



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**JOÃO VICTOR DA SILVA BEZERRA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UMA LECTINA ISOLADA DE OVOS DO  
GASTRÓPODE MARINHO *Aplysia dactylomela* NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS  
INDUZIDAS CIRURGICAMENTE EM CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA**

**2021**

JOÃO VICTOR DA SILVA BEZERRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UMA LECTINA ISOLADA DE OVOS DO GASTRÓPODE  
MARINHO *Aplysia dactylomela* NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS INDUZIDAS  
CIRURGICAMENTE EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Patologia. Área de concentração: Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.  
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Nascimento Neto.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

B469a Bezerra, João Victor da Silva.  
AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UMA LECTINA ISOLADA DE OVOS DO GASTRÓPODE MARINHO  
*Aplysia dactylomela* NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS INDUZIDAS CIRURGICAMENTE EM  
CAMUNDONGOS / João Victor da Silva Bezerra. – 2021.  
56 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.

Coorientação: Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Nascimento Neto.

1. Cicatrização. 2. Lectina de gastrópode. 3. *Aplysia dactylomela*. I. Título.

CDD 571.9

---

JOÃO VICTOR DA SILVA BEZERRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UMA LECTINA ISOLADA DE OVOS DO GASTRÓPODE  
MARINHO *Aplysia dactylomela* NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS INDUZIDAS  
CIRURGICAMENTE EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Patologia. Área de concentração: Medicina.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Nascimento Neto (Coorientador)  
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

---

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos  
Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me proteger, pelo fortalecimento nos dias difíceis, e pelo dom da vida.

Aos meus pais, Francisco de Assis e Magna Maria, por tudo que eles tem feito por mim e pelo incentivo, carinho e atenção.

Ao Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira e ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Nascimento Neto pela orientação na realização deste trabalho.

Aos professores participantes da banca examinadora da defesa, Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira, Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Nascimento Neto, Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz e o Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos pelo tempo e as valiosas colaborações e sugestões.

À coordenação do Mestrado em Patologia, em especial à Valéria Oliveira e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Cunha Frota.

Aos mestres e doutores do grupo LIBS, pela contribuição com seus conhecimentos e pela convivência tão agradável.

Às técnicas Kélvia Miranda Sá e Susana Moreira de Souza pela auxílio e contribuição técnica na execução deste trabalho.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

A ajuda da doutoranda Aryane de Azevedo Pinheiro, por me ajudar na execução desse trabalho e suas contribuições.

A todas as demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração desta pesquisa.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

## RESUMO

As feridas resultam do rompimento da pele associado a efeitos danosos na estrutura que integra a matriz extracelular. Uma vez danificada, a pele perde suas funções podendo comprometer a saúde física e mental das pessoas, podendo inclusive levar a morte. Centenas de compostos bioativos já foi prospectado a partir de invertebrados. Dentre esses compostos estão as lectinas, proteínas que reconhecem e ligam carboidratos específicos podendo ser encontrados nas superfícies das células, desempenhando um importante papel na interação e comunicação celular. O presente estudo avaliou o efeito citotóxico e cicatrizante da lectina isolada de ovos do gastrópode marinho *Aplysia dactylomela* (ADEL) em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Com intuito de avaliar a citotoxicidade de ADEL sobre fibroblastos murinos (L929) e queratinócitos humanos (HaCat) realizou-se o ensaio de viabilidade celular por MTS. O modelo animal zebrafish (*Danio rerio*) adulto foi utilizado para avaliação da toxicidade aguda e do efeito sobre a atividade locomotora. Para análise da atividade pró-cicatrizante, feridas cirúrgicas de 6 mm de diâmetro foram induzidas na região dorsal de camundongos Swiss (n= 60) que foram tratados com aplicação tópica diária de 100 µL de acordo com o grupo teste ( ADEL 125 µg/mL; dADEL 125 µg/mL; BSA 125 µg/mL; NaCl 150mM; Vitamina C 125 µg/mL) durante 12 dias. As feridas foram avaliadas levando-se em consideração os seguintes parâmetros, edema, hiperemia, exsudação, presença de crosta e sangramento. Além disso, para análise microscópica, amostras de tecido correspondentes à área da lesão experimental no 3º, 7º e 12º dias pós-operatórios foram biopsiadas. Os resultados citotóxicos obtidos mostraram que os fibroblastos tratados com ADEL nos tempos 24h, 48h e 72h mantiveram-se com viabilidade acima de 80% em todas as concentrações testadas (7,8 – 500 µg/mL), o mesmo foi observado para os queratinócitos. Na atividade locomotora do zebrafish exposto às concentrações de 125 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL de ADEL, também não foi verificado toxicidade aguda em nenhuma das doses testadas por até 96h após a exposição à ADEL em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). As feridas cutâneas tratadas com ADEL mostraram sinais clínicos como hiperemia, edema e exsudado mais discretos, com total reepitelização no 12º pós-operatório, o mesmo foi observado nos demais grupos experimentais. No P.O 12, os grupos tratados com ADEL e dADEL apresentaram as camadas da pele bem estruturadas e adequadas, contudo o grupo dADEL com maior tração. Em conclusão, ADEL contribuiu para a cicatrização mais precoce, sem apresentar efeitos citotóxicos, com discreta ação sobre o reparo tecidual.

**Palavras-chave:** Cicatrização. Lectina de gastrópode. *Aplysia dactylomela*.

## ABSTRACT

The wounds result from the rupture of the skin associated with damaging effects on the structure that integrates the extracellular matrix. Once damaged, the skin loses its functions and can compromise people's physical and mental health, and can even lead to death. Hundreds of bioactive compounds have already prospected from invertebrates. Among these compounds are lectins, proteins that recognize and bind specific carbohydrates and can be found on cell surfaces, playing an important role in cell interaction and communication. The present study evaluated the cytotoxic and healing effect of lectin isolated from eggs of the marine gastropod *Aplysia dactylomela* (ADEL) in experimental models *in vitro* and *in vivo*. In order to evaluate the cytotoxicity of ADEL on murine fibroblasts (L929) and human keratinocytes (HaCat), the cell viability assay was performed by MTS. The adult zebrafish animal model (*Danio rerio*) was used to assess acute toxicity and the effect on locomotor activity. For analysis of pro-healing activity, surgical wounds of 6 mm in diameter were induced in the dorsal region of Swiss mice (n = 60) that were treated with a topical daily application of 100  $\mu$ L according to the test group (ADEL 125  $\mu$ g / mL ; dADEL 125  $\mu$ g / mL; BSA 125  $\mu$ g / mL; NaCl 150mM; Vitamin C 125  $\mu$ g / mL) for 12 days. The wounds were evaluated taking into account the following parameters, edema, hyperemia, exudation, presence of crust and bleeding. In addition, for microscopic analysis, tissue samples corresponding to the area of the experimental lesion on the 3rd, 7th and 12th postoperative days were biopsied. The cytotoxic results obtained showed that fibroblasts treated with ADEL at 24h, 48h and 72h remained viable above 80% in all tested concentrations (7.8 - 500  $\mu$ g / mL), the same was observed for keratinocytes . In the locomotor activity of zebrafish exposed to concentrations of 125  $\mu$ g / mL, 250  $\mu$ g / mL and 500  $\mu$ g / mL of ADEL, neither acute toxicity was verified in any of the doses tested for up to 96 hours after exposure to ADEL in relation to the control ( p <0.05). Skin wounds treated with ADEL showed more discrete clinical signs such as hyperemia, edema, and exudate, with total re-epithelialization in the 12th postoperative period, the same was observed in the other experimental groups. In P.O 12, the groups treated with ADEL and dADEL presented well-structured and adequate skin layers, however the dADEL group with greater traction. In conclusion, ADEL contributed to the earlier healing, without showing cytotoxic effects, with a discreet action on tissue repair.

**Keywords:** Wound healing.Lectin gastropoda.*Aplysia dactylomela*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da pele humana.....	14
Figura 2 – Diferentes fases da cicatrização normal de feridas.....	20
Figura 3 – Estrutura geral da ADEL .....	27
Figura 4 – Distribuição dos grupos de acordo com a solução aplicada.....	34
Figura 5 – Avaliação da atividade hemaglutinante com ADEL nativa (linhas A-C) e dADEL (Linha E).....	37
Figura 6 – Evolução do processo de cicatrização nos grupos experimentais ADEL, dADEL, BSA, NaCl e Vitamina C.....	41
Figura 7 - Análise histológica em HE das feridas tratadas com administração tópica.....	43
Figura 8 - Análise histológica da deposição de colágeno nas feridas tratadas com administração tópica.....	44

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito da ADEL em diversas concentrações sobre a viabilidade celular de fibroblastos (L929).....	38
Gráfico 2 – Efeito da ADEL sobre HaCat no ensaio de viabilidade celular.....	38
Gráfico 3 – Efeito da ADEL sob a atividade locomotora do zebrafish no Teste de Campo Aberto.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
DRC	Domínio de carboidratos Domínio de Reconhecimento de Carboidrato
GAGs	Glicosaminoglicanos
IL-1	Interleucina 1
MCP-1	Proteína quimiotática-1 dos monócitos
MEC	Matriz extracelular
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3- carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium]
NaCl	Cloreto de sódio
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
P.O	Pós-operatório
PDGF-1	Fator de crescimento derivado de plaqueta-1
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformante - beta
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## LISTA DE SÍMBOLOS

µg	Microgramas
µL	Microlitro
%	Porcentagem
±	Mais ou menos
©	Copyright
®	Marca Registrada

## SUMÁRIO

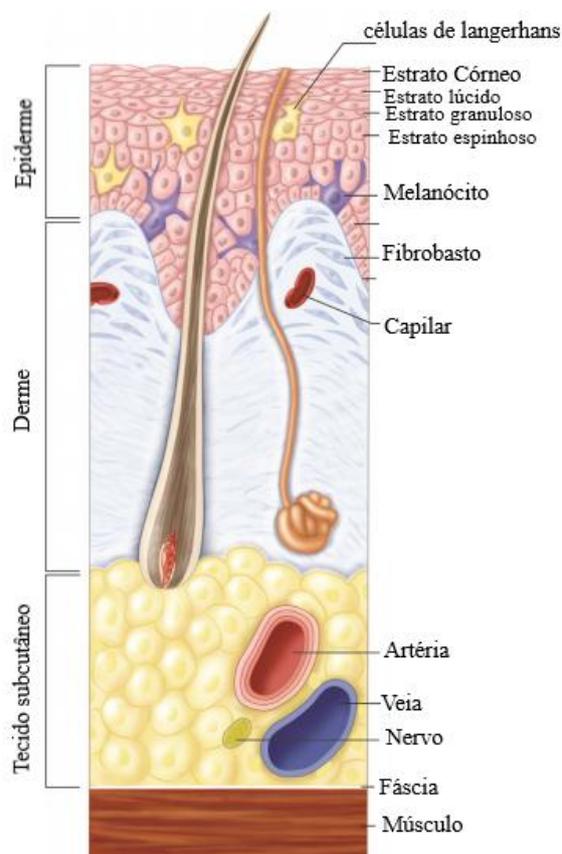
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Matriz extracelular.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2</b>	<b>Fisiologia da cicatrização .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3</b>	<b>Lectinas.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4</b>	<b>Gastrópodes.....</b>	<b>24</b>
<b>1.5</b>	<b>Gastrópodes e cicatrização.....</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Avaliação da atividade hemaglutinante.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>Linhagens celulares e condições de cultura.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3</b>	<b>Análise da citotoxicidade da lectina ADEL sobre as linhagens de fibroblastos e queratinócitos.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4</b>	<b>Teste de toxicidade e atividade locomotora em zebrafish.....</b>	<b>32</b>
<b>3.4.1</b>	<b><i>Atividade locomotora (teste de campo aberto).....</i></b>	<b>33</b>
<b>3.4.2</b>	<b><i>Toxicidade aguda 96h.....</i></b>	<b>33</b>
<b>3.5</b>	<b>Ensaio de Cicatrização.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5.1</b>	<b><i>Animais e grupos experimentais.....</i></b>	<b>34</b>
<b>3.5.2</b>	<b><i>Procedimento operatório.....</i></b>	<b>34</b>
<b>3.5.3</b>	<b><i>Tratamento e avaliação macroscópica da ferida.....</i></b>	<b>35</b>
<b>3.5.4</b>	<b><i>Avaliação Histopatológica .....</i></b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Detecção da atividade hemaglutinante.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>Efeito da ADEL sobre a viabilidade de fibroblastos.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3</b>	<b>Avaliação da atividade locomotora (Teste de campo aberto).....</b>	<b>39</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação da toxicidade aguda.....</b>	<b>40</b>
<b>4.5</b>	<b>Avaliação macroscópica da cicatrização de feridas.....</b>	<b>40</b>
<b>4.6</b>	<b>Histopatologia.....</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pele é a principal barreira entre o ambiente interno e externo do corpo e desempenha um papel fundamental na retenção da água corporal e na prevenção da penetração ou perda de muitas outras moléculas. Além disso, é um componente importante do sistema imunológico, podendo nos defender contra a invasão de microrganismos (WANG *et al.*, 2020). De modo consequente, como órgão externo do corpo humano, o tecido epitelial sofre danos ambientais a agentes como poluição do ar e tabagismo (GU *et al.*, 2020).

Sua estrutura é composta por três regiões principais: epiderme, derme e hipoderme. A primeira camada é a epiderme, a camada mais externa da pele e que cumpre principalmente a função de uma barreira e interface de troca com o exterior com renovação e crescimento constantemente em suas subcamadas, onde as células-tronco no estrato basal se diferenciam em queratinócitos, migram para o exterior e eventualmente decaem como corneócitos, formando o estrato córneo, uma camada queratinizada resistente conforme a figura 1 (PISSARENKO; MEYERS, 2019).

Figura 1 – Representação esquemática da pele humana



Fonte: TEJIRAM *et al.*, 2016 (com adaptações).

Uma vez danificada, a pele perde suas funções e compromete seriamente a saúde física e mental das pessoas, o que leva a graves desafios e graves encargos econômicos. Assim, a cicatrização de feridas invariavelmente tem sido um foco fundamental de pesquisa em todo o campo da medicina (CHI *et al.*, 2020).

Para os seres humanos, o impacto na saúde pode ser minimizado se as lesões na pele puderem se recuperar mais rapidamente. Assim, os pesquisadores estão explorando os métodos para acelerar a cicatrização de feridas na pele. Na medicina moderna, medicamentos direcionados desenvolvidos com base na exploração de mecanismos de cicatrização de feridas reduzem ainda mais os riscos de outras doenças induzidas pelo atraso na cicatrização de feridas na pele (LIU *et al.*, 2020).

