



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**LIVIANE MARIA ALVES RABELO**

**EFEITO DA LECTINA RECOMBINANTE R-FRUTAPINA DE *Artocarpus altilis*  
SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

**FORTALEZA - CE**

**2025**

LIVIANE MARIA ALVES RABELO

**EFETO DA LECTINA RECOMBINANTE R-FRUTAPINA DE *Artocarpus altilis*  
SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal do Ceará como requisito  
parcial para obtenção do título de mestre em  
Farmacologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Nylane Maria  
Nunes de Alencar.

Co-orientador(a): Dr. Felipe Domingos  
de Sousa

**Fortaleza - CE**

**2025**

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

---

R114e Rabelo, Liviane Maria Alves.

Efeito da lectina recombinante r-frutapina de *Artocarpus altilis* sobre o processo de cicatrização: estudos in vitro e in vivo / Liviane Maria Alves Rabelo. – 2025.

92 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Nylane Maria Nunes de Alencar.

Coorientação: Prof. Dr. Felipe Domingos de Sousa.

1. Lectinas vegetais. 2. Proteínas recombinantes. 3. Reepitelização. 4. Balb/c. I. Título.

CDD 615.1

---

LIVIANE MARIA ALVES RABELO

**FEITO DA LECTINA RECOMBINANTE R-FRUTAPINA DE *Artocarpus altilis* SOBRE O  
PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal do Ceará como requisito  
parcial para obtenção do título de mestre em  
Farmacologia.

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Felipe Domingos de Sousa (Coorientador)  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Profa. Mirele da Silveira Vasconcelos  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

*A Jesus Cristo, para que a honra e glória sejam dadas à Ele;  
À minha família, por viabilizar e fazer tudo valer a pena.*

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Deus, por enviar Seu Filho Cristo Jesus e dar significado a minha vida que, além do Seu amor incondicional e imerecido, me abençoou e me sustentou na realização deste objetivo.

Ao meu marido, Davi Fernandes, pelo apoio emocional e incentivos diários que me fortaleceram nessa caminhada. Muito obrigada por acreditar nos meus sonhos e me dar todo o suporte para concluí-los. Amo você.

À minha filha, Maria Laura, que eu descobri sua vinda durante a escrita deste trabalho. Você é a melhor recompensa que Deus poderia me dar. Te amarei eternamente.

À minha irmã Dra. Viviane, por ser o maior exemplo de determinação e força e por ter me incentivado a continuar na pesquisa, sempre ressaltando sua importância.

Aos meus pais, Ana Lúcia e Cleber Rabelo, pelo dom da vida e amor incondicional, pelos incentivos e por acreditarem e confiarem na minha formação.

À minha avó Iolanda, que sempre me apoiou, me incentivou e contribuiu para a minha educação durante toda a minha vida.

À minha madrinha Mariana (*in memoriam*), que me criou e me deu seu amor, atenção e carinho. Sou eternamente grata por tudo o que fez por mim.

Aos meus irmãos, Ana Patrícia (*in memoriam*), Cleilson, Cleber e Clarice, pelo afeto e carinho.

Ao meu primo, Paulo Victor, pelo qual louvo a Deus pela vida e saúde restauradas. Obrigada por ser tão gentil e carinhoso comigo e por me dado o maior exemplo de resiliência.

A todos os meus familiares que contribuíram, de alguma forma, para a minha formação, em especial meus tios Romero e Roberto (*in memoriam*).

À Nira e sua família, por todo carinho e atenção, me apoiando e acolhendo em seu lar sempre que necessário, sendo essencial para a elaboração deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Nylane Alencar, na qual tenho imenso orgulho de ser uma das suas alunas, por toda a sua dedicação e oportunidades para evoluir como estudante. Obrigada por abrir as portas para mim, me acolher em um dos momentos mais difíceis da minha vida e me dar confiança e motivação. Tenho profunda admiração pela sua caminhada, força e determinação não apenas para fazer ciência, mas para lutar pelo que é justo.

Ao meu coorientador Dr. Felipe Domingos de Sousa, por me receber e trabalhar comigo na padronização e execução dos métodos apresentados nesta dissertação com humor e muita dedicação. Sou muito grata pelos ensinamentos e experiências compartilhadas e o apoio oferecido nessa jornada.

Às doutoras da família LFB Dra.Tamiris Goebel, Dra.Taiana Pierdoná, Dra.Gisele Rangel, Dra.Marília Oliveira, Dra.Bianca Kurita, Dra.Kayanny Ferreira e Dra.Luana Carmo por toda a atenção ao compartilhar seus conhecimentos, apoio e carinho durante essa jornada. Obrigada por construírem a minha base científica.

Aos pós-graduandos da UFC Fernanda Soares, Jussara Rodrigues, Jonas França, Vinnie, Gilvan, Dr. Brandon Sousa, Ellen Bianca, Isabelle de Fátima, Gabriela Freire, Arlene, Dilailson, Lorena, David, que me acompanharam no mestrado, por todo apoio emocional e suporte nos experimentos. Não se faz ciência sozinho e vocês foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao querido técnico de laboratório Manuel Monteiro, pela atenção e disposição para ajudar durante os experimentos.

Aos meus queridos estudantes de iniciação científica Marcelo Fernandes, Mireia de Oliveira, Ianah Macilon, João Victor, Ilaine Campos, Tiago Batista e Miguel Ripardo por todo apoio e companheirismo. Vocês me enchem de orgulho ao mostrar comprometimento e atenção em cada experimento.

À Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro por ter aceitado contribuir com este trabalho e participar da banca avaliadora.

A todos os funcionários do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) e Núcleo de Biologia Experimental da Unifor (NUBEX).

Às minhas amigas da faculdade Ellen Gomes, Thalia Lourenço, Nayara Lima e Jessyca Norberto pelos almoços compartilhados, pela terapia em grupo, pela força, pelo companheirismo e pela amizade.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

A Frutapina é uma lectina com afinidade por glicose/manose presente em sementes de *Artocarpus altilis* (fruta-pão) e apresenta semelhança estrutural com Artocarpina, conhecida por suas propriedades imunoestimulantes e cicatrizantes. Considerando seu baixo rendimento de extração natural, a expressão da sua forma recombinante em *Escherichia coli* foi padronizada, e, assim, aumentou sua produção, viabilizando estudos sobre seu potencial farmacológico. Este trabalho teve como objetivo a investigar a forma recombinante da frutapina (rFTP) quanto ao seu potencial cicatrizante *in vitro* e *in vivo* através da avaliação da viabilidade de Fibroblastos (L929), Queratinócitos (HaCaT) e Macrófagos (RAW 264.7) (resazurina), bem como a produção de Óxido Nítrico (Griess) e Citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 (Elisa) no sobrenatante da RAW 264.7. Em seguida, a rFTP (0,1%, 0,5% e 1%) foi incorporada em biomembranas de Xiloglucana e testada em feridas excisionais de camundongos *BALB/c* (n=6animais/grupo), comparando-se com os controles sem tratamento (Sham) e biomembrana, sem o ativo. Os animais foram eutanasiados após 3, 7 e 14 dias após a cirurgia. A rFTP (0,15 – 1mg/mL) aumentou a proliferação da L929, HaCaT, bem como modulou a resposta inflamatória da RAW 264.7, em comparação ao grupo CTRL, aumentando significativamente a proliferação e a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e reduzindo os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 e IL1 $\beta$  com e sem LPS. A biomembrana de xiloglucana contendo rFTP na concentração de 0,1% acelerou a contração das lesões e diminuiu o infiltrado inflamatório no 3º e 7º dia. Além disso, a espessura epitelial foi significativamente maior nos grupos tratados com rFTP (0,1%) em comparação aos grupos sham e controle, evidenciando a capacidade da rFTP de estimular a regeneração tecidual e estruturação da matriz extracelular. Os níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 foram reduzidos e houve um aumento considerável de IL-10, sugerindo que a rFTP modula inflamação. Esses resultados indicam que a rFTP é uma candidata promissora para o manejo de feridas através do controle inflamatório e estimulação regenerativa. Dessa forma, este trabalho impulsiona estudos adicionais para elucidar os mecanismos moleculares específicos da rFTP e avaliar sua eficácia e segurança em ensaios clínicos.

**Palavras-chave:** *Lectinas vegetais*, proteínas recombinantes, reepitelização, *BALB/c*.

## ABSTRACT

### EFFECT OF THE RECOMBINANT LECTIN R-FRUTAPIN FROM ARTOCARPUS ALTILIS ON THE WOUND HEALING PROCESS: IN VITRO AND IN VIVO STUDIES

Frutapin is a lectin with affinity for glucose/mannose found in the seeds of *Artocarpus altilis* (breadfruit) and shares structural similarity with artocarpin, which is known for its immunostimulatory and wound-healing properties. Given its low natural extraction yield, the expression of its recombinant form in *Escherichia coli* was standardized, thereby increasing its production and enabling studies on its pharmacological potential. This study aimed to investigate the recombinant form of frutapin (rFTP) for its wound-healing potential in vitro and in vivo by evaluating the viability of fibroblasts (L929), keratinocytes (HaCaT), and macrophages (RAW 264.7) using the resazurin assay, as well as nitric oxide production (Griess assay) and cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-10 (ELISA) in RAW 264.7 cell supernatants. Subsequently, rFTP (0.1%, 0.5%, and 1%) was incorporated into xyloglucan-based biomembranes and tested in excisional wounds in BALB/c mice (n = 6 animals/group), compared with untreated controls (sham) and biomembrane without the active compound. The animals were euthanized on days 3, 7, and 14 post-surgery. rFTP (0.15–1 mg/mL) increased the proliferation of L929 and HaCaT cells and modulated the inflammatory response in RAW 264.7 macrophages compared to the CTRL group, significantly enhancing proliferation and IL-10 production while reducing the levels of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ , both in the presence and absence of LPS. The xyloglucan biomembrane containing 0.1% rFTP accelerated wound contraction and reduced inflammatory cell infiltration on days 3 and 7. Moreover, epithelial thickness was significantly higher in the rFTP-treated groups (0.1%) compared to the sham and control groups, highlighting rFTP's ability to stimulate tissue regeneration and extracellular matrix remodeling. Levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 were reduced, while IL-10 was considerably increased, suggesting that rFTP modulates inflammation. These results indicate that rFTP is a promising candidate for wound management by promoting inflammatory control and regenerative stimulation. Thus, this work encourages further studies to elucidate the specific molecular mechanisms of rFTP and to assess its efficacy and safety in clinical trials.

**Keywords:** Plant lectins, recombinant proteins, re-epithelialization, BALB/c.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - As camadas da pele.....	19
Figura 2 - Junções de adesão entre células epidérmicas.....	21
Figura 3 - Fases da cicatrização.....	24
Figura 4 - <i>Artocarpus altilis</i> (fruta-pão) .....	36
Figura 5 - Sítios de ligação a manose e à glicose .....	38
Figura 6 - Unidades de glicose das Xiloglucanas.....	39
Figura 7 - Cromatograma de eluição da rFTP .....	50
Figura 8 - Gel SDS PAGE Fração retida da rFTP .....	51
Figura 9 - Ensaio de hemaglutinação em hemácias de coelho .....	52
Figura 10 - Viabilidade celular de Fibroblastos L929 .....	53
Figura 11 - Viabilidade celular de Queratinócitos HaCaT .....	54
Figura 12 - Viabilidade celular de macrófagos murinos RAW 264.7 .....	55
Figura 13 - Efeito da rFTP sobre a produção de nitrito no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 estimulados ou não por LPS .....	56
Figura 14 - Níveis de citocinas no sobrenadante de RAW 264.7 em 24, 48 e 72 horas .....	58
Figura 15 - Taxa de contração das lesões (%).....	60
Figura 16 - Representação fotográfica do seguimento clínico das úlceras.....	61
Figura 17 - Fotomicrografias da área ulcerada na pele após 3, 7 e 14 dias nos grupos experimentais (HE).....	61
Figura 18 - Fotomicrografias da área ulcerada na pele após 14 dias nos grupos experimentais (HE) .....	62
Figura 19 - Efeito do tratamento com rFTP nos níveis de TNF-a, IL-1b, IL-6 e IL-10 nas lesões cutâneas .....	65

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Parâmetros histológicos para análise da lesão por H&E.....	48
Tabela 2 - Representação por escores da avaliação histológica das úlceras .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
BCA	Ácido bicinconínico
CTRL	Controle
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
H&E	Hematoxilina e eosina
HaCaT	Linhagem de queratinótipos humanos
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
i.p.	Intraperitoneal
LB	Caldo Lúria-Bertani
L929	Linhagem de fibroblastos murinos
LPS	Lipopolissacarídeo S
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases de matriz extracelular
NO	Óxido Nítrico
RAW 264.7	Linhagem de macrófagos murinos
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TLR 4	Receptor Toll-like 4
TNF- $\alpha$	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
rFTP	Frutapina recombinante
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
SUS	Sistema Único de Saúde

“A curiosidade é o começo da sabedoria.” –

Anne With An E

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>19</b>
2.1	A pele.....	19
2.2	Lesões cutâneas .....	22
2.3	O processo cicatricial em lesões cutâneas.....	23
2.4	Fatores que afetam a cicatrização .....	28
2.5	Modelos experimentais para o estudo da cicatrização.....	29
2.6	Tratamentos disponíveis para a cicatrização de feridas .....	31
2.7	Bioprospecção de ativos cicatrizantes.....	31
2.8	Lectinas Vegetais .....	32
2.9	Gênero <i>Artocarpus</i> .....	35
2.10	<i>Artocarpus altilis</i> .....	35
2.11	<i>Frutapina</i> .....	37
2.12	Xiloglucanas .....	39
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
3.1	Objetivo Geral.....	41
3.2	Objetivos específicos .....	41
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
4.1	Expressão da rFTP em cepas de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) .....	42
4.2	Ensaios <i>in vitro</i> .....	43
4.3	Ensaio <i>in vivo</i> .....	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
5.1	Expressão e purificação da rFTP em cepas de <i>E. coli</i> .....	50
5.2	A pureza da rFTP foi validada por SDS-PAGE .....	51
5.3	A atividade hemaglutinante da rFTP manteve-se preservada .....	51
5.4	Efeito da rFTP na viabilidade celular em diferentes doses e tempos de incubação.....	52
5.5	A rFTP 50 µg/mL reduziu a produção de óxido nítrico por rFTP em macrófagos RAW 264.7 tratados com e sem LPS.....	56
5.6	rFTP modulou os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-10 em 24, 48 e 72 horas.....	56
5.7	O tratamento com a Biomembrana de Xiloglucana contendo rFTP aumenta a contração de feridas excisionais.....	58
5.8	rFTP reduz o infiltrado inflamatório no 3º dia de cicatrização .....	61

5.9 rFTP aumentou a espessura do epitélio no 14º dia de cicatrização .....	62
5.10rFTP modula citocinas pró e anti-inflamatória na fase proliferativa e de remodelamento	64
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e é responsável pela proteção contra agentes externos, regulação da temperatura, prevenção contra a desidratação, percepção sensorial, equilíbrio de fluidos e eletrólitos e, portanto, essencial para a sobrevivência e bem-estar (MPHANDE, 2020). Por revestir a superfície corporal, a pele está naturalmente exposta a agentes agressores que podem causar uma ruptura na sua continuidade e alterar sua estrutura anatômica e até sua fisiologia. Por contribuir diretamente para a homeostase do organismo, a restituição do tecido deve ocorrer em tempo hábil (DINIZ *et al.*, 2022).

Imediatamente após a lesão, o organismo reage e estabelece a cicatrização por meio de quatro fases clássicas, sobrepostas e contínuas que são: hemostasia, inflamação, proliferação celular e remodelação tecidual. Esse processo ocorre por meio da ativação e interação de células residentes e recrutadas, citocinas, quimocinas e fatores de crescimento. A complexidade da dinâmica dependerá do grau de comprometimento da área lesionada e a transição da fase inflamatória para a fase de proliferação celular pode ser uma das etapas mais críticas (RODRIGUES, MELANIE *et al.*, 2019).

O processo cicatricial pode ser afetado por fatores intrínsecos, como o envelhecimento e alterações hormonais (GILLIVER; ASHWORTH; ASHCROFT, 2007), e por fatores extrínsecos, como infecções bacterianas e fúngicas, que prolongam a fase inflamatória com a dinâmica requerida para conte-los. Além disso, o estresse e a má alimentação podem comprometer a resposta imunológica e a síntese de colágeno (GUO, S.; DIPIETRO, 2010). Doenças crônicas, como diabetes, obesidade, imunodeficiências e doenças vasculares também são agravantes desse processo e podem estagnar a cicatrização (WILKINSON; HARDMAN, 2023a).

As feridas de difícil cicatrização causam muitos transtornos ao paciente, que, além da dor e do incômodo que compromete as suas atividades diárias, torna-o mais suscetível a infecções, com agravamento do quadro clínico. Somando-se a isso, esta condição produz altos índices de danos psicossociais, e, frequentemente, os pacientes apresentam uma qualidade de vida diminuída. É válido frisar a geração de altos gastos com a saúde, pois demanda profissionais especializados e materiais constantemente. O impacto psíquico, social e econômico da cronificação de lesões impulsiona a busca por novas opções terapêuticas eficazes (SEN, 2021).

Atualmente, há um arsenal de estratégias e recursos farmacêuticos para a cicatrização de feridas. Dentre eles, cita-se: curativos com alginato de cálcio, hidrocolóides e membranas de colágeno, laserterapia, ultrassom terapêutico e microcorrentes. Porém, essas opções têm um custo elevado e são de difícil acesso, não atendendo a demanda real desses produtos. Com isso, muitos pacientes ficam sem o tratamento adequado para sua condição e seu quadro clínico pode ser agravado (MIRHAJ *et al.*, 2022).

As lectinas são conceituadas como um grupo heterogêneo de proteínas ou glicoproteínas amplamente distribuídas na natureza, que possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de se ligar de maneira específica e reversível à carboidratos. Essa habilidade permite a sinalização de células e mediadores envolvidos na resposta inflamatória responsáveis pela regeneração do tecido epitelial através do recrutamento de neutrófilos (DE SOUSA *et al.*, 2019a; GONZAGA, 2011), proliferação de fibroblastos (GONZAGA, 2011), secreção de TGF- $\beta$  e VEGF (HWANG *et al.*, 2018; KIM, YEON JUNG *et al.*, 2020a) e da produção da metaloproteinase-9 (MMP-9) (BRUSTEIN *et al.*, 2012). Nesse sentido, as lectinas têm sido consideradas potenciais candidatas para desenvolvimento de ferramentas medicinais baseadas em interações proteína-carboidrato (BARBOSA *et al.*, 2021).

Frutapina (FTP) é uma lectina isolada das sementes da *Artocarpus altilis*, uma planta popularmente conhecida como fruta-pão e interage especificamente com resíduos de glicose e manose. Além da FTP, foi isolada também a Fratalina, uma lectina mais abundante que a FTP, sendo uma molécula quimiotática potente para neutrófilos, estimuladora de linfócitos, citotóxica para células tumorais, cicatrizante em modelos *in vitro* e *in vivo* e indutora da ativação do receptor TLR4, importante estímulo da resposta imune inata (CAMPANA *et al.*, 2002; DE SOUSA *et al.*, 2019b; OLIVEIRA; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2014).

Em sementes de *Artocarpus integrifolia* (jaca), do mesmo gênero, também foram isoladas duas lectinas, a Jacalina e Artocarpina. A Jacalina é ligante do anticorpo Ig-A, linfócito CD-4 e de células tumorais. A Artocarpina é potente estimuladora do sistema imune (COLTRI *et al.*, 2008; PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2001), além de apresentar potencial para aplicações em cicatrização de feridas (CHAHUD *et al.*, 2009).

Apesar da analogia estrutural da frutapina (FTP) com outras lectinas do gênero *Artocarpus*, principalmente com a Artocarpina, ainda há poucos estudos devido ao laborioso processo de isolamento e seu baixo rendimento e, durante a extração, normalmente é descartada. Assim, De Sousa (2017) otimizou a produção da frutapina recombinante em *Escherichia coli*,

com rendimento ( $>40\text{mg}$  de frutapina/L de cultura) e preservação da funcionalidade pelo teste hemaglutinante e ação estimulatória da proliferação de fibroblastos humanos 3T3 *in vitro*, além de efeito modulador do sistema imune, pela interação com o receptor Toll-like 4 (TLR 4) e aumento da produção de IL-6 em fibroblastos.

