll Ip and Cramoll Immunod Ip groups; hiperemy showed pale at all groups. Inflammatory infiltrate, fibroblast proliferation and collagen fiber deposition were observed with higher intensity on all Cramoll treated wounds, especially on Cramoll T group. The latter aspects favored an excellent closing and repair of lesions treated with Cramoll 1,4. In experimental mice, closing of all injuries was obtained in day 10 for Cramoll Immunod Ip and day 11 for Cramoll T, Cramoll Ip and Cramoll Immunod T groups. The control groups had wounds closed in day 12 for NaCl Immunod T group and 90% of NaCl T, NaCl Ip and NaCl Immunod Ip groups. In accordance with examined aspects, normal or immunocompromised animals treated with Cramoll 1,4 had injuries efficiently repaired, in less time.

Keywords: *Cratylia mollis* lectin, wound, immunocompromised mice.

1. INTRODUCTION

The healing process live to recover anatomic and physiologic integrity of tissue the repair of wound is a complex sequence of biochemical and cellular events in response to tissue lesion.

The successful cure of a wound implies in an appropriate sequence of events; the final result, in general a connective tissue scar, express all this process (LOPES, 2005b).

The cure of acute wounds is represented with phases of coagulation, inflammation, deposition and synthesis of matrix, angiogenesis, epithelization, contraction and fibrosis as well as scar formation (STADELMANN et al., 1998). After injury, blood vessels are disrupted resulting in extravasation of blood components such as proteins, coagulation factors and platelets. These latter components promote platelet aggregation and blood coagulation for the re-establishment of haemostasis. On the inflammatory site, neutrophils and macrophages are attracted. These immune cells act phagocytosing remaining cells, fibrin and damaged extracellular matrix and opportunistic pathogen bacteria infecting the site of wound (KAPOOR & APPLETON, 2005).

The immune cells exert a fundamental role in the transition between the inflammatory process and fibroplasia phase (SZPADERSKA & DI PIETRO, 2005). In the sequence occurs the migration of inflammatory cells and regeneration of remaining vases characterizing a new tissue in formation, the granulation tissue, that brings fibroblasts to the wound site to fill the place with collagen matrix and to promote contraction of injury (WERNER and GROSE, 2003).

In set to the process, basal epithelial cells (keratinocytes) start to proliferate filling the area of wound and, to the end, to compose together by new collagen deposited a scar that still will suffer remodeling (SANTORO & GAUDINO, 2005).

The annexes of the skin, as coats and glands suffer limited regeneration and the coloration of scar is pale, therefore the regeneration of the melanocyte is in deficit (DIPIETRO & BURNS, 2003).

Some chemical molecules act in the repair process and platelets serves as one of the recruiting components that are factors of the growth and vessel modulators such as Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Fibroblast Growth Factor (FGF), Epidermal Growth Factor (EGF), β - thromboglobulin, Platelet Factor 4 (PF4), Platelet-Derived Angiogenesis Factor (PDAF), serotonin,

bradykinin, prostacyclins, thromboxane, and histamine (STADELMANN et al., 1998; NUMATA et al., 2006). Many studies use the immunosuppression to elucidate the biochemical stages involving the repair process and, mainly, the immune reply of the organism front to the injury. The drugs cyclosporin, methotrexate (CIESIELSKI et al., 1998; KONING et al., 2006) and cyclophosphamide (GARCIA et al., 2004) are immunossupressor drugs more used in these studies in function of its mechanism of action to involve the blockade and inactivation of some cytokines, factors of growth, integrins and PMNs, which allowed the briefing of some cicatricial process stages (PETERS et al., 2006).

The treatments praised for cutaneous injuries present in elapsing the cicatricial process limitations and have as limits factors the dosage, the practical use and the cost. In this context, the use of biomaterials in the repair process has been investigated as effective alternative therapeutics (SILVA, 2000; ABBAS et al, 2002; SEAL, et al., 2001).

A great number of lectins with distinct characteristics and specificities have extended its use, as biomaterials, in medical and biological processes. These carbohydrate recognition proteins are ubiquitous in organisms. The majority of plant seed lectins are present mainly in leguminous and constitute about 10% of total proteins of seed, however the isolated amount is small and it varies among 0.1-1% of total (LORIS, 2002; ALENCAR et al., 2005a). Lectins have been used in diverse research, such as induction of apoptosis in tumoral cells (YANG, et al., 2005), cytotoxic action on MCDK cells (KURAMOTO et al., 2005), release of histamine in mastocytes (LOPES et al., 2005a) and stimulation of autophosphorylation receiving it of insulin (CAVADA et al., 2003). The lectins still are used as reacting polyclonals to investigate the molecular basis and control of activation and proliferation of lymphocytes; to identify and separate cells of the immune system and as drugs (SINGH, SINGH and KAMBOJ, 2004).

Cratylia mollis Mart., popularly known as camaratu beans or camaratuba, is a forage from the Northeast Semi-Arid Region of Brazil. The plant is perennial, of great resistance to dries and serves in such a way to cattle feeding in dry and rainy period. *C. mollis* seeds contain four multiple forms of lectins (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 and Cramoll 4) and a preparation with isoforms 1 and 4 is called Cramoll 1,4 (PAIVA & COELHO, 1992; CORREIA & COELHO, 1995). Cramoll free and encapsulated in liposomes have been used with antitumoral activity (ANDRADE et al., 2004) and mitogenic activity to lymphocytes (MACIEL et al. 2004). This study investigated, from clinical and histopathological aspects, the cicatricial action of Cramoll 1,4 in organisms of healthy and immunocompromised mice, with the objective to find a therapeutical alternative biomaterial to repair injuries.

