

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



AILECIRAM MONIALY BARROS MARINHO RIBEIRO

**EFEITO DA CONCAVALINA ASSOCIADA AO LASER TERÁPICO NO
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS**

Recife/PE

2015

AILECIRAM MONIALY BARROS MARINHO

**EFEITO DA CONCAVALINA A ASSOCIADA AO LASER TERÁPICO NO
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção
do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de
concentração em Biotecnologia.

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Maria das Graças
Carneiro da Cunha.**

Co-orientadora: **Prof^a Dr^a Maria Tereza dos
Santos Correia.**

Recife/PE

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Ribeiro, Aileciram Monialy Barros Marinho
Efeito da concanavalina A associada ao laser terapico no processo de
cicatrização de lesões cutâneas / Aileciram Monialy Barros Marinho Ribeiro–
Recife: O Autor, 2015.

91 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria das Graças Carneiro da Cunha

Coorientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biociências. Biotecnologia, 2015.

Inclui referências e anexos

1. Cicatrização de feridas 2. Raios laser 3. Proteínas I. Cunha, Maria das
Graças Carneiro da (orientadora) II. Correia, Maria Tereza dos Santos III. Título

615.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-258

AILECIRAM MONIALY BARROS MARINHO RIBEIRO

**EFEITO DA CONCAVALINA A ASSOCIADA AO LASER TERÁPICO NO
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Biológicas, área de concentração em
Biotecnologia.

Data da Aprovação 25 / 02 / 2015

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a. Dr.^a. MARIA DAS GRAÇAS CARNEIRO DA CUNHA.
Departamento de Bioquímica - UFPE

Profa. Dra. MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA
Departamento de Bioquímica - UFPE

Profa. Dra. MARTHYNA PESSOA DE SOUZA
Departamento de Nutrição - UFPE

Recife/PE

2015

AGRADECIMENTOS

A Deus por TUDO.

A meu filho e meu marido, João Gabriel e Wellington Ribeiro, por toda paciência, compreensão, fé e esperança depositadas em mim. Foi por vocês que não desisti de correr atrás deste sonho.

A Carolina Malafaia, Bruno Souza e Túlio Diego, sem vocês eu jamais teria conseguido concluir esta obra, vocês foram fundamentais e essenciais no processo final.

As minhas orientadora e co-orientadora, Professora Maria das Graças Carneiro da Cunha e Professora Maria Tereza dos Santos Correia, pela paciência e compreensão das minhas limitações e falhas, minha convivência com vocês me trouxe o maior crescimento acadêmico que já experimentei até hoje.

Ao grupo de Biotecnologia da UFPE, em especial Priscila Sales, pela contribuição nos momentos mais trabalhosos do experimento, ser acolhida por vocês foi muito importante para todo o processo.

Ao suporte dado durante a fase experimental pela equipe do LIKA – Laboratório Keizo Asami, Professora Helena Ribeiro, figura humana que me ensinou e me deu segurança para realizar todos os procedimentos, Felipe e “Seu Ailton”, que esteve sempre à disposição para garantir que tudo fosse realizado da forma mais correta possível.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE por toda contribuição acadêmica que alicerçaram meu conhecimento.

A minha mãe, Cileneide Cristina, pela dedicação e exemplo de mulher, pelo apoio incondicional e por ser meu porto seguro em muitos momentos.

Ao meu sogro, Dr. Temístocles Ribeiro, e minha sogra D. Téia, por todo apoio, incentivo, investimento e fé que sempre depositaram em mim.

Aos meus irmãos, Larissa, Júlia e Jefferson, pelo carinho de sempre.

A meu pai, Flávio Roberto, pelas palavras de incentivo.

Ao meu avô Geraldo Marinho (in memoria) e Tia Ilda (in memoria) pelo exemplo que foram em vida.

Aos membros da banca de avaliação pelas contribuições que foram dadas para complementar e enriquecer nosso trabalho.

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

A cicatrização de feridas é um processo complexo com sobreposição de eventos. A fim de acelerar o processo de cicatrização este estudo examinou os efeitos da terapia a laser de baixa potência (LTBP 4 J / cm² e λ = 660 nm) e a lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* (Con A, 100 ug / ml) na pele após a ferida cirúrgica lesão (1 cm²) no dorso dos ratos. Vinte e quatro ratos (machos, 250 a 300 g) foram divididos em 4 grupos (n = 6): o grupo de controle (C), 0,1 ml de NaCl a 0,9% (p / v); Con A (ConA); Con A associada com LTBP (CL) e LTBP (L). Aos 3 dias após a lesão inicial, as amostras foram coletadas para análise proteômica. A análise proteômica dos 85 pontos diferencialmente expressos foi detectada através da comparação dos grupos tratados com o grupo controle, destes, foram identificados 56 pontos, o que representa 66,24% do total, foram muitas as proteínas potencialmente relacionadas com a cicatrização de feridas. Conclui-se que a combinação de terapias, a laser e a aplicação de Con A, foi eficaz no processo de cicatrização observando um aumento na expressão de proteínas associadas com a redução da inflamação, remodelação de tecido, divisão celular, regeneração e principalmente adesão celular observada exclusivamente no grupo tratado com a associação da Con A e o laser de baixa potência, oferecendo-nos insights sobre a dinâmica da ação de as terapias.

Palavras chave: Concanavalina A, laser terapêutico de baixa intensidade, cicatrização, análise proteômica.

ABSTRACT

Wound healing is a complex process with overlapping events. In order to accelerate the healing process of this study examined the effects of low-level laser therapy (LLLT 4 J / cm² and $\lambda = 660$ nm) and the lectin from *Canavalia ensiformis* (Con A, 100 μ g / ml) in the skin wound after surgical injury (1 cm²) on the back of rats. Twenty four mice (male, 250- 300 g) were divided into 4 groups ($n = 6$): control group (C), 0.1 ml of 0.9% NaCl (w / v); Con A (ConA); Con A associated with LLLT (CL) and LLLT (L). At 3 days after the initial injury, the samples were collected for proteomic analysis. The proteomic analysis of differentially expressed 85 points detected by comparing the treated groups with the control group, these 56 points were identified, representing 66.24% of the total, many proteins were potentially related to wound healing. We conclude that the combination of therapies, laser and application of Con A, was effective in the healing process observed an increase in proteins expression associated with reduction of inflammation, tissue remodeling, cell division and regeneration, which offered insights into the dynamics of action of the therapies.

Keywords: Concanavalin A low-level laser therapy, wound healing, proteomic analysis.

LISTA DE FIGURAS

	Revisão da Literatura	Pág.
Figura 1.	Camadas celulares da epiderme: Germinativa ou Basal; Espinhosa; Granulosa e Córnea.....	17
Figura 2.	Evolução do processo cicatricial.....	23
Figura 3.	Estruturas moleculares da Concanavalina A (Con A). (A) Estruturas primárias e secundárias da Con A; (B) Estrutura tridimensional cristalizada da Con A; (C) Estrutura quaternária da Con A.....	29
	Artigo	
Figura 1.	Ferida cirúrgica realizada no dorso do rato com ênfase nos cinco pontos tratados pelo laser de baixa potencia.....	54
Figura 2.	Identificação de potenciais marcadores de cicatrização de feridas da pele utilizando electroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE). Perfis de proteínas em 2D-PAGE foram obtidos de amostras de proteínas epidérmicas derivadas de três tratamentos diferentes Con A (100 mL), a laser ($\lambda = 660 \text{ nm}$, $ED = 20 \text{ J / cm}^2$, $P = 100 \text{ mW}$, $F = 50\text{Hz}$) e a associação ConA Laser.....	59
Figura 3.	As proteínas identificadas no tecido epitelial de ratos. (A) Diagrama de Venn, mostrando a distribuição de proteínas identificadas no tecido epitelial dos ratos tratados com Con A (100 uL), laser ($\lambda = 660 \text{ nm}$, $ED = 20 \text{ J / cm}^2$, $P = 100 \text{ mW}$, $F = 50 \text{ Hz}$) e a combinação de Con A-laser. (B) A análise da distribuição de massa e pI de pontos identificados nos três tratamentos.....	60
Figura 4.	As proteínas identificadas no tecido epitelial dos ratos tratados com Con A (100 uL), laser ($\lambda = 660 \text{ nm}$, $ED = 4 \text{ J / cm}^2$, $P = 100 \text{ mW}$, $F = 50 \text{ Hz}$) e a combinação de Con A-laser. As proteínas são classificadas em categorias de acordo com sua função biológica. % Número de proteínas é a razão entre o número de proteínas identificadas em cada categoria com respeito ao número total de proteínas identificadas.....	61

LISTA DE TABELAS – ANEXOS

	Artigo	Pág.
Table 1.	As proteínas identificadas a partir de tecido epitelial de ratos Wistar (Rattus norvegicus) tratadas com Con A (100 uL) por MALDI-TOF (dessorção assistida pela matriz / ionização por laser em tempo de voo).....	85
Table 2.	As proteínas identificadas a partir de tecido epitelial de ratos (Rattus norvegicus) - Wistar tratados com laser ($\lambda = 660$ nm, ED = 20 J / cm ² , P = 100 mW, F = 50 Hz) por MALDI-TOF (assistida por matriz com dessorção por laser / ionização de tempo de voo).....	88
Table 3.	As proteínas identificadas a partir de tecido epitelial de ratos (Rattus norvegicus) - Wistar tratados com a combinação de Con A-laser por MALDI-TOF (dessorção assistida pela matriz / ionização por laser em tempo de voo).....	89

LISTA DE ABREVIACÕES

2DE – Eletroforese Bi-dimensional
3D – Tri-dimensional
ATP – Adenosina Tri-fosfato
bFGF – Fator de Crescimento Tumoral Beta
CDs – Células Dendríticas
CM – Célula de Merkel
Con A – Concanavalina A
ConBr – Canavalia Brasiliensis
COX-2 –Ciclo-oxigenase 2
EGF – Fator de Crescimento Epidérmico
ESI – Electro Spray Ionization
GaAlAs – Gálio-alumínio-arsenieto
HeNe – Hélio-neônio
IFN- γ – Interferon Gama
IL- – Interleucina
LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LBI – Laser de Baixa Intensidade
LTBP – Laser Terapia de Baixa Potência
MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
MEC – Matriz Extracelular
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
MM – Massa Molecular
MMPs – Metaloproteinases de Matriz
MS –Espectrômetro de Massa
Nd-YAG – Neodymium YAG
NIR – Infravermelho Próximo
NO –Óxido Nítrico
PAMPs – Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PGE2 – Prostaglandina E2
pH – Potencial Hidrogeniônico
pI – Ponto Isoelétrico
PMF – Peptide Mass Fingerprinting
SC – Estrato Córneo
TGF- α – Fator de Crescimento Transformante Alfa
TGF- β – Fator de Crescimento Transformante Beta
TIMPs – Inibidores de Tecidos de Metaloproteinases
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa
TOF – Time-of-flight
UV – Ultravioleta
VEGF – Fator de Crescimento de Células Endoteliais

SUMÁRIO

	Pág.
1. Introdução.....	11
2. Revisão Bibliográfica.....	14
2.1 Pele.....	15
2.1.1 Epiderme.....	15
2.1.2 Derme.....	19
2.2 Cicatrização.....	22
2.2.1 Classificação dos processos biológicos da cicatrização.....	23
2.2.1.1 Hemostasia.....	23
2.2.1.2 Fase Inflamatória.....	24
2.2.1.3 Fase Proliferativa.....	25
2.2.1.4 Fase de Remodelação.....	26
2.3 Lectinas.....	27
2.3.1 Lectinias e o Processo Inflamatório.....	30
2.4 Fototerapia.....	32
2.5 Proteômica.....	33
3. Referências Bibliográficas.....	36
4. Objetivos.....	47
5. Artigo.....	49
6. Anexos	71
6.1 Normas do Periódico a Ser submetido o artigo.....	72
6.2 Lista de Tabelas.....	85
6.3 Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.....	91

1. Introdução

O processo de reparação e a cicatrização de uma ferida existem para restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido e caracteriza-se por uma complexa série de eventos bioquímicos e celulares, simultâneos e interdependentes, em resposta a lesão tecidual (SAMPAIO et al., 2013). Uma lesão resulta em danos nos tecidos e independentemente da causa, os processos de reparação são semelhantes, através de uma resposta fisiológica coordenada em fases sucessivas para fornecer hemostasia iniciando a inflamação, proliferação e remodelação da matriz extracelular (MEC) (YOUNG; MCNAUGHT, 2011; AMAR; WU, 2014).

Ao longo do tempo, o homem sempre empregou artifícios com o intuito de aperfeiçoar o processo cicatricial através do uso de substâncias ou procedimentos. Por sua vez os biomateriais, que podem ser definidos como qualquer molécula que tenha a capacidade de interagir com o sistema biológico, sem indução de uma resposta adversa no hospedeiro; vem sendo usados na recuperação de lesões (DE MELLO et al., 2011). Neste sentido, proteínas bioativas vêm sendo utilizadas na terapêutica médica onde as lectinas vegetais tornam-se cada vez melhor compreendidas em termos de estrutura molecular, papel fisiológico e biológico, além de serem um grupo de proteínas e glicoproteínas com alto potencial para diversas atividades biológicas (DUBOIS et al., 1998; LAM; NG, 2010; BAH; FANG; NG, 2013).

A concanavalina A (Con A), uma lectina tetravalente (mitógeno de células-T, Ca^{2+} / Mn^{2+} dependente e de ligação a glicose/ manose) tem atraído atenção crescente dada sua potencialidade nas áreas médicas e biotecnológica, tais como o desenvolvimento de biosensores utilizados para detectar respostas imunológica a determinadas doenças (OLIVEIRA; CORREIA; DINIZ, 2009), agente anti-neoplásico em ensaios pré-clínicos ou clínicos para a terapêutica do câncer (LI; WANG, 2011), além de outras aplicações. No processo cicatricial a Con A é conhecida por provocar a ativação proteolítica de metaloproteinases de matriz (MMPs) em fibroblastos (KIM et al., 2010). Dubois et al. (1998) demonstraram que esta lectina induz a produção da protease MMP-9 por linfócitos in vitro; essa protease por sua vez, em associação com a MMP-2, é fundamental para o processo cicatricial.

Outra modalidade terapêutica utilizada em processos de cura é o LASER. Este é uma forma de amplificação da luz por emissão estimulada de radiação; o termo originou-se da abreviação: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation,

estando basicamente classificado como de “alta potência” e de “baixa potência”. (SANTUZZI et al., 2011). O fenômeno cicatricial ligado à aplicação do LASER tem sido referido como "terapia laser de baixa potência" (LTBP) ou fotobioestimulação (LIPOVSKY et al., 2012). O LASER é utilizado para aumentar a função mitocondrial e a síntese de ATP, aumentando a proliferação celular, e acelerando assim o processo de cicatrização (SAMPAIO et al., 2013). As respostas celulares in vitro observadas após LTBP incluem a migração, proliferação e aumento da síntese de várias proteínas que conduzem à reparação celular (SAMPAIO et al., 2013), no entanto, poucos estudos avaliaram a sua eficácia em condições associadas com biomateriais em especial com as lectinas.

Utilizamos a Análise Proteômica que pode ser aplicada para a análise de misturas complexas de proteínas que tenham sido separadas por eletroforese bidimensional - 2DE (SHIN et al., 2014). As proteínas são, então, caracterizadas usando várias técnicas analíticas. A principal vantagem desta abordagem é que ela permite tanto a análise quantitativa quanto qualitativa das proteínas por examinar sua expressão diferencial comparativa entre tratamentos distintos (SHIN et al., 2014).

Diante disso, nosso estudo analisou os resultados da associação de duas modalidades terapêuticas, o laser de baixa intensidade com a Concanavalina A (Con A). Foi realizado a avaliação do efeito bioestimulador e regenerador da associação desses dois recursos terapêuticos nos processos moleculares da cicatrização, no período de três dias, utilizando análise proteômica e bioinformática.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Pele

A pele é um órgão complexo que cobre toda a superfície do corpo e é responsável por cerca de 15% do peso total de um humano adulto com uma área superficial correspondente a cerca de 2m², sendo constituída por três camadas: epiderme, derme papilar e derme reticular, compostas respectivamente por epitélio escamoso estratificado, frouxo e conjuntivo que contém fibras de colágeno compacto (JOEY; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2009; IYOMASA et al., 2014).

A pele proporciona uma barreira física de proteção entre o corpo e o ambiente, impedindo as perdas de água e eletrólitos, reduzir a penetração de substâncias químicas, e proteção contra microrganismos patogênicos (WIKRAMANAYAKE; STOJADINOVIC; CANIC, 2014). A pele é importante na regulação da temperatura do corpo, fornece vigilância imunológica além de conter nervos sensoriais e autonômicos e receptores sensoriais, que detectam os estímulos correspondentes ao toque, vibração, pressão, temperatura, dor e coceira (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

2.1.1. Epiderme

Embriologicamente, a epiderme e seus apêndices desenvolvem-se da ectoderme superficial, enquanto que a derme e a hipoderme desenvolvem-se da mesoderme. Na quarta semana do desenvolvimento embrionário, uma única camada de ectoderme envolve o embrião. Este simples epitélio recobre uma camada frouxamente organizada da mesoderme indiferenciada conhecida como mesênquima. Por volta de seis semanas, a ectoderme e a mesoderme subjacente começam a proliferar e diferenciar-se. Folículos capilares, unhas e glândulas começam a desenvolver-se no terceiro mês. No final deste período, feixes regulares de colágeno aparecem na derme. O tecido conjuntivo embrionário abaixo da derme desenvolve-se na camada subcutânea de tecido conjuntivo frouxo caracterizado por ilhas de gordura (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

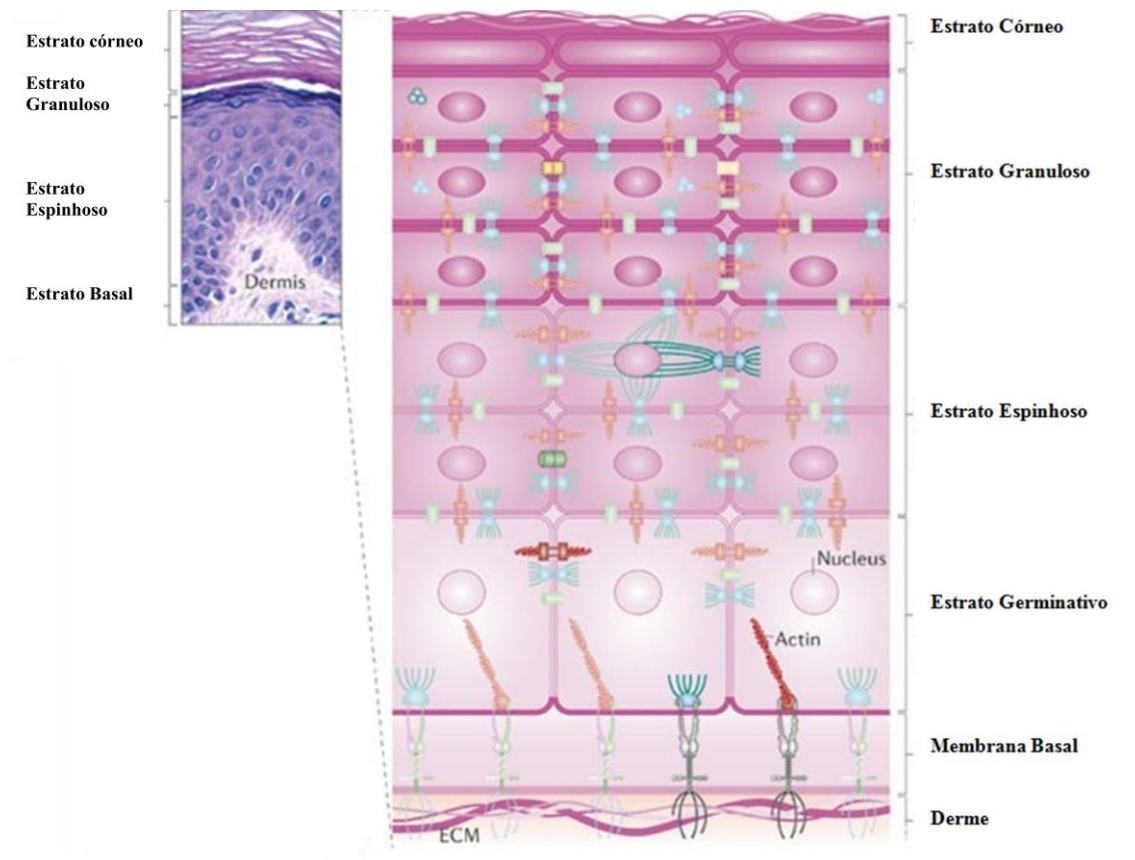
A epiderme é um epitélio altamente especializado, que evoluiu para executar várias funções de proteção essenciais como impedir a perda de água, excluir toxinas, resistir a esforços mecânicos, participar de respostas imunes (incluindo proteção contra microrganismos e radiação ultravioleta), percepção sensorial (dor, temperatura e tato), regulação da temperatura, homeostase de eletrólitos e troca gasosa (BLANPAIN;

FUCHS, 2009; STAMATAS et. al., 2011; SIMPSON; PATEL; GREEN, 2011; KHAVKIN; ELLIS, 2011).