Na cicatrização, os biomateriais são usados desde os primeiros escritos médicos, com achados egípcios do uso de mel, graxa e fibra vegetal para tratar feridas (DAS; BAKER, 2016). Conceituados como compostos de origem natural biocompatíveis, biodegradáveis e hipoalergênicos (BEDIAN *et al.*, 2017), os sistemas contendo polissacarídeos biológicos despertam o interesse de biotecnologistas, devido às suas características estruturais, propriedades reológicas e aplicabilidade, além de apresentarem vantagens sobre os polímeros sintéticos, como a produção por fontes renováveis em larga escala (CEVOLI *et al.*, 2013; PRAJAPATI *et al.*, 2013).

Xiloglucanas são polissacarídeos de alto peso molecular derivados das sementes de *Tamarindus indica Linn.*, da família *Leguminosae*. Sua estrutura compreende uma cadeia principal de glucana com cadeias laterais de xilose e galactose, conferindo-lhe a capacidade de formação de géis e mucoadesão (RODRIGUES, DELANE C. *et al.*, 2018). Aliado à biocompatibilidade e biodegradabilidade, a possibilidade de modificações em sua estrutura química permite que as xiloglucanas sejam candidatos promissores para sistemas de liberação de fármacos. Dessa forma, o estudo de Biomembranas de xiloglucana permite a exploração e avaliação deste recurso, podendo responder lacunas científicas ainda não exploradas (KULKARNI *et al.*, 2017).

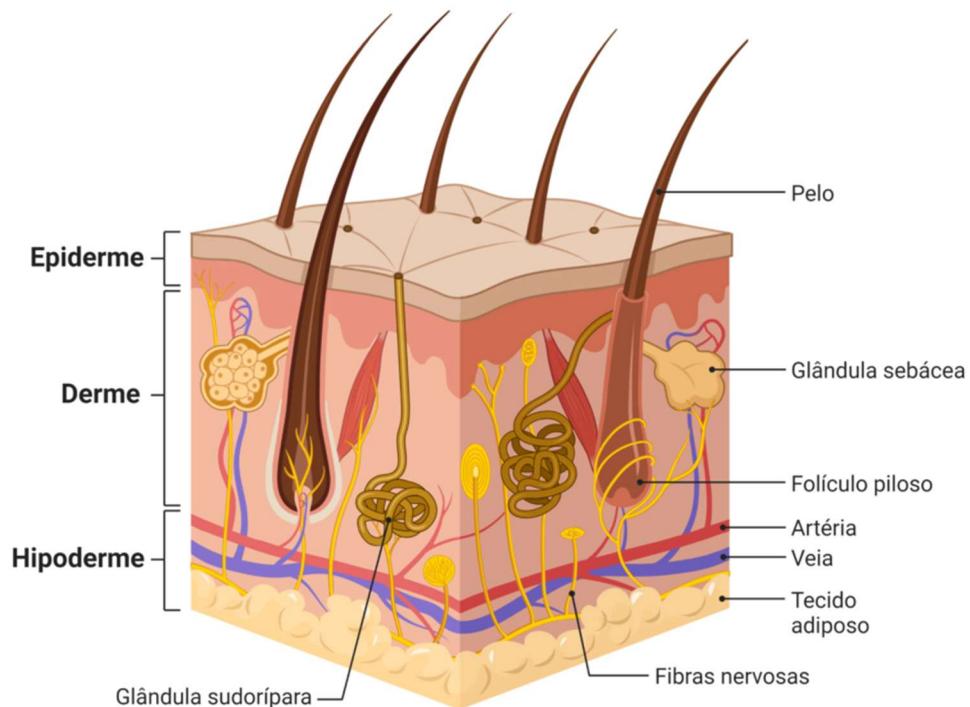
Este trabalho propôs a investigação da modulação do processo de cicatrização de feridas em culturas celulares e em camundongos *BALB/c*, usando uma lectina em matrizes de polissacarídeo, apresentando-se como uma formulação genuinamente natural em forma de biomembrana. Dessa forma, foram extraídas xiloglucanas de sementes de *Tamarindus indica Linn.*, e foi incorporado a lectina obtida através de expressão em bactérias, formando uma biomembrana que foi utilizada para investigar o potencial imunomodulador e cicatrizante. Além da utilização de um subproduto que seria anteriormente descartado, esse estudo contribuiu para avanços no campo biotecnológico.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a cerca de 15% do peso corporal (DINIZ *et al.*, 2022). Atua como a principal barreira contra agentes externos, além de cooperar para a regulação da temperatura e prevenção contra desidratação. Contém células imunes que detectam e combatem infecções, bem como é capaz de produzir glicocorticoides e vitamina D. A percepção sensorial é outro aspecto importante, permitindo que o organismo interaja e responda a estímulos ambientais. Dessa forma, contribui diretamente para a integridade e homeostase do organismo (JIN, *et al.*, 2022).

Figura 1 - As camadas da pele



Fonte: JUNQUEIRA (2013, p. 45).

#### 2.1.1 Epiderme

As principais camadas da pele são: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). A epiderme é a camada mais externa, em contato direto com o meio ambiente. Em humanos, a espessura

média pode variar entre 0,05 a 1,5mm. É composta predominantemente por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, não possui vasos sanguíneos e é dependente da difusão de nutrientes da derme. As principais funções são: percepção de estímulos externos e sensação tátil; regulação da perda de água e proteção contra agentes patógenos, químicos e radiação UV (WILKINSON; HARDMAN, 2023b).

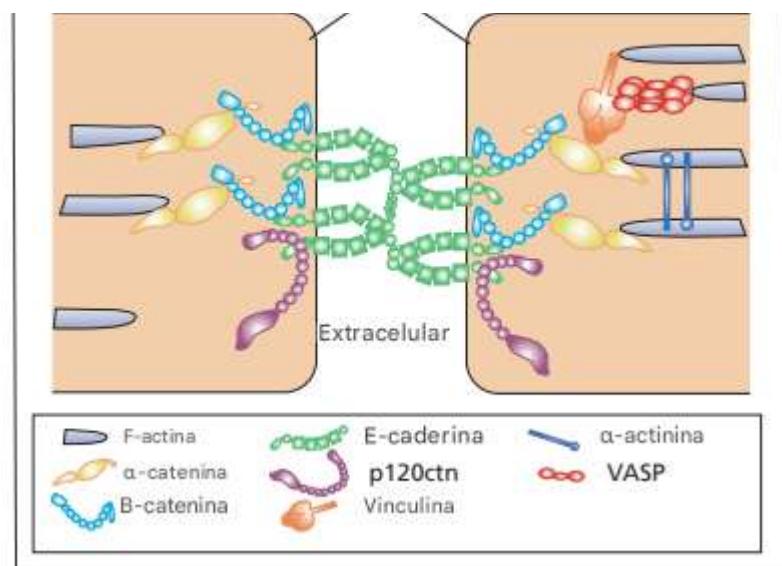
Organiza-se em estratos basal, espinhoso, granuloso e córneo. Mais externamente tem-se o estrato córneo, uma camada que descama continuamente, com vários queratinócitos anucleados e sem organelas, que, juntamente com a queratina, uma proteína fibrosa que dá firmeza, atuam como barreira impermeabilizadora da pele. Em áreas mais espessas, como palmas e plantas, há uma barreira adicional, o estrato lúcido. Este é composto por células mortas que contém eleidina, um tipo de queratina (MENKE *et al.*, 2007).

O estrato granuloso é composto por queratinócitos conectados por desmossomos e junções GAP em processo de perda de vitalidade (Figura 2) (BURNS; ROOK, 2010; WIBBE; EBNET, 2023). Essas células acumulam grânulos de queratohialina, contribuindo para a formação da queratina. O estrato espinhoso proporciona resistência e elasticidade à pele. É composto por queratinócitos que estão em processo de diferenciação e unidos por desmossomos. Há também células de Langherans, um tipo de célula dendrítica que contém os grânulos de Birbeck. Elas atuam como apresentadoras de antígeno, capturando, processando e apresentando para células T, impulsionando a resposta imune (LINDER, *et al.*, 2020).

O estrato basal ou camada germinativa é a porção mais profunda da epiderme composta por um epitélio simples cuboide com queratinócitos em divisão que produzem queratina e movimentam-se para cima. Os queratinócitos são unidos entre si por junções aderentes, permitindo a coesão celular e são ancorados à camada basal por hemidesmossomos, garantindo a conexão com a derme adjacente. Além disso, as junções Gap permitem a comunicação entre as células, facilitando a sinalização e oferta de nutrientes (MPHANDE, 2020).

Na camada basal também são encontrados os melanócitos, que são células produtoras de melanina, que é transferida para os queratinócitos, conferindo a pigmentação da pele e proteção contra as radiações UV (GOLDSMITH, 1991). Também são encontradas as células de Merkel, especializadas em percepção sensorial, atuando como mecanorreceptores em terminações nervosas que são sensíveis ao toque e à pressão (HASHIMOTO, 1972).

Figura 2 - Junções de adesão entre células epidérmicas



Fonte: Adaptado de BURNS (2010).

### 2.1.2 *Derme*

Em conexão com a epiderme, a derme contém vasos sanguíneos que fornecem nutrientes e oxigênio, terminações nervosas, que permitem a percepção de estímulos táteis, térmicos e dolorosos e células imunológicas que oferecem proteção contra agentes patogênicos (VESTITA, *et al.*, 2022). A derme é rica em componentes da Matriz Extracelular (MEC), como colágeno e elastina, que são cruciais para a estrutura e função da pele.

As principais células que compõem a derme são os fibroblastos, responsáveis pela produção de colágeno e elastina; mastócitos, especializados em produção de histamina, envolvida em processos alérgicos e inflamação; macrófagos, que são fagócitos responsáveis pela defesa contra patógenos e maestros da dinâmica da renovação celular e células endoteliais, responsáveis pela formação dos vasos sanguíneos (MYUNG, *et al.*, 2022).

Dessa forma, a derme é subdividida em camadas papilar e reticular. A derme papilar é mais superficial e caracterizada por um tecido conjuntivo frouxo contendo rede complexa de fibras colágenas finas, com predominância do colágeno do tipo III, formando uma estrutura mais frouxa e entrelaçada, permitindo maior flexibilidade e elasticidade, aumentando a área de superfície para a troca de nutrientes e adesão entre as camadas (NIKOLAEV *et al.*, 2023). As terminações nervosas dessa camada incluem os corpúsculos de Meissner, que são receptores

encapsulados encontrados na pele não peluda como palmas das mãos e pés, responsáveis pela percepção das texturas e estímulos sutis de vibrações e toques leves (SUAZO *et al.*, 2022).

A derme reticular está em contato com a camada subcutânea e é composta por tecido conjuntivo denso irregular, caracterizado por fibras colágenas mais grossas, do tipo I, conferindo mais resistência à tração. Os corpúsculos de Pacini ou lamelados, são especializados em estímulos nervosos mais intensos, detectando pressões mais profundas e vibrações de alta frequência (SUAZO *et al.*, 2022).

Os principais anexos presentes na camada reticular são os folículos pilosos, que dão origem aos pelos, às glândulas sudoríparas, produtoras de suor, sendo elas ecrinas, presentes em toda a superfície corporal, regulando a temperatura, e as glândulas apócrinas, localizadas nas axilas e genitálias, produzindo feromônios. Também são encontradas as glândulas sebáceas, produzindo o sebo que lubrifica e protege a pele (MYUNG; ANDL; ATIT, 2022).

### **2.1.3 *Hipoderme***

Também conhecida como tecido subcutâneo, a hipoderme é a camada mais profunda da pele e está conectada com os músculos, permitindo a mobilidade da pele. É caracterizada pela presença predominante de adipócitos, células que armazenam a gordura, desempenhando um papel importante no isolamento térmico e metabolismo energético, bem como proteção contra traumas e impactos (SANCHEZ *et al.*, 2022).

Além disso, há a presença de fibroblastos, macrófagos e mastócitos, vasos sanguíneos e nervos, sendo a base para a inserção dos anexos da derme. É válido ressaltar que a hipoderme pode ter sua espessura afetada pelo estilo de vida do indivíduo, podendo gerar quadros de obesidade, diabetes, alterações vasculares, lipodistrofia e celulites (VERONESE *et al.*, 2021).

## **2.2 Lesões cutâneas**

Por estar em contato direto com o meio ambiente, a pele está naturalmente exposta a agentes agressores, que podem ser físicos, químicos ou térmicos, podendo gerar uma lesão. Os traumas físicos são os mais comuns e podem resultar de impactos diretos, como cortes e perfurações. Os traumas químicos estão associados a contato com produtos corrosivos ou irritantes e as queimaduras podem estar associadas a exposição a altas temperaturas ou radiação (WILKINSON; HARDMAN, 2023a). .

### **2.2.1 *Lesões cutâneas agudas***

As feridas agudas são consideradas quando há a perda da integridade do tecido, mas a restauração é espontânea, seguindo uma progressão oportuna e ordenada, durando entre 4 e 6 semanas (DAI, CHRISTINA; SHIH; KHACHEMOUNE, 2020). Elas podem ser causadas por lesões traumáticas, abrasões, queimaduras ou podem ser consequência de procedimentos cirúrgicos, mudanças extremas de temperatura, contato com produtos químicos, exposição à radiação ou infecção. Normalmente, a extensão da lesão pode influenciar diretamente no tempo de cicatrização (RAZIYEVA *et al.*, 2021).

Com isso, as lesões agudas também podem ser classificadas de acordo com seu tamanho, profundidade e localização. As lesões superficiais, como pequenos cortes ou abrasões cicatrizam rapidamente e não causam prejuízos significativos ao acometido. No entanto, quando há a perda da integridade da pele atingindo camadas mais profundas, como a derme papilar, há a formação de úlcera, podendo resultar em desabilidades ou até mesmo óbito (DAI, CHRISTINA; SHIH; KHACHEMOUNE, 2020).

### **2.2.2 *Lesões cutâneas crônicas***

As feridas crônicas, ao contrário das agudas, requerem um tempo de cicatrização estendido a mais de 12 semanas (BERTHIAUME; HSIA, 2024). Isso ocorre devido a um estado de inflamação prolongado, que pode estar associado a irregularidades na inflamação, grande extensão da ferida, exposição a infecções, ou presença de fatores agravantes, como idade, diabetes, doença vascular e câncer associados ou não, afetando negativamente o processo de reparo de feridas, que resulta em uma incapacidade cicatricial (DAI, CHRISTINA; SHIH; KHACHEMOUNE, 2020).

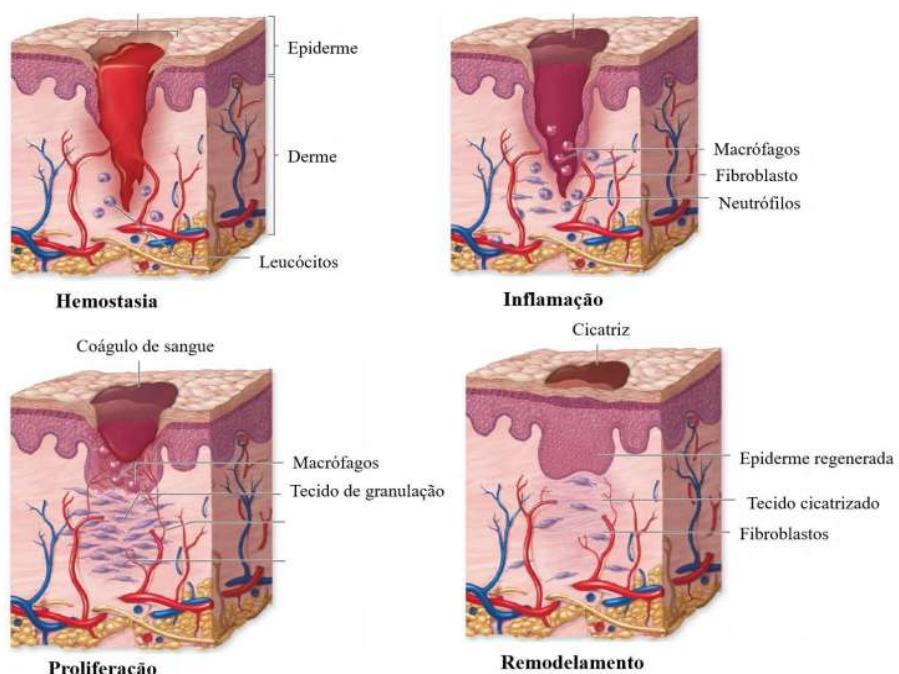
Alguns tipos de feridas que tem uma cicatrização complexa e lenta são as úlceras de pernas ou pé, isquêmicas, venosas, arteriais, úlceras diabéticas e úlceras de pressão. Além disso, pode haver ainda a formação de cicatrizes hipertróficas, conhecidas como quelóides. Os mecanismos subjacentes à formação de cicatrizes em lesões crônicas ainda são pouco compreendidos, e faltam opções de tratamentos eficazes para essas situações (SCHILRREFF; ALEXIEV, 2022). É valido acrescentar que, conforme essas feridas cronificam, os pacientes tendem a viver com a reincidência destas, e casos mais graves podem levar à morte.

## **2.3 O processo cicatricial em lesões cutâneas**

A fisiopatologia do processo cicatricial após o rompimento da continuidade anatômica da pele envolvendo epiderme e/ou derme inicia instantaneamente e é um processo biológico complexo e multifatorial que, didaticamente, pode ser dividido em quatro fases sequenciais, porém sobrepostas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento tecidual (Figura 3) (WILKINSON; HARDMAN, 2023b).

Sendo orquestrada pelos macrófagos, a cicatrização objetiva restaurar a homeostasia e a integridade do tecido por meio da cascata de coagulação e da inflamação. Células como neutrófilos, endoteliais, queratinócitos e fibroblastos, passam por modificações importantes levando à proliferação, diferenciação e migração celular (GURTNER et al., 2008). Citocinas, fatores de crescimento, proteinases e moléculas de adesão direcionam as interações celulares com componentes da matriz extracelular do tecido, estabelecendo todas as fases da cicatrização (WILKINSON; HARDMAN, 2023b).

Figura 3 - Fases da cicatrização



Fonte: Adaptado de PRENTICE; QUILLEN; UNDERWOOD (2005).

### 2.3.1 A fase de hemostasia

A fase de hemostasia ocorre imediatamente após a lesão e objetiva tamponar o sangramento e preparar o microambiente para os processos seguintes. Assim, ocorre

vasoconstricção e agregação trombocitária para a formação de um coágulo por meio da ativação dos fatores de coagulação, tendo como protagonistas as plaquetas, que entram em contato com o colágeno exposto e outros elementos da MEC, desencadeando a liberação fatores de coagulação, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e sinalizadores químicos, como o tromboxano A2 e o ADP, e, assim, aderem a área lesionada por meio do fator de Von Willebrand, criando uma rede com a fibrina ativada obtida a partir do fibrinogênio, cessando o sangramento local (OPNEJA; KAPOOR; STAVROU, 2019).

A degranulação das plaquetas e os subprodutos da proteólise da fibrina e outros componentes da matriz, liberaram consequentes sinais quimiotáticos, como a citocina IL-8, promovendo o recrutamento de neutrófilos e monócitos para a área da ferida que iniciarão a limpeza da área lesionada por meio da fagocitose dos detritos celulares e patógenos invasores. (GALLAGHER *et al.*, 2024). Esta fase inicia a liberação de fatores de crescimento e citocinas que influenciam a promoção da angiogênese e fase inflamatória. (Qiu *et al.*, 2024).

### 2.3.2 *A fase inflamatória*

A inflamação consiste em uma resposta protetora e facilitadora no reparo tecidual, sendo essencial para a eliminação de potenciais agentes patogênicos invasores e ativação dos eventos reparadores. No entanto, se não houver um equilíbrio nos mecanismos, se torna potencialmente prejudicial, podendo levar a um estado de cronificação e fibroses (SOLIMAN, *et al.*, 2022).

Sendo simultâneo ao estabelecimento da fase de hemostasia, o início da resposta inflamatória é marcado pela migração de células inflamatórias, primeiramente neutrófilos, seguidos de monócitos, para o local da lesão para remover detritos e patógenos. Citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) estão envolvidos na coordenação desse processo (KOH; DIPIETRO, 2011).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem no local da lesão. Polarizados para o perfil inflamatório N1, realizam a limpeza inicial por meio da fagocitose de detritos celulares e destruição de microrganismos invasores pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são essenciais para prevenir infecções (PHILIPSON *et al.*, 2018). Além disso, produzem as Armadilhas Extracelulares Neutrofílicas (NETs), que são estruturas que auxiliam na captura e destruição de patógenos (ZHU, *et al.*, 2024). Os neutrófilos também influenciam o

comportamento dos macrófagos para a polarização para o fenótipo M1, que é pró-inflamatório (MIHAILA, et al., 2024).

Os macrófagos se acumulam no ambiente inflamado e permanecem vários dias, atuando como maestros desta fase e contribuindo para digestão de microrganismos sobreviventes, remoção de neutrófilos mortos e debris celulares, degradação do tampão de fibrina e liberação de óxido nítrico (NO) (WANG, et al., 2011). Eles também secretam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento endotelial (EGF), TGF- $\beta$ , PDGF e VEGF. Os fatores de crescimento impulsionam a proliferação de fibroblastos e queratinócitos na fase proliferativa. Dessa forma, os macrófagos são células-chave para estruturar a transição da inflamação para a proliferação celular.

### **2.3.3 A fase proliferativa**

Com o fim da fase inflamatória, inicia-se a fase proliferativa, que dura de 3 a 21 dias e é um ponto regulatório crítico marcado pela angiogênese, produção de tecido de granulação e produção de colágeno do tipo III por fibroblastos. Nesse momento, são liberados fatores de crescimento, como fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (WEINHEIMER-HAUS; MIRZA; KOH, 2015; WOOD et al., 2014). Esse processo permite a formação de uma matriz extracelular robusta para a proliferação e migração dos queratinócitos e fechamento da lesão e a interrupção ou atraso pode comprometer a cicatrização (BUMBUC, et al., 2023).

Durante a fase proliferativa, os fibroblastos que migraram para o local se diferenciam em miofibroblastos e iniciam a produção de elastina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e colágeno do tipo III para estruturar o tecido de granulação (KING, et al., 2020). O colágeno é primordial nesta etapa, proporcionando força e integridade ao tecido neoformado. (SIEMIONOW; EISENMANN-KLEIN, 2010).

Nessa fase, os macrófagos começam a se polarizar para o perfil M2, anti-inflamatório, e impulsiona as células endoteliais a formarem novos vasos sanguíneos, e, juntamente com os fibroblastos, há a liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) (ELBIALY et al., 2020). Vale frisar que os pericitos, que são células especializadas que se localizam na parede dos vasos sanguíneos, serão os responsáveis por conferir estabilidade, maturação e remodelação dos vasos neoformados (KIM,

*et al.*, 2022). Durante a fase proliferativa, são ativados e são capazes de secretar marcadores pró-angiogênicos, como o VEGF-A, promovendo ainda mais a angiogênese (CHOPRA, *et al.*, 2022).

Com isso, os queratinócitos se proliferam intensamente, se diferenciam e se estratificam em camadas, recompondo a barreira epitelial, mediados, principalmente pelo fator de crescimento dos queratinócitos (KGF) (BÁRTOLO, *et al.*, 2021). Há, também, o aumento da expressão de genes, como a eIF2 kinase GCN2, coordenando a geração de ROS e a manutenção dos aminoácidos que são importantes para esse processo, bem como o gene MMP1 e TIMP1, regulados positivamente durante a fase proliferativa e início do remodelamento tecidual (ÅGREN, *et al.*, 2022). Há, portanto, uma intensa atividade celular para a formação de uma nova matriz que sustente o tecido recém formado (GONZALEZ *et al.*, 2016; SINNO; PRAKASH, 2013).

Paralelamente, os miofibroblastos, derivados de fibroblastos ativados sob o estímulo do TGF- $\beta$ , se contraem para diminuir o tamanho da ferida e reaproximação das bordas lesionadas. Essa etapa é importante para preparar o ambiente para a fase de remodelamento. Há, portanto, uma reorganização progressiva da matrix extracelular (MEC) e substituição do colágeno tipo III para o tipo I, mais maduro. O colágeno recém sintetizado começa a se organizar em feixes mais densos e alinhados e as enzimas, como metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) começam a remodelar o seletivamente o tecido neoformado (VOLOVAR, *et al.*, 2023).

#### **2.3.4 A fase de remodelamento**

A fase de remodelamento é o estágio final do processo de cicatrização e dura cerca de 2 meses a um ano e é crucial para o fortalecimento e a maturação do tecido neoformado. É nesta fase que ocorre a síntese e degradação contínuas do colágeno, incluindo a transição do colágeno do tipo III, para o tipo I, que é mais maduro, bem como a organização das fibras colágenas inferindo resistência à tração (SPIELMAN, *et al.*, 2022). O número de fibroblastos, a vascularização e a atividade metabólica diminuem consideravelmente e o refinamento tecidual é estabelecido por meio de metaloproteinases da matriz (MMPs) e seus inibidores teciduais (TIMPs), outros fatores de crescimento, como fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) (VOLOVAR, *et al.*, 2023).

A fase de remodelação tem o objetivo de estruturar o novo epitélio e formar o tecido cicatricial. Nesta fase, a matriz extracelular começa a amadurecer e os feixes de colágeno aumentam de diâmetro e dão resistência à ferida. Além da deposição de colágeno, há a organização das fibras colágenas, levando ao aumento da contração que havia começado na fase inflamatória. O amadurecimento da cicatriz induz a apoptose dos fibroblastos e macrófagos, e diminui a densidade no local dessas células (GONZALEZ *et al.*, 2016). Um processo cicatricial ideal envolveria uma rápida hemostasia, inflamação adequada, proliferação, diferenciação e migração de células, angiogênese, reepitelização e remodelamento tecidual.

## 2.4 Fatores que afetam a cicatrização

A cicatrização de feridas envolve uma sequencia de eventos altamente regulado envolvendo aspectos celulares e moleculares. Fatores intrínsecos, que estão relacionados ao organismo do indivíduo, como envelhecimento, obesidade, diabetes, hipertensão e desequilíbrio hormonal (estrogênio e testosterona) podem reduzir a capacidade de regeneração e a resposta imune (JAIN, *et al.*, 2024; CHOLLETTI, *et al.*, 2020). Fatores extrínsecos, que estão associados ao ambiente ou a hábitos do indivíduo, incluem o tabagismo, exposição a infecções, uso de fármacos (corticóides ou imunossupressores) e estresse oxidativo, podem induzir dano celular e intensificar a resposta inflamatória, prejudicando a cicatrização (MARQUES, *et al.*, 2023).

O microambiente do processo cicatricial na transição da fase inflamatória para a fase proliferativa é um fator determinante para o sucesso da cicatrização de feridas, e é determinado, principalmente, pelos macrófagos (GAO, *et al.*, 2023). A fase inflamatória inicial é essencial para a prevenção e o controle de possíveis microrganismos invasores. No entanto, o prolongamento e exacerbação dessa etapa pode gerar um ambiente tóxico para a regeneração tecidual. Macrófagos e neutrófilos, classicamente ativados, podem produzir citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, além de espécies reativas de oxigênio (ROS) de maneira exagerada e retroalimentarem o microambiente inflamatório crônico (WOO, *et al.*, 2024; VARDAKOSTAS, *et al.*, 2025; CIOCE, *et al.*, 2024).

A progressão para a fase de proliferação e remodelação tecidual é orquestrada, principalmente por macrófagos alternativamente ativados e linfócitos Th2 que liberam citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , bem como de fatores de crescimento, como VEGF e IGF-1, para promover a resolução da inflamação e o reparo tecidual. No entanto, a ativação

exagerada dessa dinâmica imunológica, bem como a expressão defeituosa das metaloproteinases da matriz (MMPs) pode causar a deposição desordenada da matriz extracelular, levando a formação de cicatrizes hipertróficas e quelóides (VARDAKOSTAS, *et al.*, 2025; CIOCE, *et al.*, 2024).

## 2.5 Modelos experimentais para o estudo da cicatrização

Atualmente, há diversas opções para o estudo da cicatrização, compreendendo abordagens *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* e *in silico*. Em cada uma, há aplicações específicas para a investigação dos mecanismos e testes de terapias promissoras, dependendo do tipo de estudo, do tipo de ferida e da fase da cicatrização, não havendo, portanto, um modelo superior ao outro (MASSON-MEYERS, *et al.*, 2020).

### 2.5.1 Modelos *in vivo*

Os modelos *in vivo* utilizam animais, como camundongos (*BALB/c* e *C57BL/6*), ratos (*Wistar* e *Sprague-Dawley*), coelhos (*New Zealand White*) e porcos (*Mini-pig* e *Yorkshire*) para estudar a cicatrização por primeira ou segunda intenção (PARNELL; VOLK, 2019). A cicatrização por primeira intenção é o processo sem perda de tecido, semelhantes a incisões cirúrgicas, cuja as bordas são aproximadas por suturas. Dessa forma, o exemplo menos complicado de reparação de feridas, com uma menor perda de células epiteliais e do tecido conjuntivo, preservando todo o arcabouço tecidual, incluindo matriz extracelular, células produtoras de colágeno e fatores de crescimento. Quando há união imediata das bordas da ferida e manutenção asséptica, a cicatriz evolui em 4 a 10 dias de forma linear (GOULETSOU *et al.*, 2024).

A cicatrização por segunda intenção ocorre quando há a perda de todas as camadas da pele, incluindo a epiderme, derme e camada subcutânea e suas bordas não são suturadas. Esse processo se contrasta marcadamente com o que ocorre com as incisões, pois neste caso, o objetivo é preencher a extensa perda tecidual. O processo de reparo é, portanto, mais complexo, podendo durar dias a meses e é marcado pela produção de densas quantidades de tecido de granulação. Nesse modelo, é possível avaliar a complexidade das fases da cicatrização: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento, oferecendo um estudo mais dinâmico e detalhado (WONG, *et al.*, 2022).

### 2.5.2 Modelos *in vitro*

Os modelos *in vitro* são baseados em culturas celulares, como (Fibroblastos dérmicos humanos primários (HDFs), L929 (fibroblastos murinos), HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados), HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), RAW 264.7 (macrófagos murinos), THP-1 (monócitos humanos), além dos modelos tridimensionais (3D) de pele, o *Human skin equivalents* (HSEs), que é uma pele reconstruída *in vitro* com muitos tipos celulares (fibroblastos, queratinócitos, melanócitos e/ou células endoteliais), havendo, ou não, matriz extracelular produzida *in situ* ou com suportes sintéticos (HOFMANN *et al.*, 2023).

Os ensaios podem compreender modelos de cicatrização (*scratch assay*), proliferação celular (MTT, resarzurina, SRB, XTT ou BrdU), produção de matriz extracelular (ELISA ou Imunofluorescência), produção de citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, via ELISA ou RT-qPCR) e ensaios de estresse oxidativo (mensuração de Espécies Reativas de Oxigênio ou expressão de enzimas antioxidantes (Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione redutase (GR)). Estes modelos são vantajosos por reduzir o uso de animais, aumentando a relevância translacional, bem como são úteis para investigar mecanismos moleculares (SARIAN *et al.*, 2023).

### 2.5.3 Modelos *ex vivo*

Os modelos *ex vivo* utilizam tecidos ou fragmentos de órgãos (explantes de pele humana ou animal cultivados em câmaras de interface ar-líquido) mantidos em condições controladas fora do organismo (meios de cultura enriquecidos, controle de temperatura, umidade e CO<sub>2</sub>), preservando parcialmente a arquitetura tridimensional da pele. Com isso, é possível investigar a angiogênese atrelada à reepitelização, bem como diferenças fisiopatológicas na cicatrização por primeira ou segunda intenção (RAKITA *et al.*, 2020).

### 2.5.4 Modelos *in silico*

Os modelos *in silico* são ferramentas que empregam simulações computacionais avançadas que objetivam prever respostas terapêuticas testando virtualmente biomateriais ou fármacos, sendo possível avaliar inflamação, proliferação celular, remodelação da matriz extracelular e angiogênese, por exemplo. Além disso, é possível integrar dados experimentais

dos diversos modelos *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, oferecendo uma análise sistêmica e preditiva das respostas biológicas (UD-DIN; BAYAT, 2017).

## 2.6 Tratamentos disponíveis para a cicatrização de feridas

O tratamento de feridas pode ocorrer por métodos tradicionais, terapias inovadoras e a integração das diferentes abordagens. Os curativos convencionais são feitos utilizando ataduras, algodões, gazes e pomadas contendo prata (NEGUT, *et al.*, 2018). Inicialmente, realiza-se a limpeza do local lesionado utilizando soluções antissépticas como ácido hipocloroso, clorexidina ou hipoclorito de sódio e em seguida, o curativo é depositado. O objetivo é absorver o exsudato das feridas e mantê-las secas como forma de prevenir a invasão de bactérias no local da ferida. No entanto, pesquisas recentes demonstraram que, na verdade, é um ambiente úmido que favorece o processo de cicatrização. Ainda assim, somente o curativo não é suficiente para intensificar o processo de cicatrização (KOLIMI, *et al.*, 2022).

O mercado farmacêutico atual oferece inúmeros produtos tecnológicos para a cicatrização de feridas e representa, atualmente, uma indústria multibilionária em todo o mundo. Há a venda e o desenvolvimento de curativos de diferentes tipos de materiais e objetivos específicos de tratamento que dependem do tipo de ferida (MURRAY *et al.*, 2019). Com o objetivo de estimular uma resposta celular local, há vários produtos inovadores, como hidrogéis, espumas, hidrocolóides (carboximetilcelulose), alginato, colágeno, celulose, algodão e filmes para tratar feridas e queimaduras (KOLIMI *et al.*, 2022). Porém, esses produtos são em geral de alto custo e, portanto, indisponíveis para a maioria das pessoas que precisam desses recursos.

## 2.7 Bioprospecção de ativos cicatrizantes

O Brasil detém em torno de 15 a 20% da biodiversidade total do mundo dividida em seis biomas: Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Pampa. São cerca de 46.975 espécies de vegetais catalogadas, incluindo algas, fungos e plantas, no entanto, apenas 1.100 foram avaliadas e determinadas suas propriedades medicinais e 8% estão sendo estudadas para a pesquisa de compostos bioativos (GOMES-DA-SILVA *et al.*, 2022).

As descobertas científicas e avanços tecnológicos envolvendo ativos vegetais vêm se intensificando nos últimos anos. Ressalta-se que a maioria se origina de estudos etnofarmacológicos, que consideram o conhecimento da medicina popular tradicional que foi

passado entre as gerações. Esse conhecimento impulsionou o desenvolvimento de protótipos de fármacos convencionais e medicamentos fitoterápicos (MICKE; BÜNTZEL, 2021). A continuidade dessas pesquisas envolve testes para a comprovação da segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos produzidos a partir de plantas medicinais, bem como a pesquisa por novos ativos com propriedades medicinais.

Muitas plantas medicinais têm ganhado destaque na cicatrização de feridas, como: *Aesculus hippocastanum* (Castanha-da-Índia), *Anacardium occidentale* (Cajueiro), *Arctium lappa* (Bardana), *Calendula officinalis* (Calêndula), *Casaelpinia férrea* (Pau-ferro), *Casearia sylvestris* (Guaçatonga), entre outras nativas da região Nordeste, como a Aloe Vera (Babosa) e o *Symphytum officinale* (Confrei), que estão dentre as plantas que compõem a lista proposta pela RENISUS (BRASIL, 2010; BUENO et al., 2016). Achados pré-históricos, descrevem plantas medicinais utilizadas para o tratamento de feridas na forma de emplastos naturais para estancar hemorragias e acelerar a cicatrização. Muitos desses macerados eram também ingeridas, objetivando um efeito sistêmico (PIRIZ et al., 2014).

Atualmente, o foco das pesquisas na área de reparo tecidual no Brasil é o desenvolvimento de curativos e formas farmacêuticas menos onerosas de igual ou superior eficácia, para aumentar a acessibilidade e atender a real demanda por esses recursos, principalmente no Sistema Único de Saúde (SUS) (SCHILRREFF et al., 2022). A modulação dos processos inflamatórios é o principal alvo e, somado a isso, é importante que esses produtos sejam biocompatíveis e biodegradáveis para fornecerem condições ideais para a cicatrização de feridas e melhorarem a qualidade de vida dos pacientes acometidos (CAO et al., 2024).

## 2.8 Lectinas Vegetais

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam a oligossacarídeos de superfície celular com especificidade, reversibilidade e sem alterar sua estrutura (BARBOSA et al., 2021b). Elas foram encontradas em 1888 por Stillmark em sementes de mamona (*Ricinus communis*) e o termo, derivado do latim - '*Legree*' = escolher ou selecionar, surgiu em 1954 por um grupo de pesquisadores liderados por Boyd. Pesquisas recentes já identificaram lectinas em outros seres vivos, como microorganismos e humanos (KOMATH; KAVITHA; SWAMY, et al., 2006). Com origem não imune e pelo menos um domínio de ligação não catalítico, a afinidade com carboidratos permite que elas se liguem a glicoconjungados na superfície celular

e sejam capazes de promover aglutinação celular, reconhecimento ou modulação de informações (SILVA *et al.*, 2023).

As lectinas podem ser encontradas em uma variedade de fontes, incluindo plantas, animais e micro-organismos. Na natureza, são produzidas por muitas espécies de plantas, incluindo leguminosas (como feijões, lentilhas e ervilhas), cereais (como trigo, arroz e milho) e frutas (como bananas e maçãs). Também são encontradas em animais, incluindo peixes, moluscos e mamíferos, onde desempenham papéis importantes na adesão celular, reconhecimento imunológico e outras funções biológicas. Além disso, podem ser produzidas por micro-organismos, como bactérias e fungos e desempenhar papéis na patogenicidade e na interação com o hospedeiro (KUMAR *et al.*, 2012).

Em plantas e, dependendo da espécie, as lectinas podem ser encontradas nas sementes, especificamente no endosperma, nas raízes, no córtex e no meristema. Nas folhas, podem ser encontradas em células especializadas chamadas células glandulares, e nas frutas podem ser identificadas na polpa e na casca (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Nas células dessas regiões, as lectinas são encontradas principalmente em corpos proteicos, que estão estruturas relacionados aos lisossomos (GABIUS, 2001).

As funções biológicas mais importantes incluem a defesa contra patógenos, regulação do crescimento e desenvolvimento e interações com simbiontes. Por exemplo, algumas lectinas em plantas têm atividade antifúngica e antibacteriana, ajudando na defesa contra infecções por patógenos. Outras lectinas estão envolvidas na regulação do crescimento e desenvolvimento da planta, incluindo a germinação de sementes e o desenvolvimento de raízes e folhas. Além disso, também podem desempenhar um papel importante nas interações simbióticas com microrganismos benéficos, como bactérias fixadoras de nitrogênio e micorrizas (KUMAR *et al.*, 2012).

Em humanos, as lectinas endógenas assumem um importante papel na ativação do sistema imune, ao funcionarem como sensores e ativadores do sistema complemento por meio da via das lectinas, juntamente com a via clássica e alternativa. Dessa forma, a lectina ligadora de manose (MBL), as colectinas e as ficolinas são capazes de reconhecer padrões em patógenos (resíduos de manose e N-acetilglicosamina), ou células danificadas, formarem complexos com serinaproteases associadas à MBL (MASPs) e essa conjunção lectina-MASP ativa uma cascata proteolítica que leva à clivagem das proteínas do sistema complemento resultando em

inflamação, opsonização e lise celular. Dessa forma, as lectinas endógenas são cruciais para a imunidade inata e regulação da inflamação (SMOLNIKOVA; TERESHCHENKO, 2022).

Considera-se que os requisitos para categorizar uma proteína como lectina são: A presença de um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD); não ser um produto do sistema imune, como anticorpos; e não modificar o carboidrato ligado (SILVA *et al.*, 2023). Dessa forma, as lectinas têm várias classificações, podendo ser com base na especificidade de ligação de carboidratos: glicose/manose, galactose e N-acetylgalactosamina, L-fucose e ácidos siálicos; na estrutura e sequência de aminoácidos, considerando as semelhanças estruturais e funcionais; na origem em plantas, se é de animais ou micro-organismos ou na função biológica, como adesão celular, reconhecimento imunológico, patogenicidade e outras (MISHRA *et al.*, 2019).

A aplicabilidade das lectinas inclui diagnósticos de doenças, identificação e caracterização de cepas de microrganismos, inibição de crescimento bacteriano e viral (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017), atividade antifúngica (BRUSTEIN *et al.*, 2012), atividades inibidoras da transcriptase reversa do HIV-1 (LAM & NG, 2010; LAGARDA-DIAZ *et al.*, 2017), anticâncer (BHUTIA *et al.*, 2019) propriedades anti-inflamatórias (GUO, WEI YI *et al.*, 2017).

Tendo como base a habilidade de interação com carboidratos, essas macromoléculas estão relacionadas com o bioreconhecimento e podem atuar como moléculas pró-cicatrizantes em processos de reepitelização e reestruturação das camadas da pele (DOS SANTOS SILVA *et al.*, 2019). Essa capacidade das lectinas de detectar carboidratos em soluções e superfícies celulares permite a sinalização de células e mediadores inflamatórios responsáveis pela regeneração do tecido epitelial (DE SOUSA *et al.*, 2019b; KIM, YEON JUNG *et al.*, 2020b).

As lectinas têm sido alvo de diversos estudos voltados para o processo de cicatrização tecidual de feridas cutâneas por sua capacidade de sinalizar células e mediadores envolvidos na resposta inflamatória responsáveis pela regeneração do tecido epitelial através do recrutamento de neutrófilos (DE SOUSA *et al.*, 2019b; GONZAGA, 2011), proliferação de fibroblastos (GONZAGA *et al.*, 2011), secreção de TGF-  $\beta$  e VEGF (KIM, YEON JUNG *et al.*, 2020b) e da produção da metaloproteinase-9 (MMP-9) (BRUSTEIN *et al.*, 2012), se tornando uma ferramenta promissora na cura e tratamento de feridas cutâneas cirúrgicas, ulcerativas e até mesmo imunológico por queimaduras.

## 2.9 Gênero *Artocarpus*

O gênero *Artocarpus* pertence à família *Moraceae* e está distribuído em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Pacífico e América do sul. Compreende cerca de 60 espécies de árvores e arbustos, com aplicações nutricionais, ecológicas, medicinais e econômicas (PERTIWI, *et al.*, 2023). As árvores desse gênero são de grande porte, com folhas grandes e coriáceas e os seus frutos crescem diretamente do tronco, e, como exemplo, podem ser citadas diversas espécies, como *Artocarpus heterophyllus* (*jaca*), *Artocarpus altilis* (*fruto-pão*), *Artocarpus hirsutus*, *Artocarpus lakoocha*, *Artocarpus camansi*, *Artocarpus odoratissimus* (*marang*) e *Artocarpus elasticus* (SAHU, *et al.*, 2019).

As plantas do gênero *Artocarpus* são fontes de bioativos, incluindo lectinas com propriedades terapêuticas e aplicações biotecnológicas, demonstrando atividades antimicrobianas, antiproliferativas e imunomoduladoras, a depender do tipo de interação com receptores celulares (S.; KARIGAR; MURTHY, 2020). *A. integrifolia* e *A. altilis* demonstraram atividade antifúngica contra *Fusarium moniliforme* e *Saccharomyces cerevisiae* (TRINDADE, *et al.*, 2006), *A. integrifolia* foi capaz de estimular seletivamente linfócitos T e B humanos, indicando um potencial para aplicações em imunoterapia (BUNN-MORENO, *et al.*, 1981).

Em sementes de *A. integrifolia* (*jaca*), foram isoladas duas lectinas, a Jacalina e Artocarpina. A Jacalina desperta especial interesse como ferramenta biotecnológica por ser ligante do anticorpo Ig- A, linfócito CD-4 e de células tumorais. A Artocarpina é potente estimuladora do sistema imune (COLTRI *et al.*, 2008; PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2001), além de apresentar potencial para aplicações em cicatrização de feridas (CHAHUD *et al.*, 2009).

Lectinas do látex de *A. altilis* apresentaram propriedades antiproliferativas, antimigratórias, nematicidas e inseticidas (BORAIAH, *et al.*, 2023). AHL, uma lectina da espécie *A. hypargyreus* induziu apoptose e inibiu a proliferação celular por meio da ativação das vias de sinalização p38 e ERK (LUO, *et al.*, 2021). Uma lectina recém identificada da espécie *A. hypargyreus Hance* foi capaz de induzir uma resposta Th1 e produção de óxido nítrico em linfócitos periféricos humanos e macrófagos peritoneais de ratos (ZENG, *et al.*, 2019).

## 2.10 *Artocarpus altilis*

Da família *Moraceae*, a *Artocarpus altilis*, (Figura 4) popularmente conhecida como fruta-pão, é uma árvore encontrada nas regiões tropicais e subtropicais. É intimamente relacionada com outras espécies do gênero, tais como *Artocarpus heterophyllus* (jaca) e *Artocarpus integrifolia*. É caracterizada por atingir até 20 metros de altura e possuir uma copa ampla, com folhas lobadas que podem medir até 60 cm de comprimento. Seus frutos são grandes, ovais ou redondos, possuem uma casca rugosa e polpa amilácea. É uma planta adaptável a vários tipos de solo e reconhecida pela sua resistência perene (LATHIFF, *et al.*, 2021).

A fruta-pão é uma planta versátil, utilizada para fabricar móveis, barcos e utensílios domésticos. Além disso, também pode ser fonte de alimento e matéria-prima para muitas culturas, em que seus frutos são consumidos cozidos, fritos ou assados. Suas sementes também são comestíveis e suas folhas e raízes são utilizadas na medicina popular para tratar inflamações, febres, diabetes e problemas cutâneos. Esses efeitos podem estar associados ao alto teor de compostos fenólicos, incluindo flavonóides e esrilbenoides, que são metabólitos secundários anti-inflamatórios e antiocidantes (JAGTAP, *et al.*, 2010).

Figura 4 - *Artocarpus altilis* (fruta-pão)



Fonte: Adaptado de DE SOUSA (2017)

As sementes de *A. altilis* possuem uma composição diversa de lectinas. A fratalina é a mais abundante e interage preferencialmente à  $\alpha$ -D-galactose e uma molécula quimiotática potente para neutrófilos humanos, estimuladora de linfócitos humanos, efeitos citotóxicos sobre

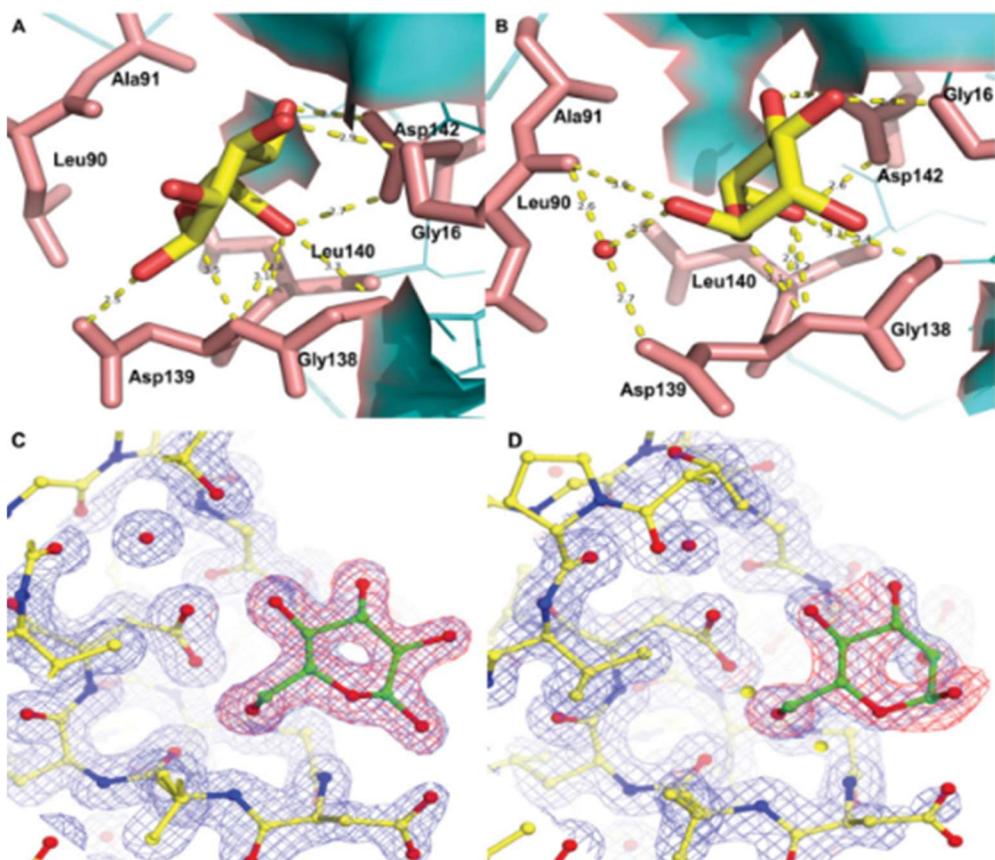
células tumorais, atividade cicatrizante em modelos *in vitro* e *in vivo* e indução da ativação do receptor TLR4, importante estímulo da resposta imune inata. Há também a frutapina, em menor quantidade e a frutackina, ainda pouco explorada (CAMPANA *et al.*, 2002; DE SOUSA *et al.*, 2019b; OLIVEIRA; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2014).

## 2.11 *Frutapina*

A frutapina (FTP) é uma lectina que se liga especificamente a resíduos de glicose e manose através de um domínio de reconhecimento de carboidratos (CDR) dependente de cálcio (Figura 5). É importante ressaltar que, mesmo a frutalina e a frutapina compartilhando a origem, a especificidade dos carboidratos de ligação diferentes pode resultar em atividades biológicas distintas. Em comparação, a frutapina é a segunda lectina mais presente, mas em quantidades insuficientes para a análise da sua atividade biológica. (DE SOUSA *et al.*, 2017).

Estruturalmente, a frutapina é composta por monômeros de, aproximadamente 14kD, podendo se organizar em dímeros ou tetrâmeros, dependendo das condições ambientais, como pH, força iônica e presença de ligantes. Análises revelaram que Cristais de apo-FTP, FTP-manose e FTP-glicose foram obtidos com difração de 1,58 Å, 1,70 Å e 1,60 Å, respectivamente, sendo a interação metalo-dependente. Há um domínio  $\beta$ -prisma I, comumente encontrado em lectinas da família Jacalina, com sítios de ligação para carboidratos nos resíduos Asp139 e Asp142. A FTP aglutina eritrócitos em concentrações mínimas de 62,5  $\mu$ g/mL e é inibida, preferencialmente, por manose (6,25mM), obtendo menor desvio conformacional em comparação com a glicose (100mM), além disso, a FTP interage mais intensamente com a manose (3,5 ligações de hidrogênio), do que com a glicose (3,0 ligações de hidrogênio) sugerindo que a frutapina tem mais afinidade por manose do que por glicose, reforçando sua seletividade bioquímica (DE SOUSA *et al.*, 2017).

Figura 5 - Sítios de ligação a manose e à glicose



Fonte: DE SOUSA (2017)

Apesar da analogia estrutural da frutapina (FTP) com as outras lectinas do gênero *Artocarpus*, principalmente com a Artocarpina, poucos estudos têm sido realizados com esta lectina devido ao seu baixo rendimento e laborioso processo de isolamento. Assim, De Sousa e colaboradores (2017) otimizaram a produção da frutapina recombinante em *Escherichia coli*, com alto rendimento ( $>40$ mg de frutapina/L de cultura) e preservação da funcionalidade pela demonstração do efeito desta em estimular a migração de fibroblastos (3T3) em ensaios de cicatrização *in vitro* (Scratch wound), e, ainda, apresentar efeito modulador do sistema imune, interagir com o receptor *toll-like 4* e aumentar a produção de IL-6 em fibroblastos de pele humana. Essas características indicam um possível efeito de ativação do sistema imune, promoção da opsonofagocitose, bem como reconhecimento e aglutinação de patógenos (SILVA, et al., 2019).

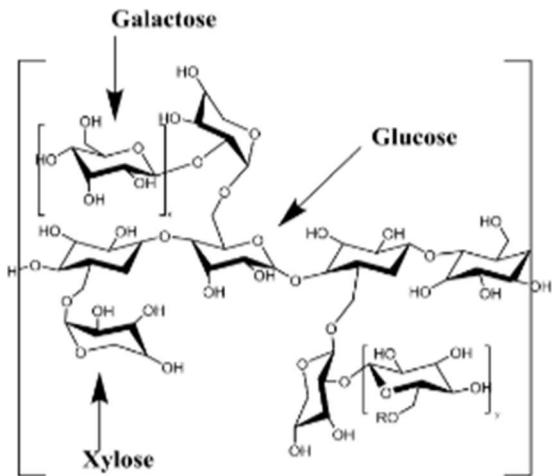
A produção recombinante da frutapina abre possibilidades para a realização de mais pesquisas mais detalhadas sobre suas propriedades biológicas, permitindo a investigação profunda dos mecanismos de interação e modulação celular. Dessa forma, somando os efeitos

já reportados às funcionalidades das lectinas, é possível credenciar a Frutapina como molécula com potencial cicatrizante a ser investigado em estudos pré-clínicos visando futuras aplicação biomédica.

## 2.12 Xiloglucanas

Xiloglucanas são polissacarídeos de alto peso molecular derivados das sementes de *Tamarindus indica Linn.*, da família *Leguminosae*. Sua estrutura compreende uma cadeia principal de glucana com quatro unidades de glicose ligadas por  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , substituídas por três unidades de xilose ligadas por  $\beta(1 \rightarrow 6)$ , que podem ser substituídas por galactose ligada por  $\beta(1 \rightarrow 2)$  (quando  $x = 1$  e  $y = 1$ ) e, em alguns casos, adicionalmente por arabinose ou fucose (Figura 6) com cadeias laterais de xilose e galactose, conferindo-lhe características físico-químicas como a capacidade de formação de géis e mucoadesão (RODRIGUES *et al.*, 2018).

Figura 6 - Unidades de glicose das Xiloglucanas



Fonte: KULKARNI, et al., 2017

As principais características da xiloglucana incluem biocompatibilidade e biodegradabilidade, tornando-a uma alternativa sustentável em relação à polímeros sintéticos (KULKARNI *et al.*, 2017). Além disso, cita-se a possibilidade de modificações em sua estrutura química, permitindo que as xiloglucanas sejam candidatos promissores para sistemas de liberação de fármacos. Acresça-se a isso, a possibilidade de formar géis em condições fisiológicas, é útil para a liberação controlada de medicamentos (KULKARNI *et al.*, 2017).

Estudos anteriores relataram o potencial das xiloglucanas como hidrogéis para a entrega de fármacos no cérebro (NISBET, *et al.*, 2010), como protetor gástrico mucoadesivo para tratar enterites (VASSILIA, *et al.*, 2023), para atenuação da inflamação na retocolite ulcerativa (PERIASAMY *et al.*, 2018) e, como biomembrana em modelos de feridas cutâneas em camundongos diabéticos (ANDRADE *et al.*, 2021) e como curativos nanoestruturados (SOUZA, *et al.*, 2021). Dessa forma, o estudo de Biomembrana de xiloglucana permite a exploração e avaliação deste recurso, podendo responder lacunas científicas ainda não exploradas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial cicatrizante da rFTP em culturas celulares e em um modelo de feridas excisionais em camundongos *BALB/c* sob a forma de Biomembranas de Xiloglucana.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito da rFTP sobre a viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929), queratinócitos humanos (HaCaT) e macrófagos murinos (RAW 264.7);
- Determinar os níveis de nitrito em culturas de macrófagos murinos (RAW 264.7) tratados com rFTP pelo método de Griess;
- Determinar os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 (ELISA) em macrófagos (RAW 264.7) tratados com rFTP;
- Avaliar o efeito tópico do tratamento com as biomembranas de Xiloglucana contendo a proteína recombinante (rFTP) em feridas excisionais em camundongos *BALB/c* por meio dos parâmetros: taxa de contração da lesão, presença de hiperemia e edema;
- Realizar a análise histológica do tecido lesionado por meio da avaliação do quadro inflamatório;
- Realizar a dosagem de mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 e IL-10) do tecido lesionado na fase inflamatória e proliferativa da cicatrização.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Expressão da rFTP em cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3)

#### 4.1.1 Expressão da rFTP

As bactérias *E. coli* (BL21(DE3)) que expressam a FTP, contendo o vetor pET28a/rFTP e que expressam a enzima ULP1, contendo o vetor de clivagem pET SUMO foram cedidos pelo NUBEX-UNIFOR. Após descongeladas, as cepas foram cultivadas em meio LB (Lúria-Bertani) suplementado com Kanamicin (50 µg/mL) a 37°C até que a densidade óptica (OD) a 600 nm atingisse entre 0,4 e 0,6. Com isso, a expressão da rFTP foi induzida pela adição do IPTG 0,3 mM (isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósideo), a uma temperatura de 20 °C, com agitação a 130 rpm, por 16 horas (DE SOUSA *et al.*, 2017).

#### 4.1.2 Purificação da rFTP por Cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC)

A proteína SUMO-FTP foi isolada a partir do lisado celular obtido em um processador ultrassônico (modelo UP100H) em ciclos de 60 segundos com amplitude de 60% com tampão para a lise (Lisozima 0,2 mg/mL com inibidor de protease e Tween 80 1%) e todo o processo ocorreu em banho de gelo. O isolamento ocorreu em um sistema de cromatografia de troca iônica – AKTA (*Fast Protein Liquid Chromatography*) uma coluna HisTrap HP (níquel-sefárose), que permite a captura de proteínas recombinantes fusionadas à uma tag de histidina. A eluição foi conduzida com Imidazol 300mM. Depois disso, o complexo foi coletado no pico 2 e, em seguida, foi dializado e incubado por 16 horas com a protease específica Ubl (ULP1), na proporção (40:1 – SUMO-FTP:ULP1) para remover a tag SUMO. Em seguida, a solução foi submetida novamente a corrida e coletado o pico 1, com a rFTP isolada, sendo o pico 2 a fração retida contendo a calda SUMO e a ULP1 (DE SOUSA *et al.*, 2017).

#### 4.1.3 Avaliação da pureza da rFTP por eletroforese (SDS-PAGE)

Após a purificação, a pureza da rFTP foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE), sob condições redutoras e considerando o padrão de peso molecular *Pierce™ Unstained Protein MW Marker*. Foram aplicados 10 µg de cada amostra, previamente quantificadas pelo método BCA (Ácido bicinconínico), que reage com os íons cúpricos ( $Cu^{1+}$ ) reduzidos pelas proteínas, formando um complexo violeta que pode ser

mensurado por espectrofotometria (562nm). Em seguida, cada alíquota foi incubada com tampão de amostra SDS e submetida a banho seco à 100°C por 5 minutos. A corrida foi realizada com voltagem constante de 120V. Em seguida, o gel foi corado com azul de Coomassie para a visualização das bandas protéicas (HWANG *et al.*, 2018).

#### **4.1.4 Avaliação da atividade hemaglutinante da r-Frutapina**

O ensaio de hemaglutinação é amplamente utilizado para avaliar a atividade biológica de lectinas devido a sua capacidade de se ligar especificamente a carboidratos de membranas celulares e causar aglutinação (GULZAR *et al.*, 2021). Em placas de 96 poços *U-bottom*, a rFTP foi incubada em diluições seriadas (1 a 0,00098 mg/mL) com hemácias de coelho lavadas e ressuspensas a 2% em PBS por 1 hora a 37°C. A hemaglutinação foi verificada visualmente e considerada positiva quando o líquido se tornava turvo com pequenos aglomerados e negativa quando as hemácias permaneceram na forma de sedimento no fundo do poço e suspendiam uniformemente quando se agitava a placa. A concentração mínima ativa foi determinada pela concentração na qual considerou-se a menor diluição em que a aglutinação foi observada.

### **4.2 Ensaios *in vitro***

#### **4.2.1 Condições de cultivo das linhagens celulares**

As linhagens de Macrófagos murinos (RAW 264.7), Fibroblastos murinos (L929) e Queratinócitos humanos (HaCaT) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro® e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco® - Thermo Fisher Scientific®) e 1% de antibiótico (100 UI/ml de Penicilina/estreptomicina 100 µg/mL) (Sigma®) em estufa de a 37°C em incubadora com 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento celular foi observado em um microscópio invertido de contraste de fase. A manutenção foi realizada duas vezes por semana em câmara de fluxo laminar vertical com nível de biossegurança II, removendo as células RAW 264.7 de maneira mecânica e HaCaT e L929 utilizando tripsina-EDTA 0,05% da garrafa (Kasvi, 75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL), quando atingida a confluência de 60 – 70 %.

#### **4.2.2 Ensaio de viabilidade da rFTP em linhagens celulares**

O ensaio da resazurina (Alamar Blue) é amplamente utilizado para avaliar a viabilidade celular e fundamenta-se na capacidade de células metabolicamente ativas reduzirem a resazurina em resorufina, um composto fluorescente por meio de enzimas mitocondriais que transferem elétrons de NADPH + H<sup>+</sup> para a resazurina (PETITI; REVEL; DIVIETO, 2024). A determinação da viabilidade celular induzida pela rFTP foi avaliada em RAW 264.7, L929 e HaCaT (2x10<sup>4</sup> células/mL) em placas de 96 poços. Após 24 horas de crescimento celular, foram adicionadas diferentes concentrações de rFTP (1,000 – 0,001 mg/mL) por 24 e 48h, sendo observado o tempo de 72h somente nos macrófagos. Foi considerado controle (CTRL) o grupo somente com o meio de cultivo. Após o tempo de incubação, foi adicionado o corante (0,15 mg/mL) e incubado 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por no mínimo 1h. As placas foram lidas em um leitor de microplacas (BioTek Synergy HT<sup>®</sup>), utilizando comprimento de onda de excitação a 530-560 nm e emissão de 590nm. Os resultados da viabilidade foram expressos como percentual de viabilidade celular, determinado através da fórmula:

$$Viabilidade (\%) = \left( \frac{Abs\ da\ amostra}{Abs\ do\ grupo\ controle\ DMEM} \right) \times 100.$$

#### **4.2.3 Avaliação do efeito da rFTP sobre a liberação de óxido nítrico por macrófagos estimulados ou não por LPS**

A quantificação de Óxido Nítrico ocorreu de maneira indireta, considerando o método de Griess, no qual mede-se a quantidade de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), um produto estável da oxidação do óxido nítrico em soluções aquosas (SCHMÖLZ; WALLERT; LORKOWSKI, 2017). O LPS está presente na membrana celular de bactérias Gram-negativas e experimentalmente é utilizado para induzir respostas inflamatórias (ZHANG, et al., 2024). Assim, a linhagem RAW 264.7 foi plaqueada com uma população de 5×10<sup>5</sup> células/mL em uma placa de 12 poços, com os seguintes grupos experimentais: DMEM 10%, rFTP 50 e 100ug/mL estimulados ou não com LPS 1μg/mL por 24h. Em seguida, 50μL as amostras foram incubadas por 10 minutos a 37°C com 50μL do reagente de Griess (1:1:1:1 - Ácido fosfórico 5%, Sulfonilamida 1% em ácido fosfórico 5%, N-(1-naftil)etilenodiamina (NEED) 0,1%, e Água Milli-Q) e lidas em espectrofotômetro com a absorbância medida a 540nm. Para a quantificação, considerou-se uma curva padrão de nitrito de sódio (0-100 μM) e os dados foram normalizados em porcentagem, utilizando as absorbâncias do grupo controle negativo DMEM 10% SBF como

baseline e as absorbâncias do grupo controle positivo LPS 1 µg/mL como 100% da produção de NO.

#### ***4.2.4 Avaliação do efeito da rFTP sobre a liberação de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1 $\beta$ e IL-6 por macrófagos estimulados ou não por LPS***

Em placas de alta ligação foram incubados anticorpos murinos de captura: anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-10 e anti IL-6. (kits da R&D systems<sup>®</sup>: Cat. No DY410, DY401, DY406 e DY417, respectivamente) por 12 horas a 4°C. Em seguida, os sítios não específicos foram bloqueados com BSA 1% por 1 hora em temperatura ambiente. Depois disso, incluiu-se o sobrenadante proveniente do cultivo celular tratados com rFTP 50µg/mL (com e sem LPS) por 2 horas a 4°C. Os anticorpos murinos de detecção TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 foram adicionados às placas e incubados por mais 2 horas a 4°C. Então, adicionou-se 100µL do complexo diluído de HRP-streptavidina por 20 minutos em temperatura ambiente com as placas protegidas da luz a partir desta etapa. Entre cada etapa realizou-se a lavagem das placas três vezes com solução tamponada de PBS com 0,05% de Tween 20. Acrescentou-se o substrato A+B (1:1) e, interrompeu-se a reação enzimática com 50 µL de ácido sulfúrico 2N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A leitura ocorreu em um espectofotômetro no comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de sobrenadante, sendo a concentração das amostras obtidas a partir de uma curva padrão de cada citocina com 8 concentrações seriadas, partindo de 4000 pg/mL para TNF- $\alpha$ , IL-10 e 2000 pg/mL para IL-1  $\beta$  e IL-6.

### **4.3 Ensaio *in vivo***

#### ***4.3.1 Produção das Biomembranas***

O polímero de xiloglucana foi obtido a partir de uma solução de xiloglucana 2% (m/m), glicerol 2% (m/m) e cetrimida 0,1% (m/m) com o auxílio de um homogeneizador por 10 min a 18 000 rpm. Em seguida, as biomembranas foram produzidas contendo ou não a rFTP (0,1, 0,5 e 1,0 mg de Frutapina/g da solução de xiloglucana). As soluções foram então centrifugadas por 30 min a 10 000 xg e 4 °C, para remoção de materiais insolúveis. Após esse procedimento, as soluções foram distribuídas em placas de 24 poços (1 g/poço) e liofilizadas sob rampas de temperatura e pressão obtendo-se materiais mais uniformes. Para assegurar que a lectina teve sua atividade preservada após manipulação das formulações, foi feito um teste de

hemaglutinação com a Biomembrana de xiloglucana/rFTP solubilizado em 10 mL de solução salina. Antes da aplicação nos animais, a biomembrana foi irradiada com luz UV durante 15 minutos.

#### **4.3.2 *Animais***

Foram utilizados 90 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem (*BALB/c*) machos e fêmeas com idade de 10 semanas, pesando entre 30-36g cedidos pelo biotério da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e mantidos no Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX) onde ocorreram todos os protocolos *in vivo* de acordo com o parecer nº 3188081121. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro, com temperatura ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade ( $55 \pm 10\%$ ) controlados, bem como fornecimento de ração e água *ad libitum*. Os animais permaneceram em grupo (5-6 animais/gaiola) até o dia do protocolo experimental.

#### **4.3.3 *Processo cirúrgico para a indução das feridas excisionais***

Os animais foram randomizados e em seguida, anestesiados com cloridrato de xilazina 2% (10mg/kg) associado ao cloridrato de cetamina 10% (100mg/Kg), por via intraperitoneal (i.p.) (HALL; CLARK, 1991). Após a confirmação da anestesia, foi realizada a tricotomia da região dorsal, assepsia álcool etílico 70%. Em campos operatórios esterilizados, foi feita a marcação circular de  $0,8 \text{ cm}^2$  com auxílio de um punch cirúrgico na superfície dorsal do animal e excisão da região dermo-epidérmica. Então, os animais (5-6 animais/grupo) receberam ou não o tratamento, conforme organizado a seguir:

#### **4.3.4 *Grupos experimentais:***

**Grupo 1 - Sham:** animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico, mas não receberam nenhum tipo de tratamento.

**Grupo 2 - Controle:** animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico, seguidos da implantação da Biomembrana de xiloglucana 2% sem ativo;

**Grupo 3 – rFTP 0,1%:** animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico, seguidos da implantação da Biomembrana rFTP 0,1%;

**Grupo 4 - rFTP 0,5%:** animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico, seguidos da implantação da Biomembrana rFTP 0,5%;

**Grupo 5 - rFTP 1%:** animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico, seguidos da implantação da Biomembrana rFTP 1%;

Após a cirurgia, os animais foram dispostos individualmente nas gaiolas com enriquecimento ambiental e ficaram em observação até a completa recuperação e ao longo dos dias experimentais, sendo observados quanto a padrões de sofrimento, tais como: mudanças na aparência física (postura, textura do pelo, sujidades de urina ou fezes), redução no consumo de alimento e água, mudança no peso corporal, inatividade, automutilação, comportamento compulsivo, movimentos repetitivos ou estereotipados, agressividade, excitabilidade e mudanças nas respostas a estímulos, conforme a escala de Grimace (LANGFORD *et al.*, 2010).

#### **4.3.5 Avaliação macroscópica e coleta das lesões**

A avaliação macroscópica ocorreu nos dias 0, 3, 7, 11 e 14 e considerou presença de hiperemia e edema, bem como, fotomicrografias foram feitas na distância de 10 cm para a análise da contração da lesão. Nos dias 3º, 7º e 14º dia do processo cicatricial os animais foram eutanasiados com superdosagem de anestésico (cloridrato de xilazina 2% (30mg/Kg) e cloridrato de cetamina 10% (300mg/Kg), por via intraperitoneal (*i.p.*)) e os tecidos foram coletados, fracionados ao meio para a análise histológica para avaliação do quadro inflamatório e dosagem de mediadores (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL- IL-10) nas fases inflamatória e proliferativa.

#### **4.3.6 Avaliação da taxa de contração das lesões**

Considerando as fases da cicatrização, a mensuração da contração comparou a área inicial com a medida da área das lesões dos dias 3 (fase inflamatória), 7 (fase proliferativa), 11 e 14 (fase de remodelamento e resolução) após a cirurgia (dia 0). Para isso, foram realizadas fotomicrografias utilizando-se uma câmera dupla (ultra-angular e grande-angular) de 12 MP do Iphone 11. A câmera foi posicionada a uma distância de 15 cm da superfície onde o animal foi posicionado contendo uma régua para calibração dos pixels. A área ( $\text{mm}^2$ ) da lesão foi mensurada pelo software ImageJ®. Para o cálculo da contração, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Contração das lesões (\%)} = \left( \frac{\text{Área do dia 0} - \text{Área do dia } X}{\text{Área do dia 0}} \right) \times 100$$

#### 4.3.7 Processamento das amostras para coloração por HE

As amostras de tecido coletadas no 3º, 7º e 14º dia foram fixadas em solução tamponada de formaldeído 10% (v/v) (pH 7,4) e seguidas para o processamento histológico de inclusão em parafina a 58°C no processador automático de tecidos (Lupe®). Segmentos de 4 µm de espessura dos fragmentos foram elaborados em micrótomo semi-automático (Leica®) e organizados em lâminas microscópicas que foram escaneadas.

#### 4.3.8 A avaliação histológica

Foi realizada de forma duplo-cega por dois avaliadores independentes, utilizando o software CaseViewer® utilizando os parâmetros adaptados de AVSAR, 2016 (Tabela 1). A espessura do epitélio recuperado foi mensurada após 14 dias da indução da lesão, medindo a distância perpendicular entre a membrana basal e a transição para a camada córnea, baseado-se no protocolo realizado por Oriá *et al.* (2003). Dessa forma, foi realizada a mensuração em cinco campos de um mesmo animal no aumento de 100x. Após isso, a medida final da espessura foi a média aritmética das cinco medidas.

Tabela 1 - Parâmetros histológicos para análise da lesão por H&E

Escores	Parâmetros
0	Sem úlcera, epitélio e derme em espessuras normais ou restauradas, ausência de infiltrado inflamatório e queratinização.
1	Áreas pontuais de úlcera, derme presente e discreto infiltrado inflamatório na derme e hipoderme.
2	Área moderada de úlcera, perda parcial da derme, e moderado infiltrado inflamatório na derme e hipoderme, com tecido de granulação inicial.
3	Área extensa de úlcera, perda total da derme, e presença de infiltrado inflamatório na hipoderme e presença de edema.
4	Úlcera profunda envolvendo a hipoderme, necrose tecidual evidente, infiltrado inflamatório maciço com células mononucleares e fibrose desorganizada.

---

5	Ausência completa de epitélio e derme, úlcera penetrante até tecidos profundos, inflamação severa atingindo a camada muscular e colapso estrutural com ausência de regeneração visível.
---	---

---

Fonte: Adaptado de AVSAR (2016)

#### **4.3.9 Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias das lesões**

As amostras das lesões excisionais foram coletadas no 3º e 7º dias para dosagem de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 (JANG et al., 2013). Os tecidos (n=5/grupo) foram triturados e homogeneizados 10% (mg tecido/ $\mu$ L) em temperatura de 4°C (POLYTRON®) em solução de PBS (pH 7,4), centrifugados a 5000 rpm por 15 min para remoção de resíduos que não foram triturados completamente. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e o método de detecção foi o ELISA sanduíche, que mensura a quantidade de analito previamente ligado a um anticorpo de captura, cuja amplificação do sinal advém de um anticorpo de detecção conjugado a uma enzima, lidos em um espectofotômetro utilizando o comprimento de onda de 450 nm (kits da R&D systems®). Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de homogenato, sendo a concentração das amostras obtidas a partir de uma curva padrão de cada citocina com 8 concentrações diferentes, partindo de uma diluição seriada, sendo as concentrações iniciais de 1000 pg/mL para IL-1 $\beta$  e 2000 pg/mL para TNF- $\alpha$  e IL-10.

#### **4.3.10 Análise estatística**

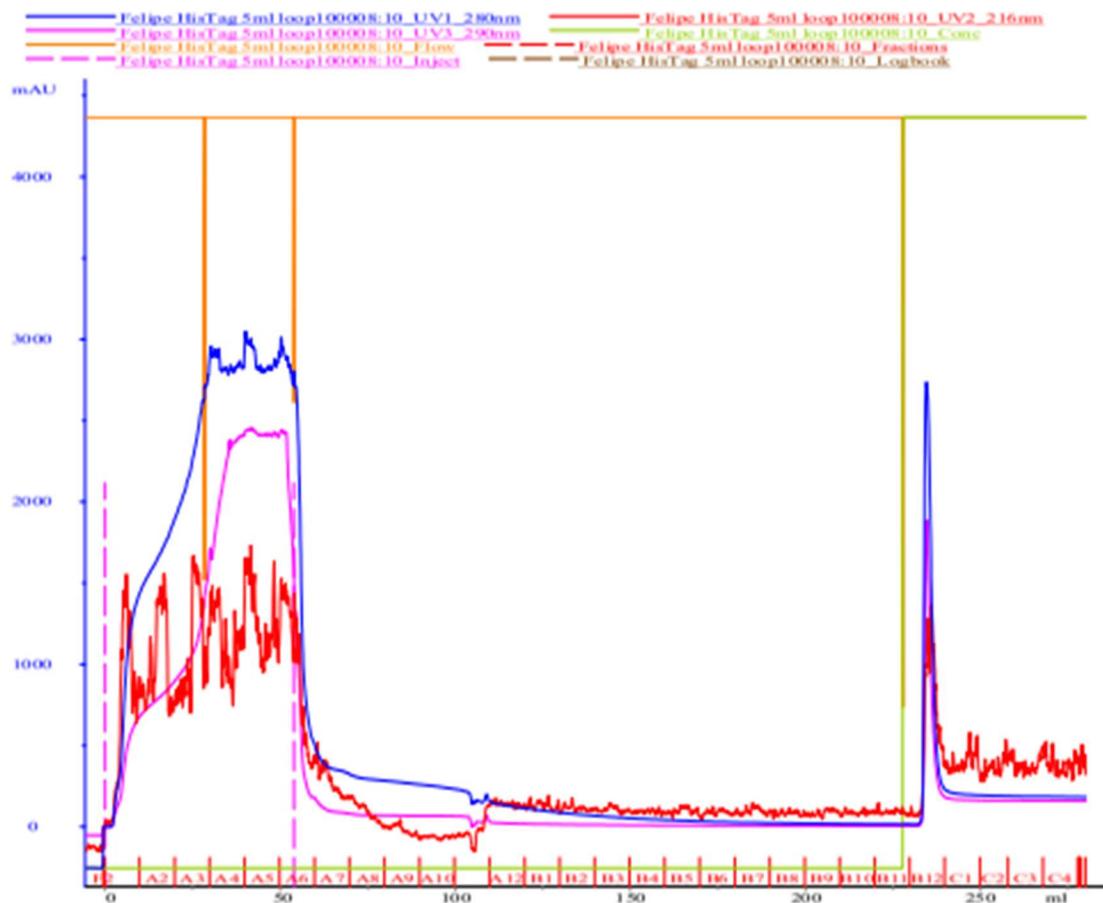
A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism® (v 8.0.1). A distribuição normal foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilke. Os dados que seguiram a normalidade (paramétricos) foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni para a comparação dos grupos ou Tukey para múltiplas comparações. Os dados que não seguiram a normalidade (não-paramétricos) foram avaliados com teste de Kruskall-Wallis e pós-teste de Dunn, para a comparação de três ou mais grupos. Os resultados foram expressos como média percentual  $\pm$  erro padrão da média e em todas as situações foi adotado um nível de significância de  $p<0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Expressão e purificação da rFTP em cepas de *E. coli*.

A rFTP isolada no Cromatograma IMAC está representada pelo primeiro pico maior (Figura 7), entre 30 e 60mL, exibindo o perfil de eluição da rFTP purificada em uma coluna HisTrap HP (níquel-sefarose). A eluição ocorreu com 300mM de imidazol, garantindo a recuperação da rFTP ligada à coluna. O segundo pico, ao final do cromatograma, após, aproximadamente 250mL corresponde a impurezas e/ou outros componentes que foram desvinculados, como a tag SUMO e a enzima ULP1.

Figura 7 - Cromatograma de eluição da rFTP

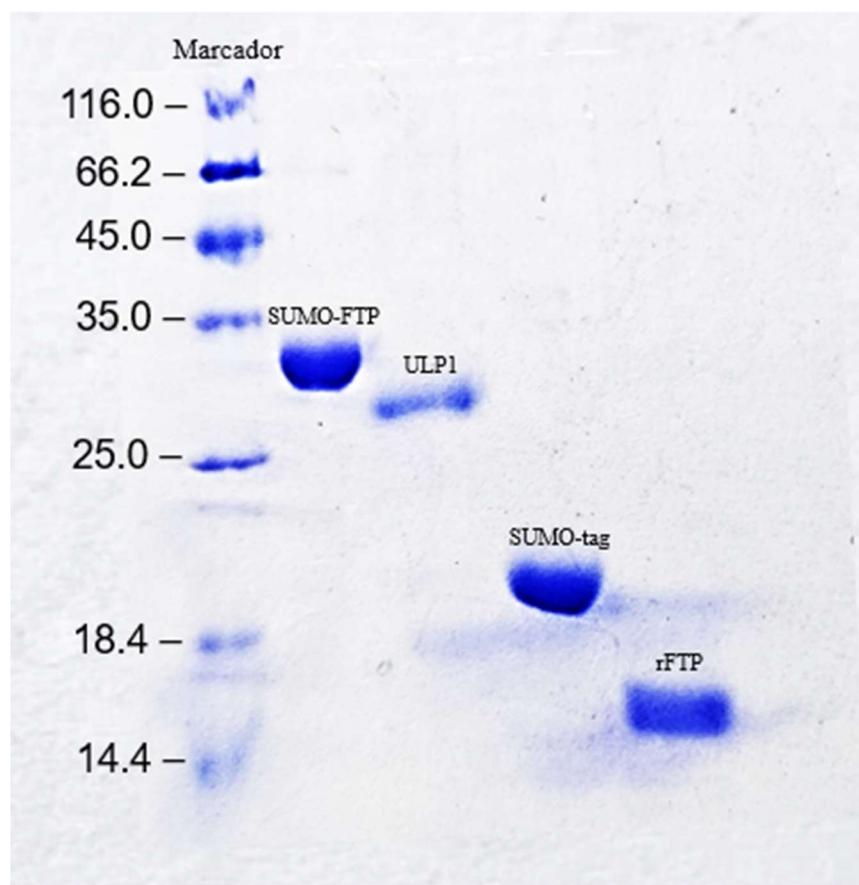


**Cromatograma de eluição da rFTP (rFTP) purificada por IMAC utilizando uma coluna HisTrap HP (níquel-sefarose) no sistema AKTA FPLC.** A eluição foi realizada com tampão contendo 300 mM de imidazol, promovendo a recuperação da rFTP ligadas à coluna. O primeiro pico significativo, entre 30 e 60 mL, corresponde à rFTP isolada. O segundo pico, observado após aproximadamente 250 mL, refere-se a impurezas ou componentes não ligados, como a tag SUMO e a enzima ULP1.

## 5.2 A pureza da rFTP foi validada por SDS-PAGE

Após a purificação, a identificação da rFTP isolada ocorreu por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sendo possível observar a amostra antes e depois do processo de digestão (Figura 8), com a presença de uma banda única correspondente ao tamanho molecular do complexo SUMO-FTP de 33kD, a protease ULP1 com 30kD, a rFTP isolada e não retida em torno de 20kD e a calda SUMO isoladas, em torno de 15kD, conforme figura.

Figura 8 - Gel SDS PAGE Fração retida da rFTP



**PAGE-SDS, gel 15%.** Coluna 1:Pierce<sup>TM</sup> Unstained Protein MW Marker. Coluna 2: SUMO-FTP. Coluna 3: Ulp1. Coluna 4: SUMO-tag, fração retida em cromatografia IMAC em coluna HisTrap<sup>TM</sup> HP. Linha 5: rFTP, fração não-retida (*flowthrough*) em cromatografia IMAC em coluna HisTrap<sup>TM</sup> HP. As amostras foram previamente quanficadas por BCA *protein assays kit* e 10 µg de amostra foram aplicados em cada poço.

## 5.3 A atividade hemaglutinante da rFTP manteve-se preservada

Com o ensaio de hemaglutinação em hemárias de coelho, foi possível observar uma reação ativa da rFTP (Figura 9), sendo visualmente interpretada pela formação de pequenos aglomerados e turbidez no líquido. Considerou-se, portanto, que a concentração mínima ativa

ocorreu em 0,03125mg/mL, uma vez que nos poços seguintes, as hemácias permaneceram como sedimento, o qual se dispersava uniformemente com a agitação da placa.

Figura 9 - Ensaio de hemaglutinação em hemácias de coelho

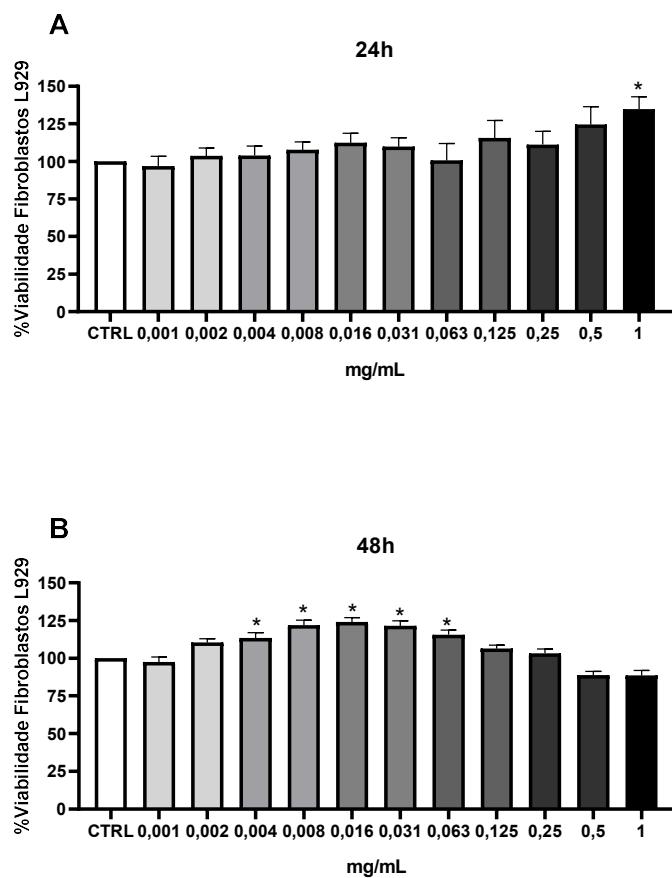


**Ensaio de hemaglutinação em hemácias de coelho.** A rFTP apresentou atividade hemaglutinante, tendo como concentração mínima ativa 0,03125mg/mL, evidenciada pela formação de aglomerados e turbidez no líquido. Nas diluições seguintes, observou-se a dispersão das hemácias e ausência de aglutinação.

#### 5.4 Efeito da rFTP na viabilidade celular em diferentes doses e tempos de incubação

Nos fibroblastos murinos L929, após 24 horas de incubação com rFTP em diferentes concentrações (Figura 10A), a viabilidade celular manteve-se inalterada para as concentrações até 0,5 mg/mL em relação ao grupo controle (CTRL). Na concentração de 1 mg/mL, observou-se um aumento significativo, com  $(134,65 \pm 3,06\%, p < 0,05)$ . Após 48 horas (Figura 10B), observou-se um aumento na viabilidade nas concentrações 0,04 a 0,63 mg/mL  $(113,4 \pm 3,24; 122,0 \pm 5,32; 124,0 \pm 5,81; 121,4 \pm 5,19 \text{ e } 115,5 \pm 3,76\%, p < 0,05)$ .

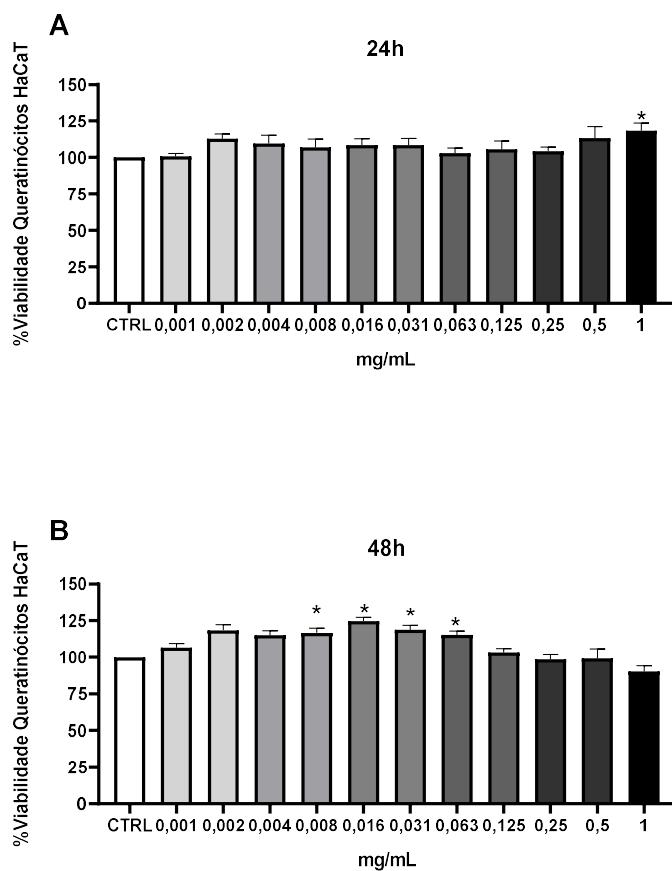
Figura 10 - Viabilidade celular de Fibroblastos L929



**Viabilidade celular de fibroblastos L929 após tratamento com rFTP em diferentes concentrações de rFTP (0,001–1 mg/mL) por 24 h (A) e 48 h (B).** Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (CTRL).

Nos queratinócitos HaCaT, a viabilidade celular permaneceu estável em todas as concentrações nas primeiras 24 horas (Figura 11A). Após 48 horas (Figura 11B), houve um aumento significativo das concentrações 0,02 a 0,63 mg/mL ( $118,5 \pm 3,85$ ;  $115,1 \pm 3,13$ ;  $116,7 \pm 3,47$ ;  $124,6 \pm 5,13$ ;  $118,6 \pm 3,88$  e  $115,3 \pm 3,18$  %  $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (CTRL).

Figura 11 - Viabilidade celular de Queratinócitos HaCaT

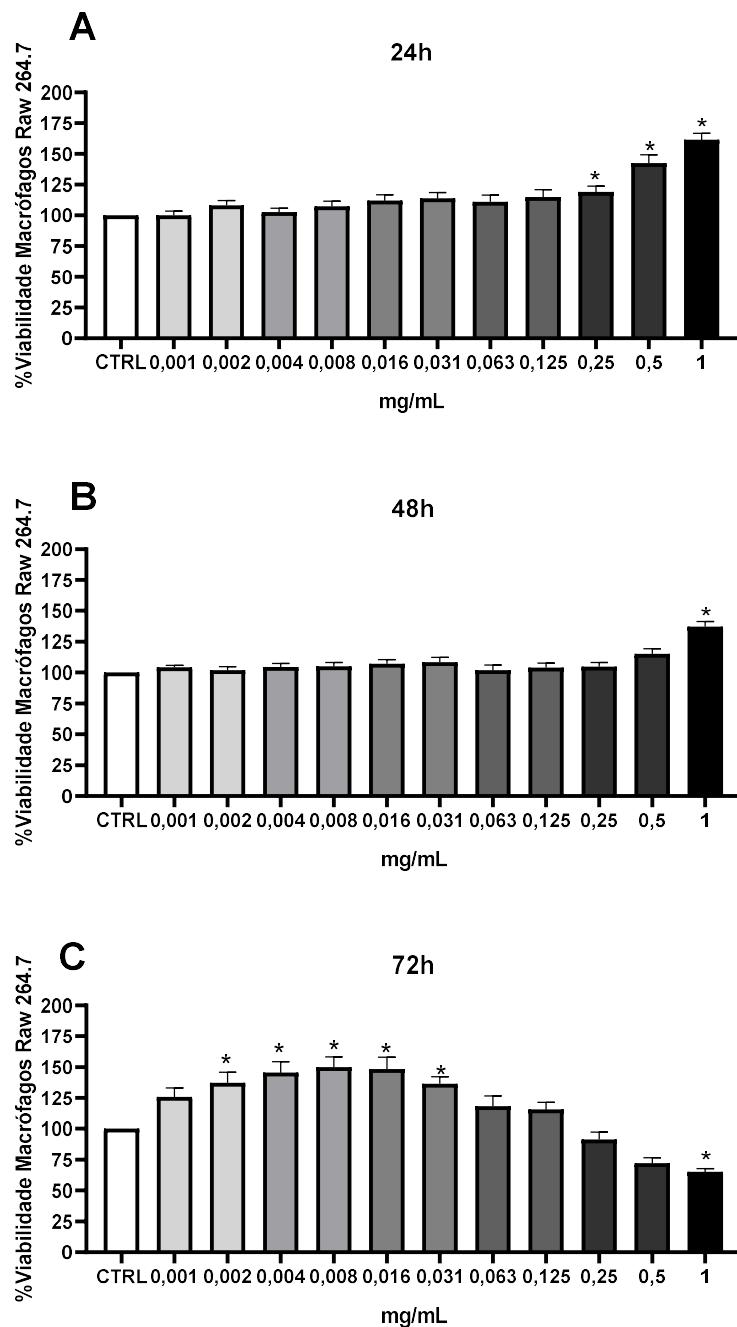


**Viabilidade celular de queratinócitos HaCaT após tratamento com rFTP em diferentes concentrações de rFTP (0,001–1 mg/mL) por 24 h (A) e 48 h (B).** Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. \*p < 0,05 em relação ao grupo controle (CTRL).

A viabilidade dos macrófagos aumentou significativamente, quando comparado ao grupo CTRL, nas concentrações de 0,25 a 1 mg/mL durante as primeiras 24 horas (Figura 12A) ( $118,9 \pm 2,86$ ;  $142,6 \pm 2,88$  e  $161,47 \pm 4,16$  %  $p < 0,05$ ). Após 48 horas (Figura 12B), a concentração de 1mg/mL também permaneceu aumentada ( $137,2 \pm 6,77$  %). As concentrações de 0,002 a 0,031mg/mL não apresentaram diferença significativa nos tempos de 24 e 48 horas (Figuras 12A e 12B), mas demonstraram um efeito proliferativo (%) ( $125,9 \pm 1,21$ ;  $137,3 \pm 1,74$ ;  $145,5 \pm 2,13$ ;  $150,0 \pm 2,34$ ;  $148,4 \pm 2,26$ ;  $136,4 \pm 1,69$  e  $118,43 \pm 0,86$ , respectivamente  $p < 0,05$ ) após 72 horas de incubação (Figura 12C). No entanto, as concentrações de 0,5 e 1mg/mL resultaram

em uma diminuição significativa da viabilidade celular após 72 horas (Figura 12C) ( $72,05 \pm 1,31$  e  $65,10 \pm 1,63$ , respectivamente  $p < 0,05$ ).

Figura 12 - Viabilidade celular de macrófagos murinos RAW 264.7

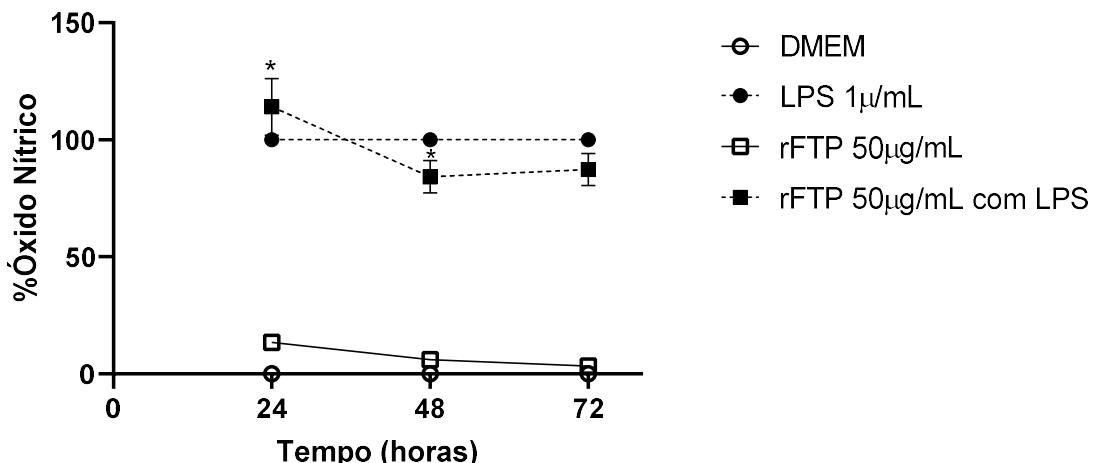


**Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 após tratamento com rFTP em diferentes concentrações de rFTP (0,001–1 mg/mL) por 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).** Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (CTRL).

## 5.5 A rFTP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduziu a produção de óxido nítrico por rFTP em macrófagos RAW 264.7 tratados com e sem LPS

O tratamento com rFTP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  e ausência de LPS em macrófagos RAW 264.7 induziu em baixos níveis a produção de nitrito em 24 ( $13,43\pm1,087\%$ ), 48 ( $6,06\pm1,087\%$ ) e 72 horas ( $3,34\pm1,087\%$ ), em relação ao controle positivo LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Por outro lado, na presença do LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), nas primeiras 24 horas, rFTP aumentou significativamente a produção o nitrito ( $114\pm1,23\%$ ), mas reduziu gradualmente em 48 ( $84,15\pm1,38\%$ ) e 72 horas ( $87,37\pm1,10\%$ ) (Figura 13).

Figura 13 - Efeito da rFTP sobre a produção de nitrito no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 estimulados ou não por LPS



**Produção de nitrito em macrófagos RAW 264.7 tratados com rFTP 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  na presença ou ausência de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).** Os níveis de nitrito foram medidos pelo método de Griess após 24, 48 e 72 horas com rFTP, com e sem LPS. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (SEM) de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando Two-Way ANOVA com pós-teste de Tukey; \* $p < 0,05$  indica diferenças significativas em relação ao controle positivo.

## 5.6 rFTP modulou os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-10 em 24, 48 e 72 horas.

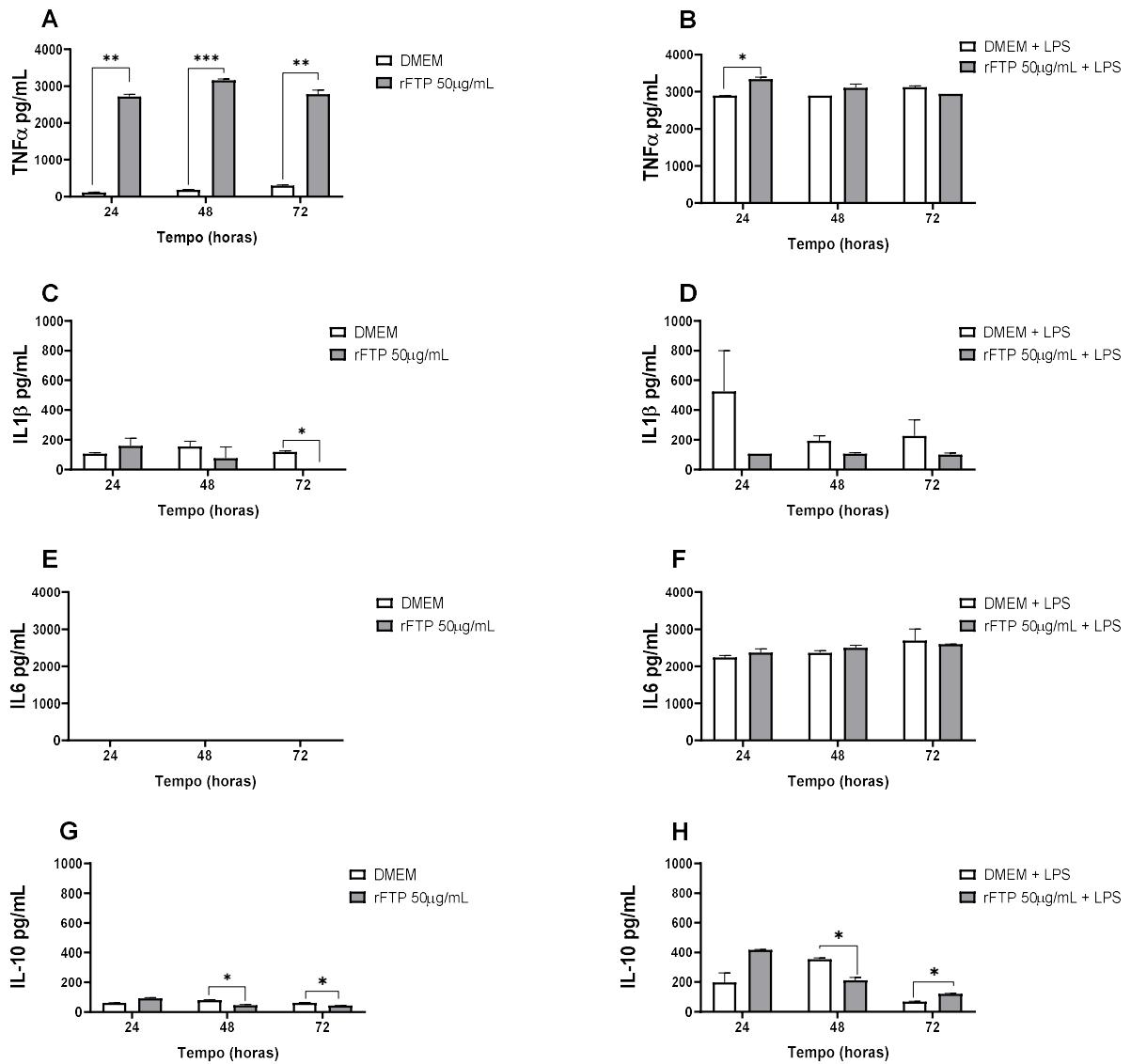
Nos macrófagos tratados com rFTP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  na ausência de LPS, os níveis de TNF $\alpha$  foram significativamente maiores em relação ao grupo DMEM (24h:  $111,27\pm10,7$ ; 48h:  $186,60\pm4,0$ ; e 72h:  $296,60\pm20,4$ ) em todos os tempos testados (24h:  $2718\pm2,13$ ; 48h:  $3163\pm2,05$  e 72h:  $2781\pm2,13$ ) (Figura 14A). Na presença do LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), o tratamento com rFTP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  aumentou os níveis de TNF $\alpha$  (24h:  $3345,27 \pm 49,02$ ), em relação ao grupo tratado somente com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (24h:  $2899,27 \pm 2,67$ ). Nos demais tempos, não foram observadas diferenças significativas entre o controle positivo e os grupos tratados (Figura 14B).

Na ausência do LPS (1 $\mu$ g/mL), não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL1  $\beta$  nas primeiras 24 e 48 horas de tratamento com rFTP 50 $\mu$ g/mL e o grupo não tratado. No entanto, após 72 horas, a produção de IL-1 $\beta$  não foi detectada em relação ao controle negativo (72h: 119,34 $\pm$ 6,67) (Figura 14C). Na presença do LPS (1 $\mu$ g/mL), não houve diferença significativa entre os grupos e tempos testados (Figura 14D).

Os níveis de IL-6 não foram detectados nos macrófagos que não foram expostos ao LPS (1 $\mu$ g/mL) em todos os tempos testados (Figura 14E). Após a ativação com LPS (1 $\mu$ g/mL), houve a produção da IL-6, porém sem diferenças estatísticas em relação ao controle positivo em todos os tempos testados (Figura 14F).

Na ausência de LPS (1 $\mu$ g/mL), os níveis de IL-10 foram semelhantes entre os grupos tratados e o controle negativo em todos os tempos testados (Figura 14G). Quando ativado pelo LPS (1 $\mu$ g/mL), o grupo tratado aumentou significativamente os níveis de IL-10 (916,67  $\pm$  52,73) em relação ao controle negativo em 24 horas (543,33  $\pm$  101,24), porém, observou-se uma diminuição dos níveis da citocina após 48h (526,67  $\pm$  58,44), com o controle positivo (783,33  $\pm$  54,01), seguido de um aumento após 72h de exposição (72h: 326,67  $\pm$  52,77), em relação ao grupo LPS (1 $\mu$ g/mL) (223,33  $\pm$  52,77) (Figura 14H).

Figura 14 - Níveis de citocinas no sobrenadante de RAW 264.7 em 24, 48 e 72 horas



**Produção de citocinas em macrófagos RAW 264.7 tratados com rFTP (50  $\mu$ g/mL) na presença e ausência de LPS (1  $\mu$ g/mL).** (A, B) TNF- $\alpha$ ; (C, D) IL-1 $\beta$ ; (E, F) IL-6; (G, H) IL-10. Os níveis de citocinas foram mensurados por ELISA nos sobrenadantes das culturas após 24, 48 e 72 horas. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão (SEM) de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey. Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle (DMEM ou DMEM + LPS).

## 5.7 O tratamento com a Biomembrana de Xiloglucana contendo rFTP aumenta a contração de feridas excisionais

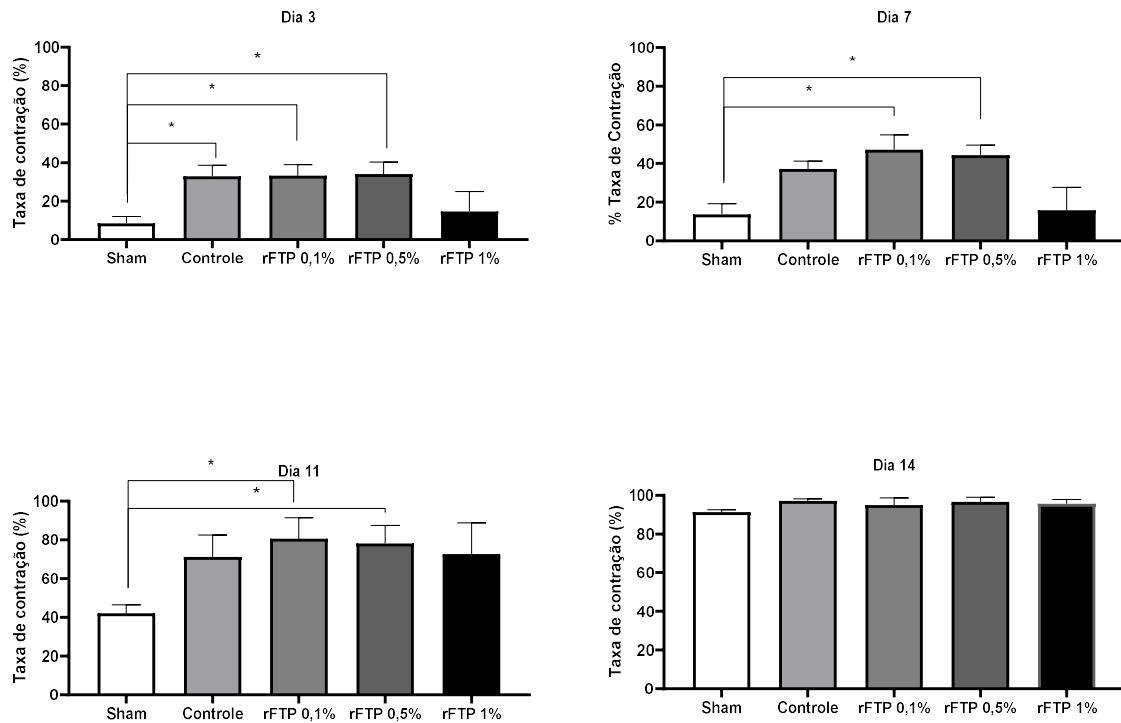
No 3º dia de cicatrização, o grupo controle ( $32,92\% \pm 2,58$ ) e os grupos tratados com rFTP 0,1 e 0,5% ( $33,25\% \pm 2,62$  e  $34,07\% \pm 2,70$ ) obtiveram taxas de contração

significativamente maiores em relação ao grupo Sham ( $8,42\pm2,58\%$ ) e rFTP 1% ( $14,62\pm0,65\%$ ) (Figura 15A). Macroscopicamente, os grupos tratados com rFTP 0,1% e 0,5% apresentaram a formação de tecido de granulação mais homogênia e menor presença de crostas em relação ao grupo Sham e rFTP 1% (Figura 16).

No sétimo dia, os grupos tratados com rFTP 0,1% ( $47,21\pm2,26\%$ ) e 0,5% ( $44,24\pm3,21\%$ ) apresentaram taxas de contração superiores ao grupo controle ( $37,25\pm2,26\%$ ) e significativamente maiores que o grupo Sham ( $13,70\pm2,26\%$ ) e grupo 1% ( $15,88\pm0,20\%$ ). No décimo primeiro dia, as taxas de contração da lesão de todos os grupos tratados com rFTP atingiram valores elevados. rFTP 0,1% ( $80,59\pm2,83\%$ ), 0,5% ( $78,22\pm2,82\%$ ) apresentaram taxa significativamente maior que o grupo Sham ( $42,08\pm2,15\%$ ). O grupo rFTP 1% ( $72,67\pm2,06\%$ ) e grupos controle ( $71,30\pm2,15\%$ ) não obtiveram diferença estatística em relação ao grupo não tratado (Figura 15B e 16).

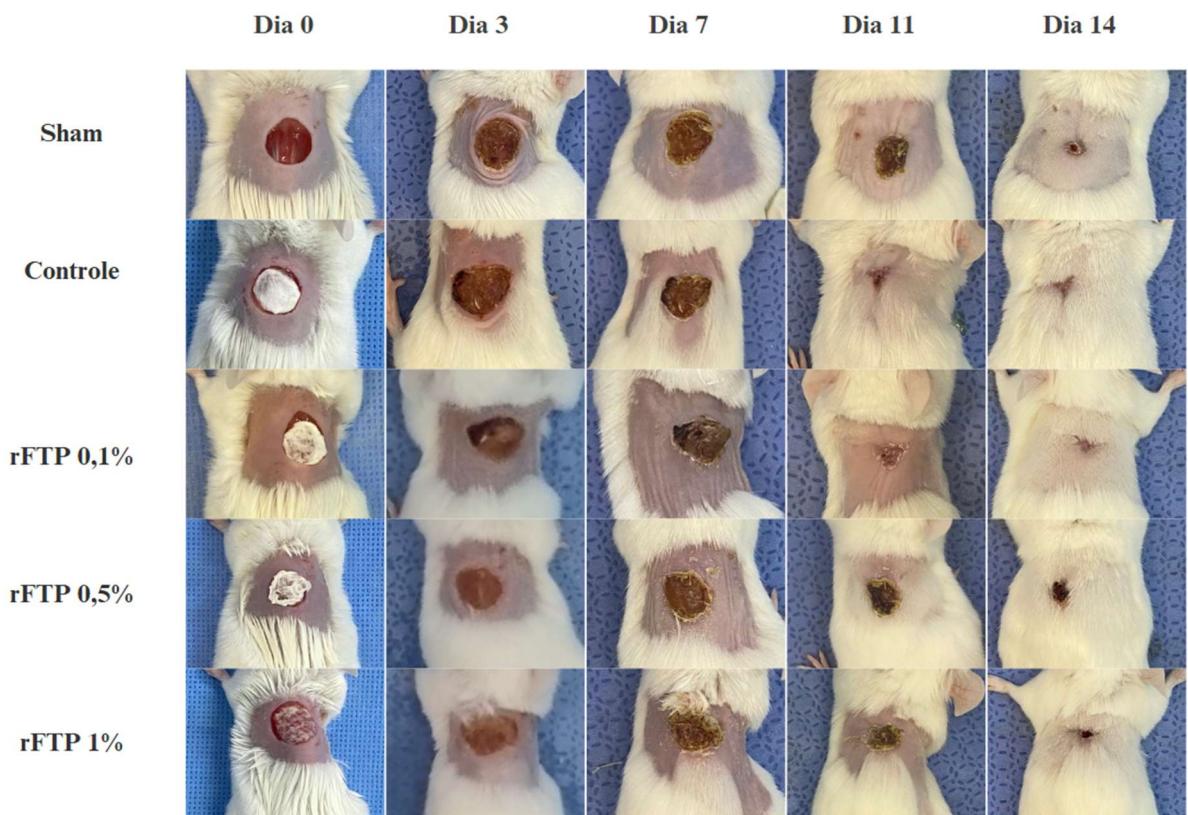
No décimo quarto dia, todas as taxas de contração são semelhantes entre si (Sham:  $91,29\pm1,75\%$ ; Controle:  $97,08\pm1,75\%$ ; rFTP 0,1%:  $95,0\pm1,12\%$ ; rFTP 0,5%:  $96,59\pm1,60\%$ ; rFTP 1%:  $95,64\pm1,14\%$ ), sem diferenças estatísticas entre os grupos. Macroscopicamente, enquanto os grupos rFTP (0,1%, 0,5%) e controle positivo apresentam formação completa do epitélio, o grupo Sham ainda apresenta crosta (Figura 15C e 16).

Figura 15 - Taxa de contração das lesões (%)



**Taxa de contração das lesões (%) em camundongos *BALB/c* tratados com diferentes concentrações de rFTP (0,1%, 0,5% e 1%) nos dias 3 (A), 7 (B), 11 (C) e 14 (D).** Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Diferenças estatisticamente significativas foram indicadas por \* $p < 0,05$  quando comparadas ao grupo Sham.

Figura 16 - Representação fotográfica do seguimento clínico das úlceras



**Representação fotográfica da evolução das lesões em camundongos tratados com diferentes concentrações de rFTP (0,1%, 0,5% e 1%), comparados aos grupos Sham e Controle (CTRL), nos dias 0, 3, 7, 11 e 14 pós-lesão.** As imagens foram feitas com um Iphone 11 a uma distância de 20cm e ilustram a progressão da cicatrização, evidenciando alterações na aparência das lesões ao longo do tempo nos diferentes grupos experimentais.

## 5.8 rFTP reduz o infiltrado inflamatório no 3º dia de cicatrização

No terceiro dia do processo cicatricial, os grupos Sham (3,0 (2-3)) e Controle (2,0 (2-3)) apresentaram um infiltrado inflamatório mais acentuado. Os grupos tratados com rFTP 0,1 e 0,5% exibiram valores intermediários (2,0 (2-3)), porém, sem diferenças estatísticas em relação ao grupo controle. Porém, no grupo rFTP 1% foi possível observar uma redução mais acentuada (2,0 (1-3)) do infiltrado inflamatório, quando comparada ao grupo Sham (Figura 17).

No sétimo dia, ainda foi possível observar um intenso infiltrado inflamatório entre os grupos (Sham 3,0 (1-4); Controle: 3,0 (1-3); rFTP 0,1 e 0,5%: 3,0 (1-3) e rFTP 1%: 2,0 (1-3)) e as medianas foram semelhantes, sem diferenças estatisticamente relevantes (Tabela 2). No

décimo quarto dia, houve uma redução acentuada do infiltrado inflamatório em todos os grupos, indicando a resolução do processo inflamatório (Figura 17).

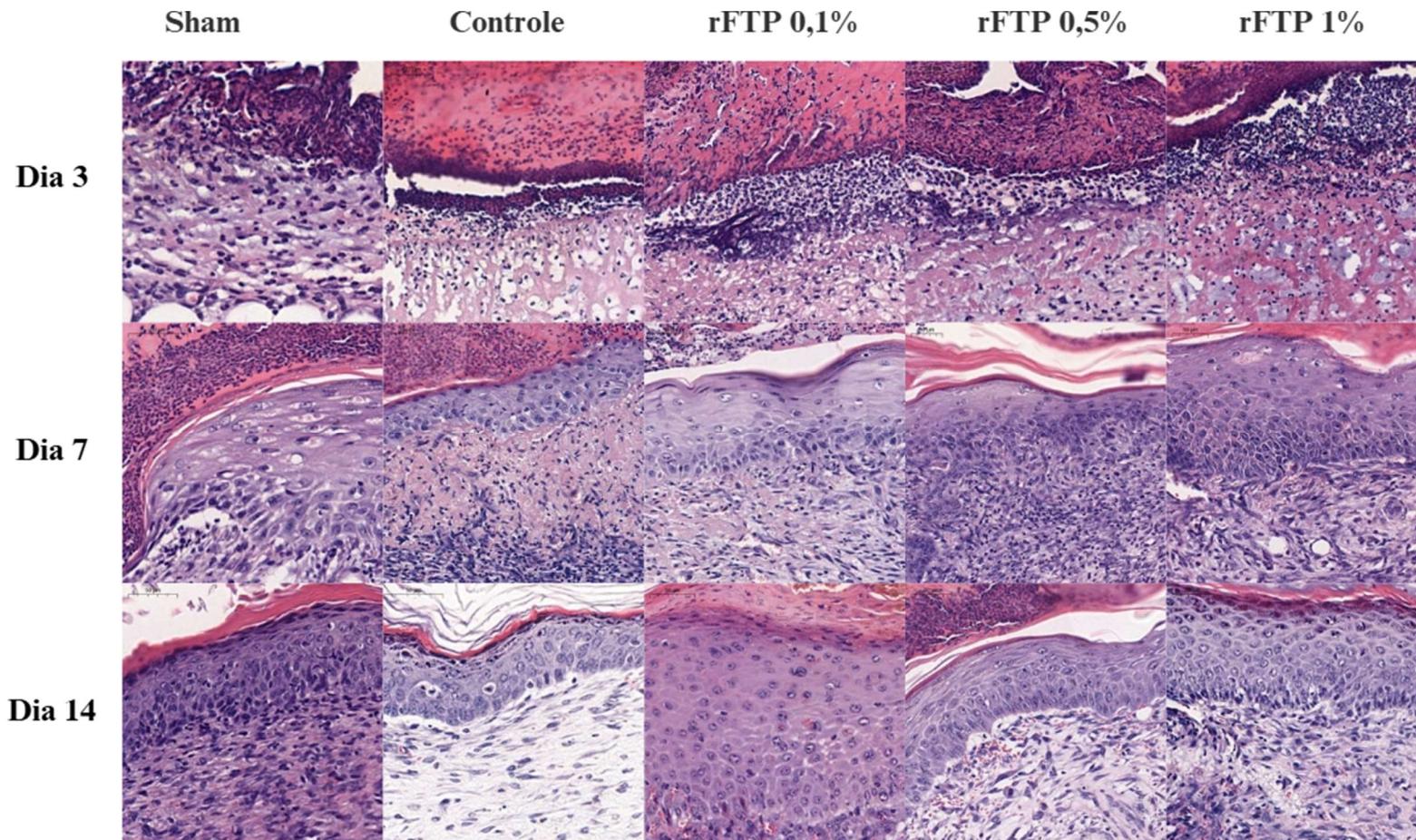
O grupo Sham apresentou uma mediana de 1,0 (1-2), indicando que o infiltrado inflamatório foi moderadamente resolvido. O grupo Controle apresentou uma mediana de 1,0 (0-2), sem diferenças estatísticas. Os grupos tratados com rFTP 0,1% e rFTP 1% tiveram uma mediana de 2,0 (0-3), indicando um infiltrado inflamatório ligeiramente mais elevado em comparação ao grupo Controle e Sham. Já o grupo rFTP 0,5% apresentou a menor mediana (1,0 (0-1)) com menor variação (Tabela 2), porém também sem diferenças estatísticas (Figura 17).

Tabela 2 - Representação por escores da avaliação histológica das úlceras

<b>Grupos</b>	<b>Escores histológicos</b>		
	<b>3º dia</b>	<b>7º dia</b>	<b>14º dia</b>
Sham	3,0 (2-3)	3,0 (1-3)	1,0 (1-2)
Controle	2,0 (2-3)	3,0 (2-3)	1,0 (0-2)
rFTP 0,1%	2,0 (2-2)	2,0 (1-3)	2,0 (2-2)
rFTP 0,5%	2,0 (2-3)	2,0 (2-3)	1,0 (1-3)
rFTP 1%	2,0 (2-2)*	2,0 (1-3)	2,0 (2-2)

**Escores histológicos no epitélio de camundongos no 3º, 7º e 14º dias pós-lesão tratados com diferentes concentrações de rFTP (0,1%, 0,5% e 1%),** comparados aos grupos Sham e Controle (A-C). Os dados são apresentados como mediana (mínimo-máximo). A análise estatística foi realizada utilizando Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por \*p < 0,05 e \*\*p < 0,01 em relação ao grupo Controle.

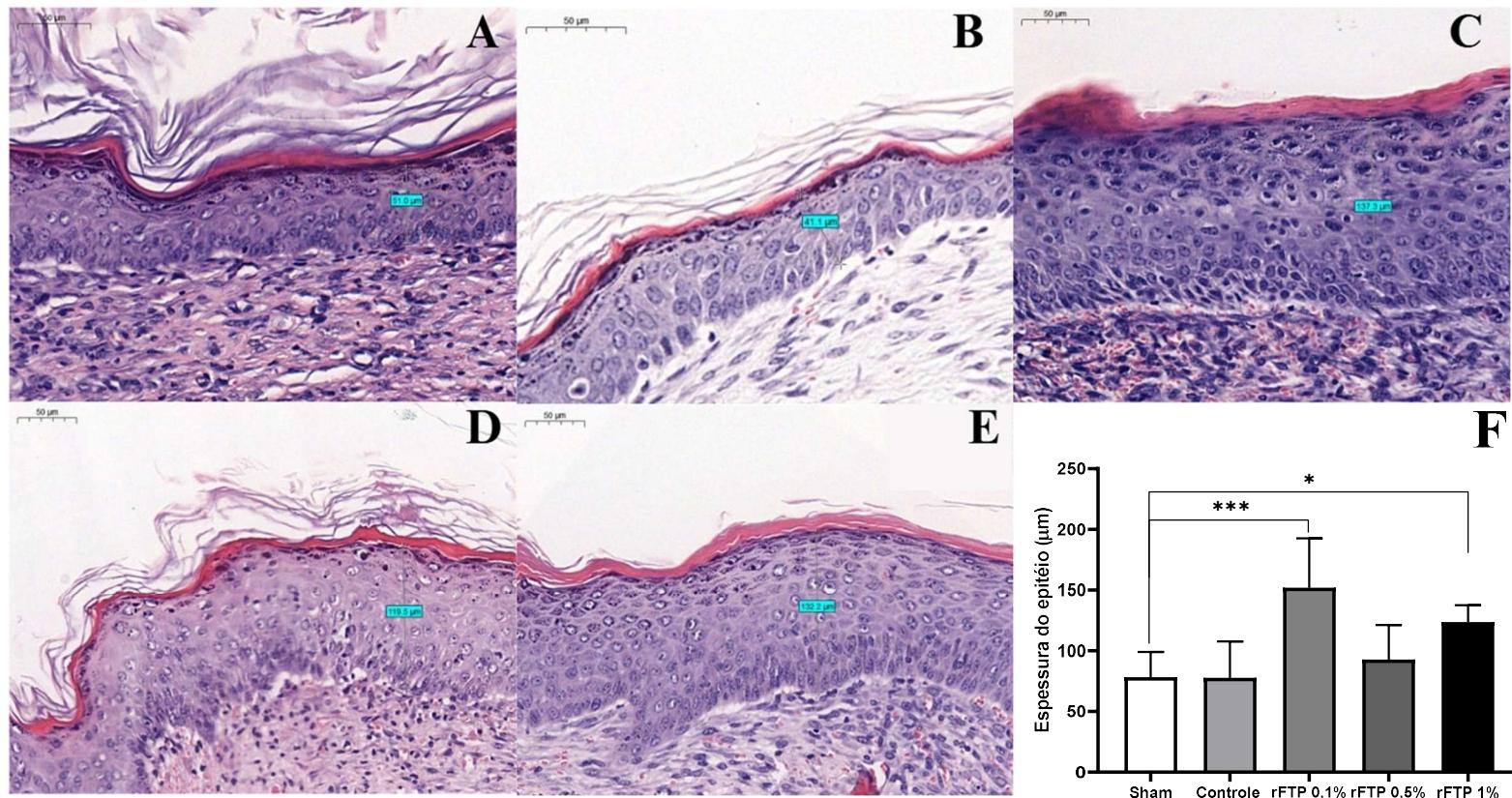
Figura 17 - Fotomicrografias da área ulcerada na pele após 3, 7 e 14 dias nos grupos experimentais (HE)



Micrografias representativas da espessura do epitélio na epiderme e derme no 3, 7 e 14º pós-lesão para os grupos Sham, Controle e tratados com rFTP (0,1, 0,5 e 1%). Coloração por Hematoxilina e Eosina (HE); barra de escala = 100  $\mu$ m.

## 5.9 rFTP aumentou a espessura do epitélio no 14º dia de cicatrização

Figura 18 - Fotomicrografias da área ulcerada na pele após 14 dias nos grupos experimentais (HE)



**Análise histológica e quantitativa da espessura epitelial no 14º dia de cicatrização.** A figura apresenta os grupos experimentais analisados no 14º dia de cicatrização. (A) Grupo Sham, (B) Grupo Controle, (C) rFTP 0,1%, (D) rFTP 0,5%, (E) rFTP 1%. A análise quantitativa da espessura epitelial está representada no gráfico (F) com as médias calculadas a partir de cinco campos distintos por animal.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando One-Way ANOVA, com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Resultados foram considerados significativos para  $p < 0,05$ . As imagens histológicas foram obtidas no aplicativo Case Viewer, utilizando coloração de hematoxilina-eosina (HE) e ampliação de 400x e a barra de escala = 50 $\mu$ m.

No décimo quarto dia após a lesão a espessura epitelial do grupo tratado com rFTP 0,1% foi significativamente maior em relação ao grupo Sham (Figura 18E e A). Os grupos tratados com Controle, rFTP 0,5 e 1% (Figura 18B, D e E) apresentaram espessuras intermediárias, sem diferenças significativas em relação ao grupo Sham.

## 5.10 rFTP modula citocinas pró e anti-inflamatória na fase proliferativa e de remodelamento

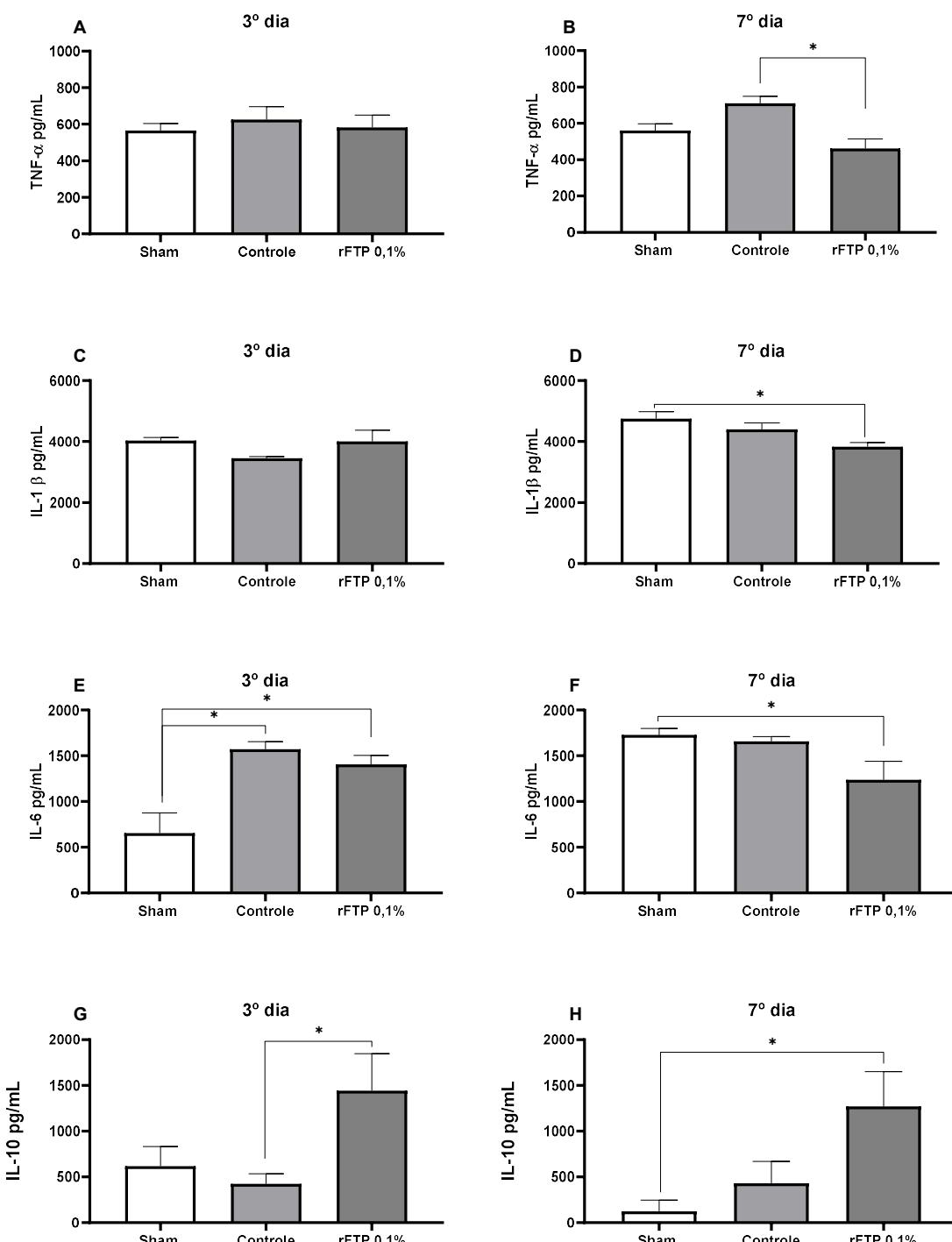
Os níveis de TNF- $\alpha$  quantificados nos grupos experimentais testados não apresentaram diferenças estatísticas no terceiro dia de cicatrização (Figura 19A). No sétimo dia, o grupo tratado com rFTP 0,1% ( $461,0 \pm 2,27$  pg/mL) apresentou níveis significativamente menores em comparação com o grupo Controle ( $710,2 \pm 5,75$  pg/mL). O grupo Sham apresentou níveis intermediários ( $559,4 \pm 3,48$  pg/mL), mas sem diferenças significativas em relação aos demais grupos (Figura 19B).

Os níveis de IL-1 beta no terceiro dia não foram diferentes entre os grupos testados (Figura 19C). No sétimo dia, os animais tratados com rFTP 0,1% ( $3827 \pm 4,57$  pg/mL) apresentaram valores significativamente menores que o grupo Sham ( $4749 \pm 1,75$  pg/mL). O grupo Controle ( $4396 \pm 2,82$  pg/mL) apresentou níveis intermediários, mas sem diferenças significativas em relação aos demais grupos (Figura 19D).

No terceiro dia, o grupo tratado com rFTP 0,1% ( $1407 \pm 5,10$  pg/mL) e controle ( $1572 \pm 1,17$  pg/mL) apresentaram níveis significativamente elevados de IL-6 em comparação com o grupo Sham ( $656,0 \pm 6,22$  pg/mL) (Figura 19E). Já no sétimo dia, observou-se uma redução significativa dos níveis de IL-6 no grupo tratado com rFTP 0,1% ( $1239 \pm 3,83$  pg/mL). O grupo Sham apresentou níveis intermediários ( $1239 \pm 0,52$  pg/mL), mas sem diferenças significativas em relação aos demais grupos (Figura 19F).

Os níveis de IL-10 foram significativamente maiores no grupo tratado com rFTP 0,1% tanto no terceiro dia ( $1443 \pm 3,04$  pg/mL) em relação ao grupo Controle ( $421,7 \pm 3,76$  pg/mL) (Figura 19G), quanto no sétimo dia ( $1271 \pm 4,29$  pg/mL), em comparação ao grupo Controle ( $429,7 \pm 3,14$  pg/mL). O grupo Sham apresentou níveis mais reduzidos nos dois tempos (3º dia:  $617,7 \pm 0,72$  pg/mL; 7º dia:  $123,0 \pm 1,15$  pg/mL) (Figura 19H).

Figura 19 - Efeito do tratamento com rFTP nos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 nas lesões cutâneas



**Níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) e anti-inflamatória (IL-10) em homogenato de lesões cutâneas de camundongos tratados com rFTP 0,1%, comparados aos grupos Sham e Controle. (A-B) Níveis de TNF- $\alpha$  nos dias 3 e 7 pós-lesão; (C-D) Níveis de IL-1 $\beta$  nos dias 3 e 7 pós-lesão; (E-F) Níveis de IL-6 nos dias 3 e 7 pós-lesão; (G-H) Níveis de IL-10 nos dias 3 e 7 pós-lesão. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. Diferenças estatisticamente significativas estão indicadas por \* $p < 0,05$ .**

## 6 DISCUSSÃO

A frutapina, encontrada nas sementes de *Artocarpus altilis*, com afinidade por glicose/manose, têm propriedades biológicas consideráveis, como a modulação da inflamação e estímulo à proliferação, respaldando a investigação da sua influência no contexto de cicatrização de feridas. Considerando a extração natural da proteína limitada e com rendimento escasso, a expressão da frutapina em sistemas heterólogos, como a *Escherichia coli*, permite a produção da lectina bioativa com maior controle e rendimento, viabilizando a análise do seu efeito bioativo no reparo tecidual (DE SOUSA *et al.*, 2017).

Os resultados *in vitro* deste estudo sugerem que a rFTP, exerceu efeitos distintos a depender do tipo celular, da concentração utilizada e do tempo de incubação. Em queratinócitos humanos (HaCaT), nas concentrações mais baixas e nos tempos mais curtos, a rFTP exibiu uma resposta proliferativa. De maneira semelhante, nos fibroblastos murinos, as concentrações mais baixas aumentaram significativamente a viabilidade celular a curto prazo. Esses achados são coerentes aos estudos anteriores que sugeriram que a rFTP estimula vias relacionadas à proliferação e sobrevivência celular (DE SOUSA *et al.*, 2017).

Estudos anteriores, relataram que as lectinas, especialmente do gênero *Artocarpus*, incluindo a Frutapina, Artin M e Artocarpina, estão associadas à indução de fatores que favorecem a cicatrização (DE SOUSA *et al.*, 2019a; KIM, YEON JUNG *et al.*, 2020a). A rFTP foi capaz de estimular a migração celular em fibroblastos murinos 3T3 (DE SOUSA *et al.*, 2017). Os pesquisadores afirmam que a afinidade a glicose/manose, permite a interação com os receptores Toll-Like 4 em fibroblastos, promovendo a sinalização que resulta na estimulação da expressão da cinase regulada por sinal extracelular fosforilada (p-ERK), que participa das vias de sinalização para regulação da inflamação e proliferação celular (SHAUL, *et al.*, 2007; SOUZA, *et al.*, 2013; ROCHA, *et al.*, 2020).

Na linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7, a rFTP promoveu um aumento importante na viabilidade celular nas primeiras horas de tratamento, especialmente nas concentrações mais altas. No entanto, a longo prazo, observou-se uma redução da viabilidade em doses mais elevadas, enquanto que em doses mais baixas observou-se o efeito proliferativo expressivo. Esse achado sugere que a rFTP pode modular a atividade dos macrófagos, que são maestros na dinâmica cicatricial, e protagonistas na transição da fase inflamatória para a proliferativa (KRZYSZCZYK *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que a redução da viabilidade celular observada na exposição à rFTP em tempos prolongados pode ter sido influenciada também por fatores relacionados ao microambiente de cultivo, como o confinamento espacial devido ao tamanho do poço da placa utilizada, levando à uma confluência precoce, esgotamento dos nutrientes e acúmulo de metabólitos tóxicos. Esses fatores podem ter contribuído para a diminuição da viabilidade celular independente da ação da rFTP.

A literatura aponta que lectinas podem modular significativamente a atividade dos macrófagos. Na superfície de macrófagos há receptores de Lectina Tipo C (CLRs) tais como Dectina-1 e o receptor de manose (MR), que estão envolvidos em respostas inflamatórias ao ativarem vias de sinalização necessárias para a produção de espécies reativas de oxigênio e secreção de citocinas (LEFÈVRE *et al.*, 2013). A Aglutinina de gérmen de trigo (WGA), um tipo de lectina, foi capaz de aumentar a atividade antitumoral de macrófagos *in vitro* (AUTH *et al.*, 2021) e lectinas do cogumelo *Formitella frazinea* (FFrL) aumentaram a apresentação de抗ígenos restritos por MHC em macrófagos peritoneais, melhorando a capacidade de apresentação (KIM, HYUNJIN *et al.*, 2007).

A dosagem de nitrito no sobrenadante dos macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS, que é utilizado como um estimulador pró-inflamatório, polarizando os macrófagos para o perfil M1, revelou que a rFTP reduziu estatisticamente a produção do NO quando comparado com o grupo tratado apenas com o LPS, indicando uma possível regulação da resposta inflamatória. Na ausência do LPS, a produção basal do NO nos macrófagos tratados com rFTP permaneceu próxima ao observado no grupo DMEM, sem diferenças significativas, inferindo que a rFTP não estimula a produção de NO em condições fisiológicas, mas exerce um efeito seletivo sobre macrófagos ativados, reduzindo a hiperprodução de NO no microambiente inflamado.

Na fase inflamatória, o NO é sintetizado principalmente por macrófagos através da via óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e é um agente essencial para a defesa contra agentes patogênicos, porém, em condições crônicas e inflamações exageradas, ele contribui para o dano tecidual (LUO; CHEN, 2005). Na fase proliferativa, o NO contribui para a proliferação de fibroblastos e produção de colágeno (BREHMER *et al.*, 2015). Também facilita a angiogênese e formação de novos vasos, o que é vital para o fornecimento de oxigênio e nutrientes para o tecido neoformado. Portanto, o óxido nítrico é crucial para a cicatrização tanto nas fases iniciais quanto nas tardias (BLECHER *et al.*, 2012).

Esses resultados sugerem que a rFTP atua como um modulador da atividade de macrófagos, influenciando sua resposta basal e durante a sua ativação. Em macrófagos não ativados, a lectina demonstra capacidade de aumentar a atividade celular e, quando estão polarizados, a rFTP demonstra a capacidade de equilibrar a inflamação excessiva, indicando um potencial imunomodulador promissor. Esses achados incentivam a importância de estudos adicionais para explorar os mecanismos moleculares subjacentes à sua ação, incluindo o papel da rFTP nas vias de sinalização relacionadas ao NF- $\kappa$ B ou iNOS, que são fundamentais para a compreender melhor as vias inflamatórias e produção de óxido nítrico.

Ao longo do estudo do cenário da fase inflamatória, observou-se que rFTP conseguiu modular os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10) na presença ou não do LPS. Essas respostas revelaram a influência que a lectina exerce na liberação desses mediadores. Na ausência do LPS, foi observado um aumento significativo dos níveis de TNF- $\alpha$  em todos os tempos avaliados quando comparado com o controle. Esse aumento considerável reforça a hipótese de que a rFTP é capaz de estimular a produção basal de TNF- $\alpha$  em macrófagos não ativados, sendo um mecanismo relevante na preparação do sistema imune para a dinâmica da fase inflamatória.

Na presença do LPS, o tratamento com a rFTP resultou em um aumento considerável nas primeiras horas de incubação, seguido de uma estabilização nos tempos subsequentes. Esse comportamento sugere que a rFTP não apenas potencializa a resposta inflamatória de macrófagos ativados, mas também exerce uma regulação temporal sobre a produção dessa citocina, evitando uma produção exagerada e prolongada. Esse efeito regulatório é particularmente importante pois indica que a rFTP pode contribuir para o controle da intensidade da inflamação.

O TNF- $\alpha$  é um mediador crítico no processo de cicatrização de feridas nas fases iniciais, em que ele é rapidamente liberado, dando o impulso para a liberação de quimiocinas para o recrutamento de células inflamatórias que irão remover os resíduos dos danos celulares, bem como controlar a invasão de patógenos (RITSU *et al.*, 2017). Na fase de remodelamento, sua função se estende à ativação das metaloproteinases de matriz (MMPs), em especial a MMP-2 em fibroblastos. Esse mecanismo é fundamental para o refinamento do tecido neoformado, permitindo a reorganização da matriz extracelular (DAI, JIEZHI *et al.*, 2021). Dessa forma, o TNF- $\alpha$  é uma citocina indispensável para qualidade estrutural da pele em cicatrização (YUSUF, 2024).

Em relação à IL-1 $\beta$ , rFTP não alterou significativamente os seus níveis na ausência de LPS nos tempos iniciais, mas foi observado uma redução importante e tardia em relação ao grupo controle DMEM. Na presença do LPS, os níveis de IL-1 $\beta$  continuaram elevados, sem diferenças estatísticas entre os grupos, inferindo que rFTP não atua significativamente na produção de IL-1 $\beta$  basal e nem em macrófagos ativados.

Durante a fase inflamatória, a IL-1 $\beta$  participa do ciclo de feedback positivo que sustenta macrófagos classicamente ativados (WEINHEIMER-HAUS; MIRZA; KOH, 2015). Quando em níveis altos, inibe a proliferação e migração de fibroblastos, pela regulação positiva de MMP-2 e MMP-9 e negativa de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPS) por meio da via p38 MAPK e ativando a via p38 MAPK (DAI, JIEZHI *et al.*, 2021). IL-1 $\beta$  também é capaz de estimular macrófagos a produzirem o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A), que é importante para impulsionar a angiogênese. A modulação da IL-1 $\beta$  promove a cicatrização em condições controladas e contribui para o destravamento da fase inflamatória em feridas crônicas, como a diabetes (DAI, JIEZHI *et al.*, 2021).

No sobrenadante dos macrófagos tratados com rