



Yeon Jung Kim

*Avaliação do efeito da Artin M no processo
de reparação em mucosa mastigatória.*

**ARARAQUARA
2011**

Yeon Jung Kim

***Avaliação do efeito da Artin M no processo
de reparação em mucosa mastigatória.***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

**ARARAQUARA
2011**

Kim, Yeon Jung

Avaliação do efeito da Artin M no processo de reparação em mucosa mastigatória / Yeon Jung Kim . – Araraquara: [s.n.], 2011. 110 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

1. Mucosa bucal 2. Cicatrização 3. Periodontia 4. Glicoproteínas
I. Título

YEON JUNG KIM

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ARTIN M NO PROCESSO DE
REPARAÇÃO EM MUCOSA MASTIGATÓRIA**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

2º Examinador Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

3º Examinador Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira

4º Examinador Prof. Dr. Rodrigo Otávio Citó César Rêgo

5º Examinador Prof. Dr. Sérgio Luis Scombatti de Souza

Araraquara, 18 de novembro de 2011.

Dedicatória

À Deus,

pela sua presença constante na minha vida e pelos sonhos que
me permitiu realizar

Aos meus pais, Myoung Hyun Kim e Hyun Suk Kim,

Pelo amor incondicional, dedicação absoluta e pelos exemplos de
vida, que me fizeram fortes para que pudesse vencer todos os obstáculos desta
caminhada.

“Tu és o meu refúgio e a minha fortaleza, o Meu
Deus em quem confio.” (Salmo 91, 2)

Agradecimentos especiais

Aos meus irmãos, Young Rae e Young Hyo,

Pelo companheirismo, por todo apoio e por estarem presentes em todas as minhas conquistas.

A minha sobrinha Julia,

Pelo amor que me faz sentir, por cada momento que posso presenciar a pureza de seus sorrisos, por me fazer uma pessoa mais feliz.

Aos meus familiares,

Pelo carinho e apoio prestados em todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara- Unesp**, na pessoa de seu Diretor, **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segala** e Vice-Diretora, **Prof. Dra. Andrea Montandon**, que me acolhe desde 2000.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli**, pelos ensinamentos, confiança em meu trabalho, disponibilidade e a contribuição durante a realização do curso de doutorado.

À **Profa. Dra. Maria Cristina Antunes Roque-Barreira**, aos alunos de pós-graduação especialmente **Fernanda Carvalho e Marina Conrado** e aos **funcionários do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP** pelo carinho que me receberam, pela colaboração e condições oferecidas durante a realização desta pesquisa.

Aos amigos do laboratório especialmente **João, Andressa, Pedro e Letícia**, que participaram ativamente deste trabalho.

Aos grandes amigos que me apoiaram durante todo esse tempo: **Andreza, Alessandra, Roberta, Carina, Ana Paula, Juliê, Ana Elisa, Lillian, Aline, Fer Lessa, Rafael, Lícia, Fábio, Leda, Paty**, pela amizade sincera, pelo convívio agradável e por momentos de descontração durante esses anos.

Aos grandes amigos de Araraquara especialmente **Kiko, Silvia, Bia e Luli**, pelo carinho, amizade sincera e pelos momentos de convívio tão importantes. **Elias e Aninha** por momentos de descontração agradáveis.

A todos meus amigos de longa data que pacientemente souberam entender minha ausência.

A Prof. Dra. Andréa Gonçalves, pelo apoio e além de tudo pela amizade tão especial.

A todos os meus colegas de curso de pós-graduação: **Livia, Michele, Naná, Rubão, Roberta, Shelon, Sabrina, Andrés, Wagner, Rodrigo, Marina, Giovana, Li Finoti**, pela troca de conhecimentos e convívio agradável.

Aos Docentes da Disciplina de Periodontia e de outras que se dedicaram às disciplinas durante o curso de Doutorado: Dr. Carlos Rossa Junior, Dr. Elcio Marcantonio Junior, Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Dr. Luís Carlos Spolidorio, Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio, Dra. Silvana Regina Perez Orrico. Pela excelente formação e extrema competência, pela disponibilidade e convivência e por contribuírem de maneira especial com a minha formação profissional.

À Regina Lúcia pela paciência, cooperação e empenho para que tudo seja da forma mais organizada possível.

Aos funcionários da disciplina de Periodontia, especialmente **Claudinha, Zezé e D. Maria do Rosário**, pela disponibilidade e compreensão que possibilitaram a realização desse trabalho.

Aos funcionários da do departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Toninho e Thelma, pela atenção e disponibilidade.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação Mara, Rosângela, Flávia e Alexandre, pela atenção e disponibilidade.

Aos **funcionários da Biblioteca**, por toda atenção e auxílios prestados.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp, Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq** pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

Epígrafe

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao
seu tamanho original. “

Albert Einstein (1879-1955)

Dados Curriculares

YEON JUNG KIM

NASCIMENTO	11 de julho de 1980 –Seul – Coréia do Sul.
FILIAÇÃO	Myoung Hyun Kim Hyun Suk Kim Lee
2000/2003	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.
2004/2005	Estágio de Atualização junto à disciplina de Periodontia na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2005/2006	Curso de Especialização em Periodontia na Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas - APCD
2006/2008	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2008/2011	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA	12
RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 PROPOSIÇÃO	28
3 CAPÍTULOS	30
3.1 Capítulo 1	31
3.2 Capítulo 2	52
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
5 CONCLUSÃO	80
6 REFERÊNCIAS	82
7 APÊNDICE	94
7.1 Metodologia	95
8 ANEXOS.....	107
8.1 Aprovação do Comitê de Ética- Estudo1	108
8.2 Aprovação do Comitê de Ética- Estudo2	109

LISTA DE ABREVIATURAS

EGF: Fator de crescimento epidermal

FGF: Fator de crescimento de fibroblasto

bFGF: Fator de crescimento de fibroblasto básico

IFN- β : interferon - beta

IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina

IL-1: Interleucina - 1

IL-1 α : Interleucina – 1 alfa

IL-1 β : Interleucina – 1 beta

IL-6: Interleucina - 6

IL-8: Interleucina - 8

MMP: Metaloproteinase da matriz

MMP-1: Metaloproteinase da matriz - 1

MMP-2: Metaloproteinase da matriz - 2

MMP-8: Metaloproteinase da matriz - 8

MMP-9: Metaloproteinase da matriz - 9

PCNA: Antígeno nuclear de proliferação celular

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PGE2: Prostaglandina E2

TGF: fator de crescimento de transformação

TGF- β : Fator de crescimento de transformação - beta

TLR2: Receptor tipo Toll 2

TNF α : Fator de necrose tumoral - alfa

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

Kim YJ. Avaliação do efeito da Artin M no processo de reparação em mucosa mastigatória [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

RESUMO

Artin M é uma lectina purificada de sementes de *Artocarpus heterophyllus* que, recentemente, mostrou-se capaz de promover aceleração da cicatrização de lesões por queimadura de pele ou por abrasão da córnea em ratos e coelhos.

O objetivo desta tese foi avaliar os efeitos da Artin M no processo de reparação da mucosa mastigatória bucal, por meio de modelos de estudo in vivo. Primeiro estudo: Três feridas cirúrgicas circulares de 6 mm de diâmetro foram criadas na mucosa palatina de 20 cães, e divididas aleatoriamente em 3 grupos de acordo com os tratamentos: C – controle (não tratados), A - Artin M, V - veículo. Quatro animais de cada grupo foram sacrificados após 2, 4, 7, 14 e 21 dias pós-tratamento e suas maxilas analisadas clinicamente quanto ao padrão de cicatrização, seguido de análise histológica, imuno-histoquímica para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e atividade de mieloperoxidase. Clinicamente, o grupo A demonstrou melhor cicatrização em todos os períodos quando comparada aos outros grupos ($p < 0,05$). A análise histológica mostrou ter havido no grupo A maior estimulação na produção de fibras colágenas, maturação do tecido de granulação e organização do epitélio. A imunolocalização de PCNA mostrou uma maior tendência na proliferação celular em lesões do grupo A principalmente nos dias iniciais ($p < 0,05$). O influxo de neutrófilos mostrou-se estatisticamente aumentado no grupo A quando comparado aos outros grupos nos dias 2 e 4 ($p < 0,05$). Conclui-se que a Artin M promoveu aceleração na reparação das feridas na mucosa mastigatória em cães, via recrutamento de neutrófilos e indução da proliferação celular.

É bem conhecido o envolvimento de mediadores biológicos como citocinas e fatores de crescimento liberados pelas diferentes células no processo de reparação

tecidual. Portanto, tendo em vista os resultados obtidos no primeiro modelo visamos avaliar a resposta ao tratamento tópico do gel de Artin M na mucosa mastigatória de rato.

Segundo estudo: Feridas cirúrgicas circulares de 4 mm de diâmetro foram criados na mucosa palatina de 72 ratos Wistar, divididos aleatoriamente de acordo com o tratamento realizado nas lesões em 3 grupos: C – controle (não tratados), A - Artin M, V - veículo. Após 3, 5 e 7 dias pós-tratamento, 8 animais de cada grupo foram sacrificados e suas hemimaxilas foram divididas para realização da análise histológica; imuno-histoquímica para PCNA, bFGF, VEGF e TGF- β ; expressão protéica das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF α , e dos fatores de crescimento VEGF e TGF- β por ELISA. A análise histológica mostrou que no grupo A houve estimulação na regeneração e organização do epitélio, na produção de fibras colágenas e maturação do tecido de granulação e diminuição estatisticamente significativa no infiltrado inflamatório no dia 7 quando comparado aos outros grupos ($p < 0,05$). A análise imuno-histoquímica mostrou maior expressão de TGF- β e VEGF no dia 3 ($p < 0,05$) e maior proliferação celular no dia 5 ($p < 0,05$) no grupo A. Além disso, maior expressão protéica de TGF- β e VEGF nas lesões tratadas pelo Artin M foi confirmada pela ELISA no dia 3 ($p < 0,05$). Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que a aplicação tópica de gel de Artin M promoveu a reparação da mucosa mastigatória de ratos através estimulação na produção de TGF- β e VEGF, proliferação celular, deposição de colágeno e reepitelização.

Palavras-chave: Mucosa bucal, cicatrização, periodontia, glicoproteínas.

Kim YJ. Evaluation of Artin M on wound healing in palatal mucosa [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

ABSTRACT

Artin M, lectin from *Artocarpus heterophyllus* seeds, has been demonstrated to stimulate recruitment and activation of neutrophil and mast cells. Furthermore, it has been shown to accelerate the process of wound healing on burn injuries and corneal epithelial lesions in rats and rabbits, respectively. The aim of this study was to evaluate the effects of Artin M on wound healing in palatal mucosa in two animal models.

Study 1: Three wounds of 6 mm full thickness were surgically created in the hard palate mucosa of twenty dogs. The wounds of each animal were randomly divided into three groups according to one of the treatment assigned: C– Control (non-treated), A- Artin M gel, and V– Vehicle (carboxymethylcellulose 3% gel). Four animals per group were sacrificed at 2, 4, 7, 14 and 21 days post-surgery. Before sacrifice, wounded areas were photographed and scored for macroscopic healing evaluation. Afterwards, maxillary tissue were harvested and divided to perform histological analysis, immunohistochemical staining against Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and measurement of myeloperoxidase activity. Clinical analysis showed that wound closure was accelerated in group A in comparison to other groups in all periods. Histological features showed enhanced reepithelization and collagen fiber formation resulting in faster maturation of granular tissue in group A compared to the other groups, by day 14. Artin M treatment significantly induced cells proliferation at day 2 and 4 ($p<0.05$). Neutrophils infiltration in the group A was significantly higher than in the other groups at days 2 and 4 ($p<0.05$). The results suggest that Artin M gel may potentially facilitate wound healing on palatal mucosa via the recruitment of neutrophils and promotion of cells proliferation.

It is well known that cytokines and growth factors released from different cells coordinate the healing process. Therefore, based on previous results we evaluated the effects of topical application of Artin M on wound healing in palatal mucosa of rats.

Study 2: Seventy-two rats were divided into three groups according to one of the treatment assigned: C– Control (non-treated), A- Artin M gel, and V– Vehicle (carboxymethylcellulose 3% gel). A 4 mm full thickness wound was surgically created on the palatal mucosa of each animal. Eight animals per group were sacrificed at 3, 5, and 7 days post-surgery. Maxillary biopsies were harvested and divided to perform histological analysis, immunohistochemical analysis for bFGF, PCNA TGF- β and VEGF and ELISA assay to evaluate levels of IL-1, IL-6, TNF α , TGF- β and VEGF. Histological features showed faster reepithelization in group A, significant decrease in inflammatory cells infiltration by day 7 ($p < 0.05$) and increased collagen fiber formation resulting in faster maturation of granular tissue compared to the other groups. Also, Artin M significantly induced cells proliferation at day 5 ($p < 0.05$). Significantly higher expression of TGF- β and VEGF were observed in group A compared to C at day 3 ($p < 0.05$). In conclusion, the single application of Artin M gel has shown to be effective in the healing of oral mucosa wound in rats by enhancing TGF- β and VEGF release, cell proliferation, reepithelization, collagen deposition and arrangement of collagen fibers. These findings may partially explain potential pharmacological actions of Artin M on promoting wound healing process.

Keywords: Oral mucosa, wound healing, periodontics, glycoproteins.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Na Periodontia e na Implantodontia, as cirurgias mucogengivais têm sido amplamente utilizadas para devolver saúde, função e estética ao paciente. Esses procedimentos têm apresentado alto índice de sucesso devido a boa previsibilidade e prognóstico favorável ⁴⁶. Dentre eles, as técnicas de enxertos de tecido mole - enxerto gengival livre e enxerto de tecido conjuntivo – são indicados, para reconstrução de áreas de recessão gengival, perda de papila interdental, deficiência no rebordo alveolar, selamento alveolar em implantação imediata e em conjunto com a técnica de regeneração óssea guiada ^{54,58,78}.

Na técnica de enxerto de tecido mole, há a necessidade de uma área doadora, que deve apresentar gengiva ceratinizada em espessura suficiente para possibilitar a remoção do enxerto, o qual será removido e transferido para outra região, mediante perda total de continuidade com a sua área doadora ⁵⁸. A irrigação sangüínea que viabilizará sua sobrevivência se fará a partir de neoformação vascular proveniente da área receptora ⁶⁶. As opções de áreas doadoras de enxertos gengivais incluem regiões retromolar, rebordos edêntulos e a mucosa mastigatória do palato, principalmente na região de molares e pré-molares ⁸⁹. As vantagens da utilização dos enxertos gengivais residem em índices elevados de sucesso, tratando-se de um tecido autógeno e de obtenção relativamente fácil. Entre as desvantagens, estão: a necessidade de segundo sítio cirúrgico, desconforto pós-operatório, cicatrização por segunda intenção, possibilidade de infecção e necrose ^{55,89}.

Esses sítios são feridas agudas, resultantes da interrupção da integridade da mucosa pelo procedimento cirúrgico, que estão sujeitas à infecção e cronificação. Entretanto, poucos estudos são encontrados na literatura avaliando materiais com a finalidade de acelerar e melhorar a reparação da área doadora na cavidade oral. Alguns trabalhos têm avaliado materiais como cimento cirúrgico, colágeno microcristalino ⁹⁴, subgalato de bismuto ¹⁰⁵ e adesivos com fibrina na tentativa de uma rápida hemostasia e proteção da ferida ^{2,10,26,51,52}.

Na medicina, terapias com corticosteróides, antimicrobianos, antiinflamatórios têm sido sugeridas e utilizadas visando acelerar a reparação para tratamento de feridas cutâneas em geral ⁶⁵. No entanto, em vista dos efeitos adversos e na busca de propriedades adicionais, nos últimos anos, tem se intensificado pesquisas com produtos naturais como alternativas. Vários estudos têm demonstrado efeitos positivos dos derivados de plantas como *Centella asiática*, *Morinda citrifolia*, *Chamomilla recutita*, *Aloe vera*, entre outros, na reparação de feridas atuando na regulação indireta de mediadores celulares em alguma fase da reparação ^{6,31,65,74,99}.

Reparação

A reparação consiste na sequência de eventos moleculares que são divididos didaticamente em quatro fases: inflamação, proliferação, remodelação e contração, ocorrendo na realidade uma transição gradual e contínua durante o processo ^{19,30,61}.

A fase inflamatória inicia-se logo após a lesão, por um período de um a cinco dias, envolvendo fenômenos vasculares, de coagulação, de migração celular e de liberação de citocinas e fatores de crescimento ¹⁹. Inicialmente, na ferida, os vasos lesionados sofrem contração, seguida de agregação plaquetária, resultando na formação de coágulo. No espaço perivascular, as plaquetas extravasadas aderem-se ao colágeno, sofrendo degranulação e liberação de fatores de crescimento como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação (TGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) ^{30,49,102}.

Os neutrófilos são as primeiras células que se dirigem ao sítio de dano tecidual, iniciando o processo da cicatrização. Os neutrófilos recrutados aderem-se às células endoteliais e migram para o tecido inflamado, iniciando debridamento de tecidos desvitalizados, reconhecimento, fagocitose e destruição dos agentes infecciosos através da produção de substâncias tóxicas como radicais livres de oxigênio, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, mieloperoxidase e elastase ¹⁹.

Macrófagos residentes, bem como macrófagos derivados de monócitos recém-atraídos para o local, são ativados e desempenham papel essencial na formação e remodelação do tecido, sendo responsáveis pela fagocitose, recrutamento de novas células inflamatórias, ativação celular e angiogênese, atividades que decorrem da liberação de quimiocinas, citocinas e diversos fatores de crescimento, como Interleucina – 8 (IL-8), fator de necrose tumoral (TNF), EGF, PDGF, TGF, FGF^{30,49}. Os mastócitos também desempenham papel importante na reparação tecidual, principalmente por liberação de fatores contidos em seus grânulos, como triptase, heparina, IL-8, PDGF, TGF, bFGF VEGF que ampliam o recrutamento de neutrófilos, angiogênese, proliferação de fibroblastos e queratinócitos^{4,61}. A importância dessa fase foi ressaltada por Devalajara et al.,²⁵ em seu estudo, os camundongos *knockout* para gene CXCR2 apresentaram recrutamento deficiente de neutrófilos e macrófagos para a local da ferida, angiogênese reduzida, e atraso na reparação, demonstrando que modificações da resposta inflamatória alteram o curso da reparação.

Dentre as enzimas proteolíticas envolvidas na reparação tecidual, as metaloproteinases da matriz (MMPs), principais responsáveis pela degradação de componente da matriz extracelular como colágeno, gelatina e elastina atuam em momentos distintos do processo⁴¹. Maior expressão das MMPs foi detectada nos tecidos em reparação¹⁰⁴. Na fase inflamatória, MMPs regulam a atividade de quimiocinas, extravasamento de leucócitos e migração celular⁴¹. Durante a angiogênese, promovem a ruptura da camada basal vascular e a proliferação endotelial, sendo essenciais na reepitelização e no remodelamento do tecido⁵⁷.

Na fase proliferativa, que ocorre de 3 a 12 dias após a lesão, os fibroblastos estimulados por bFGF e TGF- β começam a deposição de colágeno, formando o tecido de granulação que é constituído por uma matriz frouxa de colágeno, um grande número de vasos recém-formados, fibroblastos e macrófagos¹³. A reepitelização inicia-se pela migração de células epiteliais desde as margens para o centro da ferida. A angiogênese, que ocorre simultaneamente, é essencial nesta fase de proliferação^{61,102}.

A angiogênese consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes e é regulada por fatores de crescimento, citocinas pró-angiogênicas e inibidores da neovascularização ⁵⁷. Nesse processo, em resposta a fatores quimiotáticos liberados devido à descontinuidade da rede vascular, inicia-se a migração de células endoteliais ao local. Em seguida ocorre a proliferação endotelial, atribuída à ação de fatores de crescimento como FGF, TGF- β , EGF e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Dentre os fatores de crescimento que participam no restabelecimento da vascularização, o VEGF, liberado por plaquetas e macrófagos, é principal estimulador na proliferação endotelial e formação de novos vasos ^{12,57}. Por fim, ocorrem alinhamento e organização das células para formação do tubo capilar ²⁹.