Pode-se descrever a epiderme como um epitélio escamoso estratificado terminalmente diferenciado e constituído principalmente por queratinócitos (95% das células) que estabelecem uma barreira entre o organismo e o seu meio ambiente formando uma rede adesiva organizada em camadas múltiplas que sintetizam queratina - uma proteína que contém cadeias polipeptídicas enroladas que se combinam para formar supercoils (superenrolamento) de vários polipeptídeos ligados por pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína adjacentes. Estas células também produzem citocinas em resposta às lesões (SIMPSON; PATEL; GREEN, 2011; VÊNUS; WATERMAN; MCNAB, 2010).

São divididas em quatro as principais camadas da epiderme, dependendo do estado de diferenciação dos queratinócitos: estrato basal ou estrato germinativo, camada espinhosa, camada granulosa, e estrato córneo (Figura 1). Na região ventral das mãos e dos pés, há uma camada adicional, denominada estrato lúcido, pode ser identificada entre o estrato córneo e estrato granuloso. Outros tipos de células encontradas na epiderme incluem melanócitos, células de Langerhans e células Merkel (JOEY; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2009).

Figura 1. Camadas celulares da epiderme: Germinativa ou Basal; Espinhosa; Granulosa e Córnea.



Fonte: Cory L. Simpson, Dipal M. Patel e Kathleen J. Green, 2011.

A camada basal é composta de uma única camada de células cubóides, que repousam sobre a membrana basal. Os melanócitos podem ser observados entre as células basais da epiderme. As células basais podem proliferar e induzir células filhas para diferenciação terminal, as quais dão origem à camada seguinte: camada espinhosa. Esta apresenta geralmente uma espessura de 3 a 4 fileiras de células, sendo composta de células poligonais com queratina pré-formadas. Os anexos desmossomais entre as células aparecem como pequenas espinhas, dando origem ao nome estrato espinhoso, também podem ser identificadas as células de Langerhans dentro desta camada (JOEY; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2009; VÊNUS; WATERMAN; MCNAB, 2010).

Os melanócitos são derivados a partir de células da crista neural e migram para a epiderme, onde eles produzem a melanina e estão distribuídos entre os queratinócitos basais com a proporção de um melanócito para cada quatro a dez células basais. Esta

proporção varia de acordo com a localização anatômica e a densidade máxima de melanócitos na pele (WU; HAMMER, 2014).

A melanina é produzida a partir de tirosina através da enzima tirosina-quinase e são armazenadas em melanossomas. Estes são transportados ao longo dos processos dendríticos dos melanócitos para os queratinócitos adjacentes, onde formam uma cobertura sobre o núcleo, protegendo-o dos efeitos prejudiciais da luz Ultravioleta (UV). As variações étnicas na pigmentação são atribuíveis às atividades diferentes dos melanócitos e não a diferença no número de melanócitos (BALD et. al., 2014; CHOI et. al., 2014).

Já as células de Langerhans são células dendríticas apresentadoras de antígenos, derivadas da medula óssea que desempenham papel importante como sentinelas do sistema imunológico da pele (SCHUSTER et al., 2014). Representam de 3% a 6% de todas as células da epiderme e são encontradas principalmente dentro da camada espinhosa (KHAVKIN; ELLIS, 2011). Sua localização na superfície lhes fornece acesso antecipado aos patógenos de pele, organismos comensais, produtos químicos externos, bem como auto-antígenos epidérmicos (IGYÁRTÓ; KAPLAN, 2013).

O transporte de antígenos pelas células de Langerhans para linfonodos regionais ocorre inicialmente por células sentinelas contendo receptores de reconhecimento não clonais que irão responder a padrões moleculares associados a patógenos específicos (PAMPs) com a secreção de citocinas de proteção. Alternativamente, células dendríticas (CDs) periféricas podem ingerir com antígenos estranhos do processo, seguidos de migração através dos vasos linfáticos aferentes para os nódulos linfáticos próximos. Peptídeos derivados do antígeno serão, então, carregados num complexo principal de histocompatibilidade (MHC) para apresentação às células-T virgens no tecido linfóide. A ligação de células-T para as moléculas co-estimulatórias e complexos MHC-antígeno sobre os resultados da superfície CD na ativação e subsequente diferenciação de células-T em células efetoras capazes de iniciar uma resposta específica ao antígeno. Este processo é altamente eficiente, pois é necessário apenas um pequeno número de CDs para lançar um ataque imunitário grande e bem sucedido (KHAVKIN; ELLIS, 2011; CHOPIN; NUTT, 2014; IGYÁRTÓ; KAPLAN, 2013).

A célula de Merkel (CM) é uma célula neuroendócrina específica da epiderme e folículos pilosos da pele, é a menor população entre os muitos tipos de células cutâneas,

acredita-se que estas funcionem como células mecanorreceptoras, encontradas na camada basal mais especialmente na parte inferior das cristas epiteliais onde desenvolvem relações estreitas com terminações nervosas sensoriais e produzem diversas biomoléculas. Como a pele tem uma inervação autônoma (simpático e parassimpático), estas células podem interagir não só com os neurônios sensoriais, mas também com outros tipos de células nervosas, assim, as células de Merkel podem desempenhar um papel crítico na manutenção da homeostase da pele e desenvolvimento do nervo cutâneo (NAGASE et al., 2009; LUCARZ; BRAND, 2007).

O estrato espinhoso é sucedido pelo estrato granuloso, que normalmente possui a espessura de um a quatro queratinócitos que contêm grânulos intracelulares de queratohialina, de onde vem o nome desse estrato. O citoplasma dessas células também contém grânulos lamelares menores (corpos Odland). Componentes lipídicos no espaço intercelular desempenham um papel importante na função de barreira e de coesão intercelular dentro do estrato córneo (KHAVKIN; ELLIS, 2011; VÊNUS; WATERMAN; MCNAB, 2010).

A camada mais externa da epiderme é o estrato córneo (SC) composto por queratinócitos achatados que perderam seus núcleos e organelas citoplasmáticas. Estas células são embebidas numa matriz lipídica onde a estrutura do SC é muitas vezes comparada a uma parede de tijolos, na qual os queratinócitos são os tijolos e a matriz lipídica a argamassa (JOEY; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2009). A matriz lipídica forma uma via intercelular contínua, considerada importante para a difusão de substâncias através do SC. As principais classes de lipídeos presente no SC são as ceramidas, o colesterol e os ácidos graxos livres (OGURIA et al., 2014; SONG et al., 2014).

As células encontradas no estrato lúcido, chamadas de células de transição, ainda são nucleadas e apresentam tempo de divisão celular de aproximadamente 28 dias para renovação a partir da camada córnea, mas isto pode ser alterado em vários processos patológicos (VÊNUS; WATERMAN; MCNAB, 2010).

2.1.2. Derme

A camada basal da epiderme é ligada a uma membrana basal, que se sobrepõe à camada de tecido conjuntivo conhecida como derme, esta é rica em fibras de colágeno

(principalmente os tipos I e III) e dividida em duas regiões distintas: a derme papilar superior e a derme reticular inferior (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; WATT; FUJIWARA, 2011). A derme papilar está localizada logo abaixo da junção dermo-epidérmica e faz projeções cônicas para cima conhecidas como papilas dérmicas. Essas projeções interdigitam com sulcos epidérmicos, aumentando a área de interface dermo-epidérmica e permitindo uma melhor aderência entre a derme e epiderme (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

A derme papilar é composta por feixes frouxamente organizados de colágeno, fibras elásticas, fibrócitos, vasos sanguíneos e terminações nervosas. A derme reticular é mais espessa do que a derme papilar, sendo formada por tecido fibroso denso que contém células, substância fundamental e fibras, além de pequenas arteríolas e vênulas, pequenos nervos, folículos sebáceos (exceto as palmas das mãos e plantas dos pés) e ductos excretórios das glândulas sudoríparas (PROST-SQUARCIONI et al., 2008; VÊNUS; WATERMAN; MC NAB, 2010).

A substância fundamental é composta por polissacarídeos e proteínas que interagem para produzir proteoglicanos higroscópico, estes formam géis com poros de tamanho variável, que atuam como filtros que regulam a passagem de moléculas através do espaço extracelular; fixam fatores tróficos, permitem a formação de gradientes de moléculas quimiotáticas, e absorvem moléculas-sinal para uma diversidade de funções celulares, bloqueiam e estimulam ou guiam a migração e dispersão celular através da matriz extracelular (ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN, 2014). As células em maior número são os fibroblastos - células fusiformes com prolongamentos citoplasmáticos longos, derivados de células mesenquimais multipotentes, que estão intimamente ligadas às fibras responsáveis pela arquitetura dérmica e resiliência. Formam uma população de células heterogêneas, que desempenha um importante papel na deposição de componentes da matriz extracelular (MEC), incluindo colágenos, elastina, glicoproteínas, tais como a fibronectina, e glicosaminoglicanos (MCANULTY, 2007; LI; WANG, 2011). Os fibroblastos são capazes de organizar uma complexa rede de MEC, que fornece a pele sua propriedade de retenção de água e notáveis propriedades biomecânicas (LI; WANG, 2011). Assim como outros tipos de células presentes na pele (queratinócitos, células endoteliais, macrófagos), os fibroblastos também segregam metaloproteinases de matriz (MMPs), tais como collagenases e seus inibidores naturais, os inibidores de tecidos de metaloproteinases (TIMPs). Combinado com a síntese de

MEC, o equilíbrio entre estas proteases e seus inibidores regula as propriedades mecânicas da pele, a remodelação da MEC da pele intacta e também em feridas ou na pele envelhecida e danificada (VEDRENNE et al., 2012).

Seguindo os sinais de lesões internas ou externas, os fibroblastos da pele podem adquirir um fenótipo miofibroblástico, no qual essas células podem contrair-se de uma maneira semelhante ao músculo liso, proporcionando, assim, propriedades migratórias e contrácteis máximas que são críticas para a cicatrização de feridas, reparação e "firmeza" da pele envelhecida e/ou foto exposta. Os miofibroblastos começam a aparecer na fase inicial da formação do tecido de granulação, se tornam mais abundantes na fase de proliferação de cicatrização de feridas, e desaparecem progressivamente na fase posterior de cura, possivelmente através de um mecanismo apoptótico (MCANULTY, 2007; CASTELA; GABBIANT, 2010; LI; WANG, 2011; VEDRENNE et al. 2012).

Considerando que as membranas basais formam uma camada densa de malha proteica plana subjacente à ancoragem de células epiteliais e endoteliais, o tecido conjuntivo intersticial consiste de uma malha de proteína 3D de textura e composição heterogêneas. O principal componente da MEC de tecidos intersticiais é o colágeno fibrilar tipo I que forma até 90% do teor de proteína dos tecidos conjuntivos, sua estabilidade física é mediada principalmente por fibrilas de colágeno, que são mecanicamente estáveis e proporcionam uma estrutura de suporte para que outras proteínas de MEC tais como fibronectina e glicosaminoglicanos se conectem (WOLF et al., 2009).

O colágeno do tipo I é uma molécula em forma de bastonete com um comprimento de aproximadamente 300 nm e um diâmetro cerca de 1,5 nm. É composto por três cadeias polipeptídicas (por vezes chamados cadeias α), contendo cada uma um pouco mais de 1000 aminoácidos; existem duas cadeias α_1 e uma cadeia α_2 . Toda a molécula é composta por um domínio N-telopéptido, no início, um domínio de tripla hélice e um domínio C-telopéptido no final (KWANSA; VITA; FREEMAN, 2013). Estas proteínas têm como função principal servir como um arcabouço estrutural na formação de tecidos, servindo de molde para que os tecidos cresçam (WOLF et al., 2009).

As demais células que compõe a derme são os fibrócitos, fibroblastos quiescentes desprovidos de atividade metabólica, com atividade fagocítica para colágeno. Os mastócitos que se originam a partir da medula óssea e são distribuídos em torno dos vasos sanguíneos e das estruturas anexas da derme papilar. E ainda os dendrócitos dérmicos representam uma população heterogênea de células dendríticas mesenquimais e podem agir como fagócitos e células apresentadoras de antígenos (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

2.2. Cicatrização

Os objetivos primários do tratamento de feridas são o seu fechamento rápido e uma cicatriz funcional e esteticamente satisfatória (MENDONÇA; COUTINHO, 2009; MAYET et al., 2014). Desde o momento da lesão, até o tecido atingir a sua configuração final, sob a forma de uma cicatriz madura, meses ou mesmo anos, pode decorrer. No entanto, a função de proteção da pele tem de recomeçar imediatamente para evitar a desidratação, infecção, e a perda da integridade do tecido, por conseguinte, a fase inicial de cura demora apenas alguns minutos (BUGANZA; KUHL, 2013).

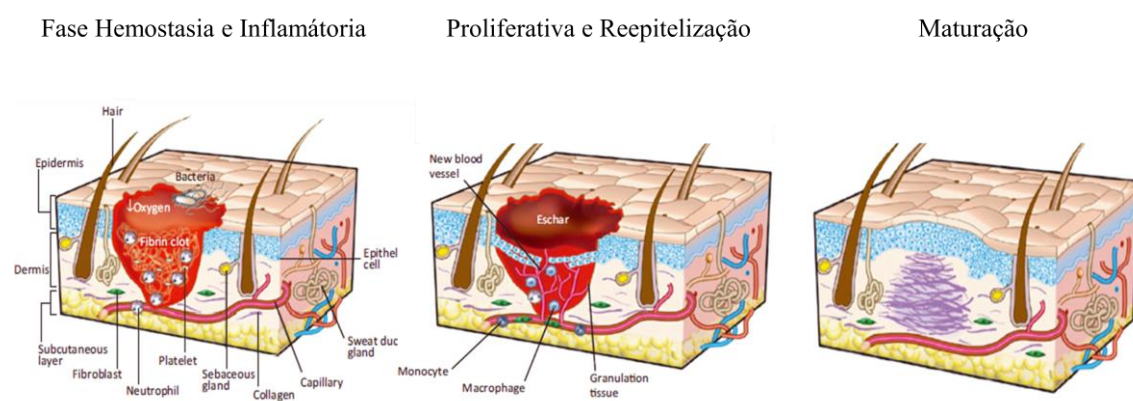
A reparação da ferida é realizada tanto por regeneração espontânea do tecido dérmico quanto por meio de reparação do tecido conjuntivo, ambos ocorrem independentemente de como a lesão tenha ocorrido e independente do tamanho da lesão se é confinada a trauma de tecidos moles ou uma ferida cirúrgica. O modo de reparação é decidido em primeiro lugar pela profundidade do tecido envolvido, em ferimentos leves, envolvendo a epiderme, a regeneração do tecido profundo é rápida, com reepitelização finalizada em torno de 7-10 dias, no entanto, em feridas que envolvem a perda de tecido dérmico e anexos da pele, tais como folículos capilares, glândulas sebáceas e etc., a reepitelização e, portanto, a regeneração não pode ocorrer, por conseguinte, o corpo baseia-se na formação de tecido conjuntivo para preencher o déficit da ferida (BELDON, 2010).

A cicatrização de feridas por intenção primária envolve a estreita aproximação das bordas da ferida de uma laceração ou ferida cirúrgica por suturas, grampos ou adesivo de pele. Já a cicatrização de feridas por segunda intenção ocorre quando as bordas da ferida não podem ser aproximadas, apresentando o leito aberto e o defeito

posteriormente seria lentamente preenchido pelo tecido conjuntivo. Tais feridas demoram a cicatrizar e são propensas a complicações como infecção. Normalmente, este tipo de cicatrização de feridas ocorre em pacientes com morbidades subjacentes (por exemplo, vascular, úlceras diabéticas ou úlceras de pressão) ou em pacientes com pós-deiscência da ferida cirúrgica (muitas vezes devido à infecção, hematoma ou tensão mecânica) (GUO; DIOIETRO, 2010; BELDON, 2010; YOUNG; MCNAUGHT, 2011).

O processo de cicatrização é composto de uma série de estágios complexos, interdependentes e simultâneos, que são descritos em fases (SAMPAIO et al., 2013). Independentemente da etiologia da lesão, os processos de reparação são semelhantes, portanto uma ferida que resulta em dano tecidual, estimula uma resposta fisiológica coordenada em fases consecutivas para fornecer hemostasia e iniciar os processos de inflamação, proliferação e remodelação da MEC (Figura 2) (YOUNG; NAUGHT, 2011; AMAR; WU, 2014).

Figura 2. Evolução do processo cicatricial.



Fonte: Modificado de Mayet et al., 2014.

2.2.1. Classificação dos processos biológicos da cicatrização

2.2.1.1. Hemostasia: Imediatamente após a lesão, o sistema imune inato é ativado, colocando em movimento uma resposta inflamatória local em que o organismo tem de gerir o recrutamento de muitas células e fatores para o processo de cicatrização e ausência da resistência mecânica da ferida. Esta resposta rápida começa com o extravasamento sanguíneo que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea

geram um tampão, rico em fibrina, que além de restabelecer a hemostasia e formar uma barreira contra a invasão de microrganismos, organiza uma matriz provisória necessária para a migração dos leucócitos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, além de servirem como um reservatório de citocinas e fatores de crescimento que serão liberados durante as fases seguintes do processo cicatricial (MENDONÇA; COUTINHO, 2009; KOH; DIPIETRO, 2011; REINKE; SORG, 2012).