2. METHODOLOGY

2.1 Animals

Females of albino Swiss mice (n=240), 12 weeks old and weight $45,0 \pm 2,0$ g were obtained from the Immunopathology Laboratory Keizo Asami Federal University of Pernambuco - UFPE. Each animal was maintained in an individual cage, maintained under controlled environmental conditions (12-h light/dark cycle, temperature $23 \pm 2^\circ\text{C}$ and humidity $55 \pm 10\%$) with water and commercial food *ad libitum* (Labina®, Agribands of Brazil). All animal procedures were in accordance with the ethical norms of the International Guiding Principles of Biomedical Research Involving Animals (CIOMS) (Genebra, 1985) and the Ethical Committee of UFPE.

2.2 Lectin extraction and purification

C. mollis seed extract (10% w/v prepared in 0.15 M NaCl) was fractionated using ammonium sulphate (40-60% w/v) and the obtained fraction was submitted to affinity chromatography in Sephadex G-75. Cramoll 1,4 was bioselectively eluted with 0.3 M D-glucose in 0.15 M NaCl, dialyzed against 0.15 M NaCl during 24 h and lyophilized (Correia & Coelho, 1995).

2.3 Immunosuppression Induction

Methotrexate (MTX) was administered in each animal using a low-dose (0.8 mg/kg/week). MTX was administered intramuscularly in 0.15 M NaCl weekly on 7 days before surgery, on surgery day and 7 days after surgery (CIESIELSKI, 1998).

2.4 Experimental protocol and groups

Animals were divided into four groups (n=30/group) and for the surgical procedure were previously anesthetized using 2% xilazine chloridate (10 mg.kg⁻¹) and 10% ketamine chloridate (115 mg.Kg⁻¹) in subcutaneous injections (Hall, et al., 1991). Each animal was placed in prone position and prepared for aseptic surgery using 2% chlorexidine digluconate. A standard wound (1 cm of diameter) was performed on the dorsal thoracic region using scalpel and curved blade surgical scissors after removal of epidermal and dermal layers with minimal bleeding. Each wound was daily treated with 100 µL of solution, as follows:

1. **Cramoll T** - healthier animals topical treated with Cramoll 1,4 lectin, in 10 µg/ml dose;
2. **NaCl T** - healthier animals topical treated with 0.15 M NaCl ;
3. **Cramoll Immunod T** - immunocompromised animals topical treated with Cramoll 1,4 lectin, in 10 µg/ml dose;
4. **NaCl Immunod T** - immunocompromised animals topical treated with 0.15 M NaCl;

5. **Cramoll Ip** - healthier animals intraperitoneal treated with Cramoll 1,4 lectin, in 10 µg/ml dose;
6. **NaCl Ip** - healthier animals intraperitoneal treated with 0.15 M NaCl;
7. **Cramoll Immuno Ip** - immunocompromised animals intraperitoneal treated with Cramoll 1,4 lectin, in 10 µg/ml dose;
8. **NaCl Immuno Ip** - immunocompromised animals intraperitoneal treated with 0.15 M NaCl;

The clinical characteristics of experimental wounds were observed every day, considering the following aspects: edema, hiperemy, secretion, scab, granulation, epithelialisation and scar tissues. Daily, wound areas were measured with pachymeter support and were calculated as follows: $A = \pi.R.r$, where A, R and r are mean area, large ray and small ray, respectively (Prata, et al., 1988). On each time of biopsy, at the 2nd, 7th and 12th days after surgery, animals were subjected to subcutaneous anesthesia were 10 animals were draw back of the experimental groups across euthanasia with cervical disruption. After this procedure total skin and area of the wound were removed, enclosing one centimeter beyond each dorsal and ventral edge in the direction volume, going deep itself until the muscular layer. Immediately after the withdrawal of skin, the samples were disposed on filter paper and incubated in formaldehyde (4%, v/v) in 0.01 PBS M, pH 7,2 for a maximum period of 48 h for the processing of histological slices (Michalany, 1991).

2.5 Microbiological evaluation

The microbiological evaluation was carried through "swabs" in the area of injuries at the surgical moment and the respective days of biopsies. This evaluation was of routine to evaluate the degree of contamination of injuries. The microorganisms were classified

through the morphologic aspects of colonies and staining pattern to Gram in accordance with Carter (1988).

2.6 Statistical analysis

The results obtained were expressed as mean $\pm$ standard deviation ($M \pm SD$), submitted to variance analysis and to the Tukey test, accepting as statically significant the values compared at signification level of 5%.

3. RESULTS

Inflammatory phase

The inflammatory parameters such as edema and hiperemy were observed in all experimental groups being more intensely observed by extended time in NaCl T and NaCl Immunod T groups; on Cramoll group this inflammatory signal was less intense. The hiperemy of the lesions had been observed in all the groups with pale aspect. In relation to infiltrate inflammatory and polimorphonuclears cells (PMNs) it was observed a deficiency or reduction of cells in the site of injuries from immunocompromised animals, in relation to health animals. The wounds of animals of Cramoll T and Cramoll Ip groups revealed more PMN in inflammatory site (Figure 1) than in respective control. This behavior was also observed on Cramoll Immunod T group.

Fibroplasia phase and initial collagen deposition

In the fibroplasia phase it could be observed that the injuries of Cramoll T demonstrate elevated collagen deposition. This aspect was suffering progressive reduction on Cramoll Ip, Cramoll Immunod T and Cramoll Immunod Ip groups, respectively. Only NaCl T and NaCl Ip groups showed meaningful collagen deposition (Figure 2).

In experimental mice, closing of all injuries was observed in day 10 for Cramoll Immunod Ip and day 11 for Cramoll T, Cramoll Ip and Cramoll Immunod T groups. The control groups closed wounds in day 12 for NaCl Immunod T group and 90% of NaCl T, NaCl Ip and NaCl Immunod Ip groups (Figure 3).

The histopathological slices differed from the macroscopic aspect of injuries. The injuries of the group Cramoll T, besides been closed first than its respective control group, demonstrated an excellent repair in relation to deposition of collagen and beginning of development of annex sprouts. This was the unique group to present this characteristic. It was observed that the repair suffered progressive reduction on Cramoll Immunod T, Cramoll Ip and Cramoll Immunod Ip groups, respectively. NaCl T and NaCl Ip control groups showed significant collagen deposition and reepithelization. On other control groups has reepithelization, the histopathological slices demonstrated that it was deposited a matrix poor in collagen fibers in the site of wound that conferred local tension fragility and inefficient tissue repair. In relation to the deficient arrival of fibroblasts in the area of injury in 7 days, the decrease of collagen deposition in the maturation phase could be explained. (Figure 4). On the NaCl Immunod T and NaCl Immunod Ip groups it could observe that the fibroplasia phase could start over the delay of inflammatory phase.

Rate of contamination of the experimental wounds

The microbiological analysis of injuries disclosed a good surgical asepsis (in time 0) and all the groups were contaminated to the long of 12 days, except animals of Cramoll T group that had no incidence of microorganisms in its injuries. The average of microorganisms observed was of 52% to NaCl T; 27% to Cramoll Immunod T, 15% to NaCl Immunod T, 15% to Cramoll Ip, 29% to NaCl Ip, 21% to Cramoll Immunod Ip and 18% to NaCl Immunod Ip, respectively.

4. DISCUSSION

Cratylia mollis seed lectin, Cramoll 1,4 containing two different molecular forms, isolectins, with glucose/mannose specificity (CORREIA & COELHO, 1995) is available in milligram quantities and have already been used to detect normal and transformed cells, benignant or malignant (BELTRÃO et al., 1998). Cramoll isolectin 1 (Cramoll 1) was sequenced (SOUZA et al., 2003) and crystallized (TAVARES et al., 1996); Cramoll 1,4 revealed immunogenic (CORREIA & COELHO, 1995), anti-tumoral (ANDRADE et al., 2004) and mitogenic activities (MACIEL et al., 2004). Lectins have been used as biomaterials to modulate the biological reply of individuals, activating cells of the immune system (ALENCAR et al., 2003; CAVADA et al., 2001), enlisting neutrophils through indirect mechanisms (ASSREUY et al., 2003), promoting pro-inflammatory effect in polimorphonuclear cells (PMNs) (ALENCAR et al., 2005b) and inducing the release of cytokines (CAVADA et al., 2001) as well as the proliferation of fibroblasts (SELL & COSTA, 2003).

Biopsy 2 days after surgery – inflammatory signals

The reduction of inflammatory signal, edema, in experimental wounds what could be justified with treatment administration, intraperitoneally, because if don't have topical application of lectin, don't have increase of osmotic pressure in site and as a result don't have increase of plasma in injury.

Immune system comporment

The reduction of PMNs cells in the site of injuries of the immunocompromised animals can be justified by the action of immunossupressor used, methotrexate, which affects directly the subunit CD18 molecule that constituent $\beta 2$ integrin of lymphocyte

cellular surface (CIESIELSKI et al., 1998). The $\beta 2$ integrin is necessary to normal development of inflammatory reply; deficiency of CD18 subunit do not induce leukocyte migration to tissues due to lack of a firm adhesion to the endothelium and, as a result, it has a reduction in site inflammation (JANEWAY, 2002; SINDRILARU, 2006). However, the more presence of PMNs in inflammatory site in Cramoll T and Cramoll Ip groups could be explained in previous studies that showed stimulation of neutrophil migration (ALENCAR et al., 2003, 2005a and b), mitosis of lymphocytes (MACIEL et al., 2004) and release of histamine in mastocytes for lectins.

Maturation phase – keratinocytes and scar tissue

The collagen deposition on fibroplasia phase is conditioned for an efficient arrival myofibroblast in site of wound. This aspect it could observed in normal wounds treated with Cramoll 1,4, as result in efficient repair. The transition of fibroblast for myofibroblast starts with the sprouting of protomyofibroblast, whose staple fibers only contain β and γ cytoplasmic actins and evolve, but not necessarily always, in the appearance of myofibroblast differentiated, that it contains actin of the smooth muscle. The differentiation of myofibroblast is a complex process regulated by one cytokine, Transforming Growth Factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), that is a component of extracellular matrix (DESMOULIÈRE, 2005). Peters and cols. (2006) observed that CD18 present in the surface of phagocytes (neutrophils) during the migration emits a chemical signal that induces infiltrates of macrophages to secretion TGF- $\beta 1$. Therefore the lack of CD18 in one or another cell leads to an extremely reduced release of TGF- $\beta 1$ due to defective adhesion and to subsequent extravasation of phagocyte in of injured area. Ronty (2006) affirmed that this deficient release of TGF- $\beta 1$ promotes a delay in arrival in myofibroblasts in the site of injury with consequence deficit collagen staple fiber depositions. The fibroblast differentiation in

myofibroblast represents a key event on cicatricial process, being increased of contractile force is the principal aspect observed. (HINZ, 2007).

One of the final and important stages in the cicatricial process is characterized by total closing of injury that not only involves deposition of collagen matrix, rich in not shaped collagen staple fibers of type III, as well as the total reepithelization of wound from centripetal differentiations of basal epithelial cells, the keratinocytes, that are disposed at the edge of lesion, next to the injury. In this context the increasing content of collagen in the wound during the fibroblastic phase correlates with increasing wound tensile strength (Pilcher et al., 1999). Various aspects in healing process are considered among them are the characteristic type of closing injuries. Therefore the fact of a wound to be closed does not mean that it was repaired in an efficient manner; the process is related to the tension force that occurs in the region.

According to Eming (2007), that the fibroplasia phase start over the delay of inflammatory phase it can harm collagen deposition and repair of wound, that it could observe on slice the NaCl Immunod T and NaCl Immunod Ip groups. Similar results were described by Zweers and cols. (2007); they observed that keratinocytes do not depend on adhesion or migration of collagen for the closing of injury, even so absence accomplished of this protein promoted a reduction of the tension of wound, with a change in the organization of extracellular matrix. Hosokawa and cols. (2005) affirmed that TGF- β 1 assumed a crucial role in the signaling of Smad2 mediator in the regulation of migration of keratinocytes and reepithelization during injury repair.

Microbiological analyze

Wounds dealt with occlusive latex dressings increased the irritability of injury, while injuries with semi-occlusive or opened dressings helped in the migration and cellular reepithelization (SCHUNCK et al., 2005). Searching the natural context of organism, the

experimental wounds of this study were treated as open wounds, displayed to the local atmosphere. In all the scab sprouting was observed. The function of this scab is to stamp the wound, isolating it from the environment, not allowing the penetration of bacteria. With this, maintenance occurs of internal haemostasis and a surface under which the migration of cells can occur and the movement of injury edges (DANTAS, 2000).

The "swabs" carried through wounds of the animals had been accurately in the area of injury, or either, over the crust. This denotes that, no matter how hard the wounds if found contaminated, it did not have a local infection to the point to be observed secretions or significant alterations. Moreover, the identified microorganisms belong to natural animal microbiota, or either, *Staphylococcus* sp. and *Micrococcus* sp. bacteria.

5. CONCLUSIONS

An efficient animal immunosuppression was detected which influenced in all stages of repair process.

The inflammatory signals had been observed in all experimental groups being more intense and detected by longer time in injuries not dealt with the lectin.

In all wounds treated through intraperitoneal administration it was observed the delay of inflammatory phase what harm the collagen deposition and repair of wound, preferentially NaCl Immunod Ip group.

The intraperitoneal treatment promoted dispersion of PMN and cytokines pro-inflammatory for other areas (on injection) confusing the wound repair.

All treated lesions had closed in less time than respective controls; NaCl Immunod Ip group was the most damaged on repair process.

At the end of the process maturation phase had an excellent repair of injuries dealt with Cramoll 1,4 T, where sprouts of annexes in health animals were observed with significant collagen deposition and reepithelization in immunocompromised animals.

We concluded that animals dealt with Cramoll 1,4 were in perfect immunological condition or its deficit immune system repaired injuries efficiently and in less time, especially on topical administration.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants and fellowship (L. C. B. B. Coelho) and to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial M.Sc. support (C. M. L. Melo).

7. REFERENCES

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

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, V.B.M.; et al. The galactose-binding lectin from *Vatairea macroparca* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. **The International Journal of Biochemistry & Cellular Biology** v.35, p.1674-1681, 2003.

ALENCAR, V. B. M.; ASSREUY, A. M. S.; ALENCAR, M. N. N. et al. Lectin of *Pisum arvense* seeds induces *in vivo* and *in vitro* neutrophil migration. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.57, p.375-381, 2005a.

ALENCAR, V. B. M.; ALENCAR, M. N. N.; ASSREUY, A. M. S. et al. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 1805-1814, 2005b.

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

ASSREUY, A. M. S.; ALENCAR, N. M. N.; CAVADA, B. S. et al. Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II Stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: Modulation by mast cells, **Biology of Reproduction**, v.68, p.1836-1841, 2003.

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

CARTER, G. R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. v.1. ed. São Paulo: Roca, 249p., 1988

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S. et al. 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.

CAVADA, B. S.; IGLESIAS, M. M.; TRONCOSO, M. F. et al. Glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans stimulate the autophosphorylation of the insulin receptor *in vitro*, **Hormone and Metabolic Research**, v.35, n.2, p.125-127, 2003.

CIESIELSKI, C. J.; MEI, J.; PICCININI, L. A. Effects of Cyclosporine A and methotrexate on CD18 expression in recipients of rat cardiac allografts. **Transplant Immunology**, v.6, p.122-133, 1998.

CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Appl Biochem Biotechnol**, v.55, p.261-273, 1995.

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

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

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

GARCIA, M.; SILVIO, P. S.; ALVES, G. J.; et al. Uso da ciclofosfamida em modelo de Imunodepressão experimental em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n.3, p. 115-119, 2004.

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

HOSOKAWA, R.; URATA, M. M.; ITO, Y. et al. Functional Significance of Smad2 in Regulating Basal Keratinocyte Migration During Wound Healing, **Journal of Investigative Dermatology**, v.125, p.1302–1309, 2005.

International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (**CIOMS**) - Genebra, 1985.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. et al. Immunobiology: the immune system in health and disease. 5. ed. Toronto: Garland Science, 2002.

KAPOOR, M., APPLETON, I. Wound healing: abnormalities and future therapeutic targets. **Current Anesthesia & Critical Care**, v.16, p.88-93, 2005.

KONING, B. A. E.; DIEREN, J. M. V.; LINDENBERGH-KORTLEVE, D. J. et al., Contributions of mucosal immune cells to methotrexate-induced mucositis. **International Immunology**, v.18, n.6, p.941-949, 2006.

KURAMOTO, T.; UZUYAMA, H.; HATAKEYAMA, T. et al., Cytotoxicity of a GalNAc-Specific C-Type Lectin CEL-I toward Various Cell Lines, **Journal of Biochemistry**, v.137, n.1, p.41-50, 2005.

LOPES, F. C.; CAVADA, B. S.; PINTO, V. P. T.; et al. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 38, p. 935-941, 2005a.

LOPES, G. C.; SANCHES, A.C.C.; NAKAMURA, C.V. et al. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p.265–272, 2005.

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

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

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**, 2 ed. São Paulo: Michalany, p. 277, 1991.

NUMATA, Y.; TERUI, T.; OKUYAMA, R. et al., The Accelerating Effect of Histamine on the Cutaneous Wound-Healing Process Through the Action of Basic Fibroblast Growth Factor, **Journal of Investigative Dermatology**, v.126, p.1403-1409, 2006.

PAIVA, P.M.G., COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.36, p.113-118, 1992.

PETERS, T.; SINDRILARU, A.; WANG, H.; et al., CD18 in Monogenic and Polygenic Inflammatory Processes of the skin, **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v.11, p.7-15, 2006.

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

RONTY, M. J.; LEIVONEN, S. K.; HINZ, B. et al. Isoform-Specific Regulation of the Actin-Organizing Protein Palladin during TGF- β 1-Induced Myofibroblast Differentiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 2387–2396, 2006.

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

SCHUNCK, M.; NEUMANN, C.; PROKSCH, E. Artificial Barrier Repair in Wounds by Semi-Occlusive Foils Reduced Wound Contraction and Enhanced Cell Migration and Reepithelization in Mouse Skin, **Journal of Investigative Dermatology**, v.125, p. 1063–1071, 2005.

SEAL, B. L.; OTERO, T. C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration materials. **Science and Engineering Reports**, v. 34, p.147-230, 2001.

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

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

SINDRILARU, A.; Seeliger, S.; Ehrchen, J. M. et al. Site of Blood Vessel Damage and Relevance of CD18 in a Murine Model of Immune Complex-Mediated Vasculitis, **Journal of Investigative Dermatology**, 2006.

SINGH, J., SINGH, J., KAMBOJ, S.S. A novel mitogenic and aniproliferative lectin from wild cobra lily, *Arisaema flavum*. **Biochemistry and Biophysics Research Communicate**, v.318, p.1057-1065, 2004.

SOUZA, G. A.; OLIVEIRA, P. S. L.; TRAPANI, S., et al. Amino acid sequence tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin, **Glycobiology**, v.23, p.961-972, 2003.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds, **The American Journal of Surgery**, v.16, p.26-38, 1998.

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

TAVARES, G. A.; CARACELLI, I.; BURGER, C. R.; et al. Crystallization and preliminary X-ray studies on the lectin from the seeds of *Cratylia mollis*, **Acta Crystallographic**, v.52 p.1046-1047, 1996.

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

YANG, N.; TONG, X.; XIANG, Y. et al., Molecular Character of the Recombinant Antitumor Lectin from the Edible Mushroom *Agrocybe aegerita*, **Journal of Biochemistry**, v.138, n.2, p. 145-150, 2005.

ZWEERS, M.; DAVIDSON, J. M.; POZZI, A. et al. Integrin $\alpha 2 \beta 1$ Is Required for Regulation of Murine Wound Angiogenesis but Is Dispensable for Reepithelialization, **Journal of Investigative Dermatology**, v.127, p.467-478, 2007.

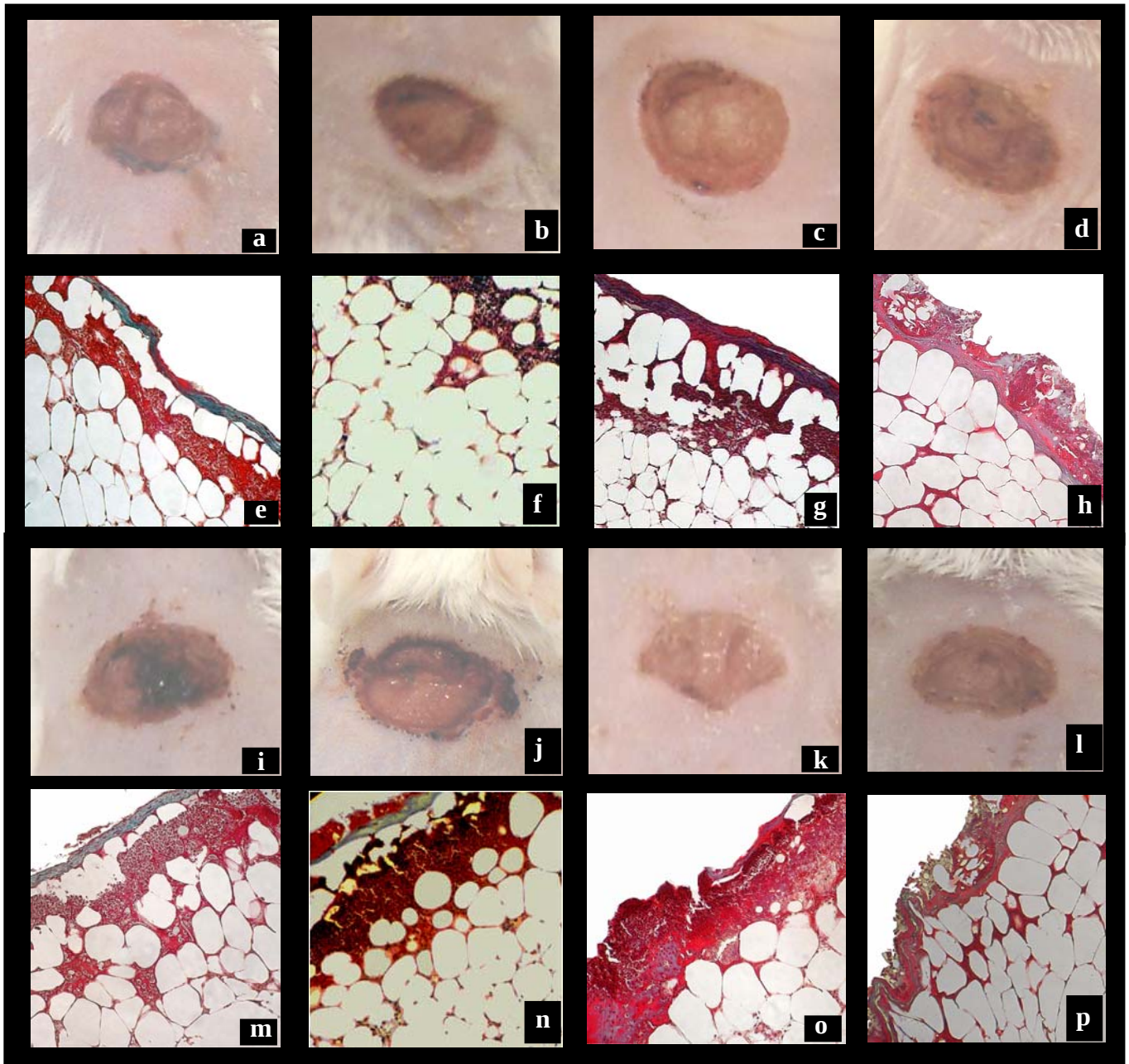


Figure 1: Macroscopic lesions (**a, b, c, d, e, f, g** and **h**) and histopathological aspects (**i, j, k, l, m, n, o** and **p**) of inflammatory phase from experimental wounds. Biopsy time – 2nd day after surgery. Topical (T) and intraperitoneal (Ip) treatments were: **a, e** – Cramoll T; **b, f** – NaCl T; **c, g** – Cramoll Immunod T and **d, h** – NaCl Immunod T. **i, m** – Cramoll Ip; **j, n** – NaCl Ip; **k, o** – Cramoll Immunod Ip and **l, p** – NaCl Immunod Ip. Optical Microscopy (200x).

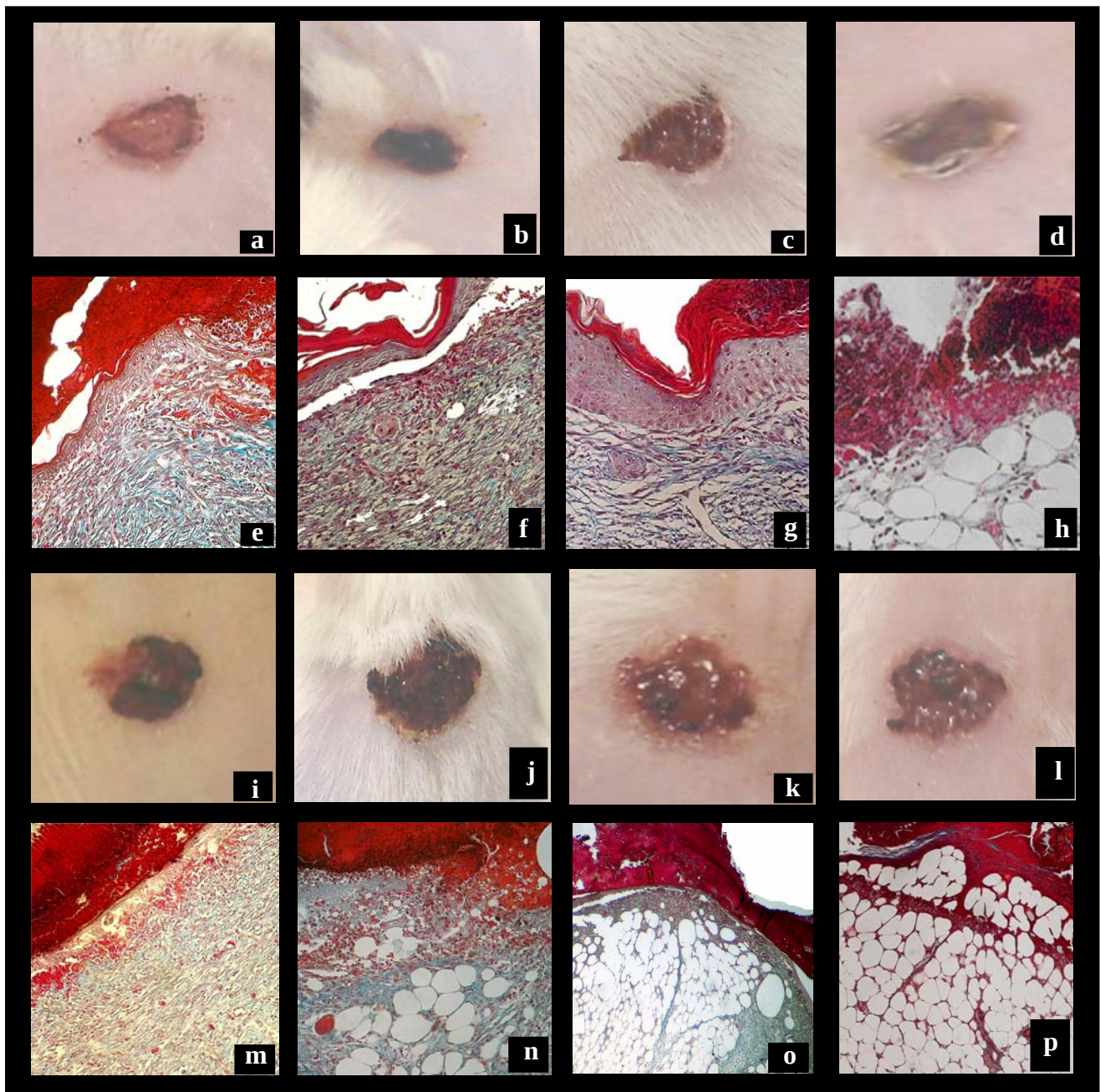


Figure 2: Macroscopic lesions (**a, b, c, d, e, f, g** and **h**) and histopathological aspects (**i, j, k, l, m, n, o** and **p**) of inflammatory phase from experimental wounds. Biopsy time – 7th day after surgery. Topical (T) and intraperitoneal (Ip) treatments were: **a, e** – Cramoll T; **b, f** – NaCl T; **c, g** – Cramoll Immunod T and **d, h** – NaCl Immunod T. **i, m** – Cramoll Ip; **j, n** – NaCl Ip; **k, o** – Cramoll Immunod Ip and **l, p** – NaCl Immunod Ip. Optical Microscopy (200x).

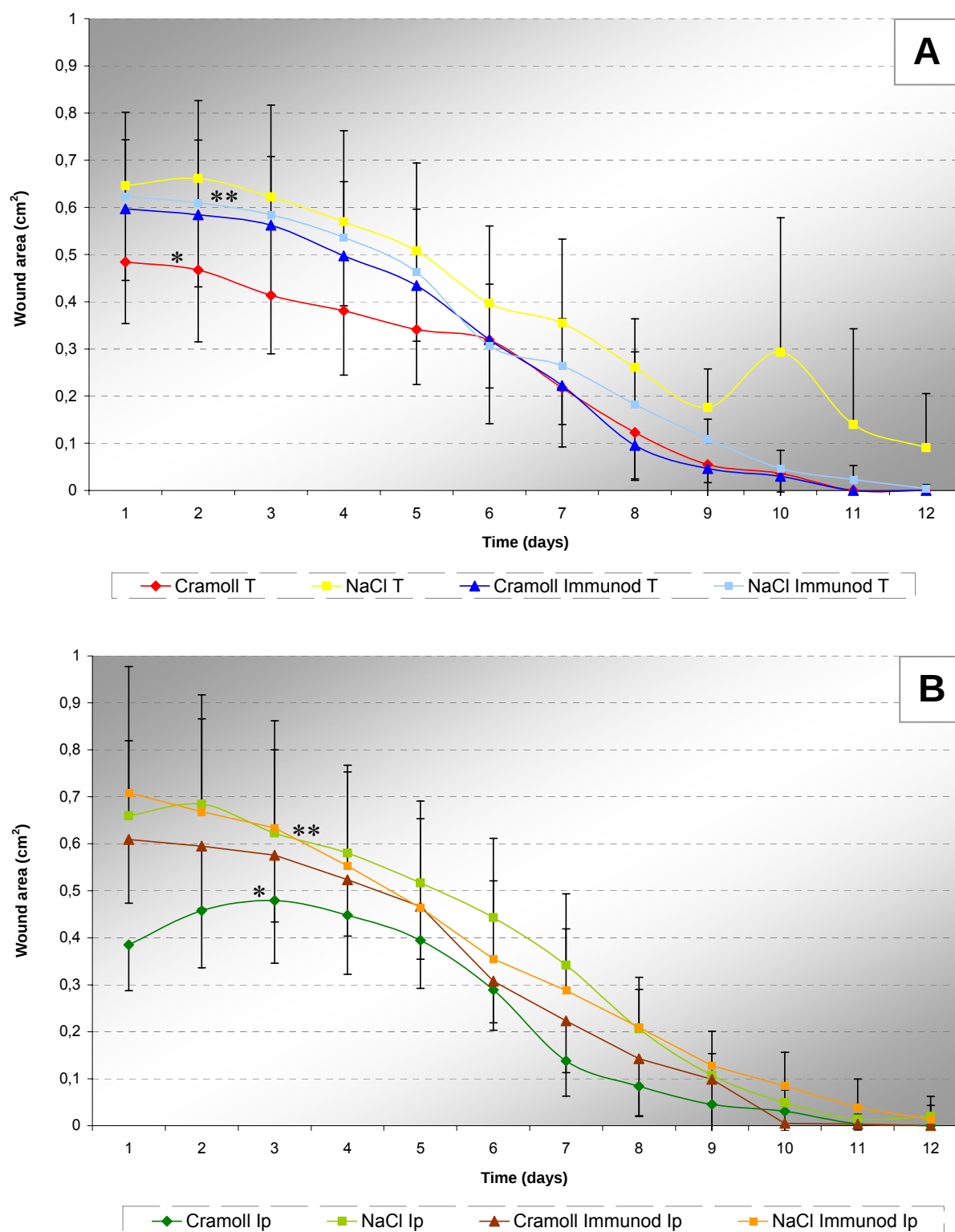


Figure 3: Area reduction of experimental wounds. **A** – Topical treatment (T), $p < 0.007$ (*), $p < 0.02$ (**). **B** – Intraperitoneal treatment (Ip), $p < 0.009$ (*), $p < 0.09$ (**). Tukey test and results are expressed as mean $\pm$ SD.

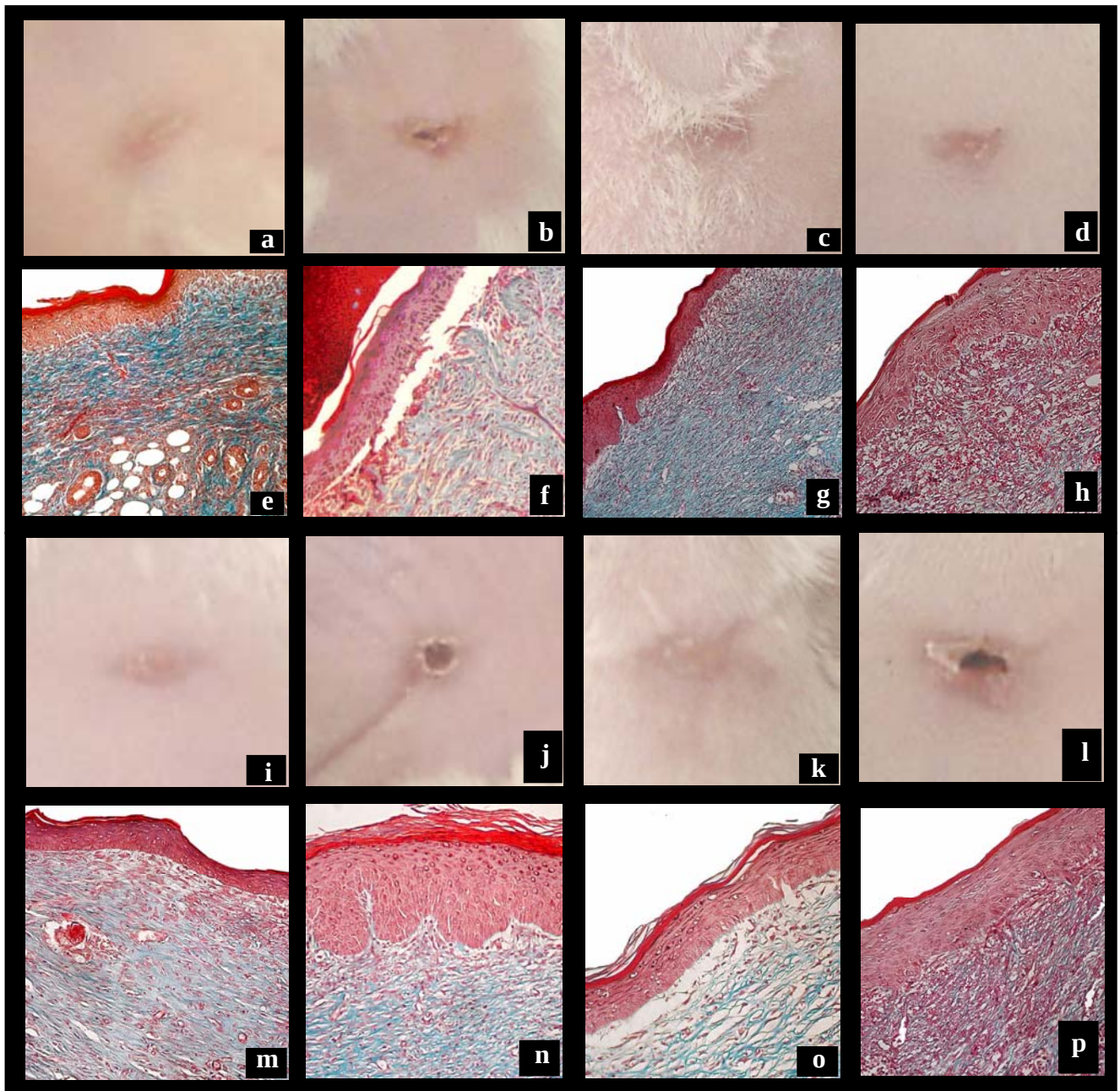


Figure 4: Macroscopic lesions (**a, b, c, d, e, f, g** and **h**) and histopathological aspects (**i, j, k, l, m, n, o** and **p**) of inflammatory phase from experimental wounds. Biopsy time – 12th day after surgery. Topical (T) and intraperitoneal (Ip) treatments were: **a, e** – Cramoll T; **b, f** – NaCl T; **c, g** – Cramoll Immunod T and **d, h** – NaCl Immunod T. **i, m** – Cramoll Ip; **j, n** – NaCl Ip; **k, o** – Cramoll Immunod Ip and **l, p** – NaCl Immunod Ip. Optical Microscopy (200x).