As condutas empregadas nas feridas que não cicatrizam continua sendo um desafio para os profissionais de saúde, dispendioso para os sistemas de saúde e, o mais grave, diminui bastante a qualidade de vida dos pacientes. As opções atuais de tratamento disponíveis para feridas crônicas incluem uma ampla gama de curativos, de gaze a substitutos da pele projetados por tecidos, terapia de feridas com pressão negativa, fatores de crescimento e oxigênio hiperbárico. No entanto, essas abordagens aparentemente ainda não resultaram na redução da taxa e da qualidade da cicatrização crônica de feridas, especialmente quando se considera que um grande número de amputações de membros inferiores é precedido por úlceras diabéticas nos pés. Além disso, tornou-se ainda mais crucial melhorar o tratamento de feridas crônicas, devido às tendências demográficas e à crescente prevalência de diabetes em todo o mundo (BARRITAU, 2020).

### **1.1 Matriz extracelular**

A matriz extracelular (MEC) é definida como todos os constituintes extracelulares que combinados fornecem estrutura, função e sinalização para as células e órgãos que a rodeiam. A MEC é composta por uma série de componentes variados, desde moléculas fibrilares que fornecem estrutura a pequenas moléculas que refinam a estrutura até proteínas de membrana que coordenam a sinalização através das células. Por exemplo, o formato da célula é direcionado por ligantes da membrana basal que iniciam cascatas de sinalização distintas (RANDLES *et al.*, 2020).

Os estratos córneos, juntamente com as junções estreitas que selam os queratinócitos vizinhos no estrato granuloso subjacente, formam uma barreira antimicrobiana. As características físicas e químicas do estrato córneo e as junções unidas

evitam a perda de água transepidermica e permitem o controle sobre quais moléculas passam por essa barreira. Elas também oferecem resistência contra a penetração da maioria dos microrganismos, fortalecendo a integridade da barreira. A presença de junções estreitas e a falta de estrato córneo acompanhante no revestimento epitelial dos apêndices cutâneos tornam essas estruturas um provável alvo de colonização microbiana (KWIECIEN *et al.*, 2019).

A epiderme apresenta principalmente uma camada de queratinócitos, mas também contém células não epiteliais, incluindo células de Langerhans, que são células dendríticas residentes que apresentam antígenos, bem como melanócitos e células de Merkel. Dentre suas funções, os queratinócitos proliferam para curar feridas, transportam água e uréia através de aquaporinas, recebem melanina dos melanócitos, controlam a permeabilidade à água e participam da imunidade inata e adaptativa através da secreção de peptídeos antimicrobianos e da presença de células de Langerhans. Os queratinócitos não existem isolados. As vias de sinalização para crescimento e diferenciação da pele através da divisão celular requerem interações moleculares entre várias células (ABDO; SOPKO; MILNER, 2020).

Os queratinócitos têm papéis importantes nos complexos mecanismos subjacentes ao início, manutenção e conclusão do processo de cicatrização de feridas cutâneas. Nos estágios iniciais após a lesão, os queratinócitos começam a migrar, perto da ferida, e liberam uma série de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento que podem estimular não apenas os próprios queratinócitos, mas também outras células inflamatórias e fibroblastos. Em particular, as interações entre queratinócitos e fibroblastos, que ocorrem de forma parácrina por meio de fatores de crescimento, desempenhando um papel extremamente importante na conclusão do fechamento da ferida durante a cicatrização (WOJTOWICZ *et al.*, 2014).

Os queratinócitos também são uma fonte importante de fatores de crescimento angiogênicos, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante ao EGF de ligação à heparina (HB-EGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), todos estimulando a migração de células endoteliais para o local da ferida e contribuindo para a angiogênese. HB-EGF e PDGF também estimulam a proliferação de fibroblastos, diferenciação e produção de matriz extracelular. Durante a cicatrização normal da ferida, o VEGF é abundantemente expresso em queratinócitos na borda da ferida (CUI *et al.*, 2019).

A segunda camada da pele é a derme, localizada entre a epiderme e o tecido subcutâneo ou hipoderme. A camada da derme é dividida em duas regiões, a região da derme papilar que é adjacente à camada da epiderme e uma região mais espessa subjacente, a derme

reticular. A espessura da derme varia de 500 a 2000  $\mu\text{m}$ , dependendo da sua localização no corpo. O limite localizado entre as camadas epidérmicas e dérmicas é chamado junção dermoepidérmica, onde células basais epidérmicas estão ligadas à membrana basal. Essa membrana porosa fornece um espaço para nutrientes e troca de fluidos e atua como um reservatório para moléculas necessárias para vários fins biológicos, como imunidade e cicatrização de feridas (DERVISEVIC *et al.*, 2019).

A derme fornece uma base mais rígida que pode absorver forças mecânicas para impedir o cisalhamento em sua estrutura apresenta uma zona papilar superficial, compreendendo fibras colágenas relativamente finas e uma derme reticular composta por uma camada compacta de fibras de colágeno mais espessa. O tipo celular primário é o fibroblasto, que produz proteínas estruturais extracelulares, glicosaminoglicanos (GAGs), fibras de colágeno e elastina, melhorando a deformabilidade da derme. Entre as células e as fibras está a matriz extracelular, composta principalmente por moléculas de glicosaminoglicano / proteoglicano, que hidratam o tecido devido à alta capacidade de ligação do ácido hialurônico à água (ABDO; SOPKO; MILNER, 2020).

O fibroblasto é o produtor predominante da MEC em todos os órgãos. A MEC é necessária para a manutenção de células e tecidos e para respostas a lesões, e pouca ou muita produção de MEC pode resultar em disfunção grave. Além da abundância, variações na composição e qualidade podem alterar o microambiente da MEC de maneiras dramáticas. O fibroblasto é um tipo de célula chave que está relacionada a quantidade e a qualidade da MEC. Por causa disso, muita atenção tem sido dada aos papéis dos fibroblastos nos distúrbios fibróticos. O termo ativação de fibroblastos é usado para denotar uma resposta de fibroblastos a qualquer estímulo, seja para estímulos imunológicos, alongamento mecânico ou outras causas (DELEON-PENNELL; BARKER; LINDSEY, 2020).

Abaixo da derme, encontra-se a hipoderme, que consiste principalmente de tecido adiposo e vasos sanguíneos. A hipoderme não apenas isola a pele e fornece um reservatório de energia, mas também garante as características mecânicas e termorregulatórias da pele. Profundamente à hipoderme estão a fáscia, os músculos e os ossos, que fornecem suporte mecânico e estrutural para todas as camadas mais superficiais a ela. Juntos, esses componentes formam um ambiente altamente organizado e complexo, para o quais diferentes tipos de células devem se comunicar para reparar e regenerar continuamente a pele durante a homeostase normal e a lesão (STRONG; NEUMEISTER; LEVI, 2017).

A hipoderme é rica em gordura, nervos sensoriais e GAGs e conecta o tecido da pele aos órgãos internos. Essa camada suporta isolamento, tem função de acolchoamento

protetor e armazenamento de energia. Em geral, em diferentes camadas da epiderme, um gradiente de adesão célula-célula específico (por exemplo, junções de oclusão, ancoragem e comunicação) pode ser visto, porque nas camadas superiores, queratinócitos são totalmente conectados no entanto, nas camadas inferiores, há mais espaço entre elas (RAHMATI *et al.*, 2020).

Uma vez que a pele é o maior órgão do nosso corpo, desempenhando a função essencial de proteção dos órgãos internos, fornecendo propriedades de barreira para o ambiente externo e patógenos nocivos, está submetida à ruptura na estrutura, criando assim as lesões, precisando ser reparada e regenerada (CHOUHAN; MANDAL, 2020).

## 1.2 Fisiologia da Cicatrização

David Stocum definiu os termos cicatrização e regeneração. “Cicatrização de feridas (ou reparo de feridas)” significa preencher lacunas no tecido danificado sem restaurar a estrutura original do tecido. Por outro lado, "regeneração" significa eliminação do defeito estrutural via restauração do tecido ou órgão original após um defeito estrutural. Por exemplo, quando um animal não pode restaurar a derme, mas forma uma cicatriz após uma lesão na pele, chamamos esse fenômeno de "cicatrização de feridas na pele". Quando um animal pode restaurar a derme danificada através da formação de novo tecido dérmica, chamamos esse fenômeno de "regeneração da pele" (ABE *et al.*, 2019).

Qualquer ruptura na estrutura anatômica normal e na integridade funcional da pele leva a uma ferida (STRONG; NEUMEISTER; LEVI, 2017). As feridas podem ser clinicamente divididas em feridas agudas e crônicas. Nas feridas agudas a lesão pode ser induzida por diferentes fatores como radiação, mudanças extremas de temperatura ou contato com produtos químicos. Esse tipo de ferida cura espontaneamente em 8 a 12 semanas. Por outro lado, as feridas crônicas geralmente requerem um tempo de cicatrização mais longo (até alguns meses), devido à inflamação prolongada conforme a figura 2. Eles podem ocorrer por várias causas, incluindo tumores, infecções ou agentes físicos (MOEINI *et al.*, 2020).

As feridas resultam do rompimento da pele associado a efeitos danosos na estrutura que integra a matriz extracelular. Diante disto, uma série de processos bioquímicos e fisiológicos ocorrem na tentativa de reestruturar o tecido danificado através da regeneração, que é um processo comum a todos os organismos vivos. Nas feridas agudas o processo de cicatrização geralmente ocorre dentro de oito a 12 semanas após lesão, enquanto feridas crônicas que incluem úlceras diabéticas, de pressão e de estase venosa, são incapazes de

seguir as etapas normais de cura, levando mais de três meses para curar. Essa incapacidade de cura em um período previsível ocorre devido ao local (por exemplo, trauma, infecções, radiação) e a fatores sistêmicos (por exemplo, distúrbios genéticos, diabetes, velhice, hábito de fumar, deficiências de vitaminas) (TEIXEIRA *et al.*, 2020).

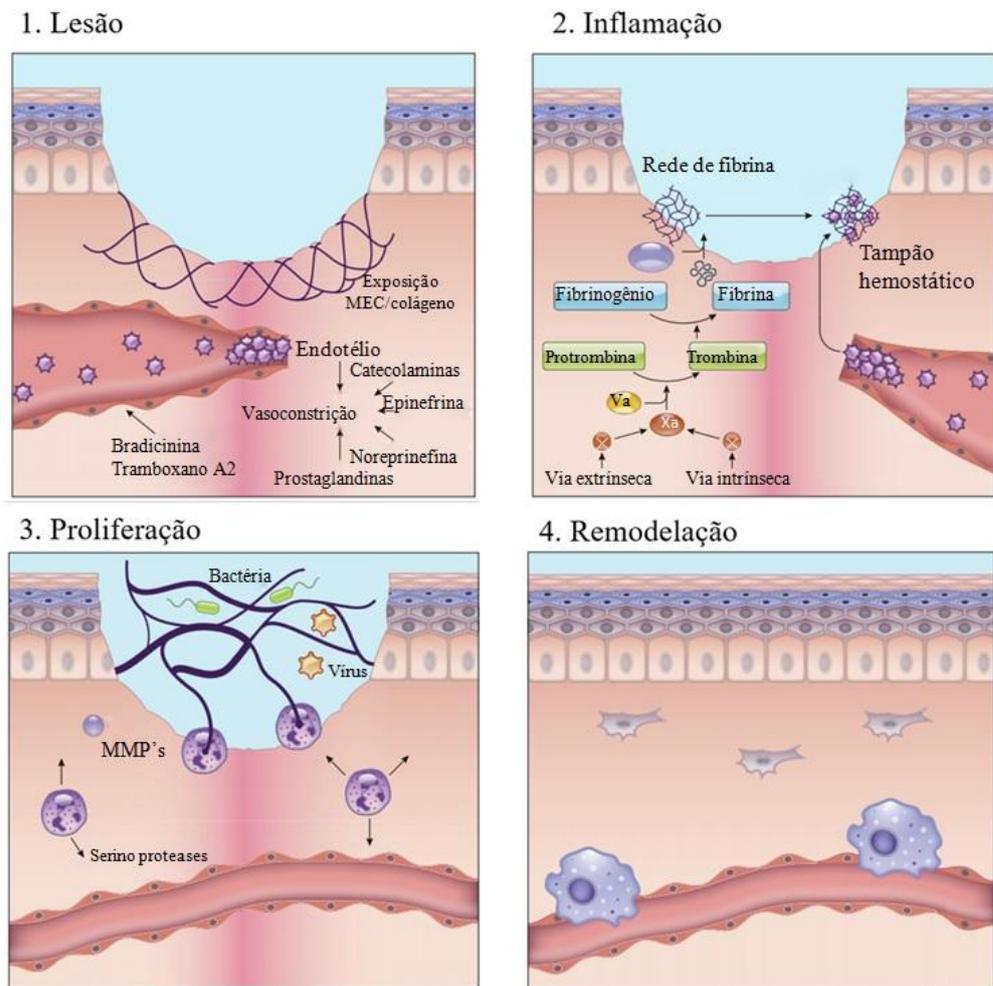
Apesar do tratamento de rotina, as feridas crônicas não conseguem progredir nos estágios normais de cicatrização em tempo hábil. Estima-se que as feridas crônicas comprometam 1 a 2% da população mundial. Essas feridas se tornam cada vez mais dinâmicas, pois podem ser infectadas por vários microrganismos, que levam a vias complexas de cura. Além disso, muitas feridas crônicas têm células senescentes que podem impedir a cicatrização e aumentar o risco de infecção (LI *et al.*, 2020).

Diante do exposto, os cuidados e tratamentos de feridas vêm ganhando importância nos sistemas de saúde pública e privada, onde muitos são os esforços na busca por tratamentos efetivos que acelerem o processo cicatricial (WANG *et al.*, 2018). A cicatrização de feridas é conceituada como um processo complexo em humanos e animais, contendo eventos multifacetários dirigidos por uma sequência de fases que se sobrepõem, incluindo hemostasia/inflamação, proliferação e remodelação, conforme a figura 2 (LINDLEY *et al.*, 2016).

Essas fases são reguladas por moléculas de sinalização produzidas por uma ampla gama de células presentes na matriz extracelular. Vários fatores afetam a cicatrização de feridas, a maioria das feridas crônicas são úlceras associadas à isquemia, estase venosa ou pressão. As medidas terapêuticas usadas para promover e tratar a cicatrização de feridas deve ser ajustado ao estado da fase de cura (KOEPPEN *et al.*, 2020).

A fase de inflamação é caracterizada por aumento da permeabilidade capilar e migração celular para o tecido da ferida. Os neutrófilos são as primeiras células que se infiltram no tecido lesionado para as feridas e liberam proteases para eliminar a matriz extracelular desnaturada. Posteriormente, os monócitos são transformados em macrófagos à medida que entram no local da ferida, regulados pela proteína quimiotática-1 dos monócitos (MCP-1), Fator de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e outras citocinas. Essas células estão associadas não apenas à resposta inflamatória, mas também à resolução do coágulo de fibrina, angiogênese e reepitelização (WANG; XU, 2020).

Figura 2 – Diferentes fases da cicatrização normal de feridas



Fonte: RODRIGUES *et al.*, (2019, com adaptações)

Os neutrófilos são atraídos e presos no tampão de plaquetas em resposta ao fator de crescimento derivado de plaquetas-1 (PDGF-1). Eles são os necrófagos iniciais para o debridamento. Eles servem inicialmente para fagocitar tecido necrótico e partículas bacterianas, além de criar um ambiente na ferida hostil às bactérias, usando espécies reativas de oxigênio. Os neutrófilos também fornecem uma citocina pró-inflamatória, chamada interleucina-1 (IL-1), que tem duplo efeito podendo atuar como citocina pró-inflamatória e como estímulo para a proliferação de queratinócitos. O ambiente local também muda inicialmente, há vasoconstrição grave secundária e a liberação de catecolaminas. Esta vasoconstrição diminui logo após e ocorre vasodilatação subsequente em resposta à liberação de histamina dos mastócitos circulantes (CHILDS; MURTHY, 2017).

Conforme a fase inflamatória progride, os macrófagos tornam-se o tipo de célula dominante dentro de 24 a 72 horas. Seu papel na orquestração da cicatrização de feridas é

fundamental e muda conforme a cicatrização da ferida progride. É amplamente aceito que os macrófagos desempenham um papel central e sua resposta é a chave para estabelecer a homeostase dentro da ferida e diminuir o estado inflamatório para evitar a inflamação patológica (SCHULZ *et al*, 2012).

A proliferação, a segunda fase da cicatrização de feridas, é caracterizada por reepitelização, formação de tecido de granulação e neovascularização. Nos estágios iniciais desta fase, os queratinócitos migram da borda da ferida e apêndices da pele, como folículos pilosos. Essas células proliferam, amadurecem e reconstróem a barreira e restauram a função do epitélio. Os fibroblastos desempenham um papel importante na formação do tecido de granulação. Uma parte destes fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, que são células contráteis necessárias para a reconstrução do tecido conjuntivo e produção de MEC durante a cicatrização de feridas na pele. A alta força contrátil produzido por miofibroblastos é necessário para cicatrização fisiológica das feridas, mas pode ser prejudicial à função do tecido quando leva à deposição excessiva de MEC, resultando em cicatrizes hipertróficas e queloides (KIYA; KUBO, 2019).

A fase de proliferação compreende inúmeros eventos, como o desenvolvimento do tecido de granulação (formação de MEC provisória), angiogênese (formação de vasos sanguíneos a partir de um existente) e reepitelização (formação de camada epidérmica da pele), resultando na contração da ferida. Esta fase específica é regulada através da associação entre várias células, principalmente macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos (CHOUHAN *et al.*, 2019).

Após cerca de três dias da ferida inicial, a fase proliferativa centra-se em torno dos fibroblastos e da produção de colágeno, glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos que formarão a base para a estrutura do novo tecido que se formará com a evolução do processo cicatricial. Enquanto isso, as células endoteliais se proliferam junto a angiogênese dando início assim ao tecido de granulação, criando uma rica rede vascular que fornece essa área muito ativa de cicatrização (HAN; CEILLEY, 2017).

A terceira fase da cicatrização consiste na remodelação, que começa duas a três semanas após o início da lesão e pode durar um ano ou mais. O objetivo central do estágio de remodelação é atingir a resistência máxima à tração por meio da reorganização, degradação e ressíntese da matriz extracelular. Neste estágio final da cicatrização, ocorre a tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal, e o tecido de granulação é gradativamente remodelado, formando tecido cicatricial menos celular e vascular e que apresenta aumento progressivo em sua concentração de fibras de colágeno. Esta fase é marcada pelo

amadurecimento dos elementos com profundas alterações na matriz extracelular e redução dos debris celulares resultantes da inflamação inicial (GONZALEZ *et al.*, 2016).

A maturação e remodelação adequadas da ferida resultam em uma cicatriz rapidamente curada e instável, enquanto o prolongamento ou desvios desta fase podem causar hipertrofia como queloides, ou feridas crônicas que não cicatrizam. A maturação requer a reorganização de novos depósitos de colágeno em uma estrutura organizada baseada em GAGs e proteoglicanos (JANIS; HARRISON, 2014).

A fase de remodelação do tecido é caracterizada pela remodelação da matriz e celularidade declinada. Durante esta fase, o colágeno inicial tipo III do tecido de granulação é gradualmente substituído pelo colágeno tipo I, que é o principal componente estrutural da derme. Originalmente desorganizadas, as fibras de colágeno são rearranjadas, reticuladas e alinhadas em feixes paralelos. Esses processos resultam na formação de uma cicatriz com redução de resistência à tração e ausência de anexos cutâneos (KIM *et al.*, 2019).

### 1.3 Lectinas

Um grande número de produtos naturais com bioatividades notáveis foi descoberto nas últimas décadas a partir de invertebrados marinhos (BLUNT *et al.*, 2012). Embora nem todas as moléculas descobertas a partir de lesmas marinhas tenham aplicações biomédicas interessantes, algumas delas têm sido o ponto de partida para uma série de potenciais drogas candidatas (PUTZ *et al.*, 2010).

As interações entre proteínas e carboidratos fazem parte das vias de sinalização mais eficientes que ocorrem nos organismos vivos ou entre eles e seu ambiente. De fato, os eventos de comunicação celular são mediados por interações entre carboidratos da superfície celular e lectinas, que são proteínas especializadas em reconhecimento de carboidratos durante a evolução de todos os organismos vivos. Esses agentes de ligação a carboidratos estão recebendo crescente atenção científica, bem como na indústria biotecnológica, devido às demandas sociais cada vez mais rigorosas por produtos de base biológica, biodegradáveis, e materiais biocompatíveis (BARRE *et al.*, 2019).

As lectinas são um grupo de proteínas de origem não imunes amplamente distribuídas na natureza. Essas proteínas reconhecem e ligam carboidratos específicos encontrados nas superfícies das células e desempenham um papel na interação e comunicação entre células (CAVADA *et al.*, 2020).

O termo "lectina" (originário da palavra latina "*legere*", que significa "selecionar") foi introduzido pela primeira vez em 1954 por Boyd para descrever o grupo de proteínas de origem não imune que ligam carboidratos sem modificá-los (BOYD; SHAPLEIGH, 1954). Inicialmente, as lectinas eram conhecidas como aglutininas e os primeiros experimentos mostrando suas propriedades de aglutinação foram realizados por Hermann Stillmark em 1888. No entanto, não se sabia então por que as aglutininas coagulam eritrócitos. Somente em 1936, James B. Sumner mostrou pela primeira vez que a Concanavalina A extraída *Canavalia ensiformis* conhecida como do feijão-de-porco ou "*jack bean*" é capaz de ligar polissacarídeos (SHARON; LIS, 2004).

As lectinas estão envolvidas em muitos processos biológicos, incluindo reconhecimento celular, patogênese viral, bacteriana e inflamação. Essa ampla gama de funções biológicas leva a uma grande diversidade de estruturas e especificidades de lectinas entre diferentes espécies. As primeiras lectinas foram descobertas em plantas, entretanto, posteriormente, as lectinas também foram identificadas em animais e microrganismos (PIETRZYK-BRZEZINSKA; BUJACZ, 2020).

A atividade de lectina animal é descrita em associação com uma diversidade surpreendente de estruturas primárias. Suas funções incluem ativação do complemento, reconhecimento celular, adesão celular, migração celular, sinalização celular e morfogênese. Além disso, as lectinas animais são capazes de participar dos mecanismos de defesa, principalmente por reconhecer carboidratos presentes nos patógenos. Além disso, estão envolvidas no tráfego de células, regulação imunológica e prevenção da autoimunidade (LOH *et al.*, 2017).

Inicialmente purificada a partir de plantas, uma ampla gama de lectinas também foram identificadas a partir de fluidos e tecidos, dentro da célula ou na superfície celular, e fora do corpo de animais não vertebrados e vertebrados, como corais, equinodermos, moluscos, peixes, pássaros e mamíferos. As lectinas de animais têm sequência variável de aminoácidos, ampla distribuição, localização de tecidos, funções, estruturas e capacidade de reconhecer e ligar a estruturas de carboidratos especificamente através do domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC). Um ou vários DRCs são encontrados nas lectinas animais e estes domínios podem ser usados para classificar lectinas nas mais diversas famílias e classes, de acordo com suas estruturas primárias e especificidades a mono- ou oligosacarídeos (DOS SANTOS SILVA *et al.*, 2019).

A atividade das lectinas animais é associada a uma surpreendente diversidade de estruturas primária. Sabe-se que pelo menos 12 famílias estruturais ligam outras estruturas

além dos carboidratos por meio de interações proteína-proteína, proteína-lipídio ou proteína-ácido nucleico. Seus papéis nos sistemas de reconhecimento incluem ativação de complemento, reconhecimento celular, adesão celular, migração celular, sinalização celular e morfogênese. Além disso, as lectinas animais são capazes de participar de mecanismos de defesa, principalmente reconhecendo um carboidrato de patógenos. As lectinas de animais são meios de ligação a várias células ou vírus através dos tipos superficiais de carboidratos das células a serem ligadas. A função no reconhecimento ou na interação da superfície celular das lectinas animais tem sido implicada na primeira linha de defesa contra patógenos (LOH *et al.*, 2017).

Organismos marinhos merecem interesse especial, pois vivem em ambientes de extrema variação de pressão, salinidade e temperatura com isso, desenvolveram capacidades metabólicas e físicas únicas para a sobrevivência nesses habitats. Eles produzem metabólitos bioativos que são estruturalmente diversos e também diferem dos produtos identificados de organismos terrestres (BARBOSA *et al.*, 2020).

No entanto, aproximadamente 52% dos produtos naturais moluscos que foram isolados até o momento nunca foram testados para qualquer atividade biológica. Além disso, <1% das espécies de moluscos conhecidas foi estudada por seus metabólitos secundários, embora um grande número de espécies de moluscos tenha sido usado como fonte de medicamentos tradicionais (AHMAD *et al.*, 2018).

Atualmente, pesquisadores vêm isolando e caracterizando várias lectinas de invertebrados marinhos e descrevendo seu potencial biotecnológico dessas proteínas. Xiong *et al.*, (2005), descreveu uma lectina isolada a partir de uma esponja *Craniella australiensis*, que possui atividade mitogênica. Moura (2006) apresentou resultados em que uma lectina extraída da esponja *Cliona varians* apresentou toxicidade contra bactérias e promastigota de *Leishmania*. Queiroz *et al.*, (2008), evidenciou atividade pró-inflamatória na lectina extraída dessa mesma esponja referida.

#### **1.4 Gastrópodes**

O filo Mollusca é um dos grupos mais diversos de invertebrados marinhos, com cerca de 200.000 espécies descritas (BRUSCA; BRUSCA, 2007). Dentre os moluscos, a ordem Gastropoda apresenta uma maior diversidade, compreendendo uma gama de padrões corpóreos e adaptações aos diferentes tipos de ambientes. São considerados bons

bioindicadores ambientais, pois diferentes táxons ocupam nichos ecológicos distintos (RUPPERT *et al.*, 2005; ZUSCHIN *et al.*, 2001).

Os moluscos têm corpo mole, não segmentado, sendo formado por uma cabeça anterior, um pé ventral e uma massa visceral dorsal. O corpo é recoberto pelo manto, responsável pela formação do aspecto de concha. Possuem sistema circulatório aberto, com coração. A respiração pode ser branquial ou pulmonar. O sistema nervoso é formado por três pares de gânglios. São animais dióicos ou monóicos e a fecundação pode ser interna ou externa (RUPPERT; BARNES, 1996).

Os gastrópodes são caracterizados pela presença de concha única com um opérculo (ainda que apenas no período larval), e apresentam uma massa torcida (AKTIPIS *et al.*, 2008). Define-se a torção em um giro de 180° da massa visceral, da cavidade palial e do sistema neural no período da fase larval, paralelamente ao desenvolvimento e a espiralização da concha, sendo importante para o sucesso evolutivo do grupo, pois os gastrópodes ocupam diferentes habitats e a grande diversidade de formas, tamanhos e padrões corporais. (RUPPERT *et al.*, 2005)

Os gastrópodes em sua grande maioria, são hermafroditas realizando fecundação cruzada e interna (HYMAN, 1967). Alguns grupos fixam a massa de ovos a um substrato, que depois eclodem, em maioria, em larvas planctônicas, enquanto algumas espécies apresentam desenvolvimento direto (THOMPSON, 1967; GODDARD, 2004; BEHRENS, 2005; MATTHEWS-CASCON *et al.*, 2011). A massa de ovos, que apresenta consistência gelatinosa, podem apresentar diferentes cores, tamanhos e formas (HYMAN, 1967; BEESLEY, 1998).

Externamente indefesos e frequentemente exibindo assimetria no seu plano corporal, gastrópodes sempre foram alvos de estudos para biólogos. Vários trabalhos científicos já descreveram e discutiram sobre sua morfologia, ciclo de vida, ecologia e hábitos alimentares. Um grupo altamente diversificado e bem-sucedido de gastrópodes marinhos apresenta uma distribuição global e ocupam uma ampla gama de nichos ecológicos. Lebres do mar, *Aplysia spp.* são provavelmente um dos grupos mais bem estudados de lesmas do mar devido ao sua papel na pesquisa médica (DIONÍSIO *et al.*, 2013).

Os moluscos têm tido um foco significativo na busca de metabólitos secundários biologicamente ativos, com mais de 1.145 produtos naturais isolados de espécies de moluscos nas últimas três décadas (BENKENDORFF, 2014 ).

Hu (2012) investigou os efeitos antitumorais e tóxicos do P2, uma fração polipeptídica de *Arca subcrenata*, um invertebrado marinho que pertence ao Filo Mollusca.

Foi mostrado que o P2 inibiu a proliferação de sete linhagens de células tumorais, principalmente nas linhagens HeLa (Linhagem de células de câncer de cólon) e HT-29 (Linhagem de células de câncer cervical). Os valores foram 11,43  $\mu\text{g} / \text{mL}$  para HeLa e 13,00  $\mu\text{g} / \text{mL}$  para HT-29 tratado por P2 por 48 h. P2 também causou pouca citotoxicidade em células hepáticas normais L-02.

Beaulieu (2013) aplicou frações de proteínas hidrolisadas extraídas do molusco marinho *Mytilus edulise* em diferentes frações, testando quanto à atividade antiproliferativa contra quatro linhagens de células imortalizadas: células epiteliais pulmonares A549 tipo II, células de carcinoma do cólon HCT15, células de carcinoma da mama BT549 e células de câncer de próstata PC3. A proteína com 50 kDa exibiu a maior atividade antiproliferativa em todas as quatro linhas de células cancerosas imortalizadas. A atividade de inibição foi particularmente forte com células de câncer de próstata PC3 e células de câncer epitelial pulmonar A549 tipo II, com respectivamente cerca de 87% e 76% de crescimento de inibição para apenas 11  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de hidrolisado.

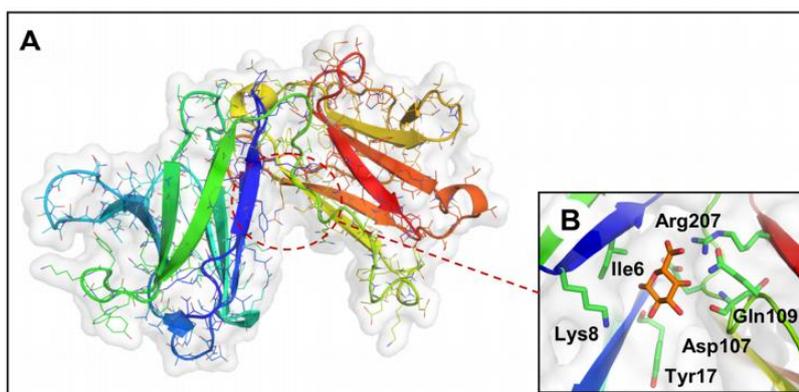
Oh (2019) demonstrou o efeito antiaterosclerótico de um hidrolisado (BMH) extraído do molusco *Mytilus edulis*. O BMH teve um efeito protetor associada à inibição de uma via relacionada à apoptose em lesões induzidas por peróxido de hidrogênio em células endoteliais de veia umbilical humana.

As espécies do gênero *Aplysia* são reconhecidas como um dos modelos de organismos invertebrados mais importantes em estudos biomédicos (KANDEL, 2001). O uso desses organismos em pesquisas científicas permitiu avanços significativos no esclarecimento de mecanismos moleculares envolvidos em todas as fases da memória implícita e base celular de comportamento (HAWKINS; KANDEL; BAILEY, 2006; KANDEL, 1982). As espécies de *Aplysia* também são modelos importantes para pesquisas sobre controle neural da secreção de hormônios (WAYNE, 1995), envelhecimento (BAILEY *et al.*, 1983) e doença de Alzheimer (SHEMESH; SPIRA, 2010).

Carneiro *et al.*, (2017) isolaram e purificaram uma lectina de ovos do gastrópode *Aplysia dactylomela* (ADEL) onde, em adição, caracterizaram físico-quimicamente e determinaram a estrutura tridimensional da ADEL (figura 3). A lectina apresentou uma forte ligação com eritrócitos humanos e de coelho que foi inibida pela presença de resíduos de D-galactose e  $\alpha$ -D-lactose. O efeito da ADEL na prevenção da formação do biofilme avaliados por dois ensaios diferentes: determinação da massa do biofilme e quantidade de células viáveis. Os biofilmes de *S. aureus* com reduziram a biomassa em quase 40%. Em relação ao número de células viáveis a partir do biofilme, a ADEL reduziu a viabilidade de

*Staphylococcus . aureus* principalmente em concentrações (250-62,5 µg/ mL) (CARNEIRO *et al.*, 2017).

Figura 3 - Estrutura geral da ADEL. A) Estrutura da proteína monomérica de ADEL representada como desenho colorido e linhas com uma superfície transparente delineando a forma da proteína. A localização do sítio de ligação de carboidratos é destacada por um círculo vermelho tracejado. B) Representação do sítio de ligação de carboidratos, que mostra a coordenação do ácido D-galacturônico pelos resíduos do sítio principal (representados como pontos verdes).



Fonte: Carneiro *et al.*, 2017.

### 1.5 Gastrópodes e Cicatrização

Enquanto avanços significativos foram alcançados no campo da produção de síntese orgânica nos últimos anos, várias moléculas registradas de organismos marinhos, como lesmas do mar, exibem peculiaridades estruturais que ainda é difícil recriar através da síntese química (BARAN; MAIMONE; RICHTER, 2007).

O conteúdo lipídico dos moluscos *Mytilus galoprovincialis* e *Rapana venosa*, foi aplicado em camundongos com feridas induzidas através de queimaduras, observaram que o processo de cicatrização apresentou redução significativa de tempo nos animais tratados, intimamente ligados ao processo de redução inicial da fase inflamatória e promoção da recuperação dos tecidos danificados (BADIU *et al.*, 2008).

Ledo, de las Heras e Ledo (1999) mostraram que o muco extraído do molusco *Cryptomphalus aspersa* apresentou propriedade regenerativa quando aplicado na derme de ratos com radiodermatite aguda.

O muco puro e pomada a base do muco de *Achatina fulica* em lesões provocadas na pele de coelhos e demonstraram com estudos clínicos e histológicos que o processo de cicatrização foi mais rápido, ou seja, a presença de fibras de colágeno ocorreu após 72 h (MARTINS *et al.*, 2003).

Corroborando estes resultados, Tsoutsos, Kakagia e Tamparopoulos (2009) realizaram um estudo com vinte e sete pacientes vítimas de queimaduras profundas no rosto, observaram que o tempo médio de reconstrução epitelial do grupo tratado foi 11( $\pm$ 2) dias enquanto para o grupo controle foi 15( $\pm$ 3) dias. Ressaltaram ainda que, cremes com muco de *Helix aspersa* aceleram o processo de apoptose do tecido queimado e a epitelização de queimaduras parcialmente profundas.

Em razão da procura por novos compostos naturais que possam representar alternativas a cicatrização e reparo de danos teciduais, a identificação e caracterização proteínas extraídas a partir de gastrópodes, não foi estudada sob esse aspecto reforçando assim, um ineditismo do trabalho.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de uma lectina isolada de ovos do gastrópode marinho *Aplysia dactylomela* (ADEL) no processo de cicatrização em feridas induzidas cirurgicamente em camundongos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar o efeito da ADEL sobre a viabilidade de linhagens celulares de fibroblastos murinos e queratinócitos humanos;
- Verificar os efeitos da ADEL sobre a atividade locomotora de peixes-zebra (*zebrafish* - *Danio rerio*) adultos;
- Analisar a toxicidade aguda e a taxa de mortalidade de *zebrafish* adulto quando submetido ao tratamento com diferentes concentrações de ADEL;
- Avaliar o efeito da ADEL no processo cicatricial de lesões cutâneas induzidas na região dorsal de camundongos sob o ponto de vista clínico/macrocópico e histopatológico.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

A lectina ADEL foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro, do Laboratório de Biotecnologia Marinha do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os ensaios *in vivo* foram executados no Laboratório Integrado de Biomoléculas na unidade localizada no Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC. Todas as amostras foram preparadas sob condições assépticas e esterilizadas com membranas filtrantes (0,22 µm). Como veículo das amostras, foi utilizada solução de cloreto de sódio (NaCl - 150 mM) estéril.

#### 3.1 Avaliação da atividade hemaglutinante

Para os testes de hemaglutinação foram utilizadas hemácias de coelhos obtidas no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará. Após a obtenção da alíquota de sangue, foram preparadas as suspensões de eritrócitos nativos e tratados com as enzimas proteolíticas papaína e tripsina. Prontamente, os eritrócitos foram imediatamente lavados por 6 vezes em diluição de 10 mL de NaCl 150 mM. Posteriormente, foram preparadas as suspensões a 3% de eritrócitos em NaCl 150 mM (v/v).

Para a obtenção das soluções de eritrócitos associadas a enzimas proteolíticas, as suspensões a 3% foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente separadamente com papaína e tripsina. Em seguida após a incubação, as suspensões foram lavadas novamente por 6 vezes em diluição de 10 volumes em NaCl 150 mM. Em seguida, após a lavagem, os eritrócitos foram suspensos e foram aferidos os volumes até que a concentração de eritrócitos a 3% em NaCl 150 mM (v/v) fosse novamente obtida.

O ensaio para determinar a atividade hemaglutinante foi realizado como descrito por Ainouz (1992). A análise foi feita em uma placa de microtitulação de fundo V realizado através do método da dupla diluição seriada. Primeiramente, foram adicionadas, 50 µL de TBS/Ca<sup>2+</sup>, 50 µL/mL da amostra ADEL, que foram diluídas seriadamente, e em seguida, em cada poço foram adicionados 50 µL da solução de eritrócitos preparadas. Para o controle negativo foi adicionado 50 µL de TBS/Ca<sup>2+</sup> e suspensão de hemácias a 3%. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos, e a reação de atividade hemaglutinante foi observada visualmente.

Para demonstrar a inibição da atividade hemaglutinante a lectina foi desnaturada, uma alíquota da solução de 1.000 µg/mL de lectina ADEL foi aquecida em termobloco durante 60 minutos a 80 °C (± 2 °C) conforme descrito por Carneiro *et al.*, (2017).

Primeiramente, foram adicionadas, 25 µL de TBS/Ca<sup>2+</sup>, logo após foi transferida 25 µL da amostra da lectina ADEL desnaturada (dADEL). A placa permaneceu por 60 minutos à temperatura ambiente e após este período foram adicionados 25µL de suspensão de eritrócitos de coelho a 2% tripsinizados, pois a presença de tripsina aumentou suscetibilidade à hemaglutinação. A placa foi deixada em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente e a detecção da atividade hemaglutinante foi feita macroscopicamente.

### **3.2 Linhagens celulares e condições de cultura**

Os fibroblastos murinos da linhagem L929 (ATCC® clone 929), e queratinócitos humanos da linhagem HaCaT (ATCC® PCS200011™), foram adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro. As linhagens foram cultivadas em frascos T75 (75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL) em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (*Gibco*®) e 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina -*Gibco*®) incubadora a 37°C (*Panasonic*®, modelo MCO 19AICUVH), com atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento das linhagens foi acompanhado com auxílio de microscópio invertido de contraste de fase (Nikon Eclipse – TS100, EUA).

A manutenção das linhagens cultivadas foi realizada a cada três dias, sendo as células removidas com tripsina/EDTA 0,05% (*Gibco*®) quando atingido 80% - 90% de confluência em relação a área do T75. Durante os ensaios as células foram utilizadas entre 3 a 7 passagens em experimentos independentes.

### **3.3 Análise da citotoxicidade da lectina ADEL sobre as linhagens de fibroblastos e queratinócitos**

Após atingirem a confluência determinada, as células foram tripsinizadas, semeadas em placas de poliestireno de fundo plano de 96 poços (5,0 × 10<sup>4</sup> células/poço) e incubadas durante 24h, sob condições padrão de cultura a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, o meio foi retirado e adicionou-se 200 µL de meio completo suplementado com FBS 2% contendo ADEL em concentrações que variaram de 500 - 7,8 µg/mL, utilizando diluição seriada na base 2.

Após 24 h, 48 h e 72 h o meio DMEM foi retirado e substituído por 100 µL de meio fresco, sem suplementação, no qual foram adicionados 20 µL da solução de sal

tetrazolium MTS (*CellTiter 96® Aqueous MTS Reagent Powder*, Promega, WI, USA ) de acordo com recomendações do fabricante.

A densidade ótica foi mensurada em um leitor de microplacas (*SpectraMax i3 Multi-Mode Microplate Reader*) em comprimento de onda de 490 nm. Foram realizados três ensaios independentes e em triplicata. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada pela equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\overline{Abs}_{490 \text{ nm}} (ADEL)}{\overline{Abs}_{490 \text{ nm}} (\text{controle})} \times 100$$

Após a leitura os dados foram avaliados através do programa *GraphPad Prism software*, analisados e comparados utilizando o teste de variância (ANOVA unidirecional), seguido do teste de Tukey.

### 3.4 Teste de toxicidade e atividade locomotora em zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) adulto, selvagens, ambos os sexos com idade de 60-90 dias, tamanhos de  $3,5 \pm 0,5$  cm e peso  $0,4 \pm 0,1$  g foram obtidos da Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA, um fornecedor em Fortaleza (Ceará, Brasil). Cada grupo de 50 peixes foram aclimatados por 24 h em aquários de vidro (30 x 15 x 20 cm), contendo água desclorada (*ProtecPlus®*) e bombas de ar com filtros submersos a 25 °C e pH 7.0, com ciclo cicardiano de 14:10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração *ad libitum* 24 h. Após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada (2-4 °C), por 10 minutos, até a perda de movimentos operculares (CONCEA, 2018). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), sob o protocolo nº 3500051018.

Os testes com zebrafish adulto foram realizados baseando-se em metodologias descritas na literatura (MAGALHÃES; EKAMBARA, 2017; RASMUSSEN; TOLWANI, 2013). No dia dos experimentos, os peixes foram selecionados randomicamente, transferidos para uma esponja úmida, tratados com as amostras testes ou controle, via oral (v.o.). Em seguida foram acondicionados individualmente em Becker de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Para os tratamentos via oral foi usada pipeta automática variável de 20 µL.

### 3.4.1 Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

Foi realizado o teste de campo aberto (AHMAD; RICHARDSON, 2013) para avaliar possíveis alterações da coordenação motora dos animais, seja por sedação e/ou relaxamento muscular. Inicialmente, os animais foram distribuídos em 7 grupos com 8 animais, tratados com 20  $\mu$ L, via oral, com ADEL (125  $\mu$ g/mL; 250 $\mu$ g/mL; 500  $\mu$ g/mL); 125  $\mu$ g/mL dADEL, 125  $\mu$ g/mL Albumina Sérica Bovina (BSA), e veículo NaCl 150 mM. Um grupo de animais sem tratamentos foi incluído (Naive). Após 1 hora dos tratamentos, os animais foram adicionados em placas de Petri de vidro (60 x 10 mm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL). Usando o valor de CL do grupo Naive como linha de base (100%), foi calculada a porcentagem de atividade locomotora (AL%) individualmente durante 0-5 minutos.

### 3.4.2 Toxicidade aguda 96h

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao zebrafish (*D. rerio*) adulto conforme metodologias propostas pela OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) (OECD, 1992) e HUANG *et al.* (2014). Os animais foram divididos em 7 grupos com 8 animais cada, tratados com 20  $\mu$ L, via oral, com ADEL (125  $\mu$ g/mL; 250  $\mu$ g/mL; 500  $\mu$ g/mL), 125  $\mu$ g/mL dADEL, 125  $\mu$ g/mL BSA e veículo NaCl 150 mM. Um grupo sem tratamentos (Naive) foi incluído. Foi observado durante 0 a 5 min e deixados 1h em repouso para analisar a taxa de mortalidade. O grupo veículo NaCl foi utilizado como controle. Após 96 horas dos tratamentos, foi anotado o número de peixes mortos em cada grupo e determinado a dose letal capaz de matar 50% dos animais ( $DL_{50}$ ) através do método matemático *Trimmed Spearman-Kärber* com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUILAR *et al.*, 2015).

Os resultados foram expressos como valores da média  $\pm$  erro padrão da média para cada grupo de 8 animais. Depois de confirmar a normalidade de distribuição e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA unidirecional), seguido do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPadPrism v. 6.0. O nível de significância estatística foi estabelecido em ( $p < 0,05$ ).

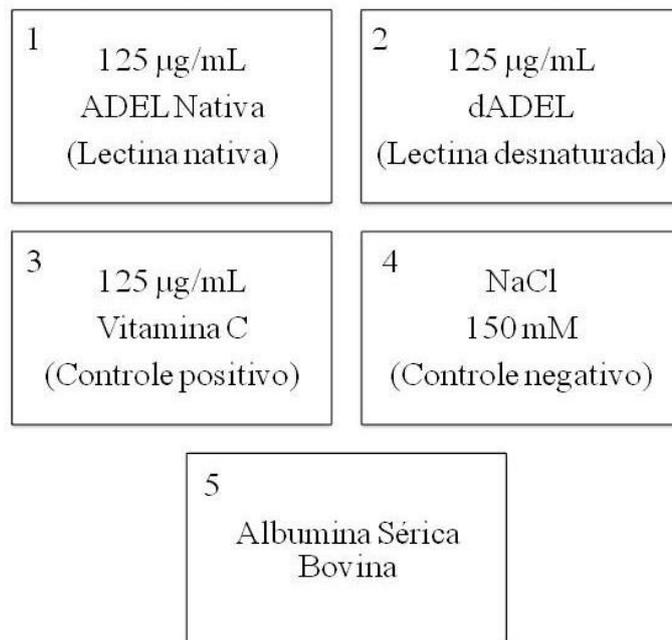
### 3.5 Ensaio de Cicatrização

#### 3.5.1 Animais e grupos experimentais

Os camundongos machos de linhagem Swiss, de 8 a 10 semanas e massa corporal entre 25 a 30 g, foram adquiridos do Biotério Setorial Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em ciclo circadiano 12 horas claro/escuro, e alimentados com ração e água *ad libitum*. O protocolo experimental está de acordo com princípios do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi devidamente aprovado sob o N° 2113071118 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Ceará.

Para realização do ensaio *in vivo*, os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos com 12 animais cada. Antes da realização do procedimento cirúrgico, os animais foram aleatoriamente divididos, de acordo com a solução aplicada conforme a figura 5.

Figura 4 – Distribuição dos grupos de acordo com a solução aplicada.



Fonte: elaborado pelo autor.

#### 3.5.2 Procedimento operatório

Conhecido o peso dos animais, foram realizados os cálculos para o processo anestésico que antecedeu a produção da ferida. A solução anestésica foi preparada conforme

Massone (2011). Foram anestesiados com Cetamina (Dopalen®, Agribrands Brasil Ltda.) a 10% (115 mg/kg) 10% e cloridrato de Xilazina (Sedanew®) a 2% (10 mg/kg), por via intraperitoneal. Após um período de latência média de sete minutos, foi verificada a prostração completa de cada animal, confirmada pela diurese espontânea comumente apresentada, respiração superficial e acelerada, e abolição total de reflexos palpebrais.

Após a anestesia, em um campo operatório delimitado foi realizada a tricotomia nos animais, em seguida a antissepsia da região dorsal torácica com iodopovidona e solução salina estéril a 0,9% com gaze. Com auxílio de *punch* metálico (diâmetro= 6 mm), foi demarcada e delimitada uma área na região dorsal do tórax para a remoção de um segmento circular de pele, expondo as fáscias musculares, através de excisão cirúrgica de um fragmento de pele com o auxílio de uma tesoura íris reta, padronizando desta forma o tamanho da ferida, e atentando-se ao fato de que todas as camadas fossem removidas, restando apenas a musculatura subjacente.

### ***3.5.3 Tratamento e Avaliação macroscópica da ferida***

O tratamento teve início logo após o procedimento cirúrgico, com isso todas as lesões foram tratadas topicamente com uma dose única diária no mesmo período de 100 µL de soluções preparadas como descrito anteriormente de acordo com cada grupo, sendo aplicada com uma pipeta volumétrica durante os 12 dias do experimento. As lesões foram avaliadas diariamente até o décimo segundo dia pós-operatório (P.O), observando-se os sinais da inflamação como: edema, hiperemia, sangramento, presença de crosta, exsudato e tecido cicatricial. Para avaliar a evolução da área das lesões e do processo cicatricial do ponto de vista macroscópico, foram realizadas fotografias a cada 48h.

### ***3.5.4 Análise Histopatológica***

Os fragmentos de tecido para o estudo histopatológico foram fixados em paraformaldeído à 10 % em tampão fosfato (pH= 7,4), por 24 – 48 h. Posteriormente foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (70 % - 100 %). As amostras foram incluídas em parafina de maneira perpendicular ao plano. Foram obtidos materiais de todos os animais de acordo com os grupos de tratamento nos tempos de 3º, 7º e 12º dias após a indução da lesão. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo com espessura de

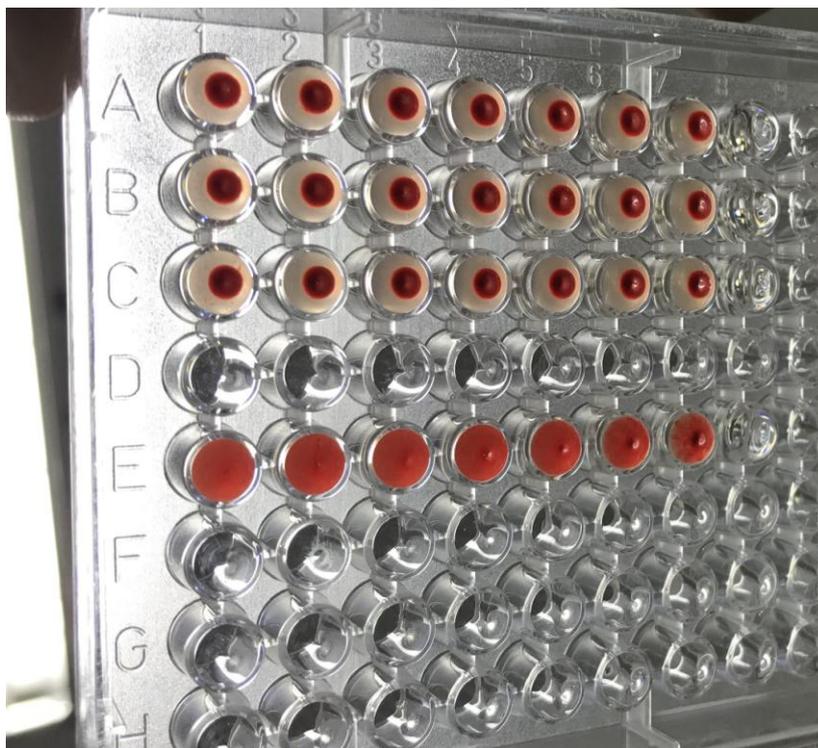
6µm. Após obtenção das lâminas, os cortes foram corados com Hematoxilina – Eosina (HE) e Tricrômio de Masson. Para a análise histopatológica do tecido as lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio óptico de luz convencional com uso de lentes que promoveram aumento de 4x e 40x e 100x o tamanho real (MYERS *et al.*, 1961).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Detecção da atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante da ADEL nativa e dADEL foi realizada com eritrócitos de coelho. É possível perceber que há a precipitação de eritrócitos no fundo da placa nas linhas “A, B e C” causadas devido à mudança na estrutura da proteína, assim promovendo a não ligação da ADEL com os eritrócitos (Figura 5). Na linha “E”, os eritrócitos foram aglutinados com ADEL nativa evidenciando sua atividade de ligação a carboidratos na membrana das hemácias.

Figura 5: Avaliação da atividade hemaglutinante com ADEL nativa (linhas A-C) e dADEL (Linha E).



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.2 Efeitos da ADEL sobre a viabilidade de fibroblastos

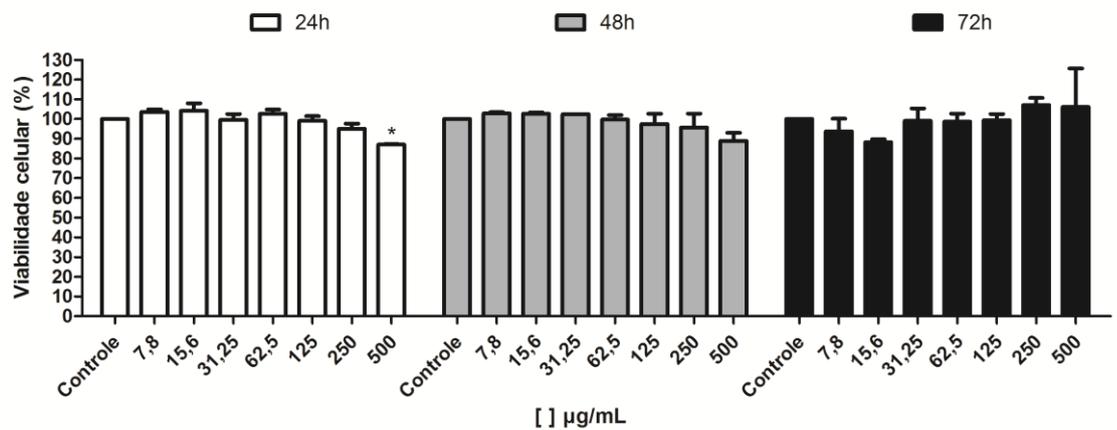
A toxicidade da ADEL sobre fibroblastos foi analisada por meio do ensaio de viabilidade celular utilizando o sal tetrazolium MTS. No tempo de 24 h os fibroblastos tratados com as concentrações 7,8; 15,6 e 31,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apresentaram viabilidade igual ou

superior a 100%, demonstrando ausência de citotoxicidade. Mesmo na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  ADEL a viabilidade celular foi de  $87,03\% \pm 0,37\%$ .

Após 48h de exposição à ADEL, a viabilidade dos fibroblastos manteve-se acima de 80% em todas as concentrações testadas ultrapassando a 100% nas concentrações de 15,6  $\mu\text{g/mL}$  e 7,8  $\mu\text{g/mL}$ . Com 72 h de exposição, nas concentrações acima de 31,5 $\mu\text{g/mL}$  a viabilidade se manteve acima de 80% conforme apresentado no gráfico 1. A concentração não tóxica (125  $\mu\text{g/mL}$ ) foi usada para testes adicionais em ensaio de cicatrização *in vivo*.

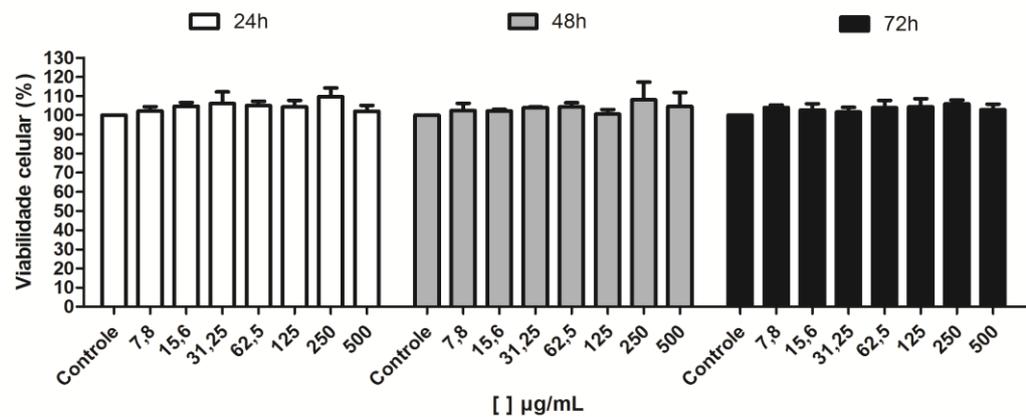
Os resultados do teste de citotoxicidade da ADEL quanto a viabilidade celular com a linhagem HaCaT, foi determinada após um período de exposição de 24 h, 48 h e 72h utilizando-se o teste de MTS. Após os três tempos, não houveram reduções da viabilidade celular dos queratinócitos havendo não só a ausência de toxicidade, mas também um efeito indutor da proliferação celular conforme apresentado no gráfico 2.

Gráfico 1 - Efeito da ADEL em diversas concentrações sobre a viabilidade celular de fibroblastos (L929)



Fonte: Próprio autor. Mensuração do efeito da lectina ADEL sobre a viabilidade de células L929. As células foram tratadas com diferentes concentrações (7,8 – 500  $\mu\text{g/mL}$ ). A viabilidade celular (%) foi medida por MTS. A) Efeito da ADEL sobre a viabilidade celular por 24h, 48h e 72h. (n=3, média  $\pm$  SEM). \*  $P < 0,05$  quando comparado ao controle.

Gráfico 2- Efeito da ADEL sobre HaCat no ensaio de viabilidade celular



Fonte: Próprio autor. Mensuração do efeito da lectina ADEL sobre a viabilidade de células HaCat. As células foram tratadas com diferentes concentrações (7,8- 500 µg/mL). A viabilidade celular (%) foi medida por MTS. A) Efeito da Adel sobre a viabilidade celular por 24h, 48h e 72h. (n=3, média ± SEM). (P<0,05 quando comparado ao controle).

#### 4.3 Avaliação da atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

Recentemente, adaptamos o teste de campo aberto em placas de Petri, proposto por Ahmad e Richardson (2013), para avaliar atividade locomotora de zebrafish adulto sob ação de drogas analgésicas (MAGALHÃES *et al.*, 2017). Desta forma, empregamos o mesmo método com as amostras teste com *Aplysia dactylomela* (ADEL) (125 µg/mL; 250 µg/mL; 500 µg/mL), 125 µg/mL dADEL, 125 µg/mL BSA e veículo NaCl 150 mM. Um grupo sem tratamentos (Naive) foi incluído para avaliar suas ações sobre o sistema locomotor do zebrafish. Como resultado, a amostra de 125 µg/mL não causou efeito sedativo e/ou comprometimento locomotor dos animais, pois não apresentaram diminuição da atividade locomotora (AL) significativamente (p<0,05) semelhante entre cada grupo de amostra, bem como em relação aos controles, conforme apresentado no gráfico 3.

Gráfico 3. Efeito da ADEL sob a atividade locomotora do zebrafish no Teste de Campo Aberto

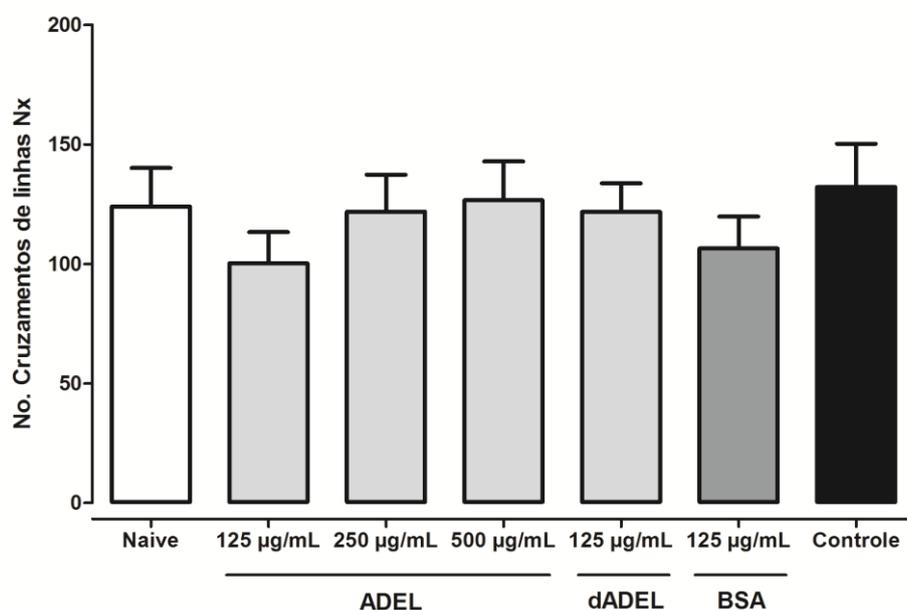


Gráfico 3. Atividade locomotora do zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto: ADEL: 125 µg/mL; 250 µg/mL ; 500 µg/mL ; dADEL:125 µg/mL; BSA: 125 µg/mL; Controle: NaCl 150 mM e Naive: sem tratamento. Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 8 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey para  $p < 0,05$ .

#### 4.4 Avaliação da toxicidade aguda

O modelo animal zebrafish foi utilizado para avaliar a toxicidade aguda das amostras teste com ADEL: 125 µg/mL; 250 µg/mL ; 500 µg/mL ; dADEL:125 µg/mL; BSA: 125 µg/mL; Controle: NaCl 150 mM e Naive: sem tratamento. Como resultado, constatou-se que todas as amostras testadas não foram tóxicas frente ao zebrafish em até 96 h de análise.

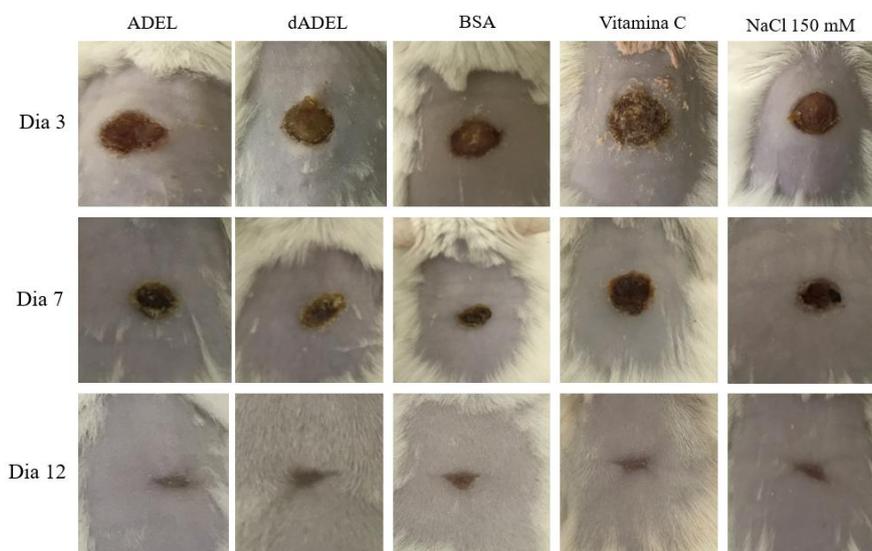
#### 4.5 Avaliação macroscópica da cicatrização de feridas

Baseado na avaliação durante 12 dias de experimento, a evolução das áreas das lesões foram avaliadas macroscopicamente indicando uma reepitelização efetiva através do tratamento com ADEL em comparação aos controles (Figura 7).

ADEL induziu uma diminuição na área das lesões do 3º ao 12º dia P.O, observando-se uma diferença no estreitamento das bordas da lesão no 12º P.O, em comparação aos demais grupos. Nos demais dias do experimento não houve diferença significativa entre as áreas das lesões dos grupos tratados com dADEL, BSA, NaCl e Vitamina C.

Ao avaliar os sinais clínicos presentes no processo de reparo tecidual, observou-se que no 3º dia P.O todos os grupos avaliados apresentaram edema e hiperemia leve com ausência de exsudado inflamatório. No 7º dia P.O todos os grupos apresentaram crosta e ausência de hiperemia, edema e exsudado. Nenhum animal apresentou sangramento da ferida durante o experimento. No 12º dia P.O todos os animais apresentaram tecido cicatricial com ausência de crostas. Com base nos sinais clínicos observados, o processo de reparo tecidual transcorreu de forma semelhante entre os diferentes grupos experimentais.

Figura 6: Evolução do processo de cicatrização nos grupos experimentais ADEL, dADEL, BSA, NaCl e Vitamina C.



Fonte: Elaborado pelo autor. Fotografias das feridas cirúrgicas tratadas de acordo com a aplicação: ADEL, dADEL, BSA, NaCl e Vitamina C no 3º, 7º e 12º dia P.O.

#### 4.6 Histopatologia

A avaliação histopatológica das feridas realizou-se a partir de fragmentos de pele da região torácica dorsal dos animais nos dias 3, 7 e 12. A reepitelização foi avaliada em cortes transversais corados com HE entre os grupos de tratamento com ADEL, dADEL, Vitamina C, NaCl 150 mM e Albumina Séria Bovina (BSA). A coloração com tricrômio de Masson é um método validado para diferenciar a expressão de colágeno em feridas cicatrizadas. Portanto, conduzimos este experimento em seções de tecido para observar a densidade do colágeno.

No 3º dia P.O, o grupo ADEL mostrou leve infiltrado inflamatório na derme, com presença de tecido adiposo reacional próximo à borda da lesão, múltiplos vasos de tecido de

granulação (Figura 7 A) além de feixes de fibroblastos alinhados para tração. No grupo dADEL observou-se um infiltrado inflamatório moderado, início da organização dos feixes de fibroblastos para tração da ferida e presença de microvasos no tecido adiposo reacional (Figura 7 D), achados semelhantes foram identificados com a mesma intensidade no grupo tratado com Vitamina C. Enquanto o grupo tratado com BSA apresentou infiltrado inflamatório intenso e início da reepitelização nas bordas da lesão, com presença de crosta selando o leito da ferida (Figura 7 G). O grupo NaCl 150 mM exibiu intenso infiltrado inflamatório, com proliferação do tecido adiposo reacional, além de fibroblastos ativados em meio aos adipócitos (Figura 7 M).

No 7º dia P.O, os animais tratados com ADEL apresentaram elevada presença de fibroblastos no leito da lesão e de fibras colágenas. A quase que total regressão do tecido adiposo reacional foi uma das características marcantes do tratamento com ADEL, que mesmo com a presença da crosta mostrou reestruturação dérmica avançada em relação aos demais grupos (Figura 7 B). Os grupos dADEL e Vitamina C, no P.O avaliado, mostraram início da regressão de tecido adiposo reacional, a reepitelização já está presente (Figura 7 E e K), o que sugere uma remodelação mais lenta em comparação ao grupo ADEL. Para BSA observou-se retração do tecido adiposo racional e reestruturação epitelial, já o grupo NaCl 150 mM, além da presença da crosta (Figura 7 N), verificou-se a presença do tecido adiposo reacional ainda muito próximo ao leito da ferida (Figura 7 N), indicando um processo cicatricial atrasado em relação aos demais grupos avaliados no 7º dia P.O.

No 12º dia P.O, todos os grupos apresentaram completa reepitelização da ferida e ausência de crosta. Nos grupos ADEL e dADEL também verificou-se total reorganização da derme (Figura 7 C e F), enquanto os grupos BSA e Vitamina C ainda apresentaram vestígios do tecido adiposo reacional em retração (Figura 7 I e L). Quanto ao grupo NaCl 150 mM, verificou-se a presença de tecido conjuntivo reestruturado, além de muitos fibroblastos ativados em sua maioria na derme papilar (figura 7 O).

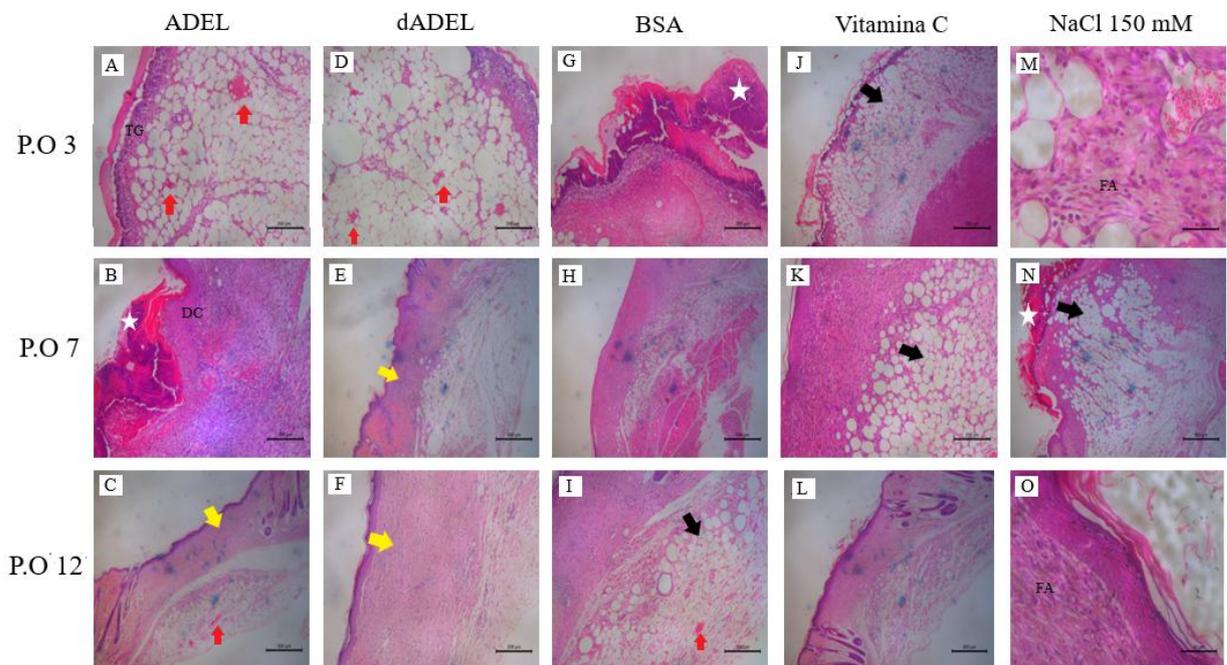
O método de coloração com tricrômio de Masson permitiu avaliar a expressão de colágeno. Constatou-se que no 3º dia P.O todos os grupos avaliados apresentaram intensa deposição de colágeno na região próxima as bordas das lesões, além de feixes finos e aleatoriamente dispersos em meio ao tecido adiposo reacional (Figura 8 D) indicando a deposição de colágeno imaturo.

No 7º dia P.O os grupos ADEL, dADEL e Vitamina C apresentaram intensa deposição de fibras colágenas dispersas em várias direções na área do tecido conjuntivo em reestruturação. No grupo BSA também foi possível observar a deposição de fibras colágenas,

porém encontram-se mais espaçadas e dispersas. Para o grupo NaCl 150 mM observou-se apenas a deposição focal de colágeno na borda da lesão (Figura 8 N) tendo em vista que grande parte da área central da ferida ainda estava ocupada pelo tecido adiposo reacional que regrediu tardiamente em relação aos outros grupos avaliados.

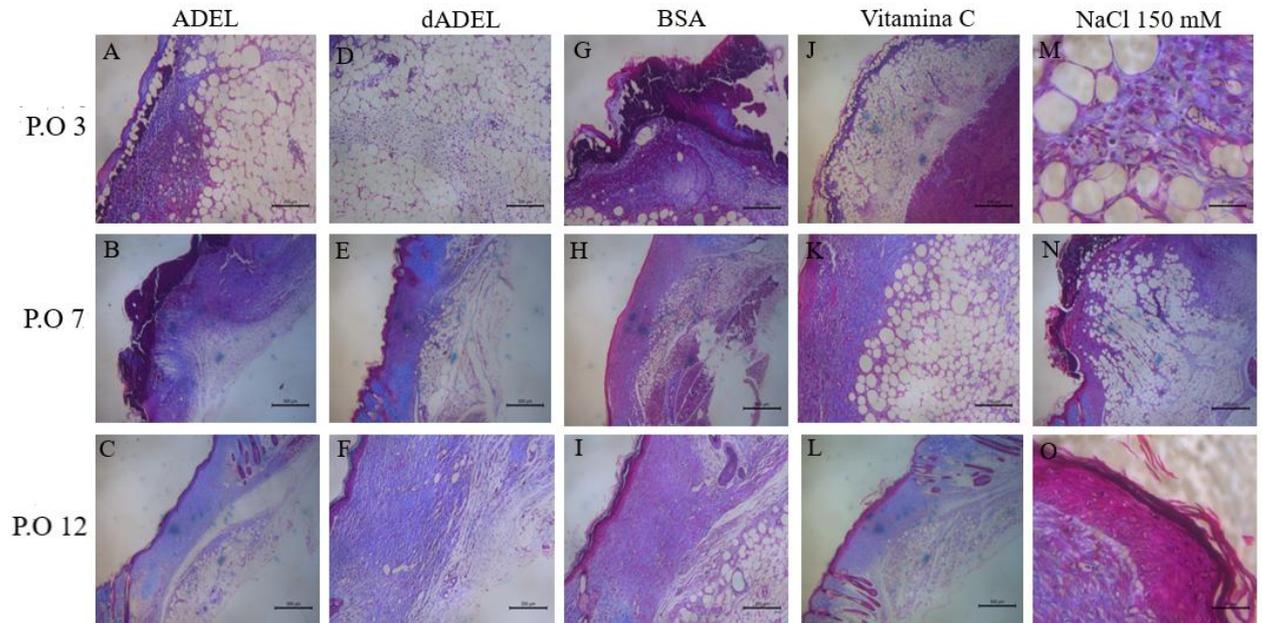
No 12º dia P.O para os grupos ADEL, dADEL, BSA e Vitamina C, a disposição e morfologia das fibras colágenas mostram-se semelhantes entre os quatro grupos, é notória a distribuição homogênea das fibras colágenas na área do tecido conjuntivo reestruturado. Apesar do grupo BSA não ter apresentado total regressão do tecido adiposo reacional no 12º dia P.O, isso não pareceu interferir na qualidade do tecido conjuntivo já reestruturado. O grupo NaCl 150 mM apresentou deposição de fibras colágenas finas e aleatoriamente dispersa (Figura 8 O), morfologia típica de colágeno imaturo, este achado era esperado tendo em vista que a avaliação em HE revelou a presença de fibroblastos ativos na derme papilar, caracterizando um processo de reparo atrasado em relação aos demais grupos.

Figura 7 - Análise histológica em HE das feridas tratadas com administração tópica.



Próprio autor. Fotomicrografia das seções de pele coradas em HE. ADEL (A, B e C), dADEL (D, E e F), BSA (G, H e I), Vitamina C (J,K, e L) e NaCl (M,N e O). As setas indicam eventos que ocorreram durante o processo de cicatrização. Seta preta: Tecido adiposo; Seta vermelha: Vasos sanguíneos; Seta amarela: Reepitelização; Estrela: Crosta; FA: Fibroblastos ativados; TG: Tecido de granulação; DC: Deposição de colágeno.

Figura 8 - Análise histológica da deposição de colágeno nas feridas tratadas com administração tópica.



Próprio autor. Fotomicrografia das secções de pele coradas em Tricrômio de Masson. ADEL (A,B e C), dADEL (D, E e F), BSA (G, H e I), Vitamina C (J,K e L) e NaCl (M,N e O).

## DISCUSSÃO

Grande parte de estudos *in vitro* relacionados à cicatrização de feridas utilizam fibroblastos e/ou queratinócitos de mamíferos (OBERRINGER *et al.*, 2007). Os queratinócitos HaCat, por exemplo, são fundamentais aos estudos de proliferação celular, pois apresentam capacidade reduzida de diferenciação (HOUGHTON *et al.*, 2005). Além disto, as interações célula-célula, célula-matriz estão interligadas a inflamação, angiogênese, contração da ferida e permitem a sobreposição das fases cicatriciais (ADETUTU *et al.*, 2011).

Trabalhos de pesquisa científica que investigam a eficácia clínica, segurança e efeitos colaterais de produtos naturais possuem extrema relevância (PEREIRA; BÁRTOLO, 2016) em especial na área da prospecção de novos fármacos com ação pró-cicatrizante. Nesse contexto, a avaliação do efeito da ADEL sobre a proliferação de fibroblastos e queratinócitos por meio do ensaio de viabilidade celular, foi essencial para determinar a dose ideal que não apresentasse citotoxicidade sobre as linhagens estudadas.

No presente trabalho, após 72h de exposição dos fibroblastos à ADEL, a porcentagem de viabilidade manteve-se acima de 80% até mesmo na dose máxima de 500 µg/mL. A linhagem de queratinócitos não houve toxicidade para todas as concentrações testadas e tempos avaliados, além disso, foi observado efeito indutor da proliferação celular. Durante a fase de proliferação na cicatrização de feridas, os leucócitos migram para o tecido lesado, onde proliferam e promove a regeneração dos vasos sanguíneos, a deposição de matriz extracelular (MEC) e a epitelização através da indução da migração de queratinócitos (FELICE *et al.*, 2015). O perfil de citotoxicidade da ADEL sobre as linhagem celulares avaliadas permitiu o uso da lectina na avaliação.

Toledo-Piza *et al.* (2013) avaliaram o efeito da proteína do muco do gastrópode *Phyllocaulis boraceiensis* sobre a proliferação de células endoteliais humanas (ATCC - CRL - 1730) e aumento da síntese de colágeno em fibroblastos dérmicos normais (ATCC - PCS - 201-010). Os fibroblastos tratados com concentrações abaixo de 0,012 µg/µL demonstraram alta taxa de proliferação, além da produção de componentes da matriz extracelular e fibras de colágeno tipo I após 24 horas de tratamento. Os resultados relatados corroboram com os achados do ensaio de viabilidade celular da ADEL frente às linhagens de fibroblastos e queratinócitos, mostrando um efeito proliferativo em células envolvidas no processo de cicatrização.

Os estudos de aplicação farmacológica de produtos naturais oriundos de gastrópodes são escassos, o que reforça a relevância dos achados iniciais do ensaio de

citotoxicidade com ADEL. Os promissores resultados de viabilidade celular motivaram a realização da análise de toxicidade *in vivo* no modelo animal alternativo zebrafish adulto (*Danio rerio*).

Desde muito tempo o zebrafish adulto vem sendo empregado em testes de toxicidade no monitoramento de contaminantes ambientais. Huang *et al.* (2014) utilizaram o zebrafish adulto para avaliar a ação de um agente agroquímico (Deltametrin), empregando-se o comportamento locomotor e mortalidade (DL50) em 24 h como parâmetros de toxicidade aguda. Vale salientar que o zebrafish adulto, também é utilizado para avaliar a toxicidade de compostos farmacêuticos (HILL, 2005).

O modelo animal zebrafish vem sendo bastante utilizado no campo da toxicologia e farmacologia com base em suas vantagens para testes reproduzíveis rapidamente e triagem comportamental de alto rendimento, além do rápido desenvolvimento externo, transparência óptica, menos espaço e cuidados de manejo e fácil manipulação. O genoma do *Danio rerio* compartilha aproximadamente 70% de homologia com humanos, e 84% de seus genes parecem estar associados com doença humana (FALCÃO *et al.*, 2018).

A resposta comportamental do zebrafish é um indicador sensível para mudança anormal na toxicidade. Dentre as respostas comportamentais, a atividade locomotora vem sendo utilizada para avaliar a ação de drogas que podem atuar sob o sistema nervoso central do zebrafish adulto causando comprometimento locomotor (KURTA; PALESTIS, 2010; GEBAUER *et al.*, 2011; TAYLOR *et al.*, 2017). Alterações na cinética de natação como variação na velocidade, nível de intensidade e profundidade de natação são parâmetros observados durante a análise de toxicidade química (CHAKRABORTY *et al.*, 2016).

A atividade locomotora do zebrafish pode ser explorada através do Teste de Campo Aberto, em um aquário simples, (ROSEMBERG *et al.*, 2011), bem como em placas de Petri (AHMAD; RICHARDSON, 2013). Diferentes parâmetros podem ser avaliados tais como *freezing* (imobilidade), entre outros. O comportamento natural do zebrafish em campo aberto é caracterizado por atividade natatória constante e manifestações de imobilidade são pouco observadas em condições naturais (CACHAT *et al.*, 2011). A análise da atividade locomotora explorada através de um campo aberto pode ser um modelo empregado para avaliar hiperatividade como sendo indicativo de ansiedade (RESENDE e SOCCOL, 2015).

Ao avaliar o efeito da ADEL sobre a atividade locomotora do zebrafish verificou-se que todas as concentrações testadas (125 µg/mL; 250 µg/mL e 500 µg/mL) não causaram efeito sedativo e/ou comprometimento locomotor, nem apresentaram efeito letal em até 96 h após a exposição dos animais. Os resultados aqui descritos são inéditos, até onde sabemos não

há relatos na literatura que envolva a avaliação da toxicidade da ADEL em zebrafish adulto, assim como não há relatos para o mesmo ensaio com lectinas de organismos marinhos, havendo registros apenas para lectinas vegetais.

Santos e colaboradores (2019), caracterizaram uma lectina presente em sementes de *Machaerium acutifolium* (MaL) ligante de manose/N-acetil-D glucosamina e investigaram o efeito na coordenação motora de zebrafish adulto. Os resultados indicaram que as concentrações de MaL utilizadas no teste não foram capazes de alterar a atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto. Os mesmos resultados foram encontrados em testes de toxicidade realizados em condições semelhantes, corroborando com os resultados do presente trabalho.

O único relato de atividade biológica descrita na literatura para a lectina de *Aplysia dactylomela* é a ação antimicrobiana e antibiofilme descrita por Carneiro e colaboradores (2017), nesse estudo a ADEL foi capaz de aglutinar e reduzir a biomassa do biofilme de *Staphylococcus aureus* em quase 40% nas concentrações 250 - 7,8 µg/mL. *S. aureus* é uma das espécies bacterianas que podem infectar feridas retardando o processo de cicatrização ou resultando em feridas crônicas (NEGUT; GRUMEZESCU; GRUMEZESCU, 2018). A atividade antimicrobiana previamente descrita para ADEL e os resultados obtidos na avaliação de (cito) toxicidade, motivou a investigação quanto sua ação pró-cicatrizante *in vivo* utilizando modelo murino.

O tratamento das feridas induzidas em camundongos com ADEL (125 µg/mL) resultou em sinais clínicos como hiperemia, edema e exsudado mais discretos, com total reepitelização no 12º pós-operatório, o mesmo foi observado nos demais grupos experimentais. Em uma análise macroscópica, a velocidade de fechamento das lesões não apresentou diferença entre os grupos ADEL, dADEL, BSA, NaCl e Vitamina C.

Piza (2012) avaliou a ação pró-cicatrizante da proteína do muco do gastrópode *Phyllocaulis boraceiensis* em feridas induzidas camundongos fêmeas Balb-c. O tratamento foi realizado a partir de uma formulação com a pomada de papaína acrescida de 0,012 µg/µl de proteína de muco de *P. boraceiensis*. Os animais tratados com a formulação apresentaram fechamento da ferida em menor tempo quando comparado ao grupo controle.

Nascimento-Neto *et al.* (2012) investigaram o potencial cicatrizante da lectina da alga marinha vermelha *Bryothamnion seaforthii* (BSL) em feridas cutâneas induzidas em camundongos. O tratamento com 200 µg/mL de BSL induziu uma diminuição nas áreas das lesões dos animais. Apesar da ação pró-inflamatória vista na avaliação clínica das feridas, a

análise histopatológica das lesões mostrou a completa reestruturação do epitélio, presença de colágeno na derme e a presença de anexos cutâneos jovens com melhor qualidade do tecido cicatricial em comparação aos controles.

A cicatrização de feridas é um processo altamente regulado de fases consecutivas e sobrepostas. A combinação da contração do tecido de granulação por fibroblastos ativados e reepitelização por queratinócitos restaura a integridade do tecido e reduz o tamanho da ferida a uma cicatriz permanente (HINZ, 2016).

Ulagesan *et al.*, (2018) caracterizaram um peptídeo bioativo derivado de caracol terrestre *Cryptozonia bistrialis* (cb) e avaliaram sua capacidade de cicatrização *in vivo* em duas diferentes concentrações: 0,5 mg/mL e 1 mg/mL. Na histopatologia o exame físico demonstrou que a regeneração do tecido foi muito mais rápida no grupo tratado com pomada de peptídeo Cb em comparação com o grupo de controle e veículo. Os ratos tratados com pomada de peptídeo Cb mostraram marcada epitelização, uma quantidade moderada de matriz extracelular síntese e formação de novos vasos sanguíneos. Apresentaram também atividades celulares significativas, como deposição máxima de colágeno, regeneração de vasos sanguíneos e significativa epitelização na ferida.

Esses achados corroboram com os resultados da presente pesquisa, já que no grupo dos animais tratados com a lectina ADEL, no P.O 3, mostrou uma alta presença de vasos e tecido de granulação, com maior prevalência em relação aos animais de outros grupos. No P.O 12 também havendo assim, todas as camadas da pele bem estruturadas e cicatrizadas.

A eficácia e a completa estruturação do tecido lesionado, é de grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos para potencial terapêutico obtidas através de gastrópodes.

## CONCLUSÃO

De acordo com os dados deste estudo, foi mostrado que a lectina de ovos do gastrópode marinho *Aplysia dactylomela* não apresentou efeito citotóxico em fibroblastos murinos e queratinócitos humanos. Quanto a atividade locomotora do zebrafish, a lectina não demonstrou efeito sedativo e/ou comprometimento dos movimentos desses animais, e não sendo tóxica frente ao zebrafish em até 96 h de análise.

Além disso, a ADEL apresentou potencial pró-cicatrizante em lesões cutâneas induzidas em camundongos, diminuindo a inflamação e conduzindo uma reepitelização completa das lesões. Dessa forma, sugere-se que ADEL tem potencial terapêutico promissor no tratamento de feridas agudas.

## REFERÊNCIAS

ABDO, Joseph M.; SOPKO, Nikolai A.; MILNER, Stephen M. The applied anatomy of human skin: a model for regeneration. **Wound Medicine**, v. 28, p. 100179, 2020.

ABE, Gembu *et al.* Insights regarding skin regeneration in non-amniote vertebrates: Skin regeneration without scar formation and potential step-up to a higher level of regeneration. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2019.

ARELLANO-AGUILAR, Omar *et al.* Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fisheries Sciences. com**, v. 9, n. 4, p. 52, 2015.

ADETUTU, A.; MORGAN, W.A.; CORCORAN, O. Ethnopharmacological survey and in vitro evaluation of wound-healing plants used in South-western Nigeria. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 50-56, 2011.

AHMAD, Farooq; RICHARDSON, Michael K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. **Behavioural processes**, v. 92, p. 88-98, 2013.

AHMAD, Tarek B. *et al.* Review of anti-inflammatory, immune-modulatory and wound healing properties of molluscs. **Journal of ethnopharmacology**, v. 210, p. 156-178, 2018.

AINOUZ, I. Lima *et al.* Agglutination of Enzyme Treated Erythrocytes by Brazilian Marine Algal Extracts. **Botanica Marina**, v. 35, n. 6, p. 475-480, 1992.

AKTIPIS, S. W. *et al.* Gastropoda: an overview and analysis. **Phylogeny and Evolution of the Mollusca**, p. 201-237, 2008.

BAILEY, Craig H. *et al.* Behavioral changes in aging *Aplysia*: a model system for studying the cellular basis of age-impaired learning, memory, and arousal. **Behavioral and neural biology**, v. 38, n. 1, p. 70-81, 1983.

BARAN, Phil S.; MAIMONE, Thomas J.; RICHTER, Jeremy M. Total synthesis of marine natural products without using protecting groups. **Nature**, v. 446, n. 7134, p. 404-408, 2007.

BARBOSA, Filipa *et al.* Targeting Antimicrobial Drug Resistance with Marine Natural Products. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. 106005, 2020.

BARRE, Annick *et al.* Overview of the structure–function relationships of mannose-specific lectins from plants, algae and fungi. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 2, p. 254, 2019.

BARRITAUULT, Denis. Overview of 10 years of practice with CACIPLIQ20® matrix therapy as a healing agent for hard to heal wounds: efficacy, cost-effectiveness and future perspectives. **Wound Medicine**, p. 100180, 2020.

BEAULIEU, Lucie *et al.* Evidence of anti-proliferative activities in blue mussel (*Mytilus edulis*) by-products. **Marine drugs**, v. 11, n. 4, p. 975-990, 2013.

BENKENDORFF, Kirsten. Chemical diversity in molluscan communities: From natural products to chemical ecology. 2014.

BENKENDORFF, Kirsten. Molluscan biological and chemical diversity: secondary metabolites and medicinal resources produced by marine molluscs. **Biological Reviews**, v. 85, n. 4, p. 757-775, 2010.

BLUNT, John W. et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 29, n. 2, p. 144-222, 2012.

BOYD, William C.; SHAPLEIGH, Elizabeth. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, n. 3091, p. 419, 1954.

BRUSCA, Richard C.; BRUSCA, Gary J. **Invertebrados**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

CARNEIRO, Rômulo Farias et al. Purification, biochemical characterization, and amino acid sequence of a novel type of lectin from *Aplysia dactylomela* eggs with antibacterial/antibiofilm potential. **Marine biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 49-64, 2017.

CACHAT, Jonathan et al. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. **PLoS one**, v. 6, n. 3, p. e17597, 2011.

CAVADA, Benildo Sousa et al. Reviewing Mimosoideae lectins: A group of under explored legume lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

CHAKRABORTY, Chiranjib et al. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. **Journal of nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2016.

CHI, Junjie et al. Antibacterial and angiogenic chitosan microneedle array patch for promoting wound healing. **Bioactive materials**, v. 5, n. 2, p. 253-259, 2020.

CHILDS, Dylan R.; MURTHY, Ananth S. Overview of wound healing and management. **Surgical Clinics**, v. 97, n. 1, p. 189-207, 2017.

CHOUHAN, Dimple et al. Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: current status and advances. **Biomaterials**, p. 119267, 2019.

CHOUHAN, Dimple; MANDAL, Biman B. Silk biomaterials in wound healing and skin regeneration therapeutics: From bench to bedside. **Acta Biomaterialia**, v. 103, p. 24-51, 2020.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL-CONCEA. **Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA**. 2018. 49p.

COLLYMORE, Chereen; RASMUSSEN, Skye; TOLWANI, Ravi J. Gavaging adult zebrafish. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 78, p. e50691, 2013.

CORY, Ann H. et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth

assays in culture. **Cancer communications**, v. 3, n. 7, p. 207-212, 1991.

CUI, Hui Song et al. Wound Healing Potential of Low Temperature Plasma in Human Primary Epidermal Keratinocytes. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 16, n. 6, p. 585-593, 2019.

DEBELIUS, Helmut; KUITER, Rudie H. **Nudibranchs of the world**. Ikan-Unterwasserarchiv, 2007.

DELEON-PENNELL, Kristine Y.; BARKER, Thomas H.; LINDSEY, Merry L. Fibroblasts: The arbiters of extracellular matrix remodeling. **Matrix Biology**, 2020.

DERVISEVIC, Muamer et al. Skin in the diagnostics game: Wearable biosensor nano-and microsystems for medical diagnostics. **Nano Today**, p. 100828, 2019.

DIONÍSIO, Gisela et al. Beauties and beasts: a portrait of sea slugs aquaculture. **Aquaculture**, v. 408, p. 1-14, 2013.

DOS SANTOS SILVA, Priscila Marcelino et al. Insights into anti-pathogenic activities of mannose lectins. **International journal of biological macromolecules**, 2019.

EKAMBARAM, Sanmuga Priya; PERUMAL, Senthamil Selvan; PAVADAI, Selvaranjani. Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. **Inflammopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 147-158, 2017.

FALCÃO, Maria Alice Pimentel et al. Zebrafish as an alternative method for determining the embryo toxicity of plant products: a systematic review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 35, p. 35015-35026, 2018.

FELICE, Francesca et al. Effect of different chitosan derivatives on in vitro scratch wound assay: a comparative study. **International journal of biological macromolecules**, v. 76, p. 236-241, 2015.

GEBAUER, Daiane L. et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 3, p. 480-486, 2011.

NASCIMENTO-NETO, Luiz et al. Characterization of isoforms of the lectin isolated from the red algae *Bryothamnion seforthii* and its pro-healing effect. **Marine drugs**, v. 10, n. 9, p. 1936-1954, 2012.

GONZALEZ, Ana Cristina de Oliveira et al. Wound healing-A literature review. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614-620, 2016.

GOODWIN, C. J. et al. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. **Journal of immunological methods**, v. 179, n. 1, p. 95-103, 1995.

GU, Yanpei et al. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. **Ageing Research**

**Reviews**, p. 101036, 2020.

GUERRA, Ana; BELINHA, Jorge; JORGE, Renato Natal. Modelling skin wound healing angiogenesis: A review. **Journal of theoretical biology**, v. 459, p. 1-17, 2018.

HAN, George; CEILLEY, Roger. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. **Advances in therapy**, v. 34, n. 3, p. 599-610, 2017.

HAWKINS, Robert D.; KANDEL, Eric R.; BAILEY, Craig H. Molecular mechanisms of memory storage in Aplysia. **The Biological Bulletin**, v. 210, n. 3, p. 174-191, 2006.

HILL, Adrian J. et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological sciences**, v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.

HINZ, B. The role of myofibroblasts in wound healing. **Current research in translational medicine**, v. 64, n. 4, p. 171-177, 2016.

HOUGHTON, P. J. et al. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 100-107, 2005.

HU, Xianjing et al. Antitumor effect of a polypeptide fraction from *Arca subcrenata* in vitro and in vivo. **Marine drugs**, v. 10, n. 12, p. 2782-2794, 2012.

HUANG, Yi et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 4, p. 3650-3660, 2014.

JANIS, Jeffrey E.; HARRISON, Bridget. Wound healing: part I. Basic science. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 133, n. 2, p. 199e-207e, 2014.

KANDEL, Eric R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1030-1038, 2001.

KANDEL, Eric R.; SCHWARTZ, James H. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. **Science**, v. 218, n. 4571, p. 433-443, 1982.

KIM, Hye Sung et al. Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing. **Advanced drug delivery reviews**, v. 146, p. 209-239, 2019.

KIYA, Koichiro; KUBO, Tateki. Neurovascular interactions in skin wound healing. **Neurochemistry international**, v. 125, p. 144-150, 2019.

KOEPPEN, Detlev et al. Medicinal leech therapy in venous congestion and various ulcer forms: Perspectives of Western, Persian and Indian medicine. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 10, n. 2, p. 104-109, 2020.

KURTA, Anastasia; PALESTIS, Brian G. Effects of ethanol on the shoaling behavior of zebrafish (*Danio rerio*). **Dose-Response**, v. 8, n. 4, p. dose-response. 10-008. Palestis, 2010.

KWIECIEN, Kamila et al. Architecture of antimicrobial skin defense. **Cytokine & growth**

**factor reviews**, 2019.

LI, Shuxin et al. Imaging in Chronic Wound Diagnostics. **Advances in Wound Care**, v. 9, n. 5, p. 245-263, 2020.

LINDLEY, Linsey E. et al. Biology and biomarkers for wound healing. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 138, n. 3, p. 18S, 2016.

LIU, Ya Mei et al. Photothermal Effect-based Cytotoxic Ability of Melanin from *Mytilus edulis* Shells to Heal Wounds Infected with Drug-resistant Bacteria in vivo. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 33, n. 7, p. 471-483, 2020.

LOH, So Hee et al. Animal lectins: potential receptors for ginseng polysaccharides. **Journal of ginseng research**, v. 41, n. 1, p. 1-9, 2017.

MAGALHÃES, F.E.A et al. Adult zebrafish (*Danio rerio*): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. *Zebrafish*. DOI. 10.1089/zeb.2017. p. 1436, 2017.

MASSONE, Flávio. Anestesia dissociativa. **Clin. Pract**, p. 73-84, 2011.

MYERS, ALONZO H.; POSTLETHWAIT, R. W.; SMITH, ALBERT G. Histologic grading of the experimental healing wound. **Archives of Surgery**, v. 83, n. 5, p. 771-774, 1961.

MOEINI, Arash et al. Wound healing and Antimicrobial effect of active Secondary Metabolites in Chitosan-based Wound dressings: A review. **Carbohydrate Polymers**, p. 115839, 2020.

MOURA, R.M.; QUEIROZ, A.F.S.; FOOK, J.M.S.L.L.; DIAS, A.S.F.; MONTEIRO, N.K.V.; MACEDO, L.L.P.; SANTOS, E.A.; SALES, M.P. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenics bacteria and *Leshmanis promastigotes*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v.145, p.517-523, 2006.

NETO, José Antônio Ribeiro et al. Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 112547, 2020.

NEGUT, Irina; GRUMEZESCU, Valentina; GRUMEZESCU, Alexandru Mihai. Treatment strategies for infected wounds. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2392, 2018.

OBERRINGER, M.; MEINS, C.; BUBEL, M.; POHLEMANN, T. A new in vitro wound model based on the co-culture of human dermal microvascular endothelial cells and human dermal fibroblasts. **Biology of the Cell**, v. 99, n. 4, p. 197-207, 2007.

OECD, Guideline. 203—for testing of chemicals. 1992.

OH, Yunok et al. Amino acid composition, antioxidant, and cytoprotective effect of blue mussel (*Mytilus edulis*) hydrolysate through the inhibition of caspase-3 activation in oxidative stress-mediated endothelial cell injury. **Marine drugs**, v. 17, n. 2, p. 135, 2019.

OPNEJA, Aman; KAPOOR, Sargam; STAVROU, Evi X. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. **Thrombosis research**, v. 179, p. 56-63, 2019.

PEREIRA, Rúben F.; BARTOLO, Paulo J. Traditional therapies for skin wound healing. **Advances in wound care**, v. 5, n. 5, p. 208-229, 2016.

PIETRZYK-BRZEZINSKA, Agnieszka J.; BUJACZ, Anna. H-type lectins—Structural characteristics and their applications in diagnostics, analytics and drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

PINTO, Ana M. et al. Bacteriophages for Chronic Wound Treatment: From Traditional to Novel Delivery Systems. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 235, 2020.

PISSARENKO, Andrei; MEYERS, Marc A. The materials science of skin: Analysis, characterization, and modeling. **Progress in Materials Science**, p. 100634, 2019.

PIZA, Ana Rita de Toledo. **Avaliação e caracterização proteica do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* sobre a capacidade proliferativa de fibroblastos, células endoteliais e em modelos de cicatrização**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PUTZ, Annika; KÖNIG, Gabriele M.; WÄGELE, Heike. Defensive strategies of Cladobranchia (Gastropoda, Opisthobranchia). **Natural product reports**, v. 27, n. 10, p. 1386-1402, 2010.

QUEIROZ, F.S.A.; MOURA, R.M., RIBERIO, J.K.C.; LYRA, I.L.; CUNHA, D.C.S.; SANTOS, E.A.; SALES, M.P. Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 147, I.2, p. 216-221, 2008a.

RANDLES, Michael J. et al. Basement membrane ligands initiate distinct signalling networks to direct cell shape. **Matrix Biology**, 2020.

RAHMATI, M. et al. Designing multigradient biomaterials for skin regeneration. **Materials Today Advances**, v. 5, p. 100051, 2020.

RISS, T. L. Comparison of MTT, XTT and a novel tetrazolium compound MTS for in-vitro proliferation and chemosensitivity assays. **Mol. Biol. Cell**, v. 3, n. 1, p. 184-190, 1992.

RODRIGUES, Melanie et al. Wound healing: a cellular perspective. **Physiological reviews**, v. 99, n. 1, p. 665-706, 2019.

ROSEMBERG, Denis B. et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e19397, 2011.

RUPPERT, Edward E.; BARNES, Robert D. **Zoología de los invertebrados**. 1996.

RUPPERT, Edward E.; FOX, Richard S.; BARNES, Robert D. Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva. In: **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem**

**funcional-evolutiva**. 2005. p. 1045-1045.

SAMADIAN, Hadi et al. Natural polymers-based light-induced hydrogels: Promising biomaterials for biomedical applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 420, p. 213432, 2020.

SANTOS, Ana LE et al. Purification and biophysical characterization of a mannose/N-acetyl-d-glucosamine-specific lectin from *Machaerium acutifolium* and its effect on inhibition of orofacial pain via TRPV1 receptor. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 664, p. 149-156, 2019.

SCHULZ, Christian et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. **Science**, v. 336, n. 6077, p. 86-90, 2012.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.

SHEMESH, Or A.; SPIRA, Micha E. Hallmark cellular pathology of Alzheimer's disease induced by mutant human tau expression in cultured *Aplysia* neurons. **Acta neuropathologica**, v. 120, n. 2, p. 209-222, 2010.

TAYLOR, J. Christopher et al. A novel zebrafish-based model of nociception. **Physiology & behavior**, v. 174, p. 83-88, 2017.

TOLEDO-PIZA, A. R. et al. Proliferation of fibroblasts and endothelial cells is enhanced by treatment with *Phyllocaulis boraceiensis* mucus. **Cell proliferation**, v. 46, n. 1, p. 97-108, 2013.

STRONG, Amy L.; NEUMEISTER, Michael W.; LEVI, Benjamin. Stem cells and tissue engineering: regeneration of the skin and its contents. **Clinics in plastic surgery**, v. 44, n. 3, p. 635-650, 2017.

TEIXEIRA, Marta A. et al. Electrospun Nanocomposites Containing Cellulose and Its Derivatives Modified with Specialized Biomolecules for an Enhanced Wound Healing. **Nanomaterials**, v. 10, n. 3, p. 557, 2020.

TEJIRAM, S. et al. Wound healing. In: **Wound healing biomaterials**. Woodhead Publishing, 2016. p. 3-39.

THAKUR, R.. et al. Practices in wound healing studies of plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p.1-17, 2011.  
Wade Jr LG. Organic chemistry. Prentice-Hall Inc.; 1999

ULAGESAN, Selvakumari; SANKARANARAYANAN, Kamatchi; KUPPUSAMY, Amutha. Functional characterisation of bioactive peptide derived from terrestrial snail *Cryptozona bistrialis* and its wound-healing property in normal and diabetic-induced Wistar albino rats. **International wound journal**, v. 15, n. 3, p. 350-362, 2018.

WANG, Yiwei et al. Burn injury: challenges and advances in burn wound healing, infection,

pain and scarring. **Advanced drug delivery reviews**, v. 123, p. 3-17, 2018.

WANG, Dan et al. The Role of NLRP3 Inflammasome in Infection-related, Immune-mediated and Autoimmune Skin Diseases. **Journal of Dermatological Science**, 2020.

WANG, Jiao; XU, Jixiong. Effects of Topical Insulin on Wound Healing: A Review of Animal and Human Evidences. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 13, p. 719, 2020

WAYNE, N. L. The neuroendocrine bag cells of *Aplysia*: a model system for neural control of hormone secretion. **Journal of endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 1-4, 1995.

WOJTOWICZ, Abigail M. et al. The importance of both fibroblasts and keratinocytes in a bilayered living cellular construct used in wound healing. **Wound repair and regeneration**, v. 22, n. 2, p. 246-255, 2014.

ZUSCHIN, Martin et al. Fossil evidence for chemoautotrophic bacterial symbiosis in the thyasirid bivalve *Thyasira michelottii* from the Middle Miocene (Badenium) of Austria. **Historical Biology**, v. 15, n. 3, p. 223-234, 2001.

XIONG, C.; LI, W.; LIU, H.; ZHANG, W.; DOU, J.; BAI, X.; DU, Y.; MA, X. A normal mucin-binding lectin from the sponge *Craniella australiensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v.143, p.9–16, 2006.