No início da cicatrização, o fluxo sanguíneo reduzido rapidamente mediado pela constrição da arteríola leva à hipóxia tecidual e acidose. Isto promove a produção de óxido nítrico, adenosina e outros metabolitos vasoativos para provocar um reflexo de vasodilatação e relaxamento dos vasos arteriais. Ao mesmo tempo, a libertação de histamina a partir de mastócitos atua também para aumentar a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, o que facilita a entrada de células inflamatórias para o espaço extracelular em torno da ferida. Isso explica a aparência característica quente, vermelha e túrgida dos primeiros momentos após a lesão (WILD et al., 2010; YOUNG; NAUGHT, 2011).

As plaquetas, essenciais à formação desse tampão hemostático, também secretam múltiplos mediadores incluindo fatores de crescimento liberados na área lesada. Induzidas pela trombina, ainda sofrem a degranulação plaquetária e liberam vários fatores de crescimento, como o derivado de plaquetas (PDGF), o de crescimento transformante- β (TGF- β), o de crescimento epidérmico (EGF), o de crescimento transformante- α (TGF- α) e o fator de crescimento de células endoteliais (VEGF), além de glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospondina, que são importantes constituintes da matriz extracelular provisória. Mais ainda, a ativação da cascata de coagulação e do complemento, juntamente com a liberação dos fatores de crescimento e ativação de células parenquimatosas pela lesão, produz numerosos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos que auxiliam o recrutamento das células inflamatórias no local da ferida (ISAAC et al., 2010; GUO; DIPIETRO, 2010; BELDON, 2010; YOUNG; NAUGHT, 2011; MAYET et al., 2014; HU et al., 2014).

2.2.1.2. Fase Inflamatória: O objetivo principal desta etapa da cicatrização de feridas é prevenir a infecção. Nesta fase, ocorrerá, primeiramente, a migração de neutrófilos dos vasos sanguíneos para a ferida, que será mediada pela ligação a selectinas super-expressas de endotélio ativado. Este tecido teve sua fisiologia alterada

por IL-1 (interleucina-1) e TNF- α (fator de necrose tumoral- α), ambos secretados por macrófagos e pelo próprio endotélio, sendo que a primeira citocina também é expressa por queratinócitos (YOUNG; MCNAUGHT, 2011).

Posteriormente, monócitos se infiltrarão em resposta a estímulos semelhantes aos de neutrófilos, e se diferenciarão em macrófagos sob o estímulo de substâncias como o IFN- γ (interferon- γ), estas últimas células desempenham múltiplos papéis na cicatrização. No início da lesão, os macrófagos liberam citocinas que promovem a resposta inflamatória, recrutando e ativando leucócitos adicionais, que são responsáveis também por induzir e remover as células em apoptose (incluindo neutrófilos), abrindo assim o caminho para a resolução da inflamação. Visando degradar elementos da matriz extracelular e tecido necrótico para facilitar a migração celular no leito cruento, neutrófilos e macrófagos utilizam, além da fagocitose, metaloproteinases (proteinases de elementos da matriz). Sendo assim, os macrófagos sofrem uma transição para um estado fenotípico reparador que estimulam queratinócitos, fibroblastos e endotélio para promover a regeneração do tecido, realizando desta forma a transição para a fase proliferativa da cicatrização (GUO; DIPIETRO, 2010; REINKE; SORG, 2012).

2.2.1.3. Fase Proliferativa: Esta fase é caracterizada por fibroplasia, angiogênese e reepitelização. Na fibroplasia ocorrerá migração e proliferação de fibroblastos que são estimulados pelo fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e fator de crescimento tumoral- β a partir de macrófagos e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), a partir de plaquetas. Na primeira semana, os fibroblastos produzem glicosaminoglicanos (ácido hialurônico), proteoglicanos e colágeno; estes produtos são as principais substâncias extracelulares do tecido de granulação. A síntese de colágeno, para formar uma nova MEC é um processo multicamadas em que inicialmente, os chamados ‘colágeno III’ compreendem cerca de 30% de tecido de granulação e não contribui para a resistência à tração da ferida, posteriormente este colágeno amadurece e é convertido em ‘colágeno I’, normalmente encontrado no tecido dérmico adulto (BELDON, 2010; WILD et al., 2010).

As células epiteliais utilizam-se da matriz provisória como um substrato para a reepitelização e continuam a migrar para o interior a partir da borda da ferida até que o leito defeituoso seja coberto, neste ponto, a inibição de contato induz a transformação de fibroblastos em miofibroblastos (tipo de célula intermédia entre os fibroblastos e as

células do músculo liso) que contêm fibras de actina contrácteis que se ligam às fibras de colágeno puxando-as em direção a eles, sendo este fenômeno responsável pela contração da ferida e estimulado por TGF- β e PDGF. Simultaneamente, as células endoteliais também produzem metaloproteinase (MMP), enzimas de degradação da matriz extracelular adjacente para criar defeitos do tecido no qual os vasos capilares infiltram-se para formar uma rede a partir da qual irá surgir à formação de arteríolas, e assim a vascularização é restaurada. Este processo de angiogênese também é interdependente da produção de uma nova MEC, que atua como uma estrutura de suporte para apoiar os vasos sanguíneos recentemente formados (MAYET et al., 2014; BIELEFELD; AMINI; ALMAN, 2013; LI; WANG, 2011).

2.2.1.4. Fase de Remodelação: Esta é a última fase do processo de cicatrização e é responsável pelo aumento da resistência do leito danificado, durante o qual os fibroblastos regulam o processo de degradação da matriz da ferida através das metaloproteinases de matriz (MMPs) e a síntese de nova matriz extracelular com o objetivo de remodelá-la para uma arquitetura que se aproxime do tecido normal, característica essencial da fase de remodelação. Nesta fase, a regressão de muitos dos capilares recém-formados também ocorre, de modo que a densidade vascular da ferida possa voltar ao normal. Como a remodelação continua, as metaloproteinases de matriz colagenólise atingem um estado de equilíbrio com a síntese de colágeno. Ao final da primeira semana após o surgimento da ferida, ocorre restauração de 3% da resistência da pele íntegra; ao final da terceira semana, 30%, e de três meses, 80%. Isto reflete uma diminuição da deposição de colágeno, do número de ligações cruzadas feitas entre seus monômeros e da mudança do tipo III para o I. Em cerca de um ano ou mais, a relação entre o colágeno I e III atinge proporção semelhante a anterior à ferida, entretanto a ferida nunca atingirá 100% de sua resistência fisiológica (BELDON, 2010; GUO; DIPIETRO, 2010; WILD et al., 2010; BIELEFELD; AMINI; ALMAN, 2013; MAYET et al., 2014; AMAR; WU, 2014).

Tabela 1: Citocinas envolvidas no processo de cicatrização, seus efeitos biológicos e células produtoras.

Citocinas	Células produtoras	Efeito biológico
IL-1 (interleucina-1)	Macrófagos, Endotélio, Queratinócitos	Super-expressão de selectinas no endotélio e aumento da síntese de NOSi.
IL-8 (interleucina-8)	Macrófagos, Fibroblastos	Quimioatraente para polimorfonucleares e macrófagos.
IFN- γ (interferon gama)	Macrófagos	Diferenciação de monócitos em macrófagos e ativação destes; aumento da síntese de NOSi.
TNF- α (fator de necrose tumoral alfa)	Macrófagos, Endotélio	Super-expressão de selectinas no endotélio, aumento da síntese de NOSi e supra-regulação de integrinas.
EGF (fator de crescimento epidérmico)	Plaquetas, Macrófagos	Quimiotaxia e proliferação de fibroblastos; proliferação e quimioatração de queratinócitos.
FGF (fator de crescimento dos fibroblastos)	Macrófagos, Endotélio, Fibroblastos	Quimiotaxia e proliferação de fibroblastos e queratinócitos; potente fator angiogênico.
KGF (fator de crescimento dos queratinócitos)	Fibroblastos	Quimiotaxia e proliferação de queratinócitos.
HGF (fator de crescimento dos hepatócitos)	Células Mesenquimais	Quimiotaxia e proliferação de queratinócitos.
VEGF (fator de crescimento vascular endotelial)	Macrófagos, Queratinócitos	Potente fator angiogênico.
PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas)	Plaquetas, Macrófagos, Endotélio, Queratinócitos	Quimiotaxia de polimorfonucleares; proliferação de fibroblastos e diferenciação para miofibroblasto; degradação do colágeno I e síntese do III.
TGF- β (fator transformador do crescimento beta)	Plaquetas, Macrófagos, Endotélio, Queratinócitos, Fibroblasto	Quimiotaxia de polimorfonucleares; síntese de NOSi; proliferação de fibroblastos e diferenciação para miofibroblasto; degradação do colágeno III e síntese do I; fator angiogênico.

Fontes: BROUGHTON, JANIS et al., 2006; TOWNSEND, BEAUCHAMP et al., 2011; GURTNER, WERNER et al., 2008; LI, CHEN et al., 2007

2.3. Lectinas

Lectinas são proteínas de origem não imune, aglutinantes de células e glicoconjugados, com um domínio não catalítico de reconhecimento seletivo e reversível a carboidratos e substâncias contendo açúcares. O domínio não catalítico, também é responsável pela precipitação de polissacarídeos e glicoconjugados através dos glicanos livres ou açúcares em glicoproteínas e glicolípidos, sem alterar a estrutura de hidratos de carbono. São proteínas amplamente distribuídas na natureza, em microrganismos, plantas, animais e seres humanos, agindo como mediadores de uma ampla gama de eventos biológicos que envolvem o passo crucial no reconhecimento proteína-carboidrato, como por exemplo, na comunicação celular, na defesa do

hospedeiro, na fertilização, no desenvolvimento de células, em infecções parasitárias, na metástase tumoral, inibição da formação de biofilmes da placa dentária, inflamação, entre outros. (SILVA et al., 2014; CAVALCANTE et al., 2013; MARTINS; SILVEIRA; CAVALTI, 2012; LI; WANG, 2011; LAM; NG, 2010; MACIEL; ARAÚJO; NAKAZAWA, 2004).

No reino das plantas, as sementes têm sido conhecidas por serem uma fonte rica de lectinas, compreendendo até 10% do conteúdo total de proteína. Por isso, as lectinas de plantas são os elementos mais exaustivamente investigados, especialmente os extraídos de membros da família Leguminosae. Lectinas de leguminosas são um grande grupo de proteínas que partilham um elevado grau de semelhança estrutural com as especificidades a carboidratos distintos. A subtribo Diocleinae (Leguminosae) compreende 13 gêneros, no entanto, apenas três destes gêneros (ou seja, *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*) são considerados as principais fontes para a purificação de lectinas (TEIXEIRA et al., 2012, VAREJÃO; ALMEIDA; CICCIO, 2010; MARTINEZ et al., 2010).

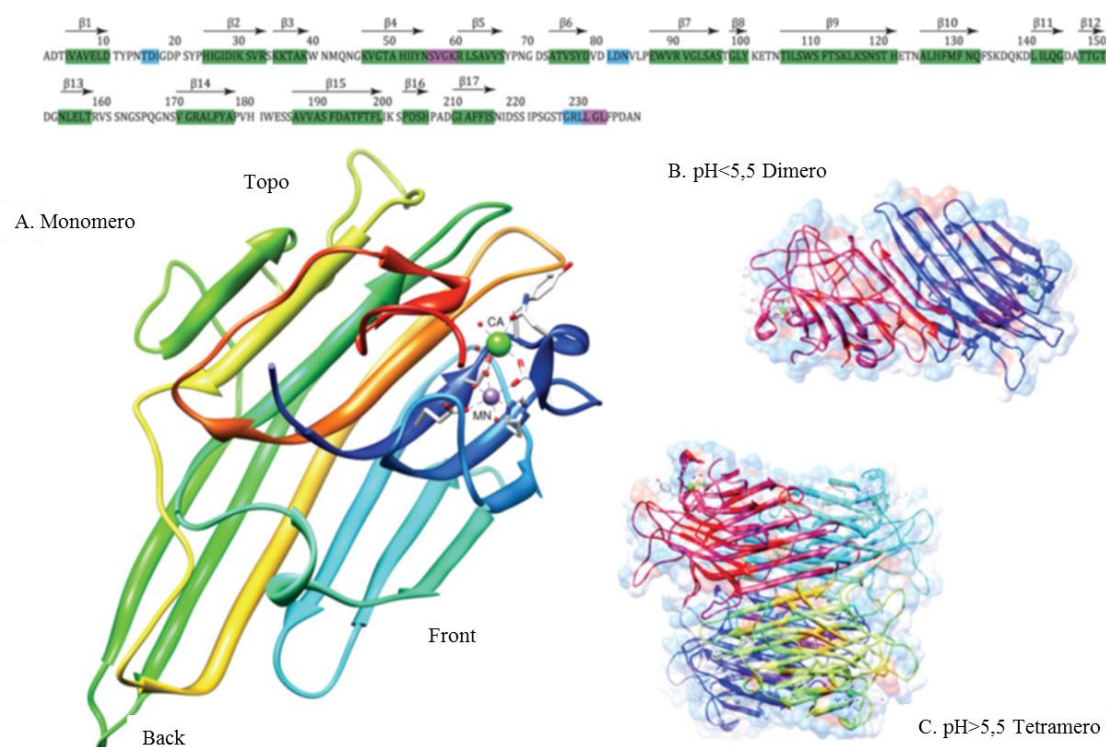
É importante destacar que o estudo de lectinas extraídas de leguminosas sempre leva em consideração suas homologias com a Concanavalina A (Con A), isolada a partir de sementes da *Canavalia ensiformis* (feijão de porco) sendo a lectina desse grupo taxonômico mais bem estudada em relação à sua estrutura e suas atividades biológicas. Grande conservação de sequência e estrutura nos domínios de reconhecimento a carboidrato e nos sítios hidrofóbicos foi constatada a partir de estudos comparativos. Devido a essa homologia, as demais lectinas dessa família são denominadas de Con A-like (ARAÚJO; VASCONCELOS; MARTINS, 2010; CAVALCANTE et al., 2013).

Historicamente a Con A começou a ser estudada em 1916 com o objetivo de isolar duas globulinas de feijão de porco. Foi a primeira lectina de legume a ser purificada e cristalizada em 1936 e mais tarde, em 1972, a estrutura principal e a estrutura tridimensional da Con A foram elucidadas (LI et al., 2010; SHARON; LIS, 2004).

As lectinas desse grupo normalmente possuem cerca de 220 a 250 resíduos de aminoácidos (cerca de 30 kDa) por monômero (o monômero maduro de Con A é composto por 237 aminoácidos), são extremamente semelhantes quanto aos aspectos estruturais e apresentam o mesmo tipo de enovelamento em relação a seus monômeros.

Esses monômeros são compostos exclusivamente de sete fitas beta “front face” e seis fitas beta “back face” interligadas por voltas e alças formando uma estrutura na forma achatada. Esse tipo de enovelamento é conhecido como “ β -sanduíche”, por ser composto de fitas betas antiparalelas (cerca de 60%). A orientação antiparalela das fitas beta e a mudança entre uma face e outra, forma uma estrutura estável, explicando em parte a extrema resistência das lectinas de leguminosas à ação de muitas enzimas. Quatro loops localizados na parte superior da estrutura tridimensional da lectina formam o sítio de ligação do monômero, onde é complexado o açúcar. Entretanto, as formas biologicamente ativas das Con A-like encontram-se di- ou tetramerizadas, fato este influenciado pelo pH do meio, $\text{pH} > 5,5$, apresentando-se como um tetrâmero, enquanto que para $\text{pH} < 5,5$, apresentam-se como dímero (Figura 3) (LI et al., 2010; LI; WANG, 2011).

Figura 3: Estruturas moleculares da Concanavalina A (Con A). (A) Estruturas primárias e secundárias da Con A; (B) Estrutura tridimensional cristalizada da Con A; (C) Estrutura quaternária da Con A.



Fonte: LI; WANG, 2011.

Seus monômeros possuem dois sítios de ligação altamente conservados para os íons divalentes Ca^{++} e Mn^{++} os quais são essenciais para estabilização da proteína e

coordenação das moléculas de carboidratos. Foi observado que a capacidade de reconhecer o açúcar depende da presença desses íons estando localizados a uma distância de aproximadamente 4.5Å um do outro, e são coordenados por cadeias laterais constituídas de oito aminoácidos e três moléculas de água (KAUSHIK; MOHANTY; SUROLIA, 2009; ABHILASH et al., 2013).

2.3.1. Lectinas e o processo inflamatório

Os carboidratos atuam como intermediários na comunicação em processos biológicos, tais como a diferenciação, proliferação e certas interações célula-célula que são crucialmente importantes em ambos os fenômenos fisiológicos e patológicos (SACCHETTINI, BAUM, BREWER, 2001; DI LELLA et al., 2011). A informação contida na enorme variedade de estruturas de oligossacáridos normalmente conjugados com lípidos ou proteínas na superfície de células (glicocódigos) é reconhecida e decifrada por um grupo especializado de proteínas estruturalmente diverso, as lectinas (DI LELLA et al., 2011).

No sistema imunitário, duas fases de atividade podem ser claramente demonstradas: a resposta imune inata e a resposta imunitária adaptativa. Na primeira, existe a atividade de células e citocinas de uma forma não específica, com o principal objetivo de aniquilar rapidamente os agentes danificadores de locais. Nesta fase, destacam-se os neutrófilos, eosinófilos, basófilos e macrófagos, células com atividades bem estabelecidas, mas com a função comum de produção e liberação de citocinas. Estas citocinas são moléculas com várias funções no processo inflamatório, tal como quimiotaxia, ativação de certos grupos de células e aumento da perfusão tecidual (RODRÍGUEZ; LÓPEZ-VÁZQUEZ; LÓPEZ-LARREA, 2012).

Por outro lado, a resposta imune adaptativa é composta por outro conjunto de células que atua de forma mais específica, os linfócitos. Essas células são responsáveis pela produção de anticorpos específicos para determinados microrganismos invasores e da ativação de mecanismos de apoptose em células anormais (DANESE; FIOCCHI, 2011).

A utilização de plantas como material para o tratamento de feridas é bem conhecida e amplamente utilizado, sendo assim, pCramoll (lectina 82% homologa à ConA) demonstrou elevada atividade cicatrizante (SILVA, et al, 2014). É de especial

interesse científico a utilização de moléculas capazes de induzir o recrutamento de células, bem como das citocinas, produção e proliferação de linfócitos (TEIXEIRA et al., 2012).

Um estudo pioneiro investigou os efeitos da pCramoll no tratamento de feridas cutâneas utilizando ratos normais e imunocomprometidos. Foi realizada administração tópica diária de pCramoll (100 L a 100 g / ml) que resultou na reparação das lesões experimentais, onde estas apresentaram maior edema, aumento da infiltração de células polimorfonucleares, maior intensidade de tecido de granulação e deposição de fibras de colágeno (MELO , PORTO, MELO et al., 2011).

Posteriormente um segundo estudo foi desenhado para avaliar a ação de um hidrogel contendo pCramoll no tratamento de queimaduras de segundo grau em ratos e obtiveram reepitelização, aceleração da granulação, processo de reepitelização e retração de feridas. Foi relatado pelos autores que o tratamento não provocou alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos. (PEREIRA, RIBEIRO et al., 2012).

Oliveira et al. (2011) demonstraram a atividade imunomoduladora de ConBr, uma lectina isolada a partir de sementes de *Canavalia brasiliensis*. Os ensaios mostraram que ConBr foi capaz de induzir a proliferação *in vitro* de esplenócitos com o mínimo de danos para a estrutura celular. Além disso, ConBr aumentou a produção de citocinas, tais como IL-2, IL-6 e a produção de IFN- γ e diminuição da IL-10. Estes resultados indicam o efeito imunomodulador potencial desta lectina em conjunto com a função intrínseca de carboidratos na comunicação intercelular relacionada com o processo inflamatório.

Em relação à atividade de lectinas em linfócitos, Melo et al. (2010) avaliou o efeito da lectina Cramoll 1,4, extraída de sementes de *Cratylia mollis* Mart., em culturas de linfócitos de ratos. Neste estudo, os aspectos diretamente relacionados com a inflamação, como a produção de citocinas, e a citotoxicidade celular de produção de óxido nítrico (NO) foram avaliados. Cramoll 1,4 não demonstrou citotoxicidade às concentrações testadas, em adição, foi capaz de induzir o IFN- γ e mostrou uma atividade anti-inflamatória através da supressão da produção de NO. Ademais, as lectinas exercem um efeito imunoestimulante em quantidades baixas e um efeito citotóxico para concentrações mais elevadas (MARTINS; CALEY; O'TOOLE, 2012).

A função biológica dos carboidratos em eventos de inflamação é bem definida. Neste contexto, as proteínas que se ligam especificamente a tais glicanos são de grande interesse devido às suas possíveis funções e aplicações em estudos biotecnológicos (TEIXEIRA et al., 2012).

2.4. Fototerapia

O laser é uma forma de amplificação da luz por emissão estimulada de radiação; o termo originou-se da abreviação: Light amplification by stimulated emission of radiation, (SANTUZZI et al., 2011). Lasers terapêuticos estão identificados e diferenciados dos lasers cirúrgicos por diferentes nomes incluindo suave, frio, fototerapia, fotobiomodulação, terapia laser de baixa intensidade (LTBI) ou laser terapia de baixa potencia (LTBP) envolvem a aplicação de luz (geralmente luz laser de um comprimento de onda específico ou um diodo emissor de luz) para estimular os processos celulares (MAGHRABY et al., 2013; HOURELD, 2014).

Lasers terapêuticos (ou de baixa potência) são utilizados para o tratamento de lesões de tecidos moles e duros e são classificados como classe III dos dispositivos médicos. Sistemas de laser utilizados para bioestimulação incluem Argônio, HeNe, gálio-alumínio, Nd: YAG, e o gálio-alumínio- arsenieto (GaAlAs) lasers de diodo (MAGHRABY; ROUBY; SAAFAN, 2013). Os efeitos da fototerapia são químicos e não térmicos. A energia que é entregue a células produz mudanças de temperatura insignificantes e mínimas, tipicamente na gama de 0,1-0,5 ° C, sendo o poder tão baixo que não há quebra de biomoléculas nem desnaturação de proteínas. (HSU et al., 2010; HOURELD, 2014).

A premissa básica desta terapia, é que feixes luminosos com longos comprimentos de onda estimulam o metabolismo e produção de energia celular. Os lasers de baixa intensidade utilizados na prática clínica para o tratamento de condições dermatológicas localizam-se no espectro eletromagnético visível entre 400 a 770 nm, sendo que três grandes moléculas foto-aceptoras em tecidos de mamíferos são conhecidas por absorver a luz na faixa do vermelho e infravermelho próximo (NIR): hemoglobina, mioglobina e citocromo-c oxidase.

Dos três, apenas o citocromo-c oxidase tem sido associado com a produção de energia (RILEY; LIANG; EELLS, 2005; MITCHELL; JOHNSON; MYRER, 2012). Os foto-aceptores participam do metabolismo celular e não estão ligados a uma resposta luminosa, tais como a clorofila que é um fotorreceptor dependente da luz. Uma vez que a energia dos fótons é absorvida, o foto-aceptor assume um estado eletronicamente excitado, que por sua vez estimula o metabolismo celular, através da ativação ou desativação de enzimas que alteram outras macromoléculas, tais como DNA e RNA (HASHMI et al., 2010; AVCI et al., 2013; FARFARA et al., 2015; CHEN et al., 2014). A energia que é absorvida pelo foto-aceptor pode ser transferida para outras moléculas que provocam reações químicas no tecido circundante; este, em seguida, dá origem a efeitos observáveis a nível biológico. A energia do fóton é absorvida pelos cromóforos causando um aumento do trifosfato de adenosina (ATP) e da permeabilidade da membrana celular, o que conduz à ativação de mensageiros secundários, que por sua vez ativam uma cascata de sinais intracelulares; há também um aumento no potencial de membrana mitocondrial e um gradiente dos canais da membrana (HOURELD, 2014).

A laserterapia de baixa intensidade tem se mostrado uma alternativa anti-inflamatória com efeitos semelhantes aos observados na terapia com anti-inflamatórios não-esteroidais, inibindo e/ou diminuindo a concentração de prostaglandina ES2 (PGE2), ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e histamina. Dessa forma a laserterapia pode ser capaz de modular a inflamação em vários tecidos e apresenta vantagens como método não invasivo, não farmacológico, e com baixo índice de efeitos colaterais (PIVA et al., 2011).

2.5. Proteômica

A proteômica é um campo da pesquisa que surgiu para complementar a genômica (BUHIMSCHI; BUHIMSCHI, 2010). É uma fonte particularmente rica fonte de informação biológica, pois as proteínas estão envolvidas em quase todas as atividades biológicas e também possuem diversas propriedades que contribuem coletivamente para a compreensão de sistemas biológicos (PATTERSON; AEBERSOLD, 2003). Sendo assim, o proteoma não é apenas a soma dos produtos traduzidos a partir das sequências genômicas, mas inclui também proteínas resultantes de processos pós-transcricionais e pós-traducionais, bem como complexos formados por essas biomoléculas. Além de sua grande complexidade, o proteoma é dinâmico e seu

perfil se altera de acordo com a condição fisiológica e as fases da diferenciação celular. Algumas estimativas sugerem que mais de um milhão de diferentes tipos de proteínas estão presentes nas células, tecidos e fluidos corporais em condições e/ou momentos distintos. O termo proteômica refere-se ao estudo do conjunto dessas moléculas, que são responsáveis direta ou indiretamente pelo controle de todos ou quase todos os processos biológicos (BARBOSA; VIDOTTO; POLACHINI, 2012).

Os principais objetivos da proteômica vão além da simples catalogação das proteínas que as células expressam em estados de saúde e doença. O objetivo final é elucidar a organização e dinâmica metabólica, sinalização e redes de regulação por meio do qual a vida da célula é transacionada. Além disso, a proteômica procura entender como essas redes se tornam disfuncionais na doença, e para prever como a sua função pode ser manipulado através de intervenções, tais como drogas e manipulações genéticas (LEIGH; ALASTAIR; STEINER, 2000).

A proteômica abrange três principais áreas: 1) proteômica estrutural - caracterização de proteínas, incluindo modificações pós-traducionais; 2) proteômica comparativa - comparação da expressão proteica entre dois estados fisiológicos; 3) interação proteína-proteína usando técnicas como espectrometria de massas e ferramentas de bioinformática (PANDEY; MANN, 2000; FLOWLER et al., 2002).

A separação de proteínas a partir de misturas complexas de proteínas é possível através de uma série de tecnologias de alta capacidade. Algumas destas técnicas experimentais fazem uso de propriedades intrínsecas das proteínas (BUHIMSCHI; BUHIMSCHI, 2010). As mais importantes incluem, a separação de proteínas de alta qualidade em duas dimensões, a caracterização de proteínas separadas por espectrometria de massa, e a mineração de informações usando ferramentas em bioinformática (DHINGRA et al., 2005).

A tecnologia mais comumente utilizada para a análise de variabilidade entre as amostras de proteína é o método de eletroforese em gel bidimensional (2DE), que separa as proteínas (> 10 kDa) de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM) (SIWY et al., 2011). As amostras são desnaturadas, processadas, e separadas de acordo com os seus pontos isoelétricos, posteriormente esta mistura é separada numa matriz de gel de acordo com o peso molecular. Pontos individuais (spots) de proteínas são então corados e as proteínas detectadas são cortadas e digeridas

em fragmentos que serão analisados por espectrometria de massa de alta resolução (PIERCE et al., 2007).

Fundamentalmente, um espectrômetro de massa (MS) é usado para medir os índices da razão massa-carga (m/z) de íons, uma métrica a partir da qual podemos determinar o peso molecular (YATES, 2011). Este processo envolve três passos: Em primeiro lugar, as moléculas devem ser convertidas em íons e lançados em fase gasosa, o que coloca um desafio considerável para moléculas em fase sólida ou líquida. Em seguida, os íons são separados por seus valores m/z via campos elétricos ou magnéticos em um analisador de massa. Finalmente, os íons são separados e a abundância de cada espécie com um determinado valor m/z são detectados (YATES, 2011). Para este processo, O MS possui fonte de ionização, como o MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) ou o ESI (Electro Spray Ionization) (HOFFMANN; STROOBANT, 2007), e um analisador de massas Time-of-flight (TOF), Quadrupole ou Ion Trap, que podem ou não estar associados em série para uma melhor separação e análise das proteínas (YATES et al., 2009). Com isso são obtidos espectros de massa típicos de uma determinada proteína ou peptídeo, determinando a sequência dos aminoácidos através do sequenciamento de novo ou compara os dados de massas obtidos nos espectros (Peptide Mass Fingerprinting - PMF) com base de dados de proteínas conhecidas, a fim de identifica-las (YATES et al., 2009).

A nível molecular, a compreensão das funções fisiológicas essenciais da pele, e em particular as alterações qualitativas e quantitativas do proteoma induzido pela exposição a biomoléculas e à luz laser em lesões cutâneas, está incompleta.

Progressos recentes no sequenciamento do genoma apresentaram impacto significativo nas pesquisas científicas, porém, muito pouco se obteve em relação à informação dos produtos dos genes, as proteínas. A proteômica é a ciência que estuda o conjunto de proteínas codificadas pelo genoma, sendo assim, a análise das proteínas se faz necessária, pois o estudo genômico não refletiria a estrutura dinâmica das proteínas, onde os processos da ferida inicialmente ocorrem.

3. Referências Bibliográficas

1. ABHILASH, J.; DILEEP, K. V.; PALANIMUTHU, M. Metal ions in sugar binding, sugar specificity and structural stability of *Spatholobus parviflorus* seed lectin. **Journal of Molecular Modeling**. v. 19, p. 3271-3278, 2013.
2. AMAR, M. B.; WU, M. Re-epithelialization: advancing epithelium frontier during wound healing. **Journal of the Royal Society Interface**. v. 11, n. 93 (20131038) p. 1-7, 2014.
3. ARAÚJO, F. J. H.; VASCONCELOS, I. M.; MARTINS, M. A. S. A Con A-like lectin from *Dioclea guianensis* Benth. has antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*, unlike its homologues, ConM and Con A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p. 4090-4096, 2010.
4. ARDA, O.; GÖKSÜGÜR, N.; TÜZÜN, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clinics in Dermatology**. v. 32, p. 3-13, 2014.
5. AVCI, P. et al. Low-level laser therapy for fat layer reduction: A comprehensive review. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 45, p. 349-357, 2013.
6. BAH, C. S. F.; FANG, E. F.; NG, T. B. Medicinal Applications of Plant Lectins. In: FANG, E. F.; NG, T. B. **Antitumor Potential and other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds**. 1ed. Springer, 2013. Cap.5, p. 55-74.
7. BALD, T. et al. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiotropism and metastasis in melanoma. **Nature**. v. 507, p. 109-113, 2014.
8. BARBOSA, E. B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G. M. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 58, p. 366-375, 2012.
9. BELDON, P. Basic science of wound healing. **Surgery**. v. 28, p. 409-412, 2010.
10. BIELEFELD, K. A.; AMINI, N. S.; ALMAN, B. A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. **Cellular and Molecular**

- Life Sciences.** v. 70, p. 2059-2081, 2013.
11. BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** v. 10, p. 207-217, 2009.
 12. BROUGHTON G.; JANIS J.E.; ATTINGER C.E. The basic science of wound of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery.** v. 117, p. 12-34, 2006.
 13. BUGANZA, A. T.; KUHL, E. Systems-based approaches toward wound healing. **Pediatric Research.** v. 73, p. 553-563, 2013.
 14. BUHIMSCHI, I. A.; BUHIMSCHI, C. S. The role of proteomics in the diagnosis of chorioamnionitis and early-onset neonatal sepsis. **Clinics in Perinatology.** v. 37, p. 355-374, 2010.
 15. BUSTEIN V. P. et al. A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. **Inflammopharmacology.** v. 20, n. 6, p. 315-322, 2012.
 16. CASTELLA, L. F.; GABBIANI, G. Regulation of myofibroblast activities: Calcium pulls some strings behind the scene. **Experimental Cell Research.** v. 316, p. 2390-2401, 2010.
 17. CAVALCANTE, T. T. A. et al., A Con A-like lectin isolated from *Canavalia maritima* seeds alters the expression of genes related to virulence and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **Advances in Bioscience and Biotechnology.** v. 4, p. 1073-1078, 2013.
 18. CHEN, M. H. et al. Second messengers mediating the proliferation and collagen synthesis of tenocytes induced by low-level laser irradiation. **Lasers in Medical Science.** v. 30, p. 263-272, 2014.
 19. CHOI, H. et al. Regulation of pigmentation by substrate elasticity in normal human melanocytes and melanotic MNT1 human melanoma cells. **Experimental Dermatolog.** v. 23, p. 172–177, 2014.
 20. CHOPIN, M.; NUTT, S.L. Establishing and maintaining the Langerhans cell network. **Seminars in Cell & Developmental Biology.** 2014

<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2014.02.001>.

21. DANESE, S.; FIOCCHI, C. Ulcerative Colitis. **The New England Journal of Medicine**. v. 365, p. 1713-1725, 2011.
22. De Melo CM, Porto CS, Melo-Ju'nior MR et al. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **Int J Pharm** 15:113–119, 2011.
23. DHINGRA, V. et al. New frontiers in proteomics research: A perspective. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 299, p. 1-18, 2005.
24. DUBOIS, B. et al. Regulation of gelatinase B (MMP-9) in leukocytes by plant lectins. **FEBS Letters**. v. 427, n. 2, p. 275–278, 1998.
25. FARFARA, D. et al. Low-Level Laser Therapy Ameliorates Disease Progression in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Journal of Molecular Neuroscience**. v. 55, p. 430–436, 2015.
26. FOWLER, S.; THOMASHOW, M. F. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. **Plant Cell**. v. 14, p. 1675-1690, 2002.
27. FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**. v. 123, p. 4195-4200, 2010.
28. GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors Affecting Wound Healing. **Critical Reviews in oral Biology & Medicine**. v. 89, p. 219-229, 2010.
29. GURTNER G.C.; WERNER S.; BARRANDON Y.; LONGAKER M.T. Wound repair and regeneration. **Nature**. v. 453, p. 314-321, 2008.
30. HASHMI, J. T. et al. Role of Low-Level Laser Therapy in Neurorehabilitation. **Physical Medicine and Rehabilitation**. v. 2, p. 292-305, 2010.
31. HOFFMANN, E.; STROOBANT V. **Mass Spectrometry: principles and applications**. 3ed. Jhon Wiley & Sons ltd, 2007, pp. 489.
32. HOURELD N. N. Shedding Light on a New Treatment for Diabetic Wound

- Healing: A Review on Phototherapy. **The Scientific World Journal**. v. 2014, p. 1-13, 2014.
33. HSU, S. et al. The Effect of Laser Preexposure on Seeding Endothelial Cells to a Biomaterial Surface. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 28, p. 37-42, 2010.
 34. HU, M. S. et al. Tissue engineering and regenerative repair in wound healing. **Annals of Biomedical Engineering**. v. 42, p. 1494-1507, 2014.
 35. IGYÁRTÓ, B. Z.; KAPLAN, D.H. Antigen presentation by Langerhans cells. **Current Opinion in Immunology**. v. 25, p. 115-119, 2013.
 36. ISAAC, C. et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**. v. 89, p. 125-131, 2010.
 37. IYOMASA, M. M. et al. Ultrastructure and Light Microscope Analysis of Intact Skin After a Varying Number of Low Level Laser Irradiations in Mice. **BioMed Research International**. v. 2014, p. 1-8, 2014.
 38. JOEY, E.; LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine**. v. 37, p. 223-226, 2009.
 39. KAUSHIK, S.; MOHANTY, D.; SUROLIA, A. The Role of Metal Ions in Substrate Recognition and Stability of Concanavalin A: A Molecular Dynamics Study. **Biophysical Journal**. v. 96, p. 21-34, 2009.
 40. KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**. v. 19, p. 229-234, 2011.
 41. KIM, H. R. et al. Induction of macrophage migration inhibitory factor in Con A-stimulated rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the P38 map kinase-dependent signaling pathway. **The Korean Journal of Internal Medicine**. v. 25, p. 317-326, 2010.
 42. KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: The role of the macrophage. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. v. 13, p. 1-13, 2011.
 43. KWANSA, A. L.; VITA, R. D.; FREEMAN, J. W. Mechanical recruitment of

- N- and C-crosslinks in collagen type I. **Matrix Biology**. v. 34, p. 161-169, 2014.
44. LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 89 n.1, p. 45-55, 2011.
45. LEIGH, N. A.; ALASTAIR, D. M.; STEINER, S. Proteomics: applications in basic and applied biology. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 11, p. 408-412, 2000.
46. LI, B.; WANG, J. H. C. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement. **Journal of Tissue Viability**. v. 20, p. 108-120, 2011.
47. LI, C.Y. et al. Concanavalin A, from an old protein to novel candidate anti-neoplastic drug. **Current molecular pharmacology**. v. 3, p. 123-128, 2010.
48. LI, W. W. et al. Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 414, n. 2, p. 282-286, 2011.
49. LI J.; CHEN J.; KIRSNER R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**. v.25, p.9-18.
50. LIPOVSKY A. et al. Low-level visible light (LLVL) irradiation promotes proliferation of mesenchymal stem cells. **Lasers in Medical Science**. v. 28, n. 4, p. 1113-1117, 2012.
51. LUCARZ, A.; BRAND, G. Current considerations about Merkel cells. **European Journal of Cell Biology**. v. 86, p. 243-251, 2007.
52. MACIEL, E. V. M.; ARAÚJO, V. S.; NAKAZAWA, M. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**. v. 32, p. 57-60, 2004.
53. MAGHRABY, E. M. F.; ROUBY, D. H.; SAAFAN, A. M. Assessment of the effect of low-energy diode laser irradiation on gamma irradiated rats' mandibles. **Archives of Oral Biology**. v. 58, n. 7, p. 796–805, 2013.
54. MARTINEZ, R. A. F. et al. The role of plant lectins in câncer treatment. In:

- VAZQUEZ, C. M. et al. **New Approaches in the Treatment of Cancer**. 1ed. Nova Science Publishers, Inc, 2010, Cap 4, p. 71-89.
55. MARTINS, G. V. F.; SILVEIRA, A. L.; CAVALCANTI, B. C. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**. v. 26, p. 1161-1169, 2012.
 56. MARTINS, V. L., CALEY, M., O'TOOLE, E. A. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. **Cell and Tissue Research**. v. 351, n. 2, p. 255-268, 2012.
 57. MAYET, N. et al. A Comprehensive Review of Advanced Biopolymeric Wound Healing Systems. **Journal of Pharmaceutical Science**. v. 103, p. 2211-2230, 2014.
 58. MAYET, N. et al. A Comprehensive Review of Advanced Biopolymeric Wound Healing Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 103, p. 2211-2230, 2014.
 59. MCANULTY, R. J. Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 39, p. 666-671, 2007.
 60. MELO, C. M. L., et al. Immunomodulatory Response of Cramoll 1,4 Lectin on Experimental Lymphocytes. **Phytotherapy Research**. v. 24, p. 1631-1636, 2010.
 61. MENDONÇA, R. J.; COUTINHO, J. N. Cellular aspects of wound healing. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.
 62. MITCHELL, U. H.; JOHNSON, A. W.; MYRER, J. W. A Randomized Single-Blind Controlled Trial Comparing Two Monochromatic Near-Infrared Light Devices: Implications for Tissue Heating and Safety. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**. v. 91, p. 789-796, 2012.
 63. NAGASE, K. et al. An organotypic culture system of Merkel cells using isolated epidermal sheets. **British Journal of Dermatology**. v. 161, p. 1239-1247, 2009.

64. OGURI, M. et al. The effect of the chain length distribution of free fatty acids on the mixing properties of stratum corneum model membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**. v. 1838, p. 1851-1861, 2014.
65. OLIVEIRA, M. D. L.; CORREIA, M. T. S.; DINIZ, F. B. Concanavalin A and polyvinyl butyral use as a potential dengue electrochemical biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 25, p. 728-732, 2009.
66. PANDEY, A; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**. v. 405, p. 837-846, 2000.
67. PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature Genetics**. v. 33, p. 311-323, 2003.
68. PIERCE, J. D. et al. Understanding proteomics. **Nursing & Health Sciences**. v. 9, p. 54-60, 2007.
69. PIVA, J. A. A. C. et al. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 86, p. 947-954, 2011.
70. PROST-SQUARCIONI, C. et al. Functional histology of dermis. **Ann Dermatol Venereol**. v. 135, p. 15-20, 2008.
71. REINKE, J. M; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**. v. 49, p. 35-43, 2012.
72. RILEY, M. T. T. W.; LIANG, H. L.; EELLS, J. T. Photobiomodulation Directly Benefits Primary Neurons Functionally Inactivated by Toxins. *The Journal of Biological Chemistry* v. 280, p. 4761-4771, 2005.
73. RODRÍGUEZ, R. M.; LÓPEZ-VÁZQUEZ, A.; LÓPEZ-LARREA, C. Immune systems evolution. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 739, p. 237-251, 2012.
74. SAMPAIO, S. C. P. O. et al. Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. **Lasers in Medical**

- Science.** v. 28, n. 3, p. 799-806, 2013.
75. SANTUZZI, C. H. et al. Combined use of low level laser therapy and cyclooxygenase-2 selective inhibition on skin incisional wound reepithelialization in mice: a preclinical study. **Anais Brasileiros de Dermatologia.** v. 86, n. 2, p.278-83, 2011.
76. SCHUSTER, C. et al. Human embryonic epidermis contains a diverse Langerhans cell precursor pool. **Development.** v. 141, p. 807-815, 2014.
77. SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology.** v. 14, n. 11, p. 53-62, 2004.
78. SHIN, J. U. et al., Altered Vimentin Protein Expression in Human Dermal Microvascular Endothelial Cells After Ultraviolet or Intense Pulsed Light Treatment. **Lasers in Surgery and Medicine.** v. 46, p. 431-438, 2014.
79. SILVA, F. O. et al. Antiproliferative effect of Canavalia brasiliensis lectin on B16F10 cells. **Research in Veterinary Science.** v. 96, p. 276-282, 2014.
80. SIMPSON, C. L.; PATEL, D. M.; GREEN, K. J. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** v. 12, p. 565-580, 2011.
81. SIWY, J. et al. Clinical proteomics: Current techniques and potential applications in the elderly. **Maturitas.** v. 68, p. 233-244, 2011.
82. SONG, S. P. et al. Abnormalities in Stratum Corneum Function in Patients Recovered from Leprosy. **Skin Pharmacology and Physiology.** v. 22, p. 131-136, 2009.
83. STAMATAS, G. N. et al. Infant skin physiology and development during the first years of life: a review of recent findings based on in vivo studies. **International Journal of Cosmetic Science.** v. 33, p. 17-24, 2011.
84. TEIXEIRA, E. H. et al. Biological applications of plants and algae lectins: An overview. In: CHANG, C. F. **Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology.** 1.ed. InTech, Rijeka, 2012 cap. 23, p. 533–558.

85. TOWNSEND C.M.; BEAUCHAMP D. EVERS M.; MATTOX K.L. **Sabiston textbook of surgery**. St. Louis, MD: Elsevier; p. 192-207; 2011.
86. VAREJÃO, N.; ALMEIDA, M. S.; CICCIO, N. N. T. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**. v. 1804, p. 1917-1924, 2010.
87. VEDRENNE, N.; COULOMB, B. The complex dialogue between (myo) fibroblasts and the extracellular matrix during skin repair processes and ageing. **Pathologie Biologie**. v. 60, p. 20-27, 2012.
88. VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin. **Surgery**. v. 28, p. 469-472, 2010.
89. WATT, F. M.; FUJIWARA, H. Cell-Extracellular Matrix Interactions in Normal and Diseased Skin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v. 3, n. 4, p. 1-14, 2011.
90. WIKRAMANAYAKE, T. C.; STOJADINOVIC, O.; CANIC, M. T. Epidermal Differentiation in Barrier Maintenance and Wound Healing. **Advances in Wound Care**. v. 3, p. 272-280, 2014.
91. WILD, T., et al. Basics in nutrition and wound healing. **Nutrition**. v. 26, p. 862-868, 2010.
92. WOLF, K. et al. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 20, p. 931-941, 2009.
93. WU, X.; HAMMER, J. A. Melanosome transfer: it is best to give and receive. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 29, p. 1-7, 2014.
94. YATES, J. R. A century of mass spectrometry: from atoms to proteomes. **Nature Methods**. v. 8, p. 633-637, 2011.
95. YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. **Further**. v. 11, p. 49-79, 2009.

96. YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery.**
v. 29, p. 475-479, 2011.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Associar a aplicação da Concanavalina A (con A) a laser terapia de baixa intensidade, em feridas cutâneas induzidas em ratos Wistar, para a avaliação da resposta molecular no processo cicatricial no período de três dias.

4.2. Objetivos Específicos

- Analisar quantitativamente e qualitativamente através da proteômica e bioinformática as amostras de tecidos tratados pela laserterapia de baixa intensidade ($\lambda = 660\text{nm}$) em feridas cutâneas.
- Analisar quantitativamente e qualitativamente através da proteômica e bioinformática as amostras de tecidos tratados pela lectina Con A em feridas cutâneas.
- Analisar quantitativamente e qualitativamente através da proteômica e bioinformática as amostras de tecidos tratados pela lectina Con A associada à laserterapia de baixa intensidade ($\lambda = 660\text{nm}$) em feridas cutâneas.

5. Artigo

5.1. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO: ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS

Mapeamento Proteômico de Lesões cutâneas em ratos para obtenção dos efeitos moleculares da Concanavalina A associada ao Laser terapêutico no processo de cicatrização.

Aileciram M. B. Marinho-Ribeiro^a, Túlio D. Silva^b, Maria T.S. Correia^b, Maria H.M. Lima-Ribeiro^c, Jacinto da Costa Silva Neto^d, Maria G. Carneiro-da-Cunha^{a*}

^aCentro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária - CEP: 50670-420 - Recife, PE - Brazil.

^bDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária - CEP: 50670-420 - Recife, PE - Brazil.

^cBiotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife, PE - Brazil.

^dDepartamento de Patologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife, PE – Brazil.

(*) Corresponding author: Phone: +55.81.21268547; Fax: +55.81.21268576
E-mail address: mgcc@ufpe.br (M.G. Carneiro-da-Cunha)

Resumo

A cicatrização de feridas é um processo complexo com sobreposição de eventos. A fim de acelerar o processo de cicatrização este estudo examinou os efeitos da terapia a laser de baixa potência (LTBP 4 J / cm² e λ = 660 nm) e a lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* (Con A, 100 ug / ml) na pele após a ferida cirúrgica lesão (1 cm²) no dorso dos ratos. Vinte e quatro ratos (machos, 250 a 300 g) foram divididos em 4 grupos (n = 6): o grupo de controle (C), 0,1 ml de NaCl a 0,9% (p / v); Con A (ConA); Con A associada com LTBP (CL) e LTBP (L). Aos 3 dias após a lesão inicial, as amostras foram coletadas para análise proteômica. A análise proteômica dos 85 pontos diferencialmente expressos foi detectada através da comparação dos grupos tratados com o grupo controle, destes, foram identificados 56 pontos, o que representa 66,24% do total, foram muitas as proteínas potencialmente relacionadas com a cicatrização de feridas. Conclui-se que a combinação de terapias, a laser e a aplicação de Con A, foi eficaz no processo de cicatrização observando um aumento na expressão de proteínas associadas com a redução da inflamação, remodelação de tecido, divisão celular, regeneração e principalmente adesão celular observada exclusivamente no grupo tratado com a associação da Con A e o laser de baixa potência, oferecendo-nos insights sobre a dinâmica da ação de as terapias.

Abstract

Wound healing is a complex process with overlapping events. In order to accelerate the healing process of this study examined the effects of low-level laser therapy (LLLT 4 J / cm² and λ = 660 nm) and the lectin from *Canavalia ensiformis* (Con A, 100µg / ml) in the skin wound after surgical injury (1 cm²) on the back of rats. Twenty four mice (male, 250- 300 g) were divided into 4 groups (n = 6): control group (C), 0.1 ml of 0.9% NaCl (w / v); Con A (ConA); Con A associated with LLLT (CL) and LLLT (L). At 3 days after the initial injury, the samples were collected for proteomic analysis. The proteomic analysis of differentially expressed 85 points detected by comparing the treated groups with the control group, these 56 points were identified, representing 66.24% of the total, many proteins were potentially related to wound healing. We conclude that the combination of therapies, laser and application of Con A, was effective in the healing process observed an increase in proteins expression associated with reduction of inflammation, tissue remodeling, cell division and regeneration, which offered insights into the dynamics of action of the therapies.

1. Introdução

O processo de reparação e a cicatrização de uma ferida existem para restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido e caracteriza-se por uma complexa série de eventos bioquímicos e celulares, simultâneos e interdependentes, em resposta a lesão tecidual [1]. Lesão resulta em danos nos tecidos e independentemente da causa, os processos de reparação são semelhantes, através de uma resposta fisiológica coordenada em fases sucessivas para fornecer hemostasia iniciando a inflamação, proliferação e remodelação da matriz extracelular (MEC) [2,3].

Ao longo do tempo, o homem sempre empregou artifícios com o intuito de aperfeiçoar o processo cicatricial através do uso de substâncias ou procedimentos. Por sua vez biomateriais, que podem ser definidos como qualquer molécula que tenha a capacidade de interagir com o sistema biológico, sem indução de uma resposta adversa no hospedeiro; vem sendo usados na recuperação de lesões [4]. Neste sentido, proteínas bioativas vêm sendo utilizadas na terapêutica médica onde as lectinas vegetais tornam-se cada vez melhor compreendidas em termos de estrutura molecular, papel fisiológico e biológico, além de serem um grupo de proteínas e glicoproteínas com alto potencial para diversas atividades biológicas [5,6].

A concanavalina A, Con A, (um mitógeno de células-T, Ca^{2+} / Mn^{2+} dependente e de ligação a glicose/ manose) tem atraído atenção crescente para as suas atividades com muitas aplicações médicas, tais como o desenvolvimento de biosensores para respostas imunológica a doenças [7,8]. É uma lectina tetravalente conhecida por causar a ativação proteolítica de metaloproteinases de matriz (MMPs) em fibroblastos, sendo amplamente utilizada para estudar a secreção de MMP no processo de cicatrização [9,10].

Outra modalidade terapêutica utilizada em processos de cura é o LASER. Este é uma forma de amplificação da luz por emissão estimulada de radiação; o termo originou-se da abreviação: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, estando basicamente classificado como de “alta potência” e de “baixa potência”. [11]. Estudos têm mostrado que a energia luminosa da mais baixa frequência opticamente estimulante - percebida como vermelha -pode ser absorvida por fotossensibilizadores celulares, tais como citocromos, flavinas / Riboflavins e NADP, seguido por pequenas quantidades de espécies reactivas de oxigénio (ROS) é um estimulador importante de

atividades celulares. O fenômeno é conhecido como "terapia laser de baixa intensidade" (LLLT) ou fotobioestimulação [12]. As respostas celulares *in vitro* observadas após LTBP incluem a migração, proliferação e aumento da síntese de várias proteínas que conduzem à reparação celular. Nesse sentido, o LASER é utilizado para aumentar a função mitocondrial e a síntese de ATP, aumentando a proliferação celular, e acelerando assim o processo de cicatrização [1]. No entanto, poucos estudos avaliaram a sua eficácia em condições associadas com biomateriais em especial com as lectinas.

Utilizamos a Análise Proteômica que pode ser aplicada para a análise de misturas complexas de proteínas que tenham sido separadas por eletroforese bidimensional (2DE). As proteínas são, então, caracterizadas usando várias técnicas analíticas. A principal vantagem desta abordagem é que ela permite tanto a análise quantitativa quanto qualitativa das proteínas por examinar sua expressão diferencial comparativa entre tratamentos distintos

Diante disso, nosso estudo analisou os resultados da associação de duas modalidades terapêuticas, o laser de baixa intensidade com uma biomolécula, a Concanavalina A (Con A). Tivemos como objetivo do presente estudo realizar a avaliação do efeito bioestimulador e regenerador da associação desses dois recursos terapêuticos, utilizando análise proteômica e bioinformática para estudar o mecanismo da cicatrização de feridas, através da expressão proteica.

2. Materiais e métodos

2.1.Obtenção da Concanavalina A

A Concanavalina A obtida a partir de *Canavalia ensiformis* (Jack bean) foi adquirida pela compra na empresa Sigma, na forma de pó liofilizado.

2.2.Procedimento LTBP

Os animais foram submetidos à irradiação transcutânea diária usando semi-condutores previamente calibrados, laser de diodo InGaAIP (Therapy XT ®, DMC medical, USA), com emissão contínua de 660nm de comprimento de onda. A potência de saída utilizada foi de 100mW, com um ponto focal de 1 cm² , e densidade de potência de 1 W / cm² . A densidade de energia foi de 20 J / cm² distribuídos em cinco pontos equidistantes diferentes (Fig. 1), 4 J / cm² em cada ponto ao longo do tratamento; o modo de exposição foi contínuo, através da fibra óptica, e a aplicação foi realizada a 2

mm da superfície da pele [13]. A primeira irradiação foi realizada imediatamente após o processo cirúrgico.



Fig. 1. Ferida cirúrgica realizada no dorso do rato com ênfase nos cinco pontos tratados pelo laser de baixa potencia.

2.3. Animais

Os experimentos foram aprovados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação em animais (COBEA) e pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Pernambuco, aprovado com protocolo experimental nº 23.076,046605 / 2013-91. Vinte quatro ratos machos da linhagem Wistar, *Rattus norvegicus*, (90-120 dias de idade, pesando 250- 300 g). Os animais foram alojados um por gaiola (para evitar ataques nas feridas do companheiro) e teve acesso à comida e água ad libitum. Os ratos foram mantidos num ciclo claro / escuro de 12h sob uma temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.4.Procedimento Cirúrgico e Tratamento

Os ratos foram pesados, divididos em grupos experimentais e submetidos aos procedimentos cirúrgicos sob anestesia por via intramuscular com 2% de cloridrato de xilazina e cloridrato de cetamina (10 e 115 mg/kg, respectivamente) segundo Hall et al. (2001). Após o procedimento anestésico, cada animal foi submetido à tricotomia do dorso, sob antisepsia da região torácica dorsal com iodopovidona 1% e solução esterilizada de NaCl 0,15 M ou álcool 70%. Com auxílio de um molde de 0,8mm de diâmetro, a pele foi demarcada para a produção da ferida cutânea (1cm²) foram realizadas com o auxílio de uma tesoura de ponta romba e pinça de dissecação com dente com remoção da camada epidérmica e dérmica da pele.

Após a cirurgia, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n = 24) de acordo com o tratamento: (C) controle com aplicação 0,1 ml de 0,9% (p / v) de NaCl; (CA) Con A, (L) irradiação LTBP e (CL) Con A associado a irradiação do LTBP.

Os grupos CA e CL receberam uma aplicação diária de 100 uL de Con A no leito da ferida e o grupo CL antes da aplicação da proteína recebeu a aplicação do laser e o grupo C recebeu solução salina de NaCl 0,1 M. Em relação a irradiação laser, os animais que foram submetidos à LTBP (grupo CL e L) foram irradiadas de forma pontual a partir do centro da ferida. O tempo de cicatrização avaliado foi de 72h.

2.5.Extração de proteínas totais

Após 72hrs da realização da ferida foi feita a coleta do tecido epitelial lesado e conservado a -80° C. Posteriormente as proteínas foram extraídas utilizando o reagente TRIZOL, seguindo as orientações do fabricante.

2.6.Quantificação de proteínas

Depois da extração, as proteínas foram quantificadas utilizando o 2D Quant Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As proteínas foram quantificadas utilizando o método de Bradford (1976).

2.7.Eletroforese bidimensional

2.7.1. Primeira dimensão

O equivalente a 1 mg de proteínas foi precipitado com ácido tricloroacético e ressolubilizados em tampão de reidratação. A focalização foi feita utilizando gradiente de pH imobilizado (3-10). As fitas IPG foram reidratadas no aparato para a focalização isoeletrica IPGphor 3, GE Healthcare, durante 14 horas a 20°C. A focalização isoeletrica foi feita nas seguintes etapas: 500Vh, 800Vh, 11300Vh, 2900Vh. Depois da focalização, as fitas foram lavadas com ddH₂O e armazenadas a -80°C.

2.7.2. Segunda dimensão

Depois da focalização isoeletrica, as fitas IPG serão lavadas com ddH₂O, equilibradas em duas soluções redutoras de pontes de dissulfetos segundo Görg et al (1995). A segunda dimensão da eletroforese será feita em um gel vertical homogêneo de acrilamida 15% conforme descrito por Laemmli (1970). A separação eletroforética das proteínas será feita a 10°C, em cuba Hoefer SE 600 Ruby (Amersham Bioscience).

2.8.Detecção de proteínas nos géis

Após a eletroforese, as proteínas dos géis serão coradas com nitrato de prata [14] e serão armazenados em solução de ácido acético a 1% até a digitalização da imagem.

2.9.Análise de Imagens

Os géis corados com prata serão digitalizados usando-se um scanner (ImageScanner – Amershan Biosciences) em modo transparência com resolução de 300 dpi (dotch per inch) e as imagens geradas em formato tif, serão analisadas usando-se o programa computacional ImageMaster Platinum v.6 (Amershan Biosciences). A detecção de cada spot de proteína será validada por inspeção manual e editada quando necessário. O programa também fornece o número de spots e a estimativa dos seus pI e massa molecular. Os spots que apresentarem uma diferença de volume estatisticamente significativa serão assinalados como diferencialmente expressos [15].

2.10. Espectrometria de Massa

As proteínas (spots) detectadas serão retiradas dos géis, para a digestão tripídica. A partir dos peptídeos gerados pela digestão dos spots, as amostra de interesse serão selecionadas e analisadas em espectrômetro de massa com ionização do tipo Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight (MALDI TOF/TOF – Ultraflex III, Bruker Daltonics, Billerica, MA-USA) a fim de determinar as massas moleculares [15].

2.11. Identificação de proteínas por buscas em bancos de dados do Mascot

O espectro MS/MS foi confrontado com um banco de dados NCBIInr (atualizado em 1 de Março de 2011) pelo programa Mascot v. 2.3 (Matrix Science Ltd., London, UK) instalado em servidores locais no Laboratório. A tolerância da massa para o precursor e os fragmentos de íons é 10ppm e 0.8 Da, respectivamente; perfil do instrumento: MALDI/TOF/TOF; modificação fixa de carbamidometilação (cisteína); modificação variável de oxidação (metionina).

2.12. As análises de proteínas in silico

Para as proteínas identificadas, sua função biológica foi atribuída de acordo com o banco de dados Gene Ontology (<http://amigo.geneontology.org>), os bancos de dados

SwissProt / UniProt (<http://www.uniprot.org>), o Nacional Centro de Informações sobre Biotecnologia banco de dados (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e a literatura.

3. Resultados e Discursão

Os mecanismos celulares e moleculares subjacentes à reparação dos tecidos e sua incapacidade de curar ainda são pouco conhecidos. Além disso, as terapias atuais são limitadas. A má cicatrização de feridas após o trauma, cirurgia, doença aguda ou doenças crônicas afetam milhões de pessoas no mundo a cada ano e é a consequência de elementos mal regulados da resposta de reparação do tecido saudável, que inclui inflamação, angiogênese, deposição de matriz, e recrutamento de células [16]. Este estudo mostra os efeitos da LBP (He-Ne) e da Con A (100 ug / ml) sobre a re-epitelização de feridas cirúrgicas, quando usado isoladamente e em combinação.

A regulação das funções celulares durante a reparação da pele após uma lesão é complexa e criticamente dependente da interação das células com a ECM, que pode ser afetada em cada etapa e ponto de tempo do processo de cicatrização da ferida. Muitas ações celulares ou de citocinas pode ser adotado por outros sem interferência grave com o processo de cicatrização [17].

Os benefícios da LBP no processo de cicatrização têm sido amplamente estudados [18,19,21]. Neste estudo, LBP forneceu uma diminuição significativa da severidade da resposta inflamatória, independentemente da combinação com a Con A. A atividade desse tratamento pode estar relacionada com o efeito inibitório da energia do laser sobre a liberação de prostaglandina e TNF- α [22], a degranulação dos mastócitos [23, 24], e na proliferação linfocítica [25]. Estas conclusões são apoiadas por estudos que afirmam que a laserterapia estimula a migração de queratinócitos ao longo da superfície da cicatrização de feridas in vivo [20,26,27,28].

Recentemente, pesquisas têm empreendido esforços para a possível atividade pró-cura de algumas lectinas. Esta intenção é suportada pelo fato de que tais moléculas podem interferir com o processo inflamatório e induzir a liberação de citocinas [29], ativar células do sistema imune [28,30,31], podem produzir um efeito estimulador da via Th1, como quando estimulado por Cramoll 1, 4 [32] ativação de neutrófilos através de mecanismos indiretos [33].

Um ponto crucial para a terapia é conseguir um equilíbrio satisfatório entre a toxicidade e o efeito terapêutico dos medicamentos. A dosagem específica no local reduz o efeito tóxico em locais não alvo e aumenta a eficácia do agente terapêutico. O agente terapêutico específico, na dosagem correta, no local alvo depende de interações moleculares dos receptores específicos com células específicas, sendo este critério efetivamente cumprido pelas lectinas de plantas que têm uma configuração estrutural definitiva. Em afecções, como a inflamação, radicais de hidratos de carbono específicos são expressos em glicocálice celular que desempenham um papel crucial nos processos de reconhecimento biológico [34].

3.1. Abordagem proteômica dinâmica para a resposta de três diferentes tratamentos em feridas cutâneas usando eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

A partir de biópsias da pele foram extraídas satisfatoriamente proteínas dos quatro grupos (controle e tratados: Con A, Con A-laser e laser), utilizando o método do Trizol e eletroforese realizada em duas dimensões. A Fig.2 mostra os géis de eletroforese bidimensional obtidos e corados com Coomassie azul. Em cada gel foram detectados cerca de 90 pontos corados com boa resolução, observando-se alta reprodutibilidade entre as réplicas dos experimentos, utilizando o software de análise de imagem Imagem Mestre Platinum v.6 (Amersham Biosciences).

A análise comparativa 2-DE foi realizada entre os grupos tratados (Con A, Con A- laser e laser) e o grupo controle, foi selecionado os pontos diferencialmente expressos (manchas com uma diferença $> 1,5$ entre o controle e tratado) e um único ponto entre os tratamentos foi selecionado, os quais foram submetidos à digestão trípica e análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS) para obter uma impressão digital de massa do peptídeo (FPP) e para identificar as proteínas.

No total, foram selecionados 85 pontos diferencialmente expressos, 31 pontos no gel por tratamento com Con A, 12 pontos no gel do tratamento com laser, e 13 pontos no gel por tratamento com Con A- laser. Para a análise de MALDI-TOF-MS foram identificados com altas pontuações de confiança e uma cobertura de sequência significativa de 56 spots, correspondendo a $\sim 66\%$ dos pontos totais. O número de manchas não identificadas é devido à incompatibilidade estatística no banco de dados de proteínas. Sendo um número comparável às proteínas identificadas por Paiva et al,

(2010) em amostra de soro em humanos. Em dois estudos separados, Broccardo et al, (2011) realizaram análise proteômica de fragmentos de células da pele em áreas lesionada e não lesionadas, agudas e crônicas em pacientes com dermatite atópica, bem como indivíduos não-atópicos e identificaram 104 e 153 proteínas.

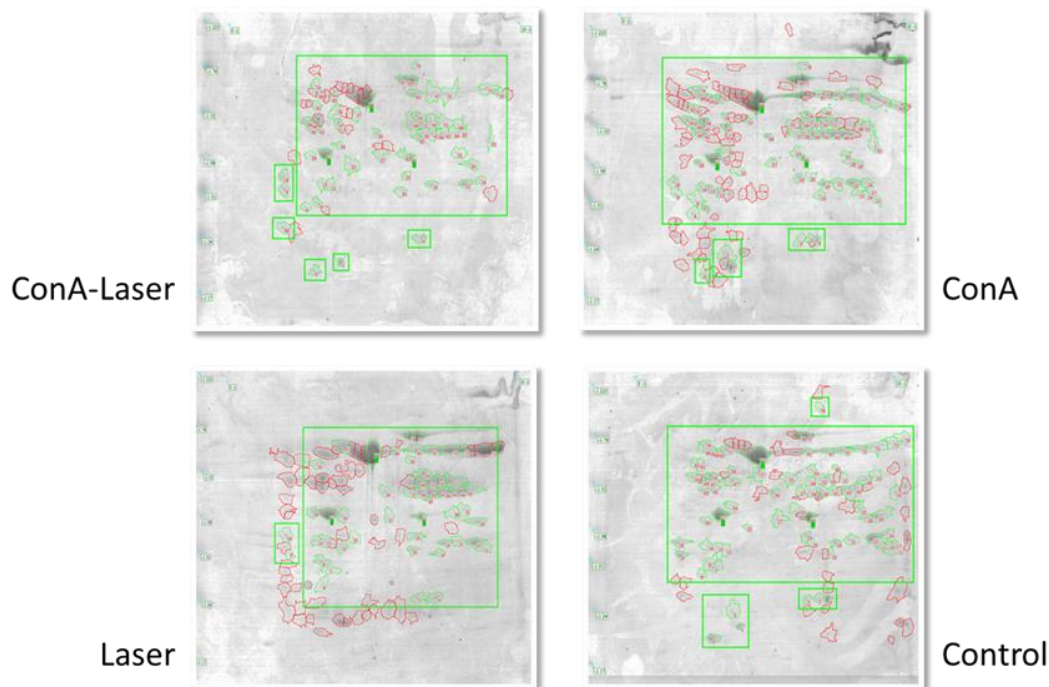


Fig. 2. Identificação de potenciais marcadores de cicatrização de feridas da pele utilizando electroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE). Perfis de proteínas em 2D-PAGE foram obtidos de amostras de proteínas epidérmicas derivadas de três tratamentos diferentes Con A (100 mL), a laser ($\lambda = 660$ nm, ED = 20 J / cm², P = 100 mW, F = 50 Hz) e a associação Con A-Laser.

3.5. Identificação de proteínas

O diagrama de Venn da Fig. 5A mostra o número de spots que eram únicos ou comuns entre os três diferentes tratamentos (Con A, Laser e Con A-Laser). Foram identificadas simultaneamente nos três tipos de tratamentos 4 proteínas; 3 proteínas foram comuns nas amostras a partir de grupos de Con A e de Con A- laser e 3 proteínas foram comuns entre os grupos Con A e laser. Nas amostras do grupo Con A foram identificados um número significativamente maior de proteínas do que nas amostras a partir dos outros dois grupos. Para avaliar o possível viés analítico na identificação de proteínas, foram calculados os pesos moleculares e pontos isoelétricos (pI) de cada uma das proteínas com base na sua sequência de aminoácidos primária. A Figura 5B mostra a distribuição das manchas por seu pI e de peso molecular, a maioria das manchas mostrou peso molecular de 20 a 60 kDa e de pI entre 5 e 8.

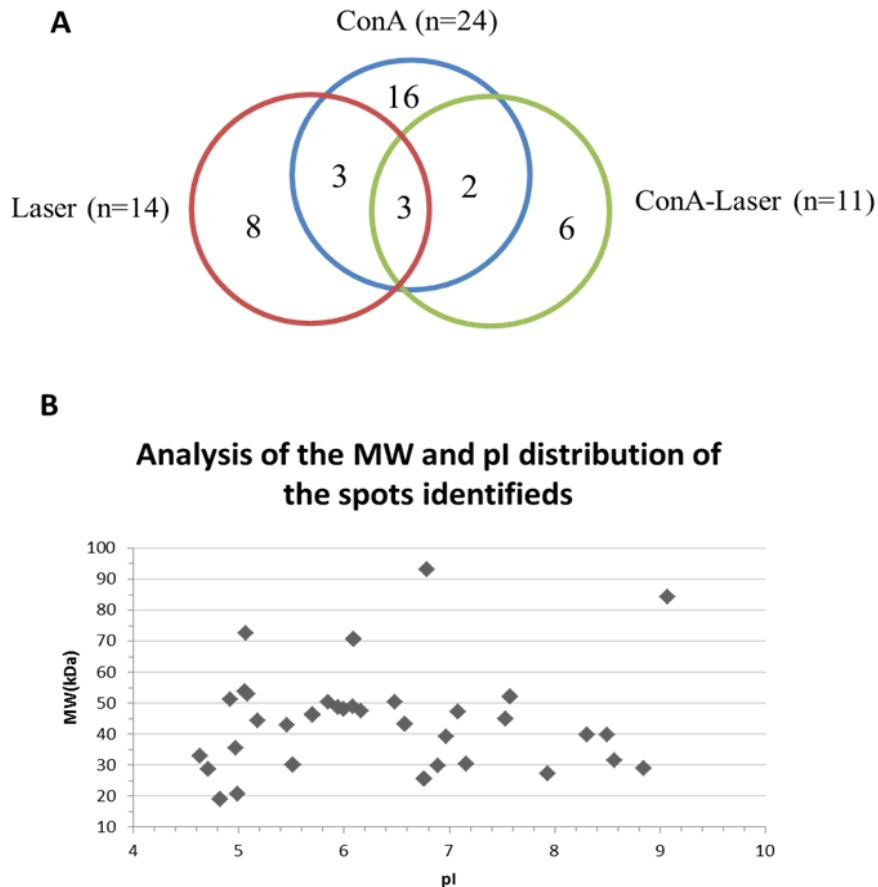


Fig. 3. As proteínas identificadas no tecido epitelial de ratos. (A) Diagrama de Venn, mostrando a distribuição de proteínas identificadas no tecido epitelial dos ratos tratados com Con A (100 uL), laser (λ = 660 nm, ED = 20 J / cm², P = 100 mW, F = 50 Hz) e a combinação de Con A-laser. (B) A análise da distribuição de massa e pI de pontos identificados nos três tratamentos.

3.6. Função biológica das proteínas

As proteínas identificadas podem ser categorizadas em grupos de acordo com gene ontology. Algumas proteínas são incorporadas em mais de um grupo, devido à sua função biológica complexa. No diagrama da fig. 6 pode ver-se que em todos os três grupos de tratamento as moléculas do metabolic process, que resultam no crescimento celular, foram mais numerosas (62,07% para a Con A, 41,67% para grupo Laser e 53,85% para o grupo Con A-laser), seguido de proteínas envolvidas no processo multicelular organismal process (27,59% para a Con A, 41,67% para Laser e 15,38% para Con A-laser), transport (24,14% de Con A, 16,67% para o laser e 7,69% para Con A-Laser), e immune system process (6,90% para Con A, 8,33 para Laser e 7,69% para Con A-Laser).

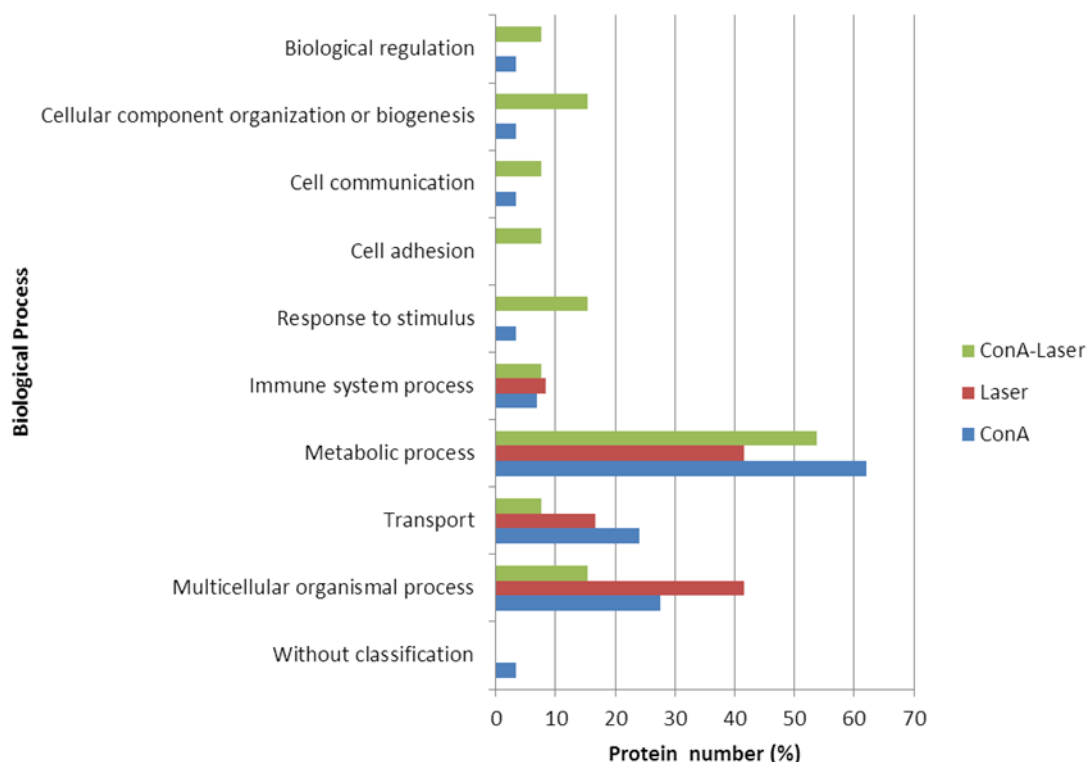


Fig. 4. As proteínas identificadas no tecido epitelial dos ratos tratados com Con A (100 uL), laser ($\lambda = 660$ nm, ED = 4 J / cm², P = 100 mW, F = 50 Hz) e a combinação de Con A-laser. As proteínas são classificadas em categorias de acordo com sua função biológica. % Número de proteínas é a razão entre o número de proteínas identificadas em cada categoria com respeito ao número total de proteínas identificadas.

Proteínas envolvidas nas outras categorias como response to stimulus (3,45% para Con A e 15,38% para Con A-Laser); cell communication (3,45% para Con A e 7,69% para Con A-Laser); cellular component organization or biogenesis (3,45% para Con A e 15,38% para Con A-Laser); biological regulation (3,45% para Con A e 7,69% para Con A-Laser) foram identificados apenas nos grupos Con A -Laser e Con A; e cell adhesion- responsável principalmente pelos componentes da matriz extracelular- (7,69% para Con A-Laser) foram encontrados exclusivamente no grupo Con A-Laser.

A relativa abundância de proteínas envolvidas nos processos celulares referentes ao processo metabólico pode estar associada à reação do organismo ao processo inflamatório instalado. Estas proteínas estão presentes nas vias das cascatas de coagulação e do sistema complemento. Os resultados indicam um foco significativo nestas vias, conhecidas como de papel relevante na inflamação [37].

Neste diagrama, pode ser visto também que, apenas no grupo ConA-laser as moléculas de adesão celular - principais componentes da matriz extracelular – foram identificadas, diferenciando-se de estudos como o de [38] em que os três grupos estudados apresentaram tais proteínas.

Os demais sistemas envolvidos no estudo foram encontrados no trabalho de Broccardo et al, 2009, categorias notáveis que incluem resposta imune, resposta a estímulos, resposta multicelular, transporte, comunicação celular e organização celular.

Para explorar os mecanismos moleculares subjacentes ao efeito dos tratamentos aplicados a análise proteômica, foi identificada proteínas up ou down-reguladas nas amostras de tecidos tratadas em comparação com o grupo controle, com foco em proteínas com expressão alterada envolvidas nas funções biológicas categorizadas de acordo com gene ontology.

As lipoproteínas foram up-reguladas 2,23 vezes após tratamento com Con A e up-reguladas 2,01 no tratamento Con A- laser. As lipoproteínas são plurimoleculares, tipicamente quase esféricas, complexos pseudomicelares compostos de lípidos polares e não-polares solubilizados por proteínas com estrutura e função especializada, as apolipoproteínas [40]. A apolipoproteína A-I é o principal componente protéico estrutural e funcional do HDL, aproximadamente 70% da proteína total de HDL [41]. As principais funções da apo A-I envolvem a ativação da lecitina: colesterol aciltransferase (ACAT), e de interação com os receptores celulares; igualmente apoA-I dota HDL com múltiplas atividades anti-aterogênico [42,43]. HDL pode afetar benéficamente a cicatrização de feridas, acelerando a resolução da inflamação, através do reforço da formação de tecido de granulação envolvendo o aumento da incorporação de células progenitoras endoteliais, aumentando os efeitos parácrinos de células progenitoras endoteliais, e acelerando a reepitelização. [44]. Os mecanismos pelos quais a HDL reduz respostas inflamatórias, particularmente em macrófagos, não são bem compreendidos, num estudo realizado por De ardo [45] mostram que HDL induz ATF3, um modulador da transcrição de genes-chave da resposta imune inata. ATF3 pode ser induzida pela ativação de TLR e age como parte de um importante ciclo de feedback negativo para limitar as respostas inflamatórias aos TLR conduzidos em macrófagos. Foi comprovado em estudos que a lectina Con A ativa os receptores Toll-like, o que

poderia aumentar a ação moduladora da ATF3. A ativação do receptor Toll-like vai inibir citocinas pró-inflamatórias [46].

O plasminogénio precursor foi up-regulado 2,46 vezes no tratamento de feridas com Con A e up-regulado 2,37 vezes no tratamento com Con A-laser, esta é uma proteína precursora de plasmina, uma protease que degrada fibrina e também ativa as MMPs que podem degradar o colágeno em fios [47]. Isto significa que tem sido demonstrado que a plasmina desempenha um importante papel em remodelação de tecidos durante a cicatrização de feridas e inflamação através de proteólise dos componentes da matriz extracelular, bem como através da ativação e/ou libertação de fatores de crescimento a partir das matrizes. Dubois et al. [48] demonstraram que a lectina de *Canavalia ensiformis* (Con A) induz a produção de MMP-9 in vitro por linfócitos; esta protease, em associação com MMP-2, é essencial para o processo de cicatrização.

Alfa-1-antitripsina, up-regulada 2,96 vezes após tratamento com Con A e up-regulada 1,77 vezes no tratamento com Con A-laser, é um inibidor de serina proteases. O seu principal objetivo é inibir a elastase, mas também tem uma afinidade moderada para a plasmina e trombina. Inibe irreversivelmente a tripsina, quimotripsina e o ativador de plasminogénio. A forma aberrante inibe a síntese de NO induzida por insulina em plaquetas, diminui o tempo de coagulação e possui atividade proteolítica contra a insulina e a plasmina. A sua função fisiológica importante é a proteção contra a destruição proteolítica das fibras de elastase dos leucócitos humanos [49].

Pré-pró-haptoglobina é um precursor da haptoglobina que é uma resposta proteica ao estresse orgânico, elevando rapidamente o nível de 2 a 5 vezes durante a inflamação, especialmente quando existe uma situação de necrose dos tecidos [50]. O tratamento com Con A conseguiu aumentar 7,16 vezes em comparação com o controle não tratado, mesmo sem necrose, o que é interessante porque haptoglobina expressada localmente pode ser um componente importante de um sistema de proteção local com efeitos antioxidantes, bacteriostáticos, anti-inflamatórios além de estimular a resposta imune [51].

Devido à diminuição da capacidade vascular em fornecer sangue rico em O₂ para o tecido da ferida, podendo ser menos do que a demanda do tecido, ao longo do tempo conduz à hipoxia e posterior necrose [52]. O grupo de controle não tem qualquer

fator externo para estimular a cicatrização, portanto, o próprio organismo necessita de responder fisiologicamente à hipoxia e necrose não demonstrando um processo de cicatrização normal, que pode ser evidenciada por aumento das enzimas glicolíticas para aumentar a taxa de glicólise e de conservação de energia, única no grupo de controle.

A albumina do soro foi up-regulada 1,54 vezes após o tratamento com Con A-laser, up-regulada 1.66 para o tratamento a laser e up-regulada 9,42 vezes para o Con A de tratamento. Sua principal função é a regulação da pressão osmótica coloidal do sangue. Maior transportador de zinco no plasma, ligando-se tipicamente a cerca de 80% de todo zinco no plasma [53]. Albumina interage especificamente com glicoproteínas de 60 kDa endotelial microvascular, explicando a sua presença e abundância nas amostras [54].

As características funcionais da cadeia gama de fibrinogênio incluem a participação em polimerização da fibrina e sua reticulação estando envolvida nas etapas finais da coagulação como precursor de monômeros de fibrina necessários para a formação do plug plaquetário. Possui alta massa molecular e é solúvel no plasma sanguíneo, convertendo-se em fibrina pela ação da trombina, que é a enzima ativa. [55]. Apenas o tratamento ConA-Laser mostrou esta proteína e foi caracterizada como única. alfa O fibrinogênio (FGA) juntamente com o fibrinogênio beta (FGB) polimerizam-se para formar uma matriz de fibrina insolúvel. Tem uma função importante na hemostase como um dos componentes primários de coágulos sanguíneos. Além disso possui função importante durante as fases iniciais de reparação de feridas para estabilizar a lesão e orientar a migração celular durante a re-epitelização [56].

Lipocortina-1, também conhecida como a anexina A1, foi originalmente identificada como uma proteína regulada por corticosteróides e envolvida nos efeitos anti-inflamatórios dos corticosteróides [57]. No entanto, as observações mais recentes têm mostrado que suas ações anti-inflamatórias são muito mais amplas. Na verdade, LC-1 inibe a atividade da fosfolipase A2 citoplasmática, desempenhando assim um papel chave na regulação negativa de mediadores lipídicos inflamatórios tais como PGs e LT, e inibe o extravasamento de leucócitos e a liberação de mediadores inflamatórios [58].

A glicose proteína regulada de 78 kDa (GRP78) está localizada no retículo endoplasmático como uma chaperona molecular, promove a facilitação do dobramento

de proteínas de forma adequada, tendo como alvo proteínas deformadas para a degradação do proteassoma, ER Ca²⁺ + de ligação, e controlando a ativação dos sensores transmembranares [59]. GRP78 tem sido implicado como uma proteína importante no papel da promoção de angiogênese e a proliferação de células [60], que são essenciais para o processo de cicatrização. Esta proteína foi encontrada aumentada no tratamento com ConA-Laser indicando uma recuperação significativa.

Filamentos intermediários vimentina, que são um dos três principais sistemas do citoesqueleto de células eucariotas, são necessários para muitas funções celulares essenciais, incluindo a motilidade celular, a migração quimiotática, e cicatrização de feridas [12], foi expressa sozinha no tratamento de Con A.

4. Conclusão

Este estudo examinou a eficácia da associação do laser de baixa potência com lectina Con A e na ação individual dos recursos cicatrizantes no tratamento de lesões cutâneas, sugerindo uma possível utilização desta associação na aceleração da cicatrização. A nível molecular foi observado um aumento na expressão das proteínas associadas com a redução da inflamação, remodelação de tecidos, divisão celular, regeneração e principalmente adesão celular, em resposta à exposição do laser de baixa potência, juntamente com a utilização da lectina. Estes resultados estendem as aplicações terapêuticas potenciais de lectinas que podem ser utilizados em combinação com o laser de baixa potência no tratamento de feridas cutâneas. Mais pesquisas sobre a aplicação das lectinas derivadas de plantas medicinais associadas à terapia laser de baixa potência em sistemas biológicos podem ser de grande importância para tratamentos terapêuticos.

5. Referências

- [1] Sampaio SCO, Monteiro JSC, Cangussú MC, Santos GMP, Santos MA, Santos JN, et al. Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. *Lasers in Med Sci.* 2013;28(3):799-806.
- [2] Young A, Mcnaught CE. The physiology of wound healing. *Surgery.* 2011;29:475-9.
- [3] Amar MB, Wu M. Re-epithelialization: advancing epithelium frontier during wound healing. *J R Soc Int.* 2014; 11(93):1-7.

- [4] Brustein VP, Souza-Araújo FV, Vaz AF, Araújo RV, Paiva PM, Coelho LC, et al. A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. *Inflammopharmacology*. 2012;20(6):315-22.
- [5] Lam SK, Ng TB. Lectins: production and practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;89(1):45-55.
- [6] Bah CSF, Fang EF, Ng TB. Medicinal Applications of Plant Lectins. In: Fang EF, NG TB, editors. *Antitumor Potential and other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds*, Springer; 2013, p.55-74.
- [7] Li WW, Yu JY, Xu HL, Bao JK. Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;414(2):282-6.
- [8] Oliveira MDL, Correia MTS, Diniz FB. Concanavalin A and polyvinyl butyral use as a potential dengue electrochemical biosensor. *Biosens Bioelectron*. 2009;25:728-32.
- [9] Kim HR, Park MK, Cho ML, Kim KW, Oh HJ, Park JS, et al. Induction of macrophage migration inhibitory factor in Con A-stimulated rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the P38 map kinase-dependent signaling pathway. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2010;25:317-26.
- [10] Santuzzi CH, Buss HF, Pedrosa DF, Freire MO, Nogueira BV, Gonçalves WL. Combined use of low level laser therapy and cyclooxygenase-2 selective inhibition on skin incisional wound reepithelialization in mice: a preclinical study. *An Bras Dermatol*. 2011;86(2):278-83.
- [11] Lipovsky A, Oron U, Gedanken A, Lubart R. Low-level visible light (LLVL) irradiation promotes proliferation of mesenchymal stem cells. *Lasers in Med Sci*. 2012;28(4):1113-7.
- [12] Shin JU, Lee WJ, Oh SH, Kim DY, Kim DS, Jung I, et al. Altered Vimentin Protein Expression in Human Dermal Microvascular Endothelial Cells After Ultraviolet or Intense Pulsed Light Treatment. *Lasers Surg Med*. 2014;46:431–8.
- [13] Kumar MS, Sripriya R, Raghavan HV, Sehgal PK. Cicatrização de feridas potencial de *Cassia fistula* no modelo de rato albino infectado. *Journal of Surgical Research* . 2006;131(2):283-9.
- [14] Chevallet M., Luche S., Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*. 2006 ;1:1852 – 1858.
- [15] Shevchenko A, Tomas H, Havlis H, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*. 2007;1:2856-60.
- [16] Shen Z., Want E.J., Chen W., Keating W., Nussbaumer W., Moore R., Gentle T.M., Siuzdak G. Sepsis plasma protein profiling with immunodepletion,

threedimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry, and spectrum counting. *J Proteome Res.* 2006;5(11):3154-60.

[17] Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49:35-43.

[18] Iyomasa DM, Garavelo I, Iyomasa MM, Watanabe IS, Issa JPM. Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in the Gerbil. *Micron.* 2009;40:413-8.

[19] Barrett DW, Gonzalez-Lima F. Transcranial infrared laser stimulation produces beneficial cognitive and emotional effects in humans. *Neuroscience.* 2013;230:13-23.

[20] Iyomasa MM, Leão JC, Rizzi EC, Issa JPM, Dias FJ, Watanabe LS, et al. Ultrastructure and Light Microscope Analysis of Intact Skin After a Varying Number of Low Level Laser Irradiations in Mice. *BioMed Research International.* 2014;2014:1-8.

[21] Esmaeelinejad M, Bayat M, Darbandi H, Bayat M, Mosaffa N. The effects of low-level laser irradiation on cellular viability and proliferation of human skin fibroblasts cultured in high glucose mediums. *Lasers Med Sci.* 2014;29(1):121-9.

[22] Sakurai Y, Yamaguchi M, Abiko Y. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci.* 2000;108(1):29-34.

[23] Fathabadie FF, Bayat M, Amini A, Bayat M, Rezaie F. Effects of pulsed infra-red low level-laser irradiation on mast cells number and degranulation in open skin wound healing of healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Cosmet Laser Ther.* 2013;15(6):294-304.

[24] Khoshvaghti A, Zibamanzarmofrad M, Bayat M. Effect of Low-Level Treatment with an 80-Hz Pulsed Infrared Diode Laser on Mast-Cell Numbers and Degranulation in a Rat Model of Third-Degree Burn. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2011;29(9):597-604.

[25] Ribeiro MAG, Albuquerque RLC, Barreto ALS, Oliveira VGM, Santos TB, Dantas CDF. Morphological analysis of second-intention wound healing in rats submitted to 16 J/cm² 660-nm laser irradiation. *Indian J Dent Res.* 2009;20(3):390.

[26] Nestor MS, Newburger J, Zarraga MB. Body contouring using 635-nm low level laser therapy. *Semin Cutan Med Surg.* 2013;32(1):35-40.

[27] Avci P, Nyame TT, Gupta GK, Sadasivam M, Hamblin MR. Low-level laser therapy for fat layer reduction: A comprehensive review. *Lasers Surg Med.* 2013;45:349-57.

[28] Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CAS. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Laser Med Sci.* 2013;28:367-74.

[29] Teixeira HE, Arruda FVS, Nascimento KS, Carneiro VA, Nagano CS, Silva BR, et al. Biological applications of plants and algae lectins: An overview. In: Chang CF

Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology. Rijeka: InTech;. 2012, p. 533–58.

[30] Alencar NM, Assreuy AM, Alencar VB, Melo SC, Ramos MV, Cavada BS, et al. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(12):1674-81.

[31] Cavada BS, Barbosa T, Arruda S, Grangeiro TB, Barral-Netto M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr Protein Pept Sci.* 2001;2(2):123-35.

[32] Melo CML, Porto CS, Melo-Júnior MR, Mendes CM, Cavalcanti CCB, Coelho LCBB, et al. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. *Int J Pharm.* 2011;408:113-9.

[33] Assreuy AM, Alencar NM, Cavada BS, Rocha-Filho DR, Feitosa RF, Cunha FQ, et al. Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. *Biol Reprod.* 2003;68(5):1836-41.

[34] Majee SB, Biswas GR. Exploring plant lectins in diagnosis, prophylaxis and therapy. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2013;7(47):3444-51.

[35] Shen Z, Want EJ, Chen W, Keating W, Nussbaumer W, Moore R, Gentle TM, Siuzdak G. Sepsis plasma protein profiling with immunodepletion, threedimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry, and spectrum counting. *J Proteome Res.* 2006; 5(11):3154-60.

[36] Broccardo C. J., Mahaffey S., Schwarz J., Wruck L., David G., Schlievert P. M., Reisdorph N. A., d, Leung D. Y.M. Comparative proteomic profiling of patients with atopic dermatitis based on history of eczema herpeticum infection and *Staphylococcus aureus* colonization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2011;127(1): 186–193.

[37] Shen Z., Want E.J., Chen W., Keating W., Nussbaumer W., Moore R., Gentle T.M., Siuzdak G. Sepsis plasma protein profiling with immunodepletion, threedimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry, and spectrum counting. *J Proteome Res.* 2006;5(11):3154-60.

[38] Torre-Escudero E, Pérez-Sánchez R, Manzano-Román R, Oleaga A. Proteomic mapping of the lung vascular endothelial cell surface in *Schistosoma bovis*-infected hamsters. *Journal of proteomics.* 2014;106:86– 98.

[39] Broccardo C. J., Mahaffey S. B., Strand M., Reisdorph N.A., Leung D.Y.M., Peeling off the layers: Skin taping and a novel proteomics approach to study atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2009; 124 (5), 1113–1115.

[40] Kontush A, Chapman JM. High-Density Lipoproteins: Structure, Metabolism, Function, and Therapeutics. 1th ed. New Jersey: Wiley & Sons, Inc; 2012.

- [41] Frank PG, Marcel YL. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res.* 2000;41(6):853-72.
- [42] Asztalos BF, Schaefer EJ. HDL in atherosclerosis: actor or bystander? *Atheroscler Suppl.* 2003;4(1):21-9.
- [43] Schaefer EJ, Santos RD, Asztalos BF. Marked HDL deficiency and premature coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol.* 2010;21(4):289-97.
- [44] Gordts SC, Muthuramu I, Amin R, Jacobs F, De Geest B. The Impact of Lipoproteins on Wound Healing: Topical HDL Therapy Corrects Delayed Wound Healing in Apolipoprotein E Deficient Mice. *Pharmaceuticals.* 2014;7(4):419-32;
- [45] De Nardo D, Labzin LI, Kono H, Seki R, Schmidt SV, Beyer M, et al. High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nature Immunol.* 2014;15:152–60.
- [46] Silva LCN, Correia MTS. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. *Front Microbiol.* 2014; 5: 20.
- [47] Li J. Studies of animal models on rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, wound healing and infection. 1th ed. Solfjädern Offset AB:Umeå; 2005.
- [48] Dubois B, Peumans WJ, Van Damme EJ, Van Damme J, Opdenakker G. Regulation of gelatinase B (MMP-9) in leukocytes by plant lectins. *FEBS Lett.* 1998;427(2):275-8.
- [49] Whisstock JC, Bottomley SP. Structural biology: Serpins' mystery solved. *Nature.* 2008;455(7217):1189-90.
- [50] Janciauskiene S, Wrenger S, Welte T. Immunoregulatory Properties of Acute Phase Proteins - Specific Focus on α 1-Antitrypsin. In: Janciauskiene S. editor. *Acute Phase Proteins*, InTech, 2013, p. 1-29.
- [51] Abdullah M, Kähler D, Vock C, Reiling N, Kugler C, Drömann D, et al. Pulmonary haptoglobin and CD163 are functional immunoregulatory elements in the human lung. *Respiration.* 2012;83(1):61-73.
- [52] Sen CK. Wound Healing Essentials: Let There Be Oxygen. *Wound Repair Regen.* 2009;17(1):1–18.
- [53] Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, Gao W, et al. An Analysis of Human MicroRNA and Disease Associations. *PlosOne.* 2008;3(10):3420-4.
- [54] Torre-Escudero E, Pérez-Sánchez R, Manzano-Román R, Oleaga A. Proteomic mapping of the lung vascular endothelial cell surface in *Schistosoma bovis*-infected hamsters. *Journal of proteomics.* 2014;106:86– 98.

- [55] Lee JW, Namkoong H, Kim HK, Kim S, Hwang DW, Na HR, et al. Fibrinogen gamma-A chain precursor in CSF: a candidate biomarker for Alzheimer's disease. *BMC Neurology*. 2007;7:1-14.
- [56] Cooper AV, Standeven KF, Ariëns RAS. Fibrinogen gamma-chain splice variant alters fibrin formation and structure. *Blood*. 2003;102(2):535-40.
- [57] D'Acquisto F, Perretti M, Flower RJ. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *British Journal of Pharmacology*. 2008;155:152–69.
- [58] Somma T, Cinci L, Formicola G, Pini A, Thurmond R, Ennis M, et al. A selective antagonist of histamine H₄ receptors prevents antigen-induced airway inflammation and bronchoconstriction in guinea pigs: involvement of lipocortin-1. *Br J Pharmacol*. 2013 Sep;170(1):200-13.
- [59] Li Z, Zhang L, Zhao Y, Li H, Xiao H, Fu R, et al. Cell-surface GRP78 facilitates colorectal cancer cell migration and invasion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013;45(5):987–94.
- [60] Li Z, Li Z. Glucose regulated protein 78: a critical link between tumor microenvironment and cancer hallmarks. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1826(1):13-22

6. Anexos

6.1 Normas do Periódico a Ser Submetido o Artigo



ACADEMIA
BRASILEIRA
DE CIÊNCIAS

Instruções aos Autores

16/03/2009

Revisadas em dezembro de 2007

A revista ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS encoraja fortemente as submissões online. Uma vez o artigo preparado de acordo com as instruções abaixo, visite o site de submissão online (<http://aabc.abc.org.br/>).

As instruções devem ser lidas cuidadosamente e seguidas integralmente. Desta forma, a avaliação e publicação de seu artigo poderão ser feitas com mais eficiência e rapidez. Os editores reservam-se o direito de devolver artigos que não estejam de acordo com estas instruções. Os artigos devem ser escritos em inglês claro e conciso.

Objetivo e Política Editorial

Todos os artigos submetidos devem conter pesquisa original e ainda não publicada ou submetida para publicação. O primeiro critério para aceitação é a qualidade científica. O uso excessivo de abreviaturas ou jargões deve ser evitado, e os artigos devem ser compreensíveis para uma audiência tão vasta quanto possível. Atenção especial deve ser dada ao Abstract, Introdução e Discussão, que devem nitidamente chamar a atenção para a novidade e importância dos dados relatados. A não observância desta recomendação poderá resultar em demora na publicação ou na recusa do artigo.

Os textos podem ser publicados como uma revisão, um artigo ou como uma breve comunicação. A revista é trimestral, sendo publicada nos meses de março, junho, setembro e dezembro.

Tipos de Artigos

Revisões: Revisões são publicadas somente a convite. Entretanto, uma revisão pode ser submetida na forma de breve carta ao Editor a qualquer tempo. A carta deve informar os tópicos e autores da revisão proposta e declarar a razão do interesse particular do assunto para a área.

Artigos: Sempre que possível, os artigos devem ser subdivididos nas seguintes partes: 1. Página de rosto; 2. Abstract (escrito em página separada, 200 palavras ou menos, sem abreviações); 3. Introdução; 4. Materiais e Métodos; 5. Resultados; 6. Discussão; 7. Agradecimentos quando necessário; 8. Resumo e palavras-chave (em português - os autores estrangeiros receberão assistência); 9. Referências. Artigos de algumas áreas, como Ciências Matemáticas, devem observar seu formato usual. Em certos casos pode ser aconselhável omitir a parte (4) e reunir as partes (5) e (6). Onde se aplicar, a parte de Materiais e Métodos deve indicar o Comitê de Ética que avaliou os procedimentos para estudos em humanos ou as normas seguidas para a manutenção e os tratamentos experimentais em animais.

Breves Comunicações: Breves comunicações devem ser enviadas em espaço duplo. Depois da aprovação não serão permitidas alterações no artigo, a fim de que somente correções de erros tipográficos sejam feitas nas provas.

Os autores devem enviar seus artigos somente em versão eletrônica.

Preparo dos Artigos

Os artigos devem ser preparados em espaço duplo. Depois de aceitos nenhuma modificação será realizada,

para que nas provas haja somente correção de erros tipográficos.

Tamanho dos artigos: Embora os artigos possam ter o tamanho necessário para a apresentação concisa e discussão dos dados, artigos sucintos e cuidadosamente preparados têm preferência tanto em termos de impacto quando na sua facilidade de leitura.

Tabelas e ilustrações: Somente ilustrações de alta qualidade serão aceitas. Todas as ilustrações serão consideradas como figuras, inclusive desenhos, gráficos, mapas, fotografias e tabelas com mais de 12 colunas ou mais de 24 linhas (máximo de figuras gratuitas: cinco figuras). A localização provável das figuras no artigo deve ser indicada.

Figuras digitalizadas: As figuras devem ser enviadas de acordo com as seguintes especificações: 1. Desenhos e ilustrações devem ser em formato .PS/.EPS ou .CDR (Postscript ou Corel Draw) e nunca inseridas no texto; 2. Imagens ou figuras em meio tom devem ser no formato .TIF e nunca inseridas no texto; 3. Cada figura deve ser enviada em arquivo separado; 4. Em princípio, as figuras devem ser submetidas no tamanho em que devem aparecer na revista, i.e., largura de 8 cm (uma coluna) ou 12,6 cm (duas colunas) e com altura máxima para cada figura menor ou igual a 22 cm. As legendas das figuras devem ser enviadas em espaço duplo e em folha separada. Cada dimensão linear das menores letras e símbolos não deve ser menor que 2 mm depois da redução. Somente figuras em preto e branco serão aceitas. 5. Artigos de Matemática, Física ou Química podem ser digitados em Tex, AMS-Tex ou Latex; 6. Artigos sem fórmulas matemáticas podem ser enviados em .RTF ou em WORD para Windows.

Página de rosto: A página de rosto deve conter os seguintes itens: 1. Título do artigo (o título deve ser curto, específico e informativo); 2. Nome (s) completo (s) do (s) autor (es); 3. Endereço profissional de cada autor; 4. Palavras-chave (4 a 6 palavras, em ordem alfabética); 5. Título abreviado (até 50 letras); 6. Seção da Academia na qual se enquadra o artigo; 7. Indicação do nome, endereço, números de fax, telefone e endereço eletrônico do autor a quem deve ser endereçada toda correspondência e prova do artigo.

Agradecimentos: Devem ser inseridos no final do texto. Agradecimentos pessoais devem preceder os agradecimentos a instituições ou agências. Notas de rodapé devem ser evitadas; quando necessário, devem ser numeradas. Agradecimentos a auxílios ou bolsas, assim como agradecimentos à colaboração de colegas, bem como menção à origem de um artigo (e.g. teses) devem ser indicados nesta seção.

Abreviaturas: As abreviaturas devem ser definidas em sua primeira ocorrência no texto, exceto no caso de abreviaturas padrão e oficial. Unidades e seus símbolos devem estar de acordo com os aprovados pela ABNT ou pelo Bureau International des Poids et Mesures (SI).

Referências: Os autores são responsáveis pela exatidão das referências. Artigos publicados e aceitos para publicação (no prelo) podem ser incluídos. Comunicações pessoais devem ser autorizadas por escrito pelas pessoas envolvidas. Referências a teses, abstracts de reuniões, simpósios (não publicados em revistas indexadas) e artigos em preparo ou submetidos mas ainda não aceitos, podem ser citados no texto como (Smith et al. unpublished data) e não devem ser incluídos na lista de referências.

As referências devem ser citadas no texto como, por exemplo, (Smith 2004), (Smith and Wesson 2005) ou, para três ou mais autores, (Smith et al. 2006). Dois ou mais artigos do mesmo autor no mesmo ano devem ser distinguidos por letras, e.g. (Smith 2004a), (Smith 2004b) etc. Artigos com três ou mais autores com o mesmo primeiro autor e ano de publicação também devem ser distinguidos por letras.

As referências devem ser listadas em ordem alfabética do primeiro autor sempre na ordem do sobrenome XY no qual X e Y são as iniciais. Se houver mais de 10 autores, use o primeiro seguido de et al. As referências devem ter o nome do artigo. Os nomes das revistas devem ser abreviados. Para as abreviações corretas, consultar a listagem de base de dados na qual a revista é indexada ou consulte a World List of Scientific Periodicals. A abreviatura para os Anais da Academia Brasileira de Ciências é An Acad Bras Cienc. Os seguintes exemplos são considerados como guia geral para as referências.

Artigos

Albe-Fessard D, Condes-Lara M, Sanderson P and Levante A . 1984a. Tentative explanation of the special role played by the áreas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.

Albe-Fessard D, Sanderson P, Condes-Lara M, Delandsheer E, Giuffrida R and Cesaro P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* 56: 371-383.

Knowles RG and Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

Pinto ID and Sanguinetti YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

Livros e capítulos de livro

Davies M. 1947. *An outline of the development of Science*, Athinker's Library, n. 120. London: Watts, 214 p.

Prehn RT . 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: *National Cancer Conference* , 5., Philadelphia *Proceedings* ..., Philadelphia: J.B. Lippincott, p. 97-104.

Uytenbogaardt W and Burke EAJ . 1971. *Tables for microscopic identification of minerals*, 2 nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

Woody RW . 1974. Studies of theoretical circular dichroism of Polipeptides: contributions of B-turns. In: Blouts ER et al . (Eds), *Peptides, polypeptides and proteins*, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.

Outras publicações

International Kimberlite Conference , 5, 1991. Araxá, Brazil. *Proceedings* ... Rio de Janeiro: CPRM, 1994., 495 p.

Siatycki J . 1985. *Dynamics of Classical Fields*. University of Calgary, Department of Mathematics and Statistics, 19985, 55 p. Preprint n. 600.

6.2 Lista de Tabelas

Tabela 1: As proteínas identificadas a partir de tecido epitelial de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) tratadas com Con A (100 uL) por MALDI-TOF (dessorção assistida pela matriz / ionização por laser em tempo de voo).

Spot	Protein	Score	Coverage (%)	Access	Expression level	pI	Mr (Da)	GO Term
1	Chain C, Crystal Structure Of The Neonatal Fc Receptor Complexed With A Heterodimeric Fc	147	64	gi 13399989	1,78	6,76	25601	Immune system process
2	Chain C, Crystal Structure Of The Neonatal Fc Receptor Complexed With A Heterodimeric Fc	97	47	gi 13399990	1,81	6,76	25601	Immune system process
3	reproapolipoprotein A-I	141	56	gi 55747	2,23	5,52	30126	multicellular organismal process
4	plasminogen precursor	161	25	gi 16758216	2,46	6,79	93214	metabolic process (Proteolysis)
5	Serum albumin	158	35	gi 124028612	2,66	6,09	70682	transport
6	alpha-1-antitrypsin precursor	174	38	gi 203063	2,96	5,7	45978	metabolic process (Proteolysis)/ biological regulation (regulation of catalytic activity)
7	Serum albumin	177	37	gi 124028612	3,04	6,09	70682	transport
8	Serum albumin	154	37	gi 124028612	3,72	6,09	70682	transport
9	Hemopexin	143	28	gi 122065203	ConA	7,58	52060	metabolic process (Proteolysis)/ Transport (Vitamin)
10	Hemopexin	146	30	gi 122065203	ConA	7,58	52060	metabolic process (Proteolysis)/ Transport (Vitamin)
11	hemopexin, isoform CRA_e	154	37	gi 149068486	ConA	8,5	39811	metabolic process (Proteolysis)/ Transport (Vitamin)
12	Hemopexin	132	33	gi 122065203	ConA	7,58	52060	metabolic process (Proteolysis)/ Transport (Vitamin)
13	hemopexin precursor	107	35	gi 16758014	ConA	7,58	52000	metabolic process (Proteolysis)/ Transport (Vitamin)
14	T-kininogen 2 precursor	102	30	gi 57526868	ConA	5,94	48757	metabolic process (Proteolysis)/ Transport (Vitamin)

Continuação Tabela 1

Spot	Protein	Score	Coverage (%)	Access	Expression level	pI	Mr (Da)	GO Term
15	T-kininogen 2 precursor	120	37	gi 57526868	ConA	5,94	48757	metabolic process (Proteolysis)/ Transport (Vitamin)
16	vimentin, isoform CRA_b	158	40	gi 149021114	ConA	5,06	53725	Cell organization
17	major acute phase alpha-1	93	28	gi 758263	ConA	6	48058	without
18	major acute phase alpha-1	136	31	gi 758263	ConA	6	48058	without
19	T-kininogen 1	127	32	gi 60392582	ConA	6,08	48828	metabolic process (Proteolysis)/ Transport (Vitamin)
20	vimentin, isoform CRA_b	247	63	gi 149021114	ConA	5,06	53725	Cell organization
21	preprohaptoglobin, partial	92	31	gi 204657	ConA	7,16	30428	immune system process/ metabolic process (PROTEOLYSIS)/ multicellular organismal process/ response to stimulus
22	preprohaptoglobin, partial	119	34	gi 204658	ConA	7,16	30428	immune system process/ metabolic process (PROTEOLYSIS)/ multicellular organismal process/ response to stimulus
23	creatine kinase M-type	184	51	gi 6978661	-6,63	6,58	43220	metabolic process
24	serum albumin	84	26	gi 124028612	-6,62	6,09	70682	transport
25	fructose-bisphosphate aldolase A	106	33	gi 6978487	-4,53	8,31	39783	metabolic process
26	myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform isoform 1f	118	56	gi 117676401	-4,19	4,99	20781	multicellular organismal process
27	fructose-bisphosphate aldolase A	103	33	gi 6978487	-2,54	8,31	39783	metabolic process
28	tropomyosin alpha isoform	75	29	gi 14134101	-2,42	4,71	28553	multicellular organismal process
29	phosphoglycerate kinase	134	47	gi 206113	-2,18	7,53	44925	metabolic process
30	alpha-enolase	117	39	gi 158186649	-2,02	6,16	47440	metabolic process
31	carbonic anhydrase 3	148	59	gi 31377484	-1,95	6,89	29698	metabolic process
32	apolipoprotein E, isoform CRA_c	115	44	gi 149056721	-1,95	7,93	27354	multicellular organismal process

Continuação Tabela 1

Spot	Protein	Score	Coverage (%)	Access	Expression level	pI	Mr (Da)	GO Term
33	myozenin-1	81	35	gi 157819165	-1,85	8,57	31379	cellular component organization or biogenesis
34	apolipoprotein A-IV precursor	124	39	gi 8392909	-1,71	5,18	44438	multicellular organismal process
35	lipocortin I	163	46	gi 235879	-1,63	6,97	39137	cell communication/ metabolic process
36	tropomyosin beta chain isoform Tpm2.1sm/cy	118	37	gi 66730475	-1,53	4,63	32995	multicellular organismal process
37	serum albumin	249	41	gi 124028612	-1,51	6,09	70682	transport
38	ATP synthase beta subunit	195	51	gi 1374715	-1,5	4,92	51171	metabolic process/ transport
39	myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	89	39	gi 6981238	Control	4,82	19071	multicellular organismal process
40	myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	100	49	gi 6981239	Control	4,82	19071	multicellular organismal process
41	phosphoglycerate mutase 2	96	42	gi 8393948	Control	8,85	28908	metabolic process
42	PREDICTED: leukocyte elastase inhibitor A-like isoform X1	84	34	gi 532023450	Control	5,46	42935	metabolic process
43	creatine kinase M-type	143	41	gi 6978661	Control	6,58	43220	metabolic process
44	beta-enolase	136	43	gi 126723393	Control	7,08	47326	metabolic process

Tabela 2: As proteínas identificadas a partir de tecido epitelial de ratos (*Rattus norvegicus*) - Wistar tratados com laser ($\lambda = 660$ nm, ED = 20 J / cm², P = 100 mW, F = 50 Hz) por MALDI-TOF (assistida por matriz com dessorção por laser / ionização de tempo de voo).

Spot	Protein	Score	Coverage (%)	Access	Expression level	pI	Mr (Da)	GO Term
1	serum albumin	194	36	gi 124028612	1,66	6,09	70682	Transport
2	myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform isoform 1f	86	35	gi 117676401	1,74	4,99	20781	multicellular organismal process
3	serum albumin	167	39	gi 124028612	1,83	6,09	70682	Transport
4	chain C, Crystal Structure Of The Neonatal Fc Receptor Complexed With A Heterodimeric Fc	139	56	gi 13399989	1,99	6,76	25601	Immune system process
5	hemopexin	144	33	gi 122065203	2,04	7,58	52060	metabolic process (Proteolysis)/ Transport (Vitamin)
6	chain C, Crystal Structure Of The Neonatal Fc Receptor Complexed With A Heterodimeric Fc	116	56	gi 13399989	2,81	6,76	25601	Immune system process
7	chain C, Crystal Structure Of The Neonatal Fc Receptor Complexed With A Heterodimeric Fc	85	56	gi 13399989	3,42	6,76	25601	Immune system process
8	lipid phosphate phosphatase-related protein type 4	73	21	gi 325197225	4,33	9,07	84249	metabolic process
9	serum albumin	163	38	gi 124028612	Laser	6,09	70682	Transport
10	serum albumin	168	37	gi 124028612	Laser	6,09	70682	Transport
11	serum albumin	198	45	gi 124028612	Laser	6,09	70682	Transport
12	creatine kinase M-type	184	51	gi 6978661	-2,4	6,58	43220	metabolic process
13	tropomyosin alpha isoform	75	29	gi 14134101	-4,95	4,71	28553	multicellular organismal process
14	apolipoprotein E, isoform CRA_c	115	44	gi 149056721	-1,6	7,93	27354	multicellular organismal process
15	tropomyosin beta chain isoform Tpm2.1sm/cy	118	37	gi 66730475	-1,54	4,63	32995	multicellular organismal process
16	serum albumin	249	41	gi 124028612	-1,61	6,09	70682	Transport
17	myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	100	49	gi 6981239	-3,3	4,82	19071	multicellular organismal process
18	phosphoglycerate mutase 2	96	42	gi 8393948	Control	8,85	28908	metabolic process
19	beta-enolase	136	43	gi 126723393	Control	7,08	47326	metabolic process

Tabela 3: As proteínas identificadas a partir de tecido epitelial de ratos (*Rattus norvegicus*) - Wistar tratados com a combinação de Con A-laser por MALDI-TOF (dessorção assistida pela matriz / ionização por laser em tempo de voo).

Spot	Protein	Score	Coverage (%)	Access	Expression level	pI	Mr (Da)	GO Term
1	Serum albumin	128	33	gi 124028612	1,54	6,09	70682	Transport
2	Chain C, Crystal Structure Of The Neonatal Fc Receptor Complexed With A Heterodimeric Fc	125	52	gi 13399989	1,65	6,76	25601	Immune system process
3	Serum albumin	162	39	gi 124028612	1,69	6,09	70682	Transport
4	Alpha-1-antitrypsin	102	33	gi 112889	1,77	5,7	46278	metabolic process (Proteolysis)/ biological regulation (regulation of catalytic activity)
5	keratin, type I cytoskeletal 14	200	43	gi 56912233	1,8	5,08	52936	cellular component organization or biogenesis
6	Chain C, Crystal Structure Of The Neonatal Fc Receptor Complexed With A Heterodimeric Fc	81	58	gi 13399989	1,88	6,76	25601	Immune system process
7	phosphoglycerate kinase	122	37	gi 206113	1,96	7,53	44925	metabolic process
8	Serum albumin	178	37	gi 124028612	2	6,09	70682	Transport
9	apolipoprotein A-I	126	49	gi 2145145	2,01	5,51	29956	multicellular organismal process
10	Chain C, Crystal Structure Of The Neonatal Fc Receptor Complexed With A Heterodimeric Fc	90	47	gi 13399989	2,11	6,76	25601	Immune system process
11	Alpha-1-antitrypsin	101	33	gi 112889	2,12	5,7	46278	metabolic process (Proteolysis)/ biological regulation (regulation of catalytic activity)
12	plasminogen precursor	92	19	gi 16758216	2,37	6,79	93214	metabolic process
13	78 kDa glucose-regulated protein precursor	115	28	gi 25742763	2,55	5,07	72473	metabolic process/ response to stimulus/ cellular component organization or biogenesis
14	Chain A, Rat Annexin V Crystal Structure: Ca ²⁺ -Induced Conformational Changes	198	53	gi 157836327	2,56	4,97	35458	metabolic process
15	Serum albumin	148	35	gi 124028612	2,81	6,09	70682	Transport
16	Serum albumin	159	35	gi 124028613	3,26	6,09	70682	Transport
17	PREDICTED: serpin B5 isoform X1	127	37	gi 672073583	8,83	6,48	50293	metabolic process

Continuação Tabela 3

Spot	Protein	Score	Coverage (%)	Access	Expression level	pI	Mr (Da)	GO Term
18	fibrinogen gamma chain precursor	136	43	gi 61098186	ConA/Laser	5,85	50247	cell communication/ cell adhesion/ response to stimulus(Coagulação)
19	serum albumin	249	41	gi 124028612	-2,13	6,09	70682	Transport
20	creatine kinase M-type	184	51	gi 6978661	-1,99	6,58	43220	metabolic process
21	myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	100	49	gi 6981239	Control	4,82	19071	multicellular organismal process

6.3 Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 06 de novembro de 2013.

Ofício nº 648/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Aileciram Monialy Barros Marinho**
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Bioquímica
Processo nº 23076.046605/2013-91

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, ***"Efeito da Concavalina A Associada ao Laser Terápico no Processo de Cicatrização de Lesões Cutâneas"***.

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

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

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

Origem dos animais: Biotério, aviário, etc. Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE. Animal; Camundongo isogênico; Linhagem; Wistar; Idade 90-120 dias; Peso; 350-400g; Sexo; macho; Nº Total de Animais; 80.

Atenciosamente


Prof.ª Tania Rieger
Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2306924

CCB: Integrar para desenvolver