As repetições sucessivas de lise, síntese e direcionamento formam fibras de colágeno maiores, resultando numa orientação paralela às forças aplicadas e aumentando a sua resistência ^{29,90}. Essa é a fase de maturação e remodelação da ferida. O remodelamento da matriz extracelular é mediado principalmente por collagenases (MMP-1 e MMP-8) e gelatinases (MMP-2 e MMP-9), controladas por IL-1, TNF α , PDGF, TGF, EGF, provenientes de fibroblastos e células epiteliais ^{41,104}. Esse processo inicia-se a partir do terceiro dia e pode perdurar por meses.

A fase de contração de ferida contribui para fechamento de lesões, principalmente quando há reparação por segunda intenção. Esse fenômeno inicia-se aproximadamente no 4º dia e dura por um período de 15 dias. O movimento é centrípeto, isto é, ocorre das margens para o centro, processo esse que é desejável, por reduzir o risco de infecção, no entanto, pode resultar em formação excessiva de tecido cicatricial, trazendo prejuízos estéticos³³. TGF- β é considerado o principal modulador dessa fase por induzir a contração da matriz extracelular e dos miofibroblastos. Entretanto, também foi demonstrado ser responsável na formação de queloides ¹¹. Uma lesão pode ser considerada reparada depois de concluída a remodelação e contração da matriz extracelular ^{39,102}.

Recentemente, muitos estudos têm confirmado o papel especialmente dos fatores de crescimentos e/ou citocinas no processo de reparação justificando sua

utilização terapêutica nesse processo ^{1,3,68}. A avaliação dos tecidos gengivais humanos demonstrou a expressão de receptores para TGF- β , IGF, PDGF nos tecidos em reparação em relação aos tecidos controle ⁸⁵. Oda et al. verificaram que a aplicação tópica de bFGF nas feridas no palato de ratos acelerou a formação de tecido de granulação, reepitelização e maturação de colágeno ⁸⁰. A aplicação de TGF isoladamente ou associada ao PDGF e/ou EGF estimulou maior deposição de colágeno em ratos com alterações nos padrões de reparação induzidas por diabetes ou decorrentes do uso de corticóides ¹¹.

Fatores de crescimento na reparação

Fatores de crescimentos são polipeptídeos biologicamente ativos que, quando se ligam aos receptores específicos, desencadeiam complexa integração dos sinais que coordenam diversos processos celulares, tais como crescimento, diferenciação e/ou metabolismo, que são fundamentais para a regulação celular durante o processo reparacional ^{11,12,19,30,49,90}.

Avanços no entendimento dos processos biológicos associados à inflamação e reparação tecidual têm justificado a aplicação terapêutica dos diversos fatores de crescimentos nos mecanismos celulares associados à reparação dos tecidos periodontais e demais tecidos ^{1,3,68}. A abordagem visa modular diretamente os eventos celulares principais para a reparação tecidual controlando, por exemplo, a velocidade e tipo de tecidos formados na área da ferida. As pesquisas indicam que a aplicação local de fatores de crescimento exógenos, como agente coadjuvante, deve ser considerada um método promissor, entretanto, apesar dos benefícios, sua aplicabilidade só está estabelecida para PDGF, único aprovado pelo órgão *US Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de feridas crônicas ⁹. Ainda existem dúvidas em relação à concentração ideal, degradação, manutenção e efeitos adversos ^{3,68}. Pesquisas envolvendo vetores, DNA recombinante, “*scaffolds*”, têm sido desenvolvidas para promover a aplicação terapêutica dos mesmos ^{5,15}. Dentre os fatores de crescimento envolvidos no processo de reparação, destacamos abaixo o FGF, TGF- β e VEGF.

FGF

Dentre os diversos fatores estudados, a família do FGF tem sido relacionada com atividades biológicas importantes na reparação de feridas ^{72,80}, particularmente FGF-2 ou bFGF, produzido principalmente por fibroblastos, macrófagos, mastócitos, células endoteliais, queratinócitos e condrócitos ⁹. Este fator de crescimento estimula a migração e proliferação de fibroblastos, migração e atividade da collagenase nas células endoteliais, participando na formação do tecido de granulação, reepitelização e remodelamento da ferida ^{9,79}.

Estudos *in vitro* tem demonstrado que bFGF estimula a quimiotaxia e mitose das células do ligamento periodontal e a proliferação de células endoteliais ⁷². Oda et al. observou que a aplicação tópica de bFGF nas feridas no palato de ratos acelerou a formação de tecido de granulação, reepitelização e maturação de colágeno ⁸⁰. Em outro estudo semelhante, a aplicação de bFGF recombinante humano estimulou maior proliferação de fibroblastos gengivais de coelho *in vitro*, demonstrado pelo análise de síntese de DNA, de maneira dose-dependente, além de promover, *in vivo*, completa reepitelização de úlceras orais em período inferior às lesões não tratadas com este fator ³⁵.

Outra função muito estudada do bFGF também é a capacidade de regular a angiogênese *in vivo* e *in vitro*, induzindo a quimiotaxia e proliferação de células endoteliais ⁷⁹. Gualandris et al., ⁴⁴ identificaram bFGF como um fator pró-angiogênico, ao isolarem o mesmo da placenta humana, e demonstrarem *in vivo* sua capacidade de estimular a proliferação celular, avaliada pela síntese de DNA, e a migração de células endoteliais. Num outro estudo, bFGF aumentou a neovascularização entre o enxerto e a área receptora e, consequentemente, elevou a taxa de sucesso dos enxertos ⁹⁶.

Estudos experimentais com animais geneticamente modificados demonstraram a importância dos fatores de crescimento específicos nas diferentes fases do processo de reparação tecidual ^{30,42}. Camundongos deficiente para o gene do bFGF com feridas excisionais apresentaram reparação atrasada comparado aos animais geneticamente não alterados ⁸³. Por outro trabalho, animais *knock out*

para o gene do bFGF apresentaram uma redução de deposição de colágeno e atrasos na reepitelização ⁴⁰.

TGF- β

Membros da família do TGF- β foram descritos primeiramente na década de 80, englobando TGF- β 1-3, proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) e ativinas ¹⁰². Inicialmente o TGF- β foi associado ao recrutamento de células inflamatórias, angiogênese e síntese de colágeno. Portanto, desempenha um papel fundamental na formação de tecido de granulação em feridas em reparação. É produzido principalmente pelas plaquetas, mas também é secretado pelos macrófagos, fibroblastos e queratinócitos. É quimiotático para células inflamatórias e fibroblastos. Estimula a produção de colágeno, a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, coordenando a reorganização das fibras colágenas e, conseqüentemente, a fase de contração ⁹. É um dos ligantes dos receptores tirosina cinase, similarmente ao PDGF, FGF e VEGF, uma vez ligado ao receptor TGF- β , ativa a sinalização intracelular pela via de proteínas Smad ^{9,109}.

Estudos têm associado TGF- β com a formação de cicatrizes. Estudos in vitro demonstraram o efeito estimulatório do TGF- β sobre a deposição de colágeno, e a formação de tecido cicatricial e de quelóides. Assim, TGF- β tem sido muito investigado em estudos relacionados à deficiência de reparação de feridas ^{11,43,90}.

Em relação aos tecidos periodontais, Parkar et al. ⁸⁵, avaliaram biópsias de tecidos gengivais humanos, 6 semanas após a realização do procedimento de regeneração tecidual guiada e observaram maior expressão aumentada de receptores de TGF- β nas áreas regeneradas. Esse resultado indica que TGF- β seja importante para a regeneração periodontal, papel coerente com suas atividades de induzir proliferação celular e produção de matriz extracelular, indicando que esse desempenha ação importante em regeneração periodontal.

Mustoe et al. ⁷³, demonstraram que a aplicação única de TGF- β nos estágios iniciais da reparação poderia acelerar a reparação de feridas incisionais in vivo. Os animais que receberam a aplicação de TGF- β apresentaram

histologicamente maior influxo de células mononucleares e maior número fibroblastos do que o controle, acompanhado de um aumento na síntese de colágeno. Além disso, o tecido tratado mostrou-se 200% mais resistente à tensão do que o não tratado. Com relação ao veículo, o uso de uma suspensão de colágeno bovino foi mais eficaz quando comparado à solução salina, evidenciando a importância de liberação lenta. Isso porque esse procedimento prolonga a exposição local, consequentemente, à ação da substância no local.

Em um estudo com camundongos *knock out* para o gene TGF- β , a maioria dos animais não sobreviveu durante a embriogênese, indicando a fundamental participação do TGF- β em diversos processos biológicos além do reparo tecidual como desenvolvimento embrionário e função endócrina. Já em outro estudo, camundongos deficientes para o gene Smad3 apresentaram diminuição de infiltrado inflamatório e também diminuição na deposição de colágeno; no entanto, não apresentaram alteração no curso da reparação⁶⁷.

VEGF

A revascularização é de grande importância no processo de resolução das feridas. O VEGF é o principal agente pró-angiogênico, responsável pela migração, proliferação e organização das células endoteliais. Além disso, o VEGF atua na formação de estruturas vasculares (*sprouting*) pelas células endoteliais que consiste em degradação da membrana basal, ativação, proliferação, invasão e formação do lúmen promovendo formação de novos vasos sanguíneos³⁸. O VEGF é uma glicoproteína homodimérica de 45kDa, ligante de heparina. A sua importância no organismo é evidente em animais geneticamente modificados para o gene do VEGF, que sofrem mortes intra-uterinas na ausência de, pelo menos, um dos alelos¹⁶. A potente ação angiogênica do VEGF, atualmente, fez com que ele se tornasse fatores de crescimentos mais estudados. A modulação da angiogênese representa grande interesse não somente no processo reparacional, mas também para doenças isquêmicas e em terapias antitumorais.

Brem et al.¹⁵, observaram que em camundongos diabéticos tratados com ADV/VEGF (liberação local por meio de adenovírus) a reparação tecidual é 6,6

vezes mais rápida do que em animais não tratados. In vitro, verificou-se que VEGF tem uma ação direta sobre queratinócitos, acelerando sua migração e a re-epitelização da ferida.

A produção de VEGF é estimulada por TGF- β , prostaglandina E2 (PGE₂) e interleucinas (IL) IL-1 α e IL-6, mediadores que são produzidos. Dentre eles expressos por fibroblastos in vitro, sendo o TGF- β um potente indutor, estimulando 6 vezes mais a secreção de VEGF quando comparado a IL-1 ou PDGF¹². Cohen et al.²⁰, investigaram se as citocinas como IL-6, TNF α e IFN- β envolvidas na inflamação, reparação e progressão tumoral influenciariam na angiogênese. Através da técnica de *Northern Blot*, demonstraram a expressão de mRNA de VEGF induzida pela IL-6 em cultura de células da carcinoma epidermóide humana, evidenciando a regulação do VEGF via IL-6.

Na tentativa de desenvolver um dispositivo de liberação lenta, Koch et al.⁵⁶, associaram o VEGF recombinante humano com matrizes de colágeno bovino e observaram que a incorporação do fator de crescimento aumentou a proliferação de células endoteliais do cordão umbilical humano no dia 7 e quando essas matrizes foram implantadas em embriões de galinha mostraram formação de micro vasos, indicando o potencial promissor da associação do potente fator pró-angiogênico com biomateriais.

Artin M

Artin M é uma lectina ligante a D-manose, isolada de sementes de *Artocarpus heterophyllus* Lam. Syn. *A. integrifolia* L.f.. A molécula é tetramérica, constituída de cadeias polipeptídicas não glicosiladas de 16kDa^{86,91,100}.

Lectinas são proteínas que, através de seus(s) domínio(s) de reconhecimento de carboidratos, ligam-se especificamente e reversivelmente a glicanas. A ligação de lectinas a glicanas de superfícies celulares pode desencadear sinalização, ativação, migração e proliferação celulares, além de induzir a produção de citocinas. As lectinas são também utilizadas como ferramentas de identificação e isolamento de glicanas da superfície de células, bactérias e vírus⁸⁷.

Artin M induz a migração de neutrófilos por mecanismo haptotático, resultante da interação concomitante com laminina da matriz extracelular e receptores glicosilados, como CXCR2, da superfície celular ⁹³. Essa propriedade depende parcialmente da ativação e degranulação dos mastócitos, também induzidas pela lectina ⁷¹. A ligação de Artin M ao receptor CXCR2 de neutrófilos é seguida de sinalização celular por via dependente da proteína G ⁸⁶.

Ao ligar-se a glicanas associadas a TLR2 da superfície de macrófagos e células dendríticas, Artin M induz a produção de interleucina 12 (IL-12), e promove respostas Th1. Por essa ação imunomoduladora, Artin M tem se mostrado capaz de conferir resistência a camundongos contra patógenos de parasitismo intracelular ⁸⁴.

Artin M foi utilizada no tratamento tópico de lesões provocadas por calor úmido no dorso de rato promoveu, em 24h a aceleração da cicatrização e redução da necrose⁸⁶. Num estudo com coelhos, observou-se que a utilização de Artin M provocou aceleração na re-epitelização das lesões por abrasão da córnea em comparação a lesões não tratadas. Segundo os autores, este resultado seria um efeito da ação direta do Artin M na proliferação do epitélio da córnea¹⁸.

Até o momento, não foram encontrados na literatura, estudos que avaliaram seu potencial reparador do Artin M em lesões orais.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo é avaliar os efeitos da Artin M no processo de reparação da mucosa mastigatória bucal, por meio de modelos de estudo in vivo. Sendo assim, os objetivos específicos deste estudo são:

1. Avaliar o efeito da aplicação do gel de Artin M no processo de reparação da mucosa mastigatória em palato de cães, por meio de análise clínica, histológica, imuno-histoquímica e atividade de mieloperoxidase.
2. Avaliar em rato, a resposta ao tratamento tópico do gel de Artin M na mucosa mastigatória do palato por meio de análise histológica, imunolocalização de bFGF, PCNA, TGF- β e VEGF; expressão protéica de citocinas IL-1, IL-6, TNF α , e dos fatores crescimento TGF- β e VEGF.

Capítulos

3 CAPÍTULOS

3.1 Capítulo 1

Lectin Artin M improves wound healing in palatal mucosa in dogs.

Kim YJ, da Silva VC, Conrado MA, Spolidório LC, Roque-Barreira MCA, Cirelli JA.

Artigo submetido para *Journal of Periodontology*

Lectin Artin M improves wound healing in palatal mucosa in dogs.

Yeon J. Kim^{*}, Vanessa C. da Silva[†], Marina C. A. V. Conrado[‡], Luis C. Spolidório[§], Maria C. A. Roque-Barreira[‡], Joni A. Cirelli^{*}.

1. Yeon J. Kim^{*}, M.Sc., UNESP - Univ. Estadual Paulista, School of Dentistry.

2. Vanessa C. da Silva[†], Ph.D., UFMA - Federal University of Maranhão, School of Dentistry at São Luís.

3. Marina C. A. V. Conrado[‡], M.Sc., School of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo.

4. Luis C. Spolidório[§], Ph.D., UNESP - Univ. Estadual Paulista, School of Dentistry.

5. Maria C. A. Roque-Barreira[‡], Ph.D., School of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo.

6. Joni A. Cirelli^{*}, Ph.D., UNESP - Univ. Estadual Paulista, School of Dentistry

Key words: wound healing, palate, mouth mucosa, periodontics, glycoproteins.

Correspondence Address:

Joni Augusto Cirelli (**corresponding author**)

UNESP - Univ. Estadual Paulista, School of Dentistry, Department of Diagnosis and Surgery, Division of Periodontology.

Address: Rua Humaita, 1680, Centro Araraquara, SP, 14801-903, Brazil

Phone Number: 55-16-33016375

^{*} UNESP - Univ. Estadual Paulista, School of Dentistry, Department of Diagnosis and Surgery, Division of Periodontology, Araraquara, São Paulo, Brazil.

[†] UFMA - Federal University of Maranhão, School of Dentistry at São Luís, Department of Dentistry II, São Luís, MA, Brazil.

[‡] Department of Cellular and Molecular Biology, School of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, São Paulo, Brazil.

[§] UNESP - Univ. Estadual Paulista, School of Dentistry, Department of Physiology and, Pathology, Division of Pathology, Araraquara, São Paulo, Brazil

Fax Number: 55-16-33016369

Email: cirelli@foar.unesp.br

Sources of support: This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Grant # 2006/60642-2.

The authors declare that they have no conflict of interests in this study.

Word Count: 2602

Number of figures: 5

Number tables: 0

Runnig title: Artin M improves wound healing.

Key finding: Artin M favours wound healing clinically and histologically via neutrophils recruitment and promotion of cell proliferation in dogs.

Abstract

Backgrounds: To evaluate the effects of Artin M on wound healing in palatal mucosa in dogs.

Methods: Three full thickness wounds of 6 mm diameter were surgically created in the hard palate mucosa of twenty dogs. The wounds of each animal were randomly divided into three groups according to one of the treatment assigned: A- Artin M gel, V- Vehicle (carboxymethylcellulose 3% gel) and C- Control. Four animals per group were sacrificed at 2, 4, 7, 14 and 21 days post-surgery. Wounded areas were photographed and scored for macroscopic healing evaluation. Lesion tissues were harvested and used for descriptive histological analysis, PCNA immunohistochemistry and measurement of myeloperoxidase activity.

Results: Clinical analysis showed accelerated wound closure in group A in comparison to other groups in all periods. Histological features showed enhanced reepithelization and collagen fiber formation resulting in faster maturation of granulation tissue in group A compared to other groups, by day 14. Treatment with Artin M significantly induced cells proliferation and increased volumetric density of fibroblasts at day 2 and 4 ($p < 0.05$). Neutrophils infiltration in A group was significantly higher than other groups ($p < 0.05$) at the same time-points.

Conclusions: Artin M gel may potentially favours wound healing on palatal mucosa lesions via the recruitment of neutrophils and promotion of cells proliferation.

INTRODUCTION

Palatal masticatory mucosa has been extensively used as a tissue donor area for free soft tissue grafts aiming correction of periodontal and peri-implant soft tissue deficits and deformities^{24,47}. Although this surgical technique has high predictability and favorable prognosis, it has the disadvantage of the creation of a second wound which depending on the size of the graft removed, may have a long healing process period, causing pain and discomfort to the patient. Also, the donor area is subject to infection or necrosis, events that can delay even more the healing process^{55,89}.

The current therapies for palatal wound have been based on mechanical protection to prevent contact injuries and facilitate primary wound closure as monofilament suture and periodontal dressings^{48,51,88,94,105}. The development of new drugs with potential to accelerate the healing process on palatal wound lesions has been investigated^{35,80,82,94}.

Artin M (previously known as KM+ and Artocarpin)⁸⁶ a lectin from *Artocarpus heterophyllus*, binds D-mannose and exhibits high specificity for the trimannoside Man α 1-3[Man α 1-6]Man, present in the core of N-glycans⁶⁹. Artin M possesses many relevant biological properties. It acts on neutrophils, inducing haptotactic migration and phenotypic and functional changes, which include intracellular tyrosine phosphorylation, shedding of L-selectin, release of inflammatory mediators, phagocytic and cell-killing activities, and increased expression of TLR2^{37,103}. Furthermore, an amplification loop for *in vivo* Artin M inflammatory activity is provided by induction of mast cell degranulation⁷¹. Artin M stimulates macrophage and dendritic cells to release IL-12, thereby establishing *in vivo* Th1 immunity and conferring protection against several intracellular pathogens^{21,84,101}. Artin M also accelerates wound healing and epithelial tissue regeneration¹⁸.

Based on those results, the aim of this study was to evaluate the effects of topical application of Artin M gel on wound healing of palatal mucosa in an excision wound model in dogs.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of Artin M

Artin M was extracted from *Artocarpus heterophyllus* seeds and purified by sugar affinity chromatography as previously described by Santos-de-Oliveira et al.1994⁹³. Artin M 0.001% was prepared using carboximetilcelulose 3% as a vehicle gel.

Experimental Animals

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the São Paulo State University, School of Dentistry at Araraquara, SP, Brazil. A total of 20 mongrel dogs, weighing between 15 and 20 kg, were used for this study. For all clinical procedures, animals were pre anesthetized using levopremazin chloritate^l 1mg/kg intramuscularly (IM), and further they were anaesthetized with sodium thiobarbiturate[¶] 25 mg/kg intravenously (IV) and kept on intravenous hydration with a 0.9% physiological solution during surgery. A local infiltration of 2% lidocaine with norepinephrine (1:100000) was administered for hemostasis and to diminish pain.

Wound creation and treatment

Scaling and tooth prophylaxis using rubber cup and prophylactic toothpaste were initially performed in the entire mouth. After a week, upper maxillary impressions were taken with a silicone-based material[#]. A tooth supported acrylic guide was made for each dog to orientate the creation of the wounds during surgical procedures. Three circular full-thickness excisional wound of 6 mm diameter were created by a surgical punch, in the palatal region adjacent to the first and second pre-molars, maintaining a distance of 10 mm between wounds (Fig. 1).

Each palatal wound was randomly distributed to one of the experimental groups according to treatment: A – Artin M gel, V - carboxymethylcellulose 3% gel vehicle and C – coagulum (no treatment). Each dog had a representative

^l Neozine, Aventis Pharma Ltd., São Paulo, SP, Brazil

[¶] Tiopental, Abbott Laboratories, São Paulo, SP, Brazil

[#] Xantopren & Optosil, Heraeus Kulzer South America, São Paulo, SP, Brazil

sample of each treatment. Afterwards, Transpore tape^{**} was sutured with 4-0 silk^{††} covering wounds in order to maintain the material and minimize mechanic trauma.

Post- Surgical Procedure

Immediately after surgeries, each animal received 10 ml of hepatic protector^{‡‡} IV and analgesic ketoprofen^{§§} 2mg/kg IM for 3 days. The animals were observed daily for any clinical abnormality and they received soft diet through the first week post-surgery.

At each experimental time-point: 2, 4, 7, 14 and 21 days after treatment, four dogs were euthanized by lethal dose of IV injection of sodium thiobarbiturate[¶] and maxillary tissues were harvested.

Clinical Analysis

Wound closure and epithelium restoration were assessed visually by means of a picture taken at the end of each experimental time-point, before sacrifice. Clinical evaluation was based on wound healing scores representing stages of absence up to complete filling of wound with or without reepithelization. Images showing empty wound were classified as index 0; partial filling wounds as index 1; complete filling with none visual reepithelialization as index 2; complete filling with partial reepithelialization as index 3 and complete filling and total reepithelialization as index 4 (Fig. 2A). All images were examined by a trained and blind examiner.

Histopathological analysis

Before tissue harvesting, the diameter of each perforation of the tooth supported acrylic guide was increased to 9 mm to guarantee a safe margin around in the excision around the wound. The tissues were removed using a 15C blade^{||} with the acrylic guide in position. Half of the tissue was stored at -80° C for myeloperoxidase analysis and the other half was processed for histology.

^{**} Transpore, 3M, St. Paul, MN, USA

^{††} Ethicon, Johnson & Johnson S.A., São Paulo, SP, Brazil

^{‡‡} Frutoplex LN, Marjan e Comércio, São Paulo, SP, Brazil

^{§§} Ketoprofeno, Laboratórios Vencofarma, Londrina, PR, Brazil

^{||} Medico International Trading Co. Ltd., Tianjin, China

The specimens were fixed in 10% formalin for 48h for routine histological processing and paraffin embedding. Histological serial sections, 4 and 5 μm thick, were cut in the sagittal plane through the entire epithelial-connective tissue extension, representing the central and internal portions of the wounds besides external area of the security margin. Haematoxylin and Eosin (HE) and Masson trichrome staining were used.

Volume densities of fibroblasts (Vf) were estimated as previously described¹⁰⁷. The count was performed with the help of a light microscope^{¶¶}, using oil immersion (magnification x1000). A square lattice of 25 points was projected into the microscope ocular, with the use of microvid system^{##}, which connected the microscope to a computer. For each animal, 5 sections were selections and 25 points were counted in each section. Vf was expressed as percentages of the total points counted.

Immunohistochemical Analysis

Immunohistochemical staining against Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) was performed on 4 μm sections mounted on silanized slides^{***}. Briefly, tissues were deparaffinized and rehydrated. Tissue sections were incubated with 0.5% trypsin for 20 min at 37°C for antigen retrieval and treated with 3% hydrogen peroxidase in methanol for 30 min to block endogenous peroxidase activity. After, sections were incubated with 3% bovine serum albumin in Phosphate buffered saline (PBS)^{†††} for 30 min at room temperature to block nonspecific protein binding, followed by incubation overnight with monoclonal primary anti- PCNA antibody^{‡‡‡} at 1:100 dilution. Then, sections were incubated with biotinylated immunoglobulin^{§§§}, the reaction product was detected with an avidin biotin peroxidase complex^{§§§} and diaminobenzidine was used as a chromogen substrate. Following, sections were counterstaining with Carrazi's

¶¶ Carl Zeiss, São Paulo, SP, Brazil

Cambridge Instruments, Buffalo, NY, USA

*** DAKO A/S, Glostrup, Denmark

††† Sigma-Aldrich co, St. Louis, MO, USA

‡‡‡ Anti-PCNA, MAB4078, Millipore, Billerica, MA, USA

§§§ ABC kit DAKO A/S, Glostrup, Denmark

§§§ ABC kit DAKO A/S, Glostrup, Denmark

hematoxylin and mounted with permount. Positive and negative controls were used. Wound areas were examined by using light microscope^{III} (magnification x40). Two representative fields from border and center of the defect from each section were chosen and PCNA immunoreactive cell nuclei were counted by a blind examiner.

Myeloperoxidase activity

The measurement of myeloperoxidase (MPO) activity was performed to quantify neutrophils accumulation in the palatal tissue. Tissue previously stored at -80°C were thawed, suspended and homogenized in 1mL of PBS at 13000 rpm and centrifuged at 3000 rpm for 15 min at 4°C. The material was suspended in 500 uL of 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0, to solubilize MPO. After centrifuging at 3000 rpm for 15 min at 4°C, 50 ul of the supernatant from each sample, 50 uL of 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine in dimethylsulfoxide, 25 uL of 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) were placed in each well at 96 well plate and incubated for 5 min at 37 °C. The reaction was stopped by adding 25uL of H₂SO₄. The absorbance was measured colorimetrically at 450 nm on spectrophotometer^{IV}.

Statistical Analysis

All data were analyzed using the GraphPad Prism software 4.0^{###}. One-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test were performed to determine the presence of any significant difference between groups for all the analyses. P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

The application of Artin M has shown to be effective in the healing of oral mucosa wound, resulting in significant improvement of all parameters evaluated. Clinical analysis revealed that Artin M accelerated mucosal healing from 2 to 7

^{III} LEICA microsystem GmbH, Wetzlar, Germany

^{IV} Biotek, Winooski, VT, USA

^{###} GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA

days, when compared to other groups, reaching statistical significance from the other groups at 7 days. At this time-point, group A was the only one to present complete filling and total reepithelialization index (4). At 14 days, one lesion from C group still presented index (3) while 100% of A and V groups presented index (4). At 21 days, there were no differences among groups which showed complete filling and total reepithelialization (Fig.2B).

Histological analysis revealed necrotic tissue associated to polymorphonuclear cells (PMNs) and vascular tissues in all groups at 2 days. Artin M group presented discontinuity epithelial tissue while other groups did not present epithelial migration into wounds. At 4 days, discontinuity epithelial tissue was present in all groups, necrotic tissue associated to PMNs were observed superficially while formation of granulation tissue with fibroblasts, collagen fibers, mononuclear inflammatory cells and neovascularization were observed more profoundly. At 7 and 14 days, A group showed fibroplasia characterized by higher collagen fiber content and lower amount of inflammatory infiltrate compared to the other groups. Also, tissue remodeling characterizing advanced maturation of granulation tissue and higher quantity of Vf indicating increased proliferation of fibroblasts was observed in the Artin M group compared to other groups at same time points. At 21 days, all groups presented similar aspects of granulation and epithelial tissues; however A group treated with Artin M still showed increased volumetric density of fibroblasts compared to groups C and V (Fig 3).

Cell proliferation was observed by immunohistochemical analysis labeling PCNA in the nuclei of cells. Artin M treatment increased significantly cell proliferation at 2 and 4 days (Fig.4A and B) in comparison to the other groups at the same time points. Similarly, myeloperoxidase activity assay showed significant increased level of neutrophils in A group compared to the other groups at 2 and 4 days (Fig.5).

DISCUSSION

Wound healing is a complex and dynamic process that consists on interactions of cells and molecules to restore tissue integrity. It is based on three different and overlapping stages: inflammation, proliferation and remodeling^{19,61}.

In this study the single application of Artin M gel has shown to be effective in accelerating the healing process of oral mucosa wound, demonstrated clinically and histologically. Histological sections presented increase in fibroplasia 14 days after treatment with Artin M. It revealed improved granulation tissue maturation consistent with clinical evaluation and PCNA immunostaining that revealed Artin M to increase significantly cell proliferation (Fig.4B). Additionally, our data also demonstrated that Artin M significantly stimulated neutrophils recruitment (Fig.5).

Recruitment of inflammatory cells, particularly neutrophils, to the site of injury is essential for immune activities and the release of growth factors^{9,30}. Although neutrophils are not the only cells directly involved in early stage of healing, they are the first cells to reach the site and they have potential to activate other cell types by inducing multiple cytokines pathways such as VEGF, IL-1, IL-6 and IL-8^{9,20}.

It has been shown that neutrophils deficiency delays wound repair in mice, evidencing important role of those cells in wound healing^{25,75}. Delays on wound healing were also observed in CXCR2 knockout mice, which presented diminished neutrophils recruitment into the wound sites and reduced neovascularization resulting in healing impairment²⁵. In those animals, neutrophils deficiency was also correlated with lower levels of VEGF and TGF β , indicating that these growth factors play important role in repair process.

In addition, in contrast to studies reporting a negative effect of neutrophils in uninfected wound healing^{27,30}, neutrophils are essential to debridement and activation of immune system in contaminated sites such as oral environment which contains abundant amount of microorganisms.

Interestingly, our results demonstrated that neutrophils influx were increased at 2 and 4 days in Artin M treated group although at 7, 14 and 21 days there were no significant differences with other groups (Fig.5). It suggests that

more neutrophils were recruited in the early phase of repair in Artin M treated wounds. As these wounds were located in an intra-oral contaminated environment, tissue healing may have been favored by increased neutrophils microbicidal activities such as phagocytosis, lysosome volume, superoxide production and LTB4 secretion by activation of CXCR2 and TLR2 receptors. In addition, neutrophils did not persist longer in the lesion which may be considered a positive condition; otherwise they might delay the healing process.

Recruitment of neutrophils promoted by Artin M has been demonstrated previously in in vivo and in vitro.). Moreover, the high level of neutrophils influx induced by Artin M and the higher expression of PCNA observed in our study are consistent with previous findings demonstrating that topical administration of Artin M was able to stimulate higher expression of PCNA, VEGF, laminin, p63 and c-Met than control treatment at 24h of corneal abrasion in rabbit ¹⁸. These results suggest an influence of Artin M on cell proliferation and growth factors production during tissue repair.

Within the limitation of this study, our findings have shown and partially explained potential pharmacological actions of Artin M on promoting wound healing process. Further studies are necessary for a full understanding of the precise mechanism whereby Artin M induces tissue repair.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Grant # 2006/60642-2. We wish to acknowledge Mrs. Ana Claudia G. C. Miranda for technical support in the histological procedures. The authors declare that they have no conflict of interests in this study.

REFERENCES

1. Del Pizzo M, Modica F, Bethaz N, Priotto P, Romagnoli R. The connective tissue graft: a comparative clinical evaluation of wound healing

- at the palatal donor site. A preliminary study. *J Clin Periodontol* 2002;29:848-854.
2. Harris RJ. Root coverage of a palatal recession defect: a case report. *J Periodontol* 2001;72:1103-1107.
 3. Kim JW, Kikkawa DO, Lemke BN. Donor site complications of hard palate mucosal grafting. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 1997;13:36-39.
 4. Reiser GM, Bruno JF, Mahan PE, Larkin LH. The subepithelial connective tissue graft palatal donor site: anatomic considerations for surgeons. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1996;16:130-137.
 5. Saroff SA, Chasens AI, Eisen SF, Levey SH. Free soft tissue autografts. Hemostasis and protection of the palatal donor site with a microfibrillar collagen preparation. *J Periodontol* 1982;53:425-428.
 6. Pini Prato GP, Cortellini P, Agudio G, Clauser C. Human fibrin glue versus sutures in periodontal surgery. *J Periodontol* 1987;58:426-431.
 7. Harris RJ, Sterne JA, Abgrall S, et al. Prognostic importance of anaemia in HIV type-1-infected patients starting antiretroviral therapy: collaborative analysis of prospective cohort studies. *Antivir Ther* 2008;13:959-967.
 8. Jackson MR. New and potential uses of fibrin sealants as an adjunct to surgical hemostasis. *Am J Surg* 2001;182:36S-39S.
 9. Tramontina VA, Machado MA, Nogueira Filho Gda R, Kim SH, Vizzioli MR, Toledo S. Effect of bismuth subgallate (local hemostatic agent) on wound healing in rats. Histological and histometric findings. *Braz Dent J* 2002;13:11-16.
 10. Oda Y, Kagami H, Ueda M. Accelerating effects of basic fibroblast growth factor on wound healing of rat palatal mucosa. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:73-80.
 11. Ophof R, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM, Von Den Hoff JW. Evaluation of a collagen-glycosaminoglycan dermal substitute in the dog palate. *Tissue Eng* 2007;13:2689-2698.

12. Fujisawa K, Miyamoto Y, Nagayama M. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2003;32:358-366.
13. Pereira-da-Silva G, Roque-Barreira MC, Van Damme EJ. Artin M: A rational substitution for the names artocarpin and KM+. *Immunol Lett* 2008;119:114-115.
14. Misquith S, Rani PG, Surolia A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. *J Biol Chem* 1994;269:30393-30401.
15. Ganiko L, Martins AR, Freymuller E, Mortara RA, Roque-Barreira MC. Lectin KM+-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. *Biochim Biophys Acta* 2005;1721:152-163.
16. Toledo KA, Schwartz C, Oliveira AF, et al. Neutrophil activation induced by ArtinM: release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. *Immunol Lett* 2009;123:14-20.
17. Moreno AN, Jamur MC, Oliver C, Roque-Barreira MC. Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;132:221-230.
18. Panunto-Castelo A, Souza MA, Roque-Barreira MC, Silva JS. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania* major antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. *Glycobiology* 2001;11:1035-1042.
19. Teixeira CR, Cavassani KA, Gomes RB, et al. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. *Vaccine* 2006;24:3001-3008.
20. Coltri KC, Oliveira LL, Pinzan CF, et al. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. *Am J Pathol* 2008;173:423-432.

21. PINTO DA SILVA L, Lamberti; FFCLRP/USP, Avenida Bandeirantes, 3900, Prédio Central, 14040-900 Ribeirão Preto (BR)., PANUNTO CASTELO AFU, Avenida Bandeirantes, 3900, Prédio Central, 14040-900 Ribeirão Preto (BR)., DE SOUZA GOLDMAN M, Helena; FFCLRP/USP, Avenida Bandeirantes, 3900, Prédio Central, 14040-900 Ribeirão Preto (BR)., et al. PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING LECTIN. In. vol. WO2004100861. Brazil: CRUZEIRO NEWMARC PATENTES E MARCAS LTDA; Rua Itajobi, 79, Pacaembu, 01246-010 São Paulo (BR). 2004.
22. Chahud F, Ramalho LN, Ramalho FS, Haddad A, Roque-Barreira MC. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits. *Int J Exp Pathol* 2009;90:166-173.
23. Santos-de-Oliveira R, Dias-Baruffi M, Thomaz SM, Beltramini LM, Roque-Barreira MC. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J Immunol* 1994;153:1798-1807.
24. Agudio G, Nieri M, Rotundo R, Cortellini P, Pini Prato G. Free gingival grafts to increase keratinized tissue: a retrospective long-term evaluation (10 to 25 years) of outcomes. *J Periodontol* 2008;79:587-594.
25. Weibel ER. Selection of the best method in stereology. *J Microsc* 1974;100:261-269.
26. Clark RA. Wound repair. *Curr Opin Cell Biol* 1989;1:1000-1008.
27. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007;25:9-18.
28. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007;127:514-525.
29. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008;16:585-601.
30. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996;271:736-741.

31. Devalaraja RM, Nanney LB, Du J, et al. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol* 2000;115:234-244.
32. Nishio N, Okawa Y, Sakurai H, Isobe K. Neutrophil depletion delays wound repair in aged mice. *Age (Dordr)* 2008;30:11-19.
33. Dovi JV, He LK, DiPietro LA. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol* 2003;73:448-455.

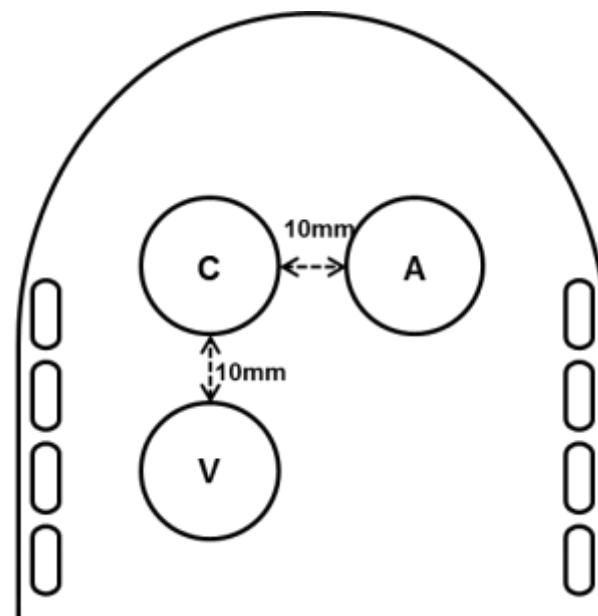
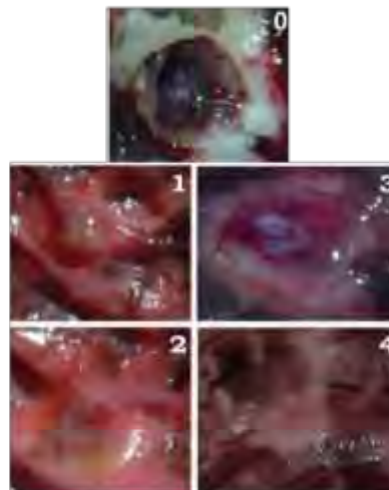


Figure 1. Three full-thickness excisional wound of 6 mm was made in the palatal mucosa of each animals. A distance of 10 mm was maintained between wounds. Each palatal wound was randomly distributed to one of the experimental groups according to treatment: A - Artin M gel, V - carboxymethylcellulose 3% gel vehicle and C - coagulum.

A



B

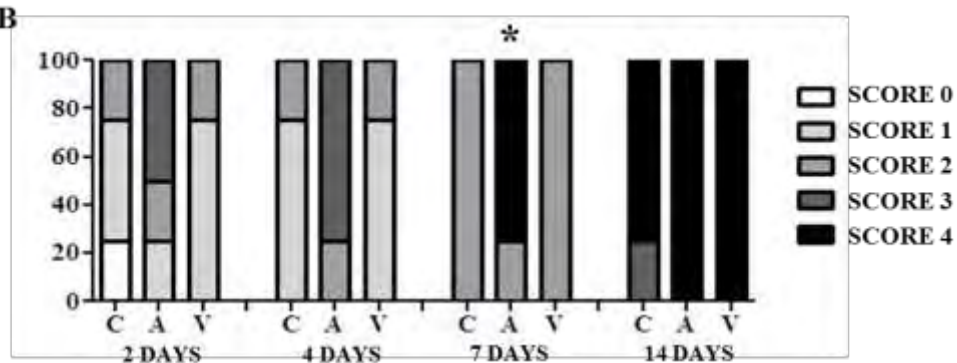
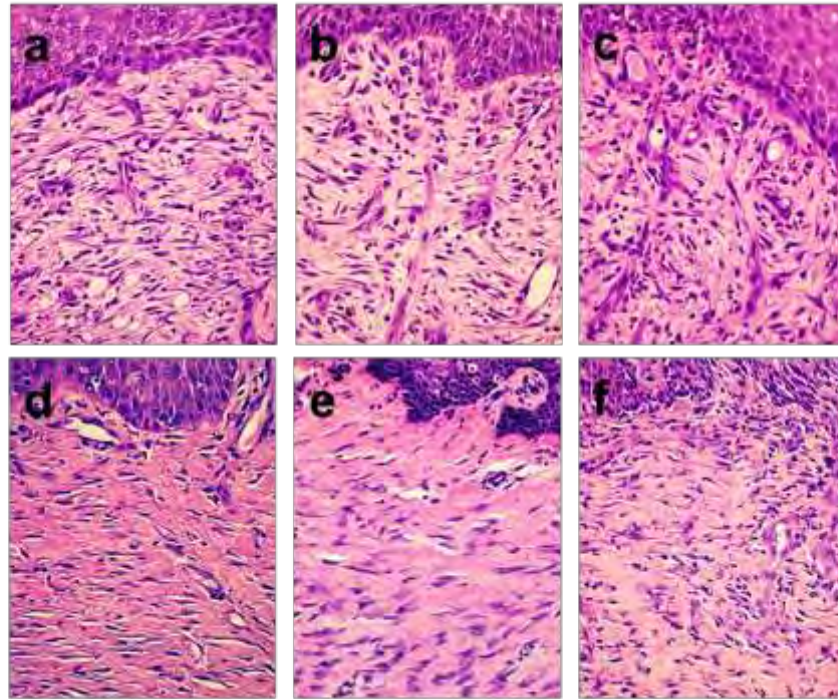


Figure 2. Clinical analysis. (A) Clinical healing index; Score 0 Minimum to none filling of the wound with new tissue; Score 1 Partial filling of the wound; Score 2 Complete filling with none visual reepithelialization; Score 3 Complete filling with partial visual reepithelialization; Score 4 Complete filling and total visual reepithelialization. (B) Clinical analysis for Control (C), Artin M (A) and Vehicle (V) groups at 2, 4, 7 and 14 days post-surgery. Values are expressed as percentage. * $p < 0.05$ – statistically different from the other groups in the same time-point.

A



B

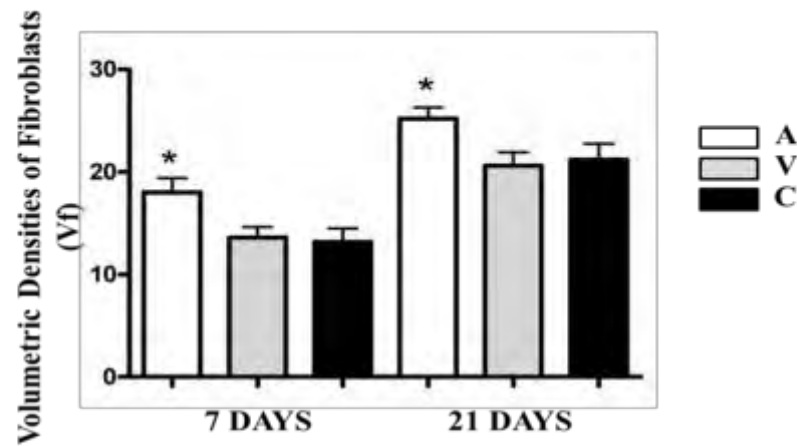
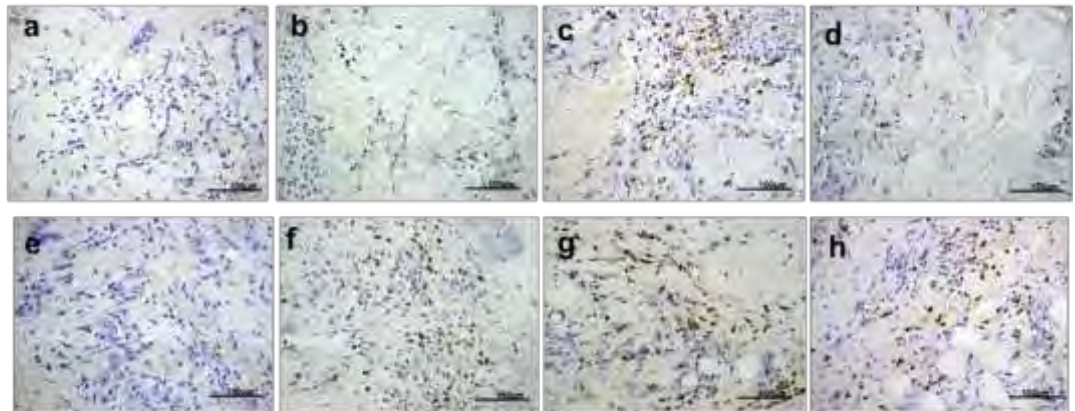


Figure 3. Quantitative analysis for volumetric densities of fibroblasts (VF).

A) Photomicrographs showing H&E staining on day 7 (a-c) and day 14 (d-f) post-treatment. (a, d) Artin M, (b,d) Control and (c,f) Vehicle. Original magnification 40X.

B) VF were expressed as percentages of the total point counted. Control (C), Artin M (A) and Vehicle (V) groups. * $p < 0.05$ – statistically different from the other groups a same time-point.

A



B

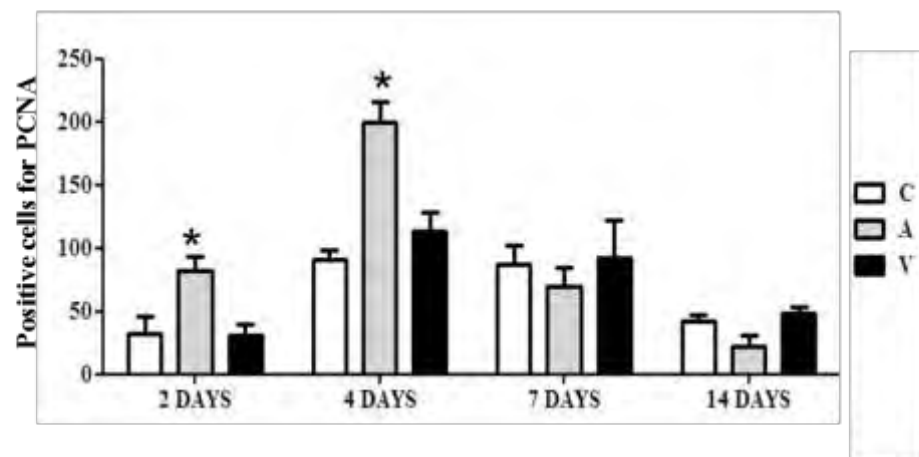


Figure 4. Immunohistochemical analysis, PCNA labeling.

(A) Photomicrographs showing immunohistochemistry against PCNA on day 2 (a-d) and day 4 (e-h) post treatment. (a, e) Negative control, (b,f) Artin M, (c,g) Control and (e,h) Vehicle. Original magnification 40X.

(B) Quantitative analysis of positive cells for PCNA at ROIs in the central and border areas of the defects. . Control (C), Artin M (A) and Vehicle (V) groups. * $p < 0.05$ – statistically different from the other groups in the same time-point.

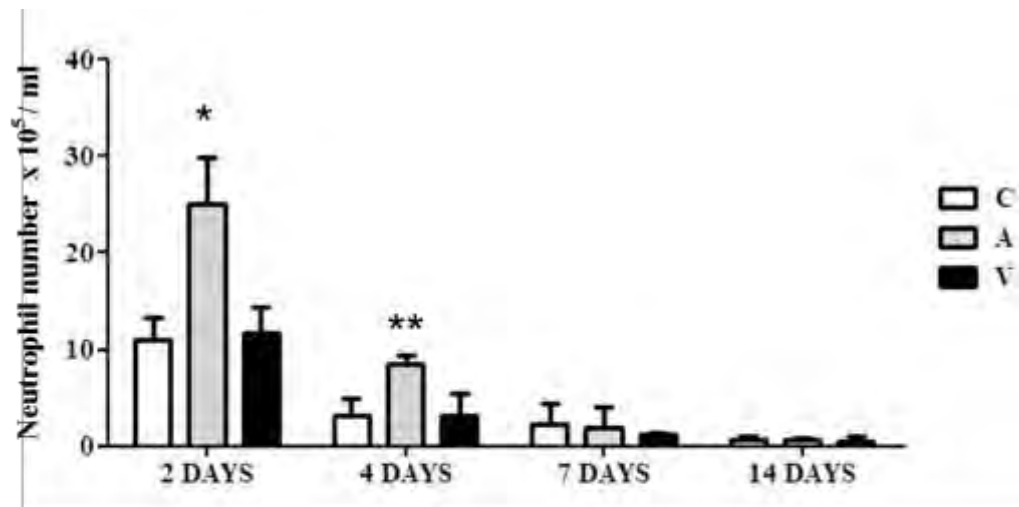


Figure 5. Myeloperoxidase activity and neutrophil recruitment in dogs palatal tissue.

*p<0.05 – statistically different from the other groups in the same time-point.

** p<0.05 – statistically different from group C in the same time-point.

3.2 Capítulo 2

Stimulation of TGF- β and VEGF expression by lectin Artin M accelerates wound healing in rat oral mucosa.

Kim YJ, Souza JA, Carvalho FC, Gonçalves PCG, Spolidório LC, Roque-Barreira MCA, Cirelli JA.

Artigo a ser submetido para *Journal of Periodontal Research*.

Stimulation of TGF- β and VEGF expression by lectin Artin M accelerates wound healing in rat oral mucosa

Kim YJ, Carvalho FC, Souza JA, Gonçalves PCG, Spolidório LC, Roque-Barreira MCA, Cirelli JA.

ABSTRACT

Artin M, lectin from *Artocarpus heterophyllus* seeds, has been demonstrated to stimulate recruitment and activation of neutrophil and mast cells. Furthermore, it has been shown to accelerate the process of wound healing on burn injuries and corneal epithelial lesions in rats and rabbits, respectively. Objectives: to evaluate the effects of topical application of Artin M on wound healing in palatal mucosa of rats. Methods: Seventy-two rats were divided into three groups according to one of the treatment assigned: C-Control (non-treated), A-Artin M gel, and V-Vehicle (carboxymethylcellulose 3% gel). A 4 mm full thickness wound was surgically created on the palatal mucosa of each animal. Eight animals per group were sacrificed at 3, 5, or 7 days post-surgery. Maxillas were harvested and divided to perform histological analysis, immunohistochemistry to detect bFGF, PCNA, TGF- β and VEGF and ELISA assay to evaluate levels of IL-1, IL-6, TNF α , TGF- β and VEGF in the tissue. Results: histological features showed faster reepithelization in group A, significant decrease in inflammatory cells infiltration by day 7 ($p < 0.05$) and increased collagen fiber formation resulting in faster maturation of granular tissue compared to the other groups. Also, Artin M significantly induced cells proliferation at day 5 ($p < 0.05$). Significantly higher expression of TGF- β and VEGF were observed in group A compared to C at day 3 ($p < 0.05$). Conclusion: The single application of Artin M gel has shown to be effective in the healing of oral mucosa wound in rats by enhancing TGF- β and VEGF release, cell proliferation, reepithelization, collagen deposition and arrangement of collagen fibers. These findings may partially explain potential pharmacological actions of Artin M on promoting wound healing process.

INTRODUCTION

Wound healing process aims to restore integrity and function of injured tissue through three overlapping stages: inflammation, proliferation, and tissue remodeling^{13,19,59,104}. The healing process can be affected by several factors, including age and health status of the patient, type of injuries, smoking, alcoholism, nutrition or use of medication^{5,45,62,68}. However, local factors such as presence of microorganisms, blood supply, pH changes or use of topical medications are mostly considered to affect the repair process^{28,45}. They can influence on speed and quality of tissue formation resulting in a better repair or in impaired healing.

Recently, studies have reported positive effects of products isolated from plants in tissue repair by inducing release of inflammatory mediators, growth factors and extracellular matrix proteins^{6,31,53,60,65,95,99}. In addition, numerous medications have already been developed from plants sources, including analgesics, treatments for heart condition and anticancer agents, e.g. *Aspirine*, *vinblastine* and *digitalis*, respectively⁷⁰.

Artin M is a lectin derived from jackfruit seeds (*Artocarpus heterophyllus* Lam. Syn. *A. integrifolia* L.f.) and has a variety of relevant biological properties^{91,100}. Lectins are carbohydrate-binding proteins that are used to probe the architecture and dynamics of cell surface carbohydrates during cell division and differentiation processes as well as for the isolation and characterization of glycoconjugates on cell surfaces or matrix^{97,98}. Artin M binds D-mannose and exhibits high specificity for the trimannoside $\text{Man}\alpha 1\text{-}3[\text{Man}\alpha 1\text{-}6]\text{Man}$, present in the core of N-glycans⁶⁹. The binding to carbohydrate is directly responsible for its biological activity. It acts on neutrophils, inducing haptotactic migration and phenotypic and functional changes, which include intracellular tyrosine phosphorylation, shedding of L-selectin, release of inflammatory mediators, phagocytic and cell-killing activities, and increased expression of TLR2^{37,103}. Furthermore, an amplification loop for *in vivo* Artin M inflammatory activity is provided by induction of mast cell recruitment and degranulation^{23,71}. Artin M

stimulates macrophage and dendritic cells to release IL-12, thereby establishing *in vivo* Th1 immunity and conferring protection against several intracellular pathogens^{21,84,101}. Besides, Artin M has been reported to accelerate wound healing in burn injury in rats⁸⁶, corneal abrasion in rabbit¹⁸.

Based on those results, the aim of this study was to evaluate the effects of topical application of Artin M gel on wound healing in palatal mucosa in an excision wound model in rats.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of Artin M

Artin M, a D-mannose-binding lectin extracted from jackfruit seeds (*Artocarpus heterophyllus* Lam. Syn. *A. integrifolia* L.f.) was purified by sugar affinity-chromatography as previously described by Santos de- Oliveira et al.1994⁹³. 0.001% of Artin M gel was prepared using 3% of carboxymethylcellulose as a vehicle.

Experimental Animals

The present study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the São Paulo State University, School of Dentistry at Araraquara, SP, Brazil. A total of 72 male Wistar rats, average weight 250 g, were kept under controlled temperature (22-25°C) with a 12 h light/dark cycle and received standard laboratory diet and water *ad libitum*. For all clinical procedures, animals were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (16 mg/kg) mixture.

Wound creation and treatment

A circular full-thickness excisional wound of 4 mm diameter was created by a surgical punch in the palatal region of each animal. Animals were randomly distributed according to one of the treatment assigned: C– Control (non-treated), A- Artin M gel, and V– Vehicle (3% of carboxymethylcellulose gel). Afterwards, Transpore® tape (3M, St. Paul, MN, USA) was sutured with 6-0 silk (Ethicon, Atralog, Johnson & Johnson S.A., SP, Brazil) covering wounds in order to

maintain the material and minimize mechanic trauma. After surgeries, the animals were observed daily for any clinical abnormality and feeding behavior throughout the experiment.

Animals were later killed using an anesthetics overdose. Maxillary tissues from the lesion area of eight rats per group were harvested in each experimental time-point: 3, 5 and 7 days after treatment. Half of the tissue was stored at -80°C for protein analysis and the other half was processed for histology.

Histopathological analysis

The specimens were fixed in 10% formalin for 48 h for routine histological processing and paraffin embedding. Histological serial sections, 4 and 5 µm thick were cut in the sagittal plane through the entire epithelial-connective tissue extension (Jung Supercut 2065 Leica, Chicago, IL, USA), representing the central and border portions of the wounds besides external area of the security margin. Haematoxylin and Eosin (HE) and Masson trichrome staining were used. Three representative fields from the borders and center of the defect from each specimen were captured using a digital camera (Leica DFC 300 FX, Wetzlar, Germany) on an optical microscope (LEICA microsystem GmbH, Wetzlar, Germany) under 200x magnifications. A 500µm² grid with 10×5 squares was constructed using image a managing /editor software (Adobe Photoshop CS5, San Jose, CA, USA) and overlaid on the digital images obtained from the histological sections. The region of interest for the analysis was represented by the whole grid, which was positioned in the center of each field. The following structures observed on each intersection point of the grid were recorded to quantitative assessment using a point-counting technique: fibroblastic cells, vascular structures and inflammatory cells⁸¹. The number of mast cells was quantified using toluidine blue pH 2,8 staining. Three representative fields from the borders and center of the defect from each section were chosen and mast cells were counted. All analysis was performed by a blind examiner, who was previously trained.

Immunohistochemical Analysis

Immunohistochemical staining against bFGF, PCNA, TGF-β and VEGF was performed on 4 µm sections mounted on silanized slides (DAKO A/S,

Denmark). Briefly, tissue sections were deparaffinized and rehydrated. Following, they were incubated with 0.5% trypsin for 20 min at 37° C for antigen retrieval and treated with 3% hydrogen peroxidase in methanol for 30 min to block endogenous peroxidase activity. After, sections were incubated with 3% bovine serum albumin in Phosphate buffered saline (PBS) (Sigma) for 30 min at room temperature to block nonspecific protein binding, followed by incubation overnight with primary antibodies specific for bFGF (FGF basic Polyclonal Antibody, Abcam, UK, dilution 1:100), PCNA (PCNA, PC10, Abcam, UK, dilution 1:1500), TGF- β (TGF beta 3 Monoclonal Antibody, Abcam, UK, dilution 1:200) and VEGF (VEGF Polyclonal antibody, Abcam, UK, dilution 1:250). Negative control was obtained by the incubation of PBS in substitution for the primary antibody. Then, sections were incubated with biotinylated immunoglobulin (ABC kit DAKO A/S, Denmark), the reaction product was detected with an avidin biotin peroxidase complex (ABC kit DAKO A/S, Denmark) and stained with the chromogen substrate diaminobenzidine (DAKO A/S, Denmark). Following, sections were counterstaining with Carrazi's hematoxylin and mounted with permount. Wound areas were examined by using light microscope (LEICA microsystem GmbH, Wetzlar, Germany) (magnification x200). Again, three representative fields from the borders and center of the defect from each section were chosen. Further a 500 μm^2 square area was constructed using image a managing /editor software (Adobe Photoshop CS5, San Jose, CA, USA) and overlaid on the digital images obtained from the sections. The region of interest for the analysis was represented by the whole grid, which was positioned in the center of each field and immunoreactive cells were counted by a blind and trained examiner.

Analysis of protein expression by ELISA

ELISA assays were carried out to detect IL-1, IL-6, TGF- β , TNF α and VEGF expression. First, harvested tissue sample were macerated and homogenized in a cocktail containing tissue protein extraction reagent buffer (T-PER, PIERCE, IL, USA) and protease inhibitors (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail Kit, PIERCE, USA). The samples were centrifuged 5 min at 13000 rpm

at 4°C. The supernatant were transferred to other tube and stored at -20°C. The target protein expression were measured using commercially available ELISA kits: Rat IL-1 ELISA kit (Invitrogen, USA), Rat IL-6 ELISA kit (ELISAOpteia™ BD Biosciences Pharmigen, USA), Rat TNF α ELISA kit (ELISAOpteia™ BD Biosciences Pharmigen, USA), Human TGF- β ELISA kit (ELISAOpteia™ BD Biosciences Pharmigen, USA) and Rat VEGF ELISA kit (Invitrogen, USA). Standard proteins for all the targets were available in each kit.

Statistical Analysis

All data were analyzed using the GraphPad Prism software 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). One-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test were performed to determine the presence of any significant difference between groups for all the analyses. P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Histology Analysis

Histologically, at 3 days, the wounds of all groups seem to be similar presenting granulation tissue associated to intense inflammatory infiltration, necrotic tissue layer covering superficially the wound and neovascularization and epithelium migration at the border of the lesion.

At 5 days, the wound of all three groups were completely filled with granulation tissue containing fibroblasts, mononuclear inflammatory cells, collagen deposition and neovascularization. However, lesions treated with Artin M (A group) were covered by a thin epithelial layer and presented higher collagen fibers deposition in comparison to the other groups which showed incomplete epithelium (Figure 2).

At 7 day, all groups presented complete reepithelization, connective tissue restoration and contraction of the lesion. Nevertheless, A group presented significantly lower amount of inflammatory cells ($p=0.005$) (Table 1), well-arranged collagen fibers, fibroplasia and tissue remodeling characterizing advanced maturation of granulation tissue compared to the other groups at the

same time point. Besides, C and V groups showed thin and disorganized epithelium and randomly arranged collagen fibers bundles (Figure 2).

According to the histological evaluation, enhancement of the wound healing process was observed in Artin M treated group which presented a thicker and well organized epithelium and a granular tissue containing increased collagen fiber amount in a well arranged manner.

There is no statistical difference in number of mast cells among groups in any time point (Table1).

Immunohistochemistry analysis

Immunohistochemical results are summarized in Table 2. PCNA labeling in the nuclei of cells demonstrated that Artin M treatment increased significantly cell proliferation at 5 day ($p=0,014$). Also, elevated expression of TGF ($p= 0,006$) and VEGF ($p= 0,011$) in the wounds treated with Artin M was noted at day 3. However, there was no statistical difference in bFGF expression among groups in any time point (Table 2).

Protein expression

Artin M modulates differently the cytokines and growth factors expression in oral mucosa. Quantitative results from ELISA assays demonstrated significantly higher level of TGF β ($p<0.05$) and VEGF ($p<0.05$) in group A compared to the other groups at day 3. But there were no statistical differences in levels of IL-1, IL-6 and TNF α among groups in any time point (Figure 4).

DISCUSSION

In the present study we evaluated the potential of Artin M to improve oral wound healing. Artin M treated wounds presented accelerated reepithelization, granulation tissue maturation and significant increase in cell proliferation demonstrated by PCNA immunostaining at day 5. This result is consistent with previous findings demonstrating the same effects of Artin M after topical application in corneal lesions in rabbits¹⁸.

Healing potential of Artin M could be partially explained based on stimuli effects in neutrophil recruitment which has been well reported in the literature

^{18,93,103} and seems to play an important function in oral lesion healing. Oral cavity contains more than 800 species of microorganisms in harmony as biofilms or planktonic form ³⁴. Interaction microorganism-host and cooperation between multispecies contribute to the oral microbial diversity ³⁴. As consequences, in contaminated sites such as oral environment, neutrophils play fundamental roles in the inflammatory phase of repair processes. They are the first cells to reach the injury sites and they are essential to debridement in wounds under this condition. Besides, they represents a potential source of multiple cytokine and growth factors that are essential to regulating other cell types and pathways during wound repair ^{9,20,30}.

Our data demonstrated that the level of both TGF- β and VEGF are up regulated in Artin M treated wound compared to the other groups at 3 days post treatment.

It is well established that endogenous growth factors released from different cells coordinates the healing process ^{9,36,43,102}.

TGF are released by macrophages, platelets, fibroblasts ⁴⁹ and is increased in acute wounds ^{9,30,32}. Previous studies highlighted the crucial role of TGF- β in early phase of repair. TGF- β stimulates collagen deposition, granulation tissue formation, angiogenesis and soft tissue remodeling ^{9,11,90}. An in vivo study has demonstrated that the application of TGF- β accelerated healing by increasing collagen deposition and augmentation of wound strength in a dose-dependent manner ⁷³. In addition, TGF- β induced peripheral blood mesenchymal stem cells migration and stimulated collagen type I expression in vitro ⁷.

VEGF is a potent angiogenic inducer that stimulates directly endothelial cells migration and proliferation ^{14,29}. Angiogenesis is essential to establish granulation tissue. It provides nutrients into the wounds and is responsible to drain metabolites ⁵⁹. Several pro inflammatory cytokines and growth factors including IL-1 β , EGF, bFGF, PDGF, TGF- β and TNF α are reported to stimulate VEGF expression by platelets, fibroblasts, neutrophils, endothelial cells and keratinocytes ^{8,9,12}. Additionally, hypoxic condition induced by injury has been shown to enhance the expression of VEGF ^{12,59}. In skin wounds, VEGF protein

expression was elevated from 1 through 7 days after injury and reached a peak at day 3. It supports VEGF as significant factor released by inflammatory cells in initial stage of normal wound healing ⁷⁶.

Local application of VEGF has also been demonstrated effective for wound healing. Zhang et al. investigated the effect of exogenous VEGF on wound healing in ischemic skin flap. An increase in tensile strength and in microvessel density was observed from group treated with human recombinant VEGF compared with control group. The findings indicated that VEGF improved synthesis of extracellular matrix and induced early angiogenesis promoting favorable environment to tissue repair ¹¹⁰.

Diabetic wounds are frequently used as delayed wound-healing model. Impaired tissue healing by diabetics has been well documented ⁸. Using a diabetes model in vivo, Brem et al. observed accelerated wound closure in 6.6 days in adenovirus mediated VEGF gene (ADV/VEGF) transfected wounds than control. Also, they showed faster reepithelization, reduced volume of granulation tissue but higher amount of collagen deposition and well-arranged fiber bundle. Moreover, it has been shown that VEGF stimulated human keratinocytes inducing epithelial proliferation in vitro ¹⁵. These results indicated that VEGF improves reepithelization and faster maturation of granulation tissue during repair.

Indeed, consistent with previous studies, we observed effects of TGF- β and VEGF speeding up the process of reepithelization and formation of granulation tissue rich in well-arranged collagen fibers ^{15,63,73}.

It is well reported that TGF and VEGF are induced by cytokines such as TNF α ⁸, IL-1 β ¹² and IL-6 ^{20,106} but we did not observed alteration in those cytokine levels. Thus, it suggests direct effect of Artin M in the expression of growth factors that play important roles in the healing process during oral mucosa healing.

Other prominent effects of Artin M being reported are in mast cells ^{23,71}. These cells are well known as central key in hypersensitivity reactions ¹⁷. Mast cells are source of histamine, heparin, cathepsin K, tryptase, prostaglandins and cytokines such as TNF, IL-6 and IL-8. Mast cell degranulation induces vasodilatation, recruitment of inflammatory cells and release of other mediators ⁴.

Some studies have discussed the significance of mast cells participation during inflammatory phases of healing and also its influence in neovascularization and tissue remodeling via expression of growth factors and proteinases^{50,64,77}. Weller et al. demonstrated impaired healing in mast cell deficient mice. They found delayed wound closure associated to reduced influx of neutrophils, thus they confirmed the importance of mast cells participation at normal tissue repair¹⁰⁸. Contradictorily, we did not observed significant differences in A group compared to the others regarding to mast cells quantity in any experimental period (Table1). Probably, the concentration of Artin M used in this work was inadequate to elicit mast cells response once previous study have reported that different concentrations of Artin M are needed for mast cells recruitment, proliferation and degranulation in different tissues²³.

In conclusion, the present study demonstrated that application of Artin M gel is effective in the healing of oral mucosa wound in rats by enhancing induction of TGF- β and VEGF release, increasing cell proliferation, reepithelization, deposition and arrangement of collagen fibers. Further investigations are necessary to better understand the mechanisms of action of Artin M and to confirm its function as new therapeutic approaches to improve wound healing process in oral lesions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Grant # 2009/16432-1, 2006/60642-2, 2009/16955-4, 2009/03032-5.

We wish to acknowledge Mrs. Ana Claudia G. C. Miranda and Sandra Thomaz for technical support. All authors contributed to the study protocol, interpretation of results and manuscript. JAC coordinated the study, participated in the study design and helped draft the manuscript. YJK carried out the histological and molecular analysis, performed statistical analysis and drafted the manuscript. JAS and PCGG participated in the histological analysis. LCS performed histological

descriptions. FCC performed molecular analysis. MCRBA participated in the study design and helped draft the manuscript.

REFERENCES

- (1) Clark RA. Wound repair. *Curr Opin Cell Biol* 1989; **1**: 1000-1008.
- (2) Toriseva M, Kahari VM. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**: 203-224.
- (3) Le AD, Basi DL, Abubaker AO. Wound healing: findings of the 2005 AAOMS Research Summit. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; **63**: 1426-1435.
- (4) Braiman-Wiksman L, Solomonik I, Spira R, Tennenbaum T. Novel insights into wound healing sequence of events. *Toxicol Pathol* 2007; **35**: 767-779.
- (5) MacKay D, Miller AL. Nutritional support for wound healing. *Altern Med Rev* 2003; **8**: 359-377.
- (6) Ashcroft GS, Mills SJ, Ashworth JJ. Ageing and wound healing. *Biogerontology* 2002; **3**: 337-345.
- (7) Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010; **89**: 219-229.
- (8) Menke MN, Menke NB, Boardman CH, Diegelmann RF. Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing. *Gynecol Oncol* 2008; **111**: S87-91.
- (9) Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis* 2004; **17**: 91-96.
- (10) Shetty BS, Udupa SL, Udupa AL, Somayaji SN. Effect of *Centella asiatica* L (Umbelliferae) on normal and dexamethasone-suppressed wound healing in Wistar Albino rats. *Int J Low Extrem Wounds* 2006; **5**: 137-143.
- (11) Ermertcan AT, Inan S, Ozturkcan S, Bilac C, Cilaker S. Comparison of the effects of collagenase and extract of *Centella asiatica* in an experimental model of wound healing: an immunohistochemical and histopathological study. *Wound Repair Regen* 2008; **16**: 674-681.

- (12) Schmidt C, Fronza M, Goettert M, et al. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *J Ethnopharmacol* 2009; **122**: 523-532.
- (13) Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpisal P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. *J Pharmacol Sci* 2009; **109**: 525-531.
- (14) Martins MD, Marques MM, Bussadori SK, et al. Comparative analysis between *Chamomilla recutita* and corticosteroids on wound healing. An in vitro and in vivo study. *Phytother Res* 2009; **23**: 274-278.
- (15) Atiba A, Nishimura M, Kakinuma S, et al. Aloe vera oral administration accelerates acute radiation-delayed wound healing by stimulating transforming growth factor-beta and fibroblast growth factor production. *Am J Surg* 2011; **201**: 809-818.
- (16) Lee TH, Lee GW, Kim CW, et al. *Stewartia koreana* extract stimulates proliferation and migration of human endothelial cells and induces neovascularization in vivo. *Phytother Res* 2010; **24**: 20-25.
- (17) Misra R. Modern drug development from traditional medicinal plants using radioligand receptor-binding assays. *Med Res Rev* 1998; **18**: 383-402.
- (18) Rosa JC, De Oliveira PS, Garratt R, et al. KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. *Protein Sci* 1999; **8**: 13-24.
- (19) Silva-Lucca RA, Tabak M, Nascimento OR, Roque-Barreira MC, Beltramini LM. Structural and thermodynamic studies of KM+, a d-mannose binding lectin from *Artocarpus integrifolia* seeds. *Biophys Chem* 1999; **79**: 81-93.
- (20) Sharon N, Lis H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am* 1993; **268**: 82-89.
- (21) Sharon N, Lis H. Lectins--proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. *Essays Biochem* 1995; **30**: 59-75.

- (22) Misquith S, Rani PG, Surolia A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30393-30401.
- (23) Ganiko L, Martins AR, Freymuller E, Mortara RA, Roque-Barreira MC. Lectin KM⁺-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1721**: 152-163.
- (24) Toledo KA, Schwartz C, Oliveira AF, et al. Neutrophil activation induced by ArtinM: release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. *Immunol Lett* 2009; **123**: 14-20.
- (25) Moreno AN, Jamur MC, Oliver C, Roque-Barreira MC. Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; **132**: 221-230.
- (26) de Almeida Buranello PA, Moulin MR, Souza DA, Jamur MC, Roque-Barreira MC, Oliver C. The lectin ArtinM induces recruitment of rat mast cells from the bone marrow to the peritoneal cavity. *PLoS One* 2010; **5**: e9776.
- (27) Panunto-Castelo A, Souza MA, Roque-Barreira MC, Silva JS. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania* major antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. *Glycobiology* 2001; **11**: 1035-1042.
- (28) Teixeira CR, Cavassani KA, Gomes RB, et al. Potential of KM⁺ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. *Vaccine* 2006; **24**: 3001-3008.
- (29) Coltri KC, Oliveira LL, Pinzan CF, et al. Therapeutic administration of KM⁺ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. *Am J Pathol* 2008; **173**: 423-432.
- (30) PINTO DA SILVA L, Lamberti; FFCLRP/USP, Avenida Bandeirantes, 3900, Prédio Central, 14040-900 Ribeirão Preto (BR)., PANUNTO CASTELO AFU, Avenida Bandeirantes, 3900, Prédio Central, 14040-900 Ribeirão Preto (BR)., DE SOUZA GOLDMAN M, Helena; FFCLRP/USP, Avenida

Bandeirantes, 3900, Prédio Central, 14040-900 Ribeirão Preto (BR)., et al. PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING LECTIN. Brazil: CRUZEIRO NEWMARC PATENTES E MARCAS LTDA; Rua Itajobi, 79, Pacaembu, 01246-010 São Paulo (BR). 2004.

- (31) Chahud F, Ramalho LN, Ramalho FS, Haddad A, Roque-Barreira MC. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits. *Int J Exp Pathol* 2009; **90**: 166-173.
- (32) Santos-de-Oliveira R, Dias-Baruffi M, Thomaz SM, Beltramini LM, Roque-Barreira MC. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J Immunol* 1994; **153**: 1798-1807.
- (33) Odze RD, Marcial MA, Antonioli D. Gastric fundic gland polyps: a morphological study including mucin histochemistry, stereometry, and MIB-1 immunohistochemistry. *Hum Pathol* 1996; **27**: 896-903.
- (34) Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res* 2010; **89**: 8-18.
- (35) Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008; **16**: 585-601.
- (36) Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996; **271**: 736-741.
- (37) Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007; **127**: 514-525.
- (38) Thomas DW, O'Neill ID, Harding KG, Shepherd JP. Cutaneous wound healing: a current perspective. *J Oral Maxillofac Surg* 1995; **53**: 442-447.
- (39) Grose R, Werner S. Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Mol Biotechnol* 2004; **28**: 147-166.
- (40) Gailit J, Clark RA. Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 717-725.
- (41) Hom DB, Thatcher G, Tibesar R. Growth factor therapy to improve soft tissue healing. *Facial Plast Surg* 2002; **18**: 41-52.

- (42) Faler BJ, Macsata RA, Plummer D, Mishra L, Sidawy AN. Transforming growth factor-beta and wound healing. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther* 2006; **18**: 55-62.
- (43) Beanes SR, Dang C, Soo C, Ting K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. *Expert Rev Mol Med* 2003; **5**: 1-22.
- (44) Rhett JM, Ghatnekar GS, Palatinus JA, O'Quinn M, Yost MJ, Gourdie RG. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. *Trends Biotechnol* 2008; **26**: 173-180.
- (45) Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science* 1987; **237**: 1333-1336.
- (46) Bakhshayesh M, Soleimani M, Mehdizadeh M, Katebi M. Effects of TGF-beta and b-FGF on the Potential of Peripheral Blood-Borne Stem Cells and Bone Marrow-Derived Stem Cells in Wound Healing in a Murine Model. *Inflammation* 2011.
- (47) Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem* 2007; **102**: 1358-1367.
- (48) Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M. Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Prog Histochem Cytochem* 2007; **42**: 115-170.
- (49) Berse B, Hunt JA, Diegel RJ, et al. Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 1999; **115**: 176-182.
- (50) Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res* 2009; **153**: 347-358.
- (51) Nogami M, Hoshi T, Kinoshita M, Arai T, Takama M, Takahashi I. Vascular endothelial growth factor expression in rat skin incision wound. *Med Mol Morphol* 2007; **40**: 82-87.

- (52) Zhang F, Lei MP, Oswald TM, et al. The effect of vascular endothelial growth factor on the healing of ischaemic skin wounds. *Br J Plast Surg* 2003; **56**: 334-341.
- (53) Brem H, Kodra A, Golinko MS, et al. Mechanism of sustained release of vascular endothelial growth factor in accelerating experimental diabetic healing. *J Invest Dermatol* 2009; **129**: 2275-2287.
- (54) Mansbridge JN, Hanawalt PC. Role of transforming growth factor beta in the maturation of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1988; **90**: 336-341.
- (55) Villiger PM, Kusari AB, ten Dijke P, Lotz M. IL-1 beta and IL-6 selectively induce transforming growth factor-beta isoforms in human articular chondrocytes. *J Immunol* 1993; **151**: 3337-3344.
- (56) Carvalho VF, Barreto EO, Cordeiro RS, Lagente V, Martins MA, e Silva PM. Mast cell changes in experimental diabetes: focus on attenuation of allergic events. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; **100 Suppl 1**: 121-125.
- (57) Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grutzkau A, Henz BM. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol* 1999; **8**: 1-16.
- (58) Noli C, Miolo A. The mast cell in wound healing. *Vet Dermatol* 2001; **12**: 303-313.
- (59) Iba Y, Shibata A, Kato M, Masukawa T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *Int Immunopharmacol* 2004; **4**: 1873-1880.
- (60) Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* 2005; **15**: 599-607.
- (61) Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J* 2006; **20**: 2366-2368.

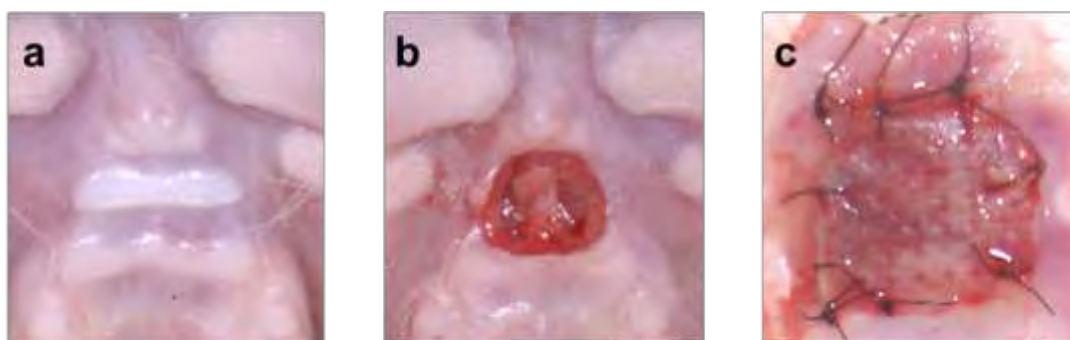


Figure 1. Clinical sequence. (a) Rat palatal mucosa. (b) Circular (4mm diameter) full thickness excision wound was created by a surgical punch which simulated a palatal tissue donor area. (c) Palatal wound covered with Transpore® tape after treatment.

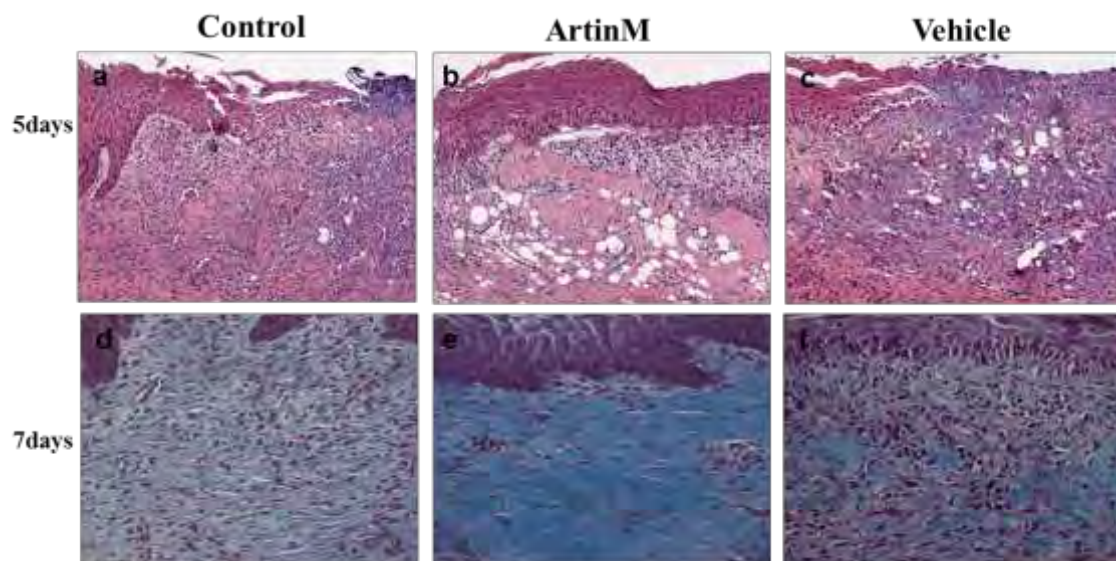


Figure 2. Photomicrographs showing H&E staining on 5 day (a-c), original magnification 40x. Masson's Trichromide staining at 7day (d-f) post treatment, original magnification 40x. The wounds treated according to experimental groups: (a,d) Control, (b,e) Artin M and (c,f) Vehicle.

Table 1. Effect of application of Artin M in number of inflammatory cells and mast cells during wound healing on rat palatal mucosa.

	CONTROL	ARTIN M	VEHICLE
Inflammatory cells			
3 days	71.5 ± 21.69	87.25 ± 18,35	69.57 ± 12.66
5 days	58.16 ± 17.16	61.16 ± 17.97	84.5 ± 9.75
7 days	66 ± 14.78	38.25 ± 5.31 [*]	78.6 ± 23.28
Mast cells			
3 days	29.83 ± 9.20	28 ± 9.21	21 ± 10.29
5 days	38.4 ± 15.48	30.33 ± 12.21	29.66 ± 10.22
7 days	20.66 ± 10.76	32.25 ± 16.67	27.33 ± 6.74

^{*}p<0.05 statistically different from the other groups a same time-point.

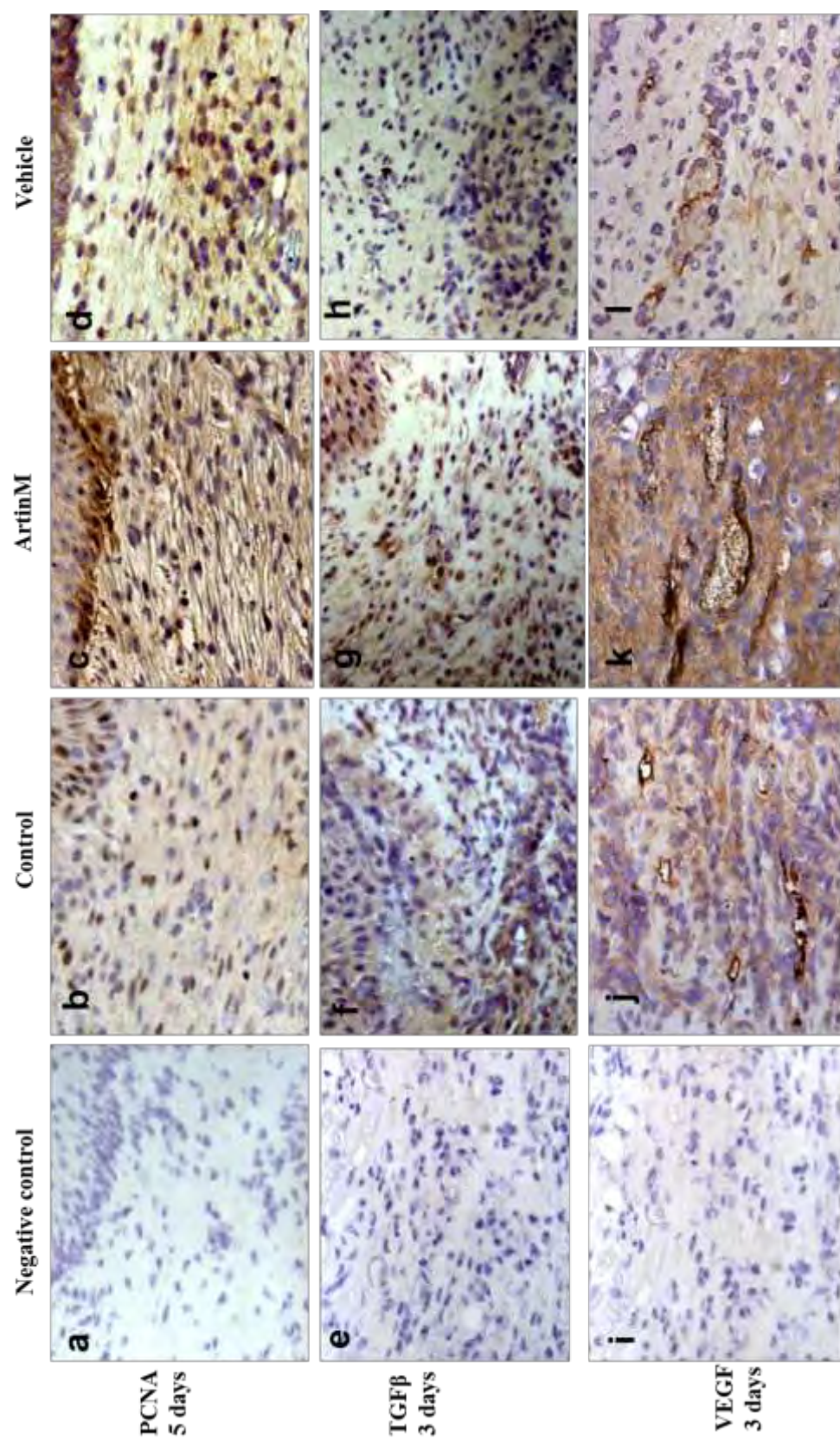


Figure 3. Photomicrographs showing immunohistochemical staining for PCNA on day 5 (a-d), TGF-β at day 3 (e-h) and VEGF at day 3 post-treatment (i-l). (a, e, i) Negative control, (b, f, j) Control, (c, g, k) ArtinM and (d, h, l) Vehicle. Original magnification 20X.

Table 2. Effect of application of Artin M in immunolocalization of bFGF, PCNA, TGF- β and VEGF during wound healing on rat palatal mucosa.

	CONTROL	ARTIN M	VEHICLE
bFGF			
3 days	82.71 $\pm$ 22.71	94.16 $\pm$ 27.37	91.33 $\pm$ 26.47
5 days	80.66 $\pm$ 12.42	74.66 $\pm$ 17.42	77.66 $\pm$ 21.09
7 days	65.85 $\pm$ 24.80	56.71 $\pm$ 22.08	48.28 $\pm$ 15.04
PCNA			
3 days	61.62 $\pm$ 21.69	51.5 $\pm$ 12.75	57.58 $\pm$ 16.11
5 days	89.66 $\pm$ 12.42	136.66 $\pm$ 17.38 [*]	80. $\pm$ 21.09
7 days	73.52 $\pm$ 24.80	56.71 $\pm$ 22.08	58.28 $\pm$ 28.23
TGF-β			
3 days	66.71 $\pm$ 24.52	163,79 $\pm$ 11.80 [*]	57.58 $\pm$ 11.5
5 days	103.66 $\pm$ 9.43	99.38 $\pm$ 19.66	85. $\pm$ 21.09
7 days	83.41 $\pm$ 28.75	46.2 $\pm$ 32.41	66.73 $\pm$ 18.94
VEGF			
3 days	36.9 $\pm$ 10.06	78 $\pm$ 8.35 [*]	31 $\pm$ 7.03
5 days	57.9 $\pm$ 13.26	60 $\pm$ 5.17	55.21 $\pm$ 18.05
7 days	60 $\pm$ 7.92	44.2 $\pm$ 13.58	62.45 $\pm$ 10.91

*p<0.05 statistically different from the other groups a same time-point.

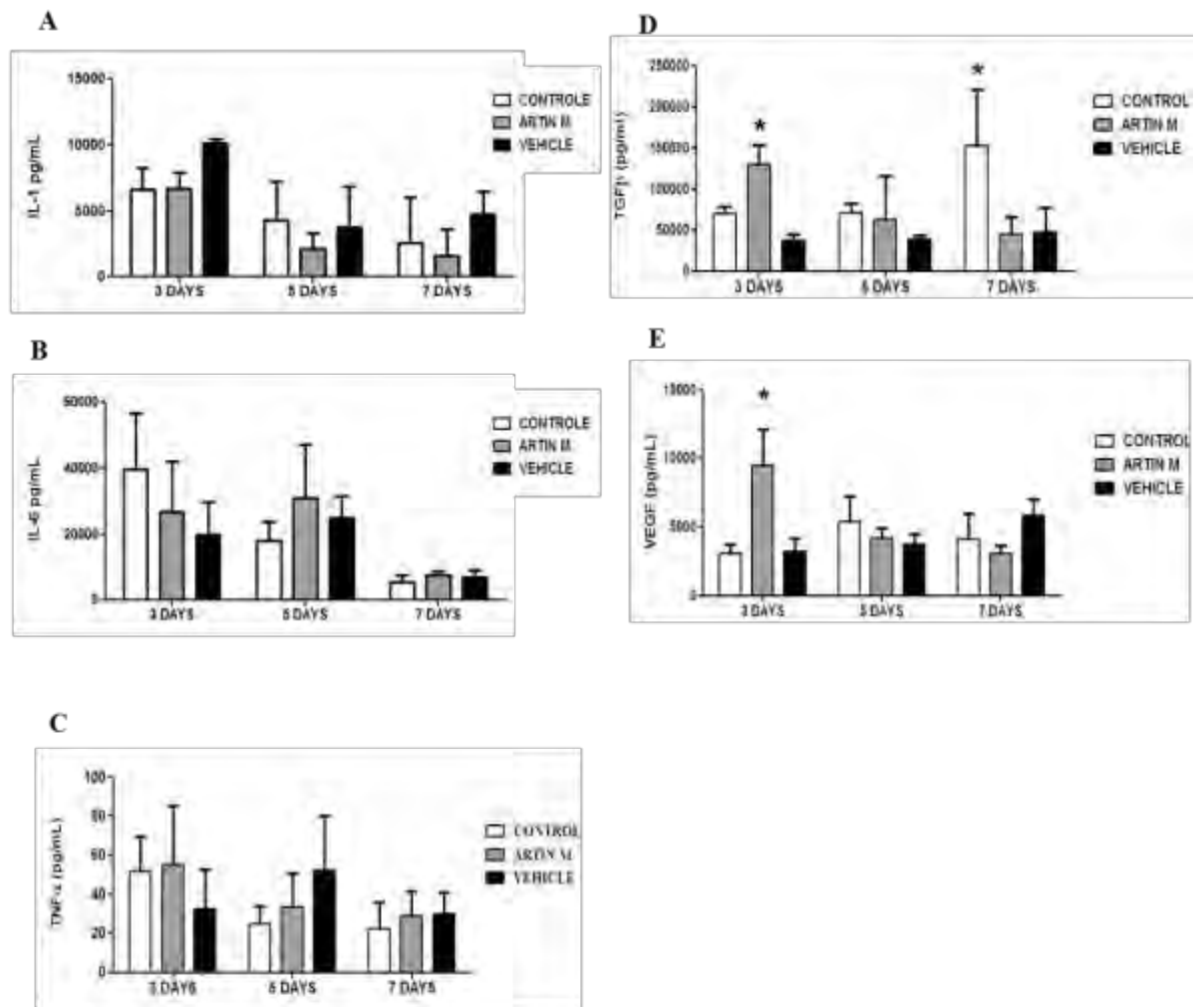


Figure 4. Effect of application of ArtinM in IL-1, IL-6, TNF α , TGF- β and VEGF expression during wound healing in rat palatal mucosa determined by ELISA. The mean and the standard error are shown.

* ($p < 0.05$) significant difference from the other groups in the same period.

Considerações Finais

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A reparação tecidual consiste num processo complexo e dinâmico baseado em interações celulares e sequência de eventos que visa reestabelecer a integridade e função do tecido lesado ^{13,19,59,104}. Vários fatores podem influenciar este processo, os fatores sistêmicos relacionados à saúde do paciente e, principalmente, os fatores locais como presença de infecção e uso de medicamentos tópicos ^{5,45,62,68}.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação tópica de gel de Artin M na reparação das feridas da mucosa palatina em modelos animais. O primeiro estudo demonstrou um efeito favorável da Artin M no processo de reparação por meio de análises clínica e histológica. No segundo estudo, o modelo de rato proporcionou uma melhor análise através de técnicas de biologia molecular que não foram possíveis de realização no estudo anterior devido à limitação de disponibilidade de reagentes para aquela espécie animal. Essas análises tiveram como propósito compreender melhor o efeito desse novo produto no processo de reparação, obtendo dados que permitirão novos estudos e adequação da forma de utilização na terapia periodontal.

Os resultados encontrados nos dois trabalhos serão discutidos em conjunto devido a inter-relação destes componentes no processo da reparação tecidual.

A avaliação clínica (Capítulo 1) mostrou aceleração da reparação das feridas tratadas com Artin M em todos os períodos experimentais.

A avaliação histológica realizada em ambos os estudos confirmou a aceleração na reparação das feridas tratadas com Artin M, que apresentaram um aumento na proliferação celular (fibroblastos), estimulação na produção de fibras colágenas, maturação do tecido de granulação e organização do epitélio regenerado e menor quantidade de infiltrado inflamatório no período tardio quando comparado aos demais grupos de tratamento.

Além disso, foi observado um aumento de neutrófilos nos períodos 2 e 4 dias pós -tratamento no grupo A comparado aos outros grupos do mesmo período. Dentre as propriedades biológicas da Artin M, a ativação e recrutamento de

neutrófilos associadas à ativação e degranulação dos mastócitos já foram previamente descritos em estudos *in vitro* e *in vivo* ^{23,71,93}.

A migração das células inflamatórias, particularmente neutrófilos, imediatamente após a injúria, é essencial para o desencadeamento da fase inflamatória da reparação. Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o sítio do dano tecidual, embora, não correspondam ao único tipo celular a atuar na fase inicial, são responsáveis pelo debridamento, ativação e recrutamento de outros tipos celulares, além de representar fontes de citocinas e fatores de crescimento, tais como IL-1, IL-6, IL-8, VEGF, dentre outros ^{9,20,29}.

Estudo com camundongos com deficiência em neutrófilos demonstraram retardos na reparação de feridas, evidenciando a sua importância no processo ^{25,75}. Comprometimento na reparação também foi observado em animais *Knock out* para gene de CXCR2, receptor responsável, para quimiotaxia de neutrófilos. As feridas apresentaram redução na migração de neutrófilos e na neovascularização associadas à diminuição de níveis de TGF- β e VEGF, resultando em reparação deficiente ²⁵. No entanto, nos sítios contaminados como a cavidade oral, o qual apresenta interação de mais de 800 espécies de microrganismos, os neutrófilos são essenciais para destruição dos agentes infecciosos, debridamento de tecidos desvitalizados e ativação de sistema imune. Sendo assim o aumento no acúmulo de neutrófilos nos períodos iniciais induzido pelo Artin M pode explicar parcialmente a aceleração na reparação das lesões de palato. Também é interessante observar que, apesar de maior quantidade de neutrófilos serem atraídos na fase inflamatória, porém eles não persistem no local da ferida, o que acarretaria dano tecidual correlacionada a perpetuar a fase inflamatória causando efeitos deletérios ^{27,30}.

Em relação aos mastócitos, é importante mencionar que apesar de estudos terem demonstrado recrutamento, proliferação e degranulação de mastócitos induzidos pela Artin M ^{23,71}, neste estudo não foi observada diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum período experimental. Há evidências que mastócitos desempenham papel fundamental na fase inflamatória e remodelação no processo da reparação normal ^{50,64,77}. Num estudo

com camundongos deficientes em mastócitos foi observado atraso no fechamento das feridas associadas à redução no influxo de neutrófilos, confirmando a importância da participação dos mastócitos no processo de reparo normal do tecido ¹⁰⁸. Portanto, podemos sugerir que a participação normal dos mastócitos na reparação tecidual não permitiu revelar uma diferença significativa entre os grupos nos períodos avaliados ou a concentração de Artin M utilizada foi inadequada para induzir respostas dessas células. Um estudo prévio relatou que diferentes concentrações da lectina seriam necessárias para induzir diferentes atividades celulares ²³.

Um dos objetivos desse trabalho também foi avaliar o efeito da aplicação de Artin M na expressão de três fatores de crescimento: bFGF, TGF- β e VEGF. As pesquisas têm demonstrado a importância de fatores de crescimento na modulação dos mecanismos biológicos da reparação justificando a utilização local de fatores de crescimentos exógenos como agente terapêutico nesse processo ^{3,35,49,59,80,92}. Todavia, apesar de resultados favoráveis, o seu uso como forma de tratamento ainda é discutido pelo seu mecanismo de ação, pois envolve um processo dinâmico e orquestrado o qual a aplicação de um único fator pode não acarretar em reparação ideal; além das dificuldades encontradas em relação à concentração ideal, degradação e efeitos adversos. Recentemente, vários estudos têm investigado a utilização de fitoterápicos na reparação, envolvendo regulação de mediadores celulares endógenos, como citocinas e fatores de crescimento ^{6,31,53,60,65,95,99}.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, Artin M não alterou a expressão de bFGF. Possíveis explicações para este resultado podem ser a ocorrência de um aumento natural da expressão de bFGF no local da lesão durante o processo de reparação, o qual não permitiria a detecção de uma diferença significativa entre os grupos nos períodos avaliados. Outra interpretação poderia ser a de que o Artin M não atue diretamente e/ou indiretamente na regulação deste fator de crescimento. No entanto, Artin M foi capaz de estimular a produção de TGF- β e VEGF no período de 3 dias pós-tratamento. Esses dados sugerem que esses fatores atuaram acelerando a

regeneração e organização do epitélio e formação de tecido de granulação rico em feixes de fibras mais organizadas. Esses resultados estão de acordo com achados observados em outros estudos nos quais se verificou que a aplicação local de TGF- β aumentou a deposição de colágeno nas feridas cutâneas incisoriais⁷³ e estimulou a expressão de colágeno tipo I pelas células-tronco mesenquimais, *in vitro*⁷. A aplicação de VEGF mediada por adenovírus acelerou o fechamento das lesões, além de acelerar a reepitelização e maturação do tecido de granulação *in vivo* estimular a proliferação de tecido epitelial em cultura de queratinócitos humanos¹⁵.

Outra questão levantada é que TGF- β e VEGF podem ser induzidos pelas citocinas como TNF α ⁸, IL-1 β ¹² e IL-6^{20,106}, entretanto não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos períodos avaliados. Dessa forma, podemos sugerir um efeito direto da Artin M na produção dos fatores de crescimento citados anteriormente.

Os resultados obtidos corroboram com estudo anterior o qual observou aceleração da reparação nas lesões de abrasão da córnea de coelho tratadas com Artin M por meio de mecanismo de aumento na indução de neutrófilos e maior expressão de VEGF e cMet (receptor para o fator de crescimento de hepatócitos)¹⁸.

Tendo em vista, estes resultados positivos deste produto na reparação das lesões na mucosa mastigatória, estudos adicionais são necessários para um melhor entendimento do mecanismo de ação e confirmar sua aplicação como agente terapêutico para promover o processo de reparação das lesões intra-orais.

Conclusão

5 CONCLUSÃO

De acordo com o que foi proposto, pode-se concluir que a aplicação tópica de gel de Artin M promoveu aceleração na reparação das lesões da mucosa mastigatória in vivo, através de aumento no recrutamento de neutrófilos, aumento na proliferação celular, estimulação na produção de fibras colágenas, maturação do tecido de granulação, formação e organização do epitélio e indução da maior expressão de fatores de crescimento TGF- β e VEGF.

Referências

6 REFERÊNCIAS*

1. Adolphe C, Wainwright B. Pathways to improving skin regeneration. *Expert Rev Mol Med*. 2005; 7: 1-14.
2. Alves-Rezende MC, Okamoto T. Effects of fibrin adhesive material (Tissucol) on alveolar healing in rats under stress. *Braz Dent J*. 1997; 8: 13-9.
3. Anusaksathien O, Webb SA, Jin QM, Giannobile WV. Platelet-derived growth factor gene delivery stimulates ex vivo gingival repair. *Tissue Eng*. 2003; 9: 745-56.
4. Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grutzkau A, Henz BM. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol*. 1999; 8: 1-16.
5. Ashcroft GS, Mills SJ, Ashworth JJ. Ageing and wound healing. *Biogerontology*. 2002; 3: 337-45.
6. Atiba A, Nishimura M, Kakinuma S, Hiraoka T, Goryo M, Shimada Y, et al. Aloe vera oral administration accelerates acute radiation-delayed wound healing by stimulating transforming growth factor-beta and fibroblast growth factor production. *Am J Surg*. 2011; 201: 809-18.
7. Bakhshayesh M, Soleimani M, Mehdizadeh M, Katebi M. Effects of TGF-beta and b-FGF on the potential of peripheral blood-borne stem cells and bone marrow-derived stem cells in wound healing in a murine model. *Inflammation*. 2011; 78: 265-74.
8. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2009; 153: 347-58.
9. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008; 16: 585-601.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

10. Bartolucci EG, Prato GP. Preliminary observations on the use of a biologic sealing system (Tissucol) in periodontal surgery. *J Periodontol.* 1982; 53: 731-5.
11. Beanes SR, Dang C, Soo C, Ting K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. *Expert Rev Mol Med.* 2003; 5: 1-22.
12. Berse B, Hunt JA, Diegel RJ, Morganelli P, Yeo K, Brown F, et al. Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* 1999; 115: 176-82.
13. Braiman-Wiksmann L, Solomonik I, Spira R, Tennenbaum T. Novel insights into wound healing sequence of events. *Toxicol Pathol.* 2007; 35: 767-79.
14. Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem.* 2007; 102: 1358-67.
15. Brem H, Kodra A, Golinko MS, Entero H, Stojadinovic O, Wang VM, et al. Mechanism of sustained release of vascular endothelial growth factor in accelerating experimental diabetic healing. *J Invest Dermatol.* 2009; 129: 2275-87.
16. Carmeliet P, Collen D. Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. *J Pathol.* 2000; 190: 387-405.
17. Carvalho VF, Barreto EO, Cordeiro RS, Lagente V, Martins MA, e Silva PM. Mast cell changes in experimental diabetes: focus on attenuation of allergic events. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100 Suppl 1: 121-5.
18. Chahud F, Ramalho LN, Ramalho FS, Haddad A, Roque-Barreira MC. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits. *Int J Exp Pathol.* 2009; 90: 166-73.
19. Clark RA. Wound repair. *Curr Opin Cell Biol.* 1989; 1: 1000-8.
20. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1996; 271: 736-41.

21. Coltri KC, Oliveira LL, Pinzan CF, Vendruscolo PE, Martinez R, Goldman MH, et al. Therapeutic administration of KM⁺ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. *Am J Pathol.* 2008; 173: 423-32.
22. daSilva LL, de Molfetta-Machado JB, Panunto-Castelo A, Denecke J, Goldman GH, Roque-Barreira MC, et al. cDNA cloning and functional expression of KM⁺, the mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia* seeds. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1726: 251-60.
23. de Almeida Buranello PA, Moulin MR, Souza DA, Jamur MC, Roque-Barreira MC, Oliver C. The lectin ArtinM induces recruitment of rat mast cells from the bone marrow to the peritoneal cavity. *PLoS One.* 2010; 5: e9776.
24. Del Pizzo M, Modica F, Bethaz N, Priotto P, Romagnoli R. The connective tissue graft: a comparative clinical evaluation of wound healing at the palatal donor site. A preliminary study. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 848-54.
25. Devalaraja RM, Nanney LB, Du J, Qian Q, Yu Y, Devalaraja MN, et al. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol.* 2000; 115: 234-44.
26. Dogan A, Taner L, Oygur T, Balos K. Effects of fibrin adhesive material (Tissucol) application on furcation defects in dogs. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1992; 34: 34-41.
27. Dovi JV, He LK, DiPietro LA. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol.* 2003; 73: 448-55.
28. Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis.* 2004; 17: 91-6.
29. Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M. Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Prog Histochem Cytochem.* 2007; 42: 115-70.

30. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007; 127: 514-25.
31. Ermertcan AT, Inan S, Ozturkcan S, Bilac C, Cilaker S. Comparison of the effects of collagenase and extract of *Centella asiatica* in an experimental model of wound healing: an immunohistochemical and histopathological study. *Wound Repair Regen.* 2008; 16: 674-81.
32. Faler BJ, Macsata RA, Plummer D, Mishra L, Sidawy AN. Transforming growth factor-beta and wound healing. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther.* 2006; 18: 55-62.
33. Farahani RM, Kloth LC. The hypothesis of 'biophysical matrix contraction': wound contraction revisited. *Int Wound J.* 2008; 5: 477-82.
34. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res.* 2010; 89: 8-18.
35. Fujisawa K, Miyamoto Y, Nagayama M. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32: 358-66.
36. Gailit J, Clark RA. Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 1994; 6: 717-25.
37. Ganiko L, Martins AR, Freymuller E, Mortara RA, Roque-Barreira MC. Lectin KM⁺-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1721: 152-63.
38. Gerhardt H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis.* 2008; 4: 241-6.
39. Giannoudis PV, Pountos I. Tissue regeneration. The past, the present and the future. *Injury.* 2005; 36 Suppl 4: S2-5.
40. Gibran NS, Isik FF, Heimbach DM, Gordon D. Basic fibroblast growth factor in the early human burn wound. *J Surg Res.* 1994; 56: 226-34.
41. Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40: 1334-47.
42. Grose R. Common ground in the transcriptional profiles of wounds and tumors. *Genome Biol.* 2004; 5: 228.

43. Grose R, Werner S. Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Mol Biotechnol*. 2004; 28: 147-66.
44. Gualandris A, Arese M, Shen B, Rifkin DB. Modulation of cell growth and transformation by doxycycline-regulated FGF-2 expression in NIH-3T3 cells. *J Cell Physiol*. 1999; 181: 273-84.
45. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010; 89: 219-29.
46. Hall WB, Lundergan WP. Free gingival grafts. Current indications and techniques. *Dent Clin North Am*. 1993; 37: 227-42.
47. Harris RJ. Root coverage of a palatal recession defect: a case report. *J Periodontol*. 2001; 72: 1103-7.
48. Harris RJ, Sterne JA, Abgrall S, Dabis F, Reiss P, Saag M, et al. Prognostic importance of anaemia in HIV type-1-infected patients starting antiretroviral therapy: collaborative analysis of prospective cohort studies. *Antivir Ther*. 2008; 13: 959-67.
49. Hom DB, Thatcher G, Tibesar R. Growth factor therapy to improve soft tissue healing. *Facial Plast Surg*. 2002; 18: 41-52.
50. Iba Y, Shibata A, Kato M, Masukawa T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *Int Immunopharmacol*. 2004; 4: 1873-80.
51. Jackson MR. New and potential uses of fibrin sealants as an adjunct to surgical hemostasis. *Am J Surg*. 2001; 182: 36S-9S.
52. Jackson MR. Fibrin sealants in surgical practice: An overview. *Am J Surg*. 2001; 182: 1S-7S.
53. Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpisal P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. *J Pharmacol Sci*. 2009; 109: 525-31.

54. Kan JY, Rungcharassaeng K, Lozada JL. Bilaminar subepithelial connective tissue grafts for immediate implant placement and provisionalization in the esthetic zone. *J Calif Dent Assoc.* 2005; 33: 865-71.
55. Kim JW, Kikkawa DO, Lemke BN. Donor site complications of hard palate mucosal grafting. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 1997; 13: 36-9.
56. Koch S, Yao C, Grieb G, Prevel P, Noah EM, Steffens GC. Enhancing angiogenesis in collagen matrices by covalent incorporation of VEGF. *J Mater Sci Mater Med.* 2006; 17: 735-41.
57. Lafleur MA, Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. *Expert Rev Mol Med.* 2003; 5: 1-39.
58. Langer B, Langer L. Subepithelial connective tissue graft technique for root coverage. *J Periodontol.* 1985; 56: 715-20.
59. Le AD, Basi DL, Abubaker AO. Wound healing: findings of the 2005 AAOMS Research Summit. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63: 1426-35.
60. Lee TH, Lee GW, Kim CW, Bang MH, Baek NI, Kim SH, et al. *Stewartia koreana* extract stimulates proliferation and migration of human endothelial cells and induces neovascularization in vivo. *Phytother Res.* 2010; 24: 20-5.
61. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007; 25: 9-18.
62. MacKay D, Miller AL. Nutritional support for wound healing. *Altern Med Rev.* 2003; 8: 359-77.
63. Mansbridge JN, Hanawalt PC. Role of transforming growth factor beta in the maturation of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1988; 90: 336-41.
64. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* 2005; 15: 599-607.

65. Martins MD, Marques MM, Bussadori SK, Martins MA, Pavesi VC, Mesquita-Ferrari RA, et al. Comparative analysis between *Chamomilla recutita* and corticosteroids on wound healing. An in vitro and in vivo study. *Phytother Res.* 2009; 23: 274-8.
66. Matter J. Free gingival grafts for the treatment of gingival recession. A review of some techniques. *J Clin Periodontol.* 1982; 9: 103-14.
67. Matzuk MM, Kumar TR, Vassalli A, Bickenbach JR, Roop DR, Jaenisch R, et al. Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature.* 1995; 374: 354-6.
68. Menke MN, Menke NB, Boardman CH, Diegelmann RF. Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing. *Gynecol Oncol.* 2008; 111: S87-91.
69. Misquith S, Rani PG, Surolia A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. *J Biol Chem.* 1994; 269: 30393-401.
70. Misra R. Modern drug development from traditional medicinal plants using radioligand receptor-binding assays. *Med Res Rev.* 1998; 18: 383-402.
71. Moreno AN, Jamur MC, Oliver C, Roque-Barreira MC. Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003; 132: 221-30.
72. Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, Shimabukuro Y, Kitamura M, Nozaki T, et al. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J Periodontal Res.* 1999; 34: 425-30.
73. Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science.* 1987; 237: 1333-6.
74. Nayak BS, Isitor GN, Maxwell A, Bhogadi V, Ramdath DD. Wound-healing activity of *Morinda citrifolia* fruit juice on diabetes-induced rats. *J Wound Care.* 2007; 16: 83-6.

75. Nishio N, Okawa Y, Sakurai H, Isobe K. Neutrophil depletion delays wound repair in aged mice. *Age (Dordr)*. 2008; 30: 11-9.
76. Nogami M, Hoshi T, Kinoshita M, Arai T, Takama M, Takahashi I. Vascular endothelial growth factor expression in rat skin incision wound. *Med Mol Morphol*. 2007; 40: 82-7.
77. Noli C, Miolo A. The mast cell in wound healing. *Vet Dermatol*. 2001; 12: 303-13.
78. Novaes AB, Jr., Novaes AB. Soft tissue management for primary closure in guided bone regeneration: surgical technique and case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997; 12: 84-7.
79. Nugent MA, Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000; 32: 115-20.
80. Oda Y, Kagami H, Ueda M. Accelerating effects of basic fibroblast growth factor on wound healing of rat palatal mucosa. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 62: 73-80.
81. Odze RD, Marcial MA, Antonioli D. Gastric fundic gland polyps: a morphological study including mucin histochemistry, stereometry, and MIB-1 immunohistochemistry. *Hum Pathol*. 1996; 27: 896-903.
82. Ophof R, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM, Von Den Hoff JW. Evaluation of a collagen-glycosaminoglycan dermal substitute in the dog palate. *Tissue Eng*. 2007; 13: 2689-98.
83. Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 5672-7.
84. Panunto-Castelo A, Souza MA, Roque-Barreira MC, Silva JS. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. *Glycobiology*. 2001; 11: 1035-42.

85. Parkar MH, Kuru L, Giouzei M, Olsen I. Expression of growth-factor receptors in normal and regenerating human periodontal cells. *Arch Oral Biol.* 2001; 46: 275-84.
86. Pereira-da-Silva G, Roque-Barreira MC, Van Damme EJ. Artin M: a rational substitution for the names artocarpin and KM+. *Immunol Lett.* 2008; 119: 114-5.
87. Peumans WJ, Van Damme EJ, Barre A, Rouge P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 491: 27-54.
88. Pini Prato GP, Cortellini P, Agudio G, Clauser C. Human fibrin glue versus sutures in periodontal surgery. *J Periodontol.* 1987; 58: 426-31.
89. Reiser GM, Bruno JF, Mahan PE, Larkin LH. The subepithelial connective tissue graft palatal donor site: anatomic considerations for surgeons. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1996; 16: 130-7.
90. Rhett JM, Ghatnekar GS, Palatinus JA, O'Quinn M, Yost MJ, Gourdie RG. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. *Trends Biotechnol.* 2008; 26: 173-80.
91. Rosa JC, De Oliveira PS, Garratt R, Beltramini L, Resing K, Roque-Barreira MC, et al. KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. *Protein Sci.* 1999; 8: 13-24.
92. Rozman P, Bolta Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2007; 16: 156-65.
93. Santos-de-Oliveira R, Dias-Baruffi M, Thomaz SM, Beltramini LM, Roque-Barreira MC. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J Immunol.* 1994; 153: 1798-807.
94. Saroff SA, Chasens AI, Eisen SF, Levey SH. Free soft tissue autografts. Hemostasis and protection of the palatal donor site with a microfibrillar collagen preparation. *J Periodontol.* 1982; 53: 425-8.

95. Schmidt C, Fronza M, Goettert M, Geller F, Luik S, Flores EM, et al. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *J Ethnopharmacol.* 2009; 122: 523-32.
96. Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Rodel F, Amann K, Radespiel-Troger M, Grabenbauer GG. Improved free vascular graft survival in an irradiated surgical site following topical application of rVEGF. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003; 57: 803-12.
97. Sharon N, Lis H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am.* 1993; 268: 82-9.
98. Sharon N, Lis H. Lectins--proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. *Essays Biochem.* 1995; 30: 59-75.
99. Shetty BS, Udupa SL, Udupa AL, Somayaji SN. Effect of *Centella asiatica* L (Umbelliferae) on normal and dexamethasone-suppressed wound healing in Wistar Albino rats. *Int J Low Extrem Wounds.* 2006; 5: 137-43.
100. Silva-Lucca RA, Tabak M, Nascimento OR, Roque-Barreira MC, Beltramini LM. Structural and thermodynamic studies of KM+, a d-mannose binding lectin from *Artocarpus integrifolia* seeds. *Biophys Chem.* 1999; 79: 81-93.
101. Teixeira CR, Cavassani KA, Gomes RB, Teixeira MJ, Roque-Barreira MC, Cavada BS, et al. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. *Vaccine.* 2006; 24: 3001-8.
102. Thomas DW, O'Neill ID, Harding KG, Shepherd JP. Cutaneous wound healing: a current perspective. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995; 53: 442-7.
103. Toledo KA, Schwartz C, Oliveira AF, Conrado MC, Bernardes ES, Fernandes LC, et al. Neutrophil activation induced by ArtinM: release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. *Immunol Lett.* 2009; 123: 14-20.
104. Toriseva M, Kahari VM. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66: 203-24.

105. Tramontina VA, Machado MA, Nogueira Filho Gda R, Kim SH, Vizzioli MR, Toledo S. Effect of bismuth subgallate (local hemostatic agent) on wound healing in rats. Histological and histometric findings. *Braz Dent J.* 2002; 13: 11-6.
106. Villiger PM, Kusari AB, ten Dijke P, Lotz M. IL-1 beta and IL-6 selectively induce transforming growth factor-beta isoforms in human articular chondrocytes. *J Immunol.* 1993; 151: 3337-44.
107. Weibel ER. Selection of the best method in stereology. *J Microsc.* 1974; 100: 261-9.
108. Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J.* 2006; 20: 2366-8.
109. Wrana JL, Attisano L. The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000; 11: 5-13.
110. Zhang F, Lei MP, Oswald TM, Pang Y, Blain B, Cai ZW, et al. The effect of vascular endothelial growth factor on the healing of ischaemic skin wounds. *Br J Plast Surg.* 2003; 56: 334-41.

Apêndice

7 APÊNDICE

7.1 APÊNDICE A

METODOLOGIA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara, processo: 26/2005 e 24/2008 (Anexos 1 e 2).

7.1.1 Obtenção da lectina Artin M

Preparações de Artin M isolada de *Artocarpus heterophyllus* foram obtidas de acordo com procedimento descrito por Santos-de-Oliveira e colaboradores⁹³ e Da Silva et al.,²². Essas preparações foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

7.1.2 CAPÍTULO 1 – Lectin Artin M improves wound healing in palatal mucosa in dogs

Neste estudo foram utilizados 20 cães de raça indefinida com idade média de 2 anos, sendo 4 cães por período de análise. Os animais receberam cuidados prévios (complementação alimentar, vacinação e vermífugos) até apresentarem boas condições gerais para o início da pesquisa. Quanto às condições bucais, apresentaram dentição permanente superior completa e ausência de perda óssea e de sinais clínicos de doença periodontal. Eles foram mantidos separados em baias do canil da Faculdade de Odontologia de Araraquara no Campus da UNESP.

Antes de cada intervenção, os animais permaneceram em jejum por 12 horas, sendo então pesados e sedados com um pré-anestésico, cloridrato de levomepromazina (Neozine, Aventis Pharma LTDA, Santo Amaro, SP) via intramuscular (2 mL/10 Kg), anestesiados, via endovenosa com tiobarbiturato de

sódio (Thiopental Sódico® ABBOTT Laboratórios do Brasil, São Paulo, SP) na concentração de 25 mg/mL e na proporção de 0,5 mL/Kg (12,5 mg/Kg), e mantidos sob hidratação endovenosa com solução fisiológica a 0,9% durante todo o ato operatório.

A parte experimental clínica foi composta de seguintes etapas: Criação da lesão, determinação aleatória do tratamento; sacrifício; análise clínica, obtenção da biópsia para a realização das análises histológica, imuno-histoquímica e imunológica.

7.1.2.1 Criação da lesão

Inicialmente, todos os animais receberam adequação da condição bucal que consistiu em raspagem supragengival manual para a remoção de cálculo dentário, alisamento e polimento de toda dentição. Após uma semana foi realizada uma moldagem da arcada superior com silicone de condensação (Xantopren® & Optosil®, Heraeus Kulzer South America, São Paulo, SP, Brazil) para obtenção de modelo de gesso e confecção da placa acrílica individual.

Na placa acrílica foram realizadas três perfurações com o uso de um bisturi circular (*punch*) de 6,0 mm de diâmetro na região adjacente ao primeiro e segundo pré-molares, mantendo uma distancia de 10 mm entre as perfurações com objetivo de orientar e padronizar o local da lesão durante os procedimentos cirúrgicos.

No dia 0 (baseline), os animais foram posicionados em decúbito dorsal para o acesso a mucosa palatina, Posicionada a placa acrílica o bisturi foi introduzido até ser sentida a resistência do osso palatino subjacente, na região anterior do palato (Figura 1). Em seguida, a porção de tecido incisada foi descolada e removida com auxílio de uma pinça (baseline). As lesões foram distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais de acordo com o tratamento:

- C. Grupo Controle (n=20): sem tratamento;
- A. Grupo Artin M (n=20): Artin M a 0,001% em carboximetilcelulose a 3%;
- V. Grupo Veículo (n=20): carboximetilcelulose a 3%.

Em seguida, cada lesão recebeu o tratamento indicado de acordo com os grupos experimentais determinados previamente: grupo C sem tratamento,

grupo A preenchida com o gel de Artin M e grupo V preenchida com gel de carboximetilcelulose. Foi realizado o rodízio no tratamento das lesões, assim cada animal recebeu todos os três tratamentos no palato. A lesão foi protegida com uma fita adesiva médica para áreas de difícil estabilização - Transpore (3M, USA), sendo esta fita suturada na mucosa palatina com fio de seda 4.0, (Johnson&Johnson,USA), tendo o propósito de minimizar a ação dos alimentos sobre a ferida e promover a manutenção do material aplicado ou do coágulo no interior da lesão.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam aplicação de protetor hepático (10mL por via endovenosa), associação dos antibióticos penicilina e estreptomicina (24.000 UI/kg, 0,1mL/kg por via intramuscular) e analgésico cetoprofeno a 1 (2mg/kg por via intramuscular). Nos dois primeiros dias seguintes pós-cirúrgicos os animais receberam dose adicionais de analgésicos (mesma dose inicial). Os animais receberam dieta pastosa durante uma semana e depois foram alimentados com ração seca.

Os períodos de biópsias foram nos dias 2, 4, 7, 15 e 21 a partir do baseline. A cada período experimental foram sacrificados 4 cães.

7.1.2.2 Análise Clínica

O padrão de reparação da ferida e restauração do epitélio de cada lesão foi avaliado visualmente através de fotografia obtida em cada período experimental, antes do sacrifício. A avaliação clínica da reparação da ferida foi baseada numa escala de escores estabelecida de 0 a 4, de acordo com o preenchimento da ferida com ~~em~~ reepitelização, sendo índice 0 lesão completamente aberta sem preenchimento, índice 1 lesão parcialmente preenchida por tecido de granulação, índice 2 lesão totalmente preenchida sem reepitelização, índice 3 lesão totalmente preenchida e reepitelizada parcialmente e índice 4 lesão totalmente preenchida e reepitelizada.

Cada lesão em cada animal recebeu um índice, posteriormente agrupado de acordo com o tratamento recebido. Os valores foram transformados em

porcentagem de cada índice para cada período. Todas as imagens foram examinadas por um examinador treinado e cego para os grupos experimentais.

7.1.2.3 Obtenção da biópsia

Para a obtenção da biópsia, a placa acrílica foi posicionada para orientar o local a ser incisado. O bisturi foi introduzido até ser sentida a resistência do osso palatino e o tecido mole foi excisado. O tecido removido foi dividido ao meio, sendo que uma das metades foi colocada num recipiente com formol 10% por 48 horas para fixação e posterior processamento histológico. A outra metade foi armazenada a -80°C para análise por teste imunológico.

7.1.2.4 Análise Histológica

O processamento das peças, desde a desidratação até o banho em parafina, foi realizado em uma processadora automática. Essa fase consistiu de desidratação das peças usando álcool 70% durante 1 hora, álcool 90% por 1 hora e álcool absoluto por 20 horas. Após o processo de desidratação, as peças ficaram em solução de álcool-xilol a 50% por 30 minutos, passando para o processo de diafanização em xilol por 5 horas. Logo após, foram colocadas em solução de parafina a 60°C por 18 horas, com uma troca de solução no meio deste período. Finalmente, as peças foram incluídas em forma de bloco com a utilização de uma inclusora semi-automática.

Após a inclusão, foram obtidos cortes seriados de 4 e 5µm de espessura no sentido longitudinal, em um micrótomo (Jung Supercut 2065 Leica, Chicago, IL, USA), para análise histológica e imuno-histoquímica. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Masson para análises.

A determinação da densidade volumétrica de fibroblastos (Vf) foi estimada de acordo com os princípios de Weibel (WEibel). A quantificação foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz (Carl Zeiss, Sao Paulo, Brazil), utilizando a técnica de imersão (aumento x100). Foram contados 25 pontos coincidentes sobre as estruturas histológicas que foram projetados através do uso Microvid system (Cambridge Instruments, Buffalo, New York, USA) o qual foi

acoplado ao microscópio. Para cada animal 5 secções foram selecionadas e quantificadas. VF foi expressa em porcentagem do total de pontos contados.

7.1.2.5 Análise imuno-histoquímica – Imunolocalização de PCNA.

O processamento para a imuno-histoquímica foi semelhante ao realizado no estudo 1.

Para detecção e localização da expressão de PCNA foi utilizado o método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) com a utilização do kit LSAB (DAKO, Glostrup, Dinamarca) segundo as instruções do fabricante. A recuperação do antígeno foi realizada utilizando de tripsina 0,05% (Sigma) por 20 minutos a 37° C. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio 3% em metanol, com duas trocas de 15 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS três vezes e o bloqueio de ligações não específicas foi realizado BSA 3% por 30 min. Para identificação antigênica foi utilizado anticorpo primário Anti-PCNA (MAB4078, Millipore, Billerica, MA, USA, 1:100). A incubação com o anticorpo primário foi feita *overnight* em câmara úmida à temperatura ambiente. Como controle negativo, o anticorpo primário foi omitido. Depois de repetidas lavagens das peças em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado e pronto para uso (LSAB-DAKO) por 30 minutos, seguido de incubação por 30 minutos com o complexo Streptavidina-Biotina-Peroxidase (LSAB-DAKO), em câmara úmida, à temperatura ambiente. Os cortes foram novamente lavados por repetidas trocas de PBS, revelados com solução de diaminobenzidina/peróxido de hidrogênio (DAB-DAKO) e contra-corados com Hematoxilina de Carrazi por 30 segundos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas e montadas em Permount.

Após a captura de imagens correspondentes à região central e bordas das lesões, a quantificação foi feita com auxílio de um microscópio de luz (Diaster Cambridge instruments) em aumento de 200x. Um total de 3 cortes foi avaliado por amostra, com auxílio de uma grade confeccionada em software de imagem delimitando uma área de 500 μm^2 cada corte. As células coradas positivamente

foram identificadas e contadas. Todas as análises foram realizadas 3 vezes por um examinador cego.

7.1.2.6 Atividade de mieloperoxidase (MPO)

O acúmulo de neutrófilos das lesões tratadas foi avaliado através da atividade de MPO. Inicialmente, as amostras de tecido armazenadas no freezer -80°C foi descongelada e homogeneizada em 1 mL de PBS. Em seguida, centrifugadas a 3000rpm a 4°C por 15 min. O material foi resuspendido em 500 uL da solução contendo 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma-Aldrich co, St. Louis, MO, USA) em 50 mM tampão de fosfato de potássio, pH 6.0. Após a centrifugação a 3000rpm a 4°C por 15 min, 50 ul do sobrenadante de cada amostra, 50 uL de tetrametilbenzidina (BD Bioscience, NJ, USA) em dimethylsulfoxide e 25 uL de H₂O₂ a 3% foram colocadas numa placa de 96 poços e incubados por 5min a 37°C. Após a adição de 25uL de H₂SO₄ a densidade óptica foi mensurada num comprimento de onda de 540 nm e o valor médio das leituras proporcionadas por cada amostra foi comparado a uma curva padrão da atividade de MPO obtida a partir de um número conhecido de neutrófilos do sangue periférico coletado dos animais. A atividade de MPO foi correspondente ao número de neutrófilos por mg de tecido.

7.1.3 CAPÍTULO 2 - Stimulation of TGF- β and VEGF expression by lectin Artin M accelerates wound healing in rat oral mucosa.

Neste estudo foram utilizados 72 ratos Wistar, adultos, machos e com peso inicial de aproximadamente de 300g, mantidos em gaiolas apropriadas, separados de acordo com o grupo experimental, em sala com temperatura ambiente controlada, com ciclos de luz-escuro de 12 horas e alimentados com ração normal e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais:

C. Grupo Controle (n=24): sem tratamento;

A. Grupo Artin M (n=24): Artin M a 0,001% em carboximetilcelulose a 3%;

V. Grupo Veículo (n=24): carboximetilcelulose a 3%.

A etapa experimental clínica constituiu nos seguintes procedimentos: Determinação aleatória dos grupos de tratamento; criação da ferida e tratamento de acordo com o grupo (baseline), sacrifício e obtenção de biópsia para análises: histológica, imuno-histoquímica e imunológica.

7.1.3.1 Criação da lesão e tratamento

No baseline (dia 0), após anestesia geral, obtida com injeção intraperitoneal de 0,08 mL/100 g por peso corporal de Ketamina e 0,04 mL/100 g por peso corporal de cloridrato de xilazina, os animais foram posicionados em decúbito dorsal para obtenção de acesso a mucosa palatina, onde foi realizada uma perfuração padronizada pela utilização de um bisturi circular (*punch*) de 3,0 mm de diâmetro. O bisturi foi introduzido até ser sentida a resistência do osso palatino subjacente, na região anterior do palato (Figura 1). Em seguida, a porção de tecido mole incisada foi descolada e removida com auxílio de uma pinça (baseline).

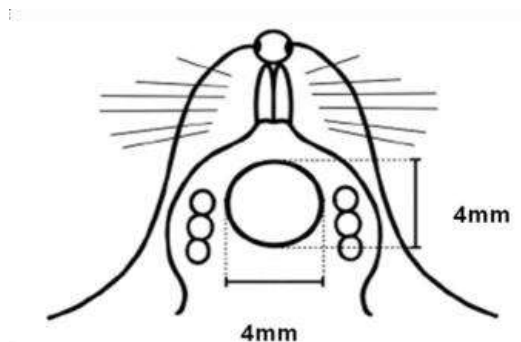


Figura 1. Esquema e foto após a criação da ferida na mucosa palatina do rato.

Após sorteio e quando indicado, de acordo com os grupos experimentais, a ferida foi preenchida com o produto (Artin M ou veículo) até as bordas da incisão. Em seguida, a ferida foi protegida com uma fita adesiva médica para áreas de difícil estabilização - Transpore (3M, USA), sendo esta fita suturada na mucosa palatina com fio de nylon 6.0, (Ethicon, Johnson & Johnson, USA), tendo o propósito de minimizar a ação dos alimentos sobre a ferida e promover a manutenção do material aplicado ou do coágulo no interior da lesão.

7.1.3.2 Sacrifício e obtenção de biópsias

Os períodos de biópsia foram nos dias 3, 5, 7, a partir do baseline. A cada período foram sacrificados oito ratos de cada grupo. O palato biopsiado foi dividido ao meio (Fig. 2), sendo que uma das metades foi armazenada a -80°C para análise por testes imunológicos. A outra metade foi colocada num recipiente com paraformaldeído neutro a 4% por 24 horas para fixação e posterior processamento histológico.

O processamento histológico das peças foi semelhante ao realizado no estudo 1.

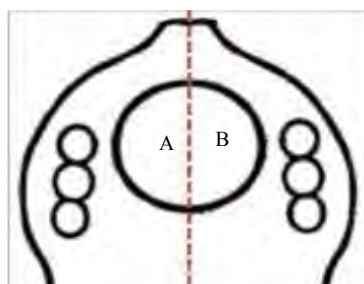


Figura 2. Esquema e foto do palato biopsiado e dividido em 2 hemimaxilas para análises posteriores.

7.1.3.3 Análise Histológica

Cortes representativos de cada animal foram corados com Hematoxilina e Eosina (H/E), Tricrômico de Masson. Para a avaliação das características histológicas das feridas na mucosa palatina dos ratos, foram utilizados métodos descritos a seguir:

Análise descritiva foi realizada por um patologista cego aos grupos sob análise. Para esta análise foram levadas em consideração três regiões distintas conforme o esquema na Figura 3. Esta separação por regiões facilitou a descrição, uma vez que as características dos tecidos em reparação nas bordas são diferentes da região central. Portanto, isto permitiu uma comparação entre as observações nos diferentes grupos e períodos.

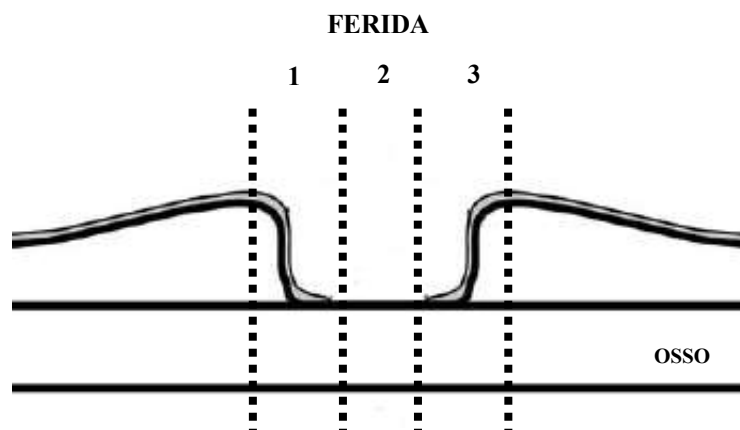


Figura 3. Esquema da divisão dos cortes para a análise histológica. Regiões 1 e 3 correspondem às bordas da ferida e região 2, ao centro da ferida.

Posteriormente, a técnica estereométrica de contagem de pontos foi empregada nos cortes corados com H/E para avaliar a proporção de componentes teciduais em um plano bidimensional. Após a captura de imagens correspondentes à região central e bordas das lesões, a quantificação foi feita com auxílio de um microscópio de luz (LEICA microsystem GmbH, Wetzlar, Germany) em aumento de 200x. Foi determinada a densidade volumétrica relativa ou proporção dos seguintes componentes teciduais: fibroblastos (células fusiformes ou estreladas), células inflamatórias e vasos sanguíneos. Portanto, as células inflamatórias foram contadas sem uma diferenciação/identificação do tipo celular específico. Um total de 3 cortes foi avaliado por amostra, com auxílio de uma grade confeccionada em *software* de imagem com a dimensão de 500 μm^2 de área, com 50 pontos de intersecção. A grade foi posicionada sobrepondo as regiões de interesse nas imagens dos cortes histológicos e as estruturas histológicas coincidentes com os 50 pontos de intersecção da grade foram identificadas e contadas, conforme descrito por Odze et al.⁸¹. Todas as análises foram realizadas 3 vezes por um examinador cego.

7.1.3.4 Análise de Mastócitos

Cortes representativos de cada animal foram corados com solução de azul de toluidina 0,1% pH 2.8 para a marcação dos mastócitos, os quais foram identificados pela metacromasia. Após a captura de imagens correspondentes à região central e bordas das lesões, a quantidade de mastócitos presentes foi determinada com auxílio de um microscópio de luz (LEICA microsystem GmbH, Wetzlar, Germany) em aumento de 200x. Um total de 3 cortes foi avaliado por amostra, com auxílio de uma grade confeccionada em software de imagem delimitando uma área de 500 μm^2 cada corte. As células coradas positivamente foram identificadas e contadas. Todas as análises foram realizadas 3 vezes por um examinador cego.

7.1.3.5 Análise imuno-histoquímica – Imunolocalização de bFGF, PCNA, TGF- β e VEGF.

O processamento para a imuno-histoquímica foi semelhante ao realizado no estudo 1.

Para detecção e localização da expressão de bFGF, PCNA, TGF- β e VEGF foi utilizado o método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) com a utilização do kit LSAB (DAKO, Glostrup, Dinamarca) segundo as instruções do fabricante. A recuperação do antígeno foi realizada utilizando de tripsina 0,05% (Sigma) por 20 minutos a 37° C. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio 3% em metanol, com duas trocas de 15 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS três vezes e o bloqueio de ligações não específicas foi realizado BSA 3% por 30 min. Para identificação antigênica foi utilizados Anticorpos primários anti-bFGF (FGF basic Polyclonal Antibody, Abcam, Uk, 1:100) Anti PCNA (PCNA, PC-10; Antibody, Abcam, Uk, 1:1500), Anti-TGF- β (TGF beta 3 Monoclonal Antibody, Abcam, UK, 1: 200) e Anti-VEGF (VEGF Policlonal antibody, Abcam, UK, 1:250). A incubação com o anticorpo primário foi feita *overnight* em câmara úmida à temperatura ambiente. Como controle negativo, o anticorpo primário foi omitido. Depois de repetidas lavagens das peças em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado e pronto para uso

(LSAB-DAKO) por 30 minutos, seguido de incubação por 30 minutos com o complexo Streptavidina-Biotina-Peroxidase (LSAB-DAKO), em câmara úmida, à temperatura ambiente. Os cortes foram novamente lavados por repetidas trocas de PBS, revelados com solução de diaminobenzidina/peróxido de hidrogênio (DAB-DAKO) e contra-corados com Hematoxilina de Carrazi por 30 segundos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas e montadas em Permount.

Após a captura de imagens correspondentes à região central e bordas das lesões, a quantificação foi feita com auxílio de um microscópio de luz (Diater Cambridge instruments) em aumento de 200x. Um total de 3 cortes foi avaliado por amostra, com auxílio de uma grade confeccionada em software de imagem delimitando uma área de 500 μm^2 cada corte. As células coradas positivamente foram identificadas e contadas. Todas as análises foram realizadas 3 vezes por um examinador cego.

7.1.3.6 Análises de expressão de fatores de crescimento VEGF e TGF- β e citocinas IL-1, TNF α , IL-6 Análise protéica por *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Para estas análises, foi coletada uma hemimaxila (B) de cada lesão. Logo após a coleta, as amostras de tecido foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C , para posterior análise. Em seguida As biópsias de tecido do palato (B2) foram descongeladas e homogenizadas em 50uL da solução contendo T-per (T-PER[®], PIERCE, IL, USA), inibidor de protease (Halt[™] Protease Inhibitor Cocktail Kit, PIERCE, USA). As amostras foram centrifugadas a 1300rpm a 4°C por 5min e o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C . A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford utilizando Kit comercial (BioRad kit, Hercules, CA).

A análise quantitativa da expressão das proteínas alvos foi realizada através do uso de kits ELISA comercialmente disponíveis: IL-1 (Rat IL-1 ELISA kit, Invitrogen, USA), IL-6 (Rat IL-6 ELISA Opteia[™] BD Biosciences

Pharmigen, USA), TNF α (Rat TNF α ELISAOpteia™ BD Biosciences Pharmigen, USA), TGF- β (Human TGF- β ELISAOpteia™ BD Biosciences Pharmigen, USA) e VEGF (Rat VEGF ELISA kit, Invitrogen, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A densidade óptica foi mensurada num comprimento de onda de 450 nm e o valor médio das leituras proporcionadas por cada amostra foi comparado ao valor médio proporcionado pelo controle negativo.

7.1.4 Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram avaliados utilizando-se GraphPad software 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

As comparações entre cada grupo em diferentes períodos de observação foram analisadas por teste ANOVA seguido de teste de Tukey para determinar presença de diferenças significantes de grupos para todas as análises. Em todos os procedimentos, foi adotado um nível de significância de 5% para a tomada da decisão quanto à validade da hipótese testada.

Anexos

8.1 ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Odontologia
Campus de Araraquara

Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA

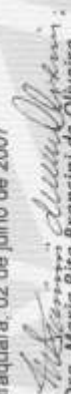
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nr. 26/2005 referente à pesquisa "*Uso do gel de KM+ e guaçatonga em áreas doadoras de enxerto epitelial. Análise clínica e histológica em cães*" sob a responsabilidade de *Rosemary Adriana Chierici Marcantonio e Vanessa Camila da Silva* está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP em reunião de 02/julho/2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol 26/2005 referring to the research "*KM+ gel and guaçatonga in epithelial graft donors regions. Clinical and histological analysis in dogs*" under responsibility of *Rosemary Adriana Chierici Marcantonio and Vanessa Camila da Silva* is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Araraquara Dental School-UNESP Ethical Committee for Animal Research (CEEA) in July 02, 2007.

Araraquara, 02 de julho de 2007


Prof. Dra. Maria Rita Brancini de Oliveira
Coordenadora do CEEA/FOAR/UNESP

8.2 ANEXO 2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEEA nº 24/2008

Araraquara, 27 de abril de 2009

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 17/04/2009, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Avaliação do efeito da artin M no processo de reparação em mucosa mastigatória. Estudo in vitro e in vivo" (Proc. CEEA nº 24/2008) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a aprovação vinculada à apresentação do RELATÓRIO FINAL (ABRIL/2011).

Atenciosamente.

Profa. Dra. ELENY BALDUCCI ROSLINDO
Coordenadora do CEEA

Ao
Prof. Dr. JONI AUGUSTO CIRELLI
Pesquisador Responsável
a/c Yeon Jung Kim
Nesta

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 18 de novembro de 2011.

YEON JUNG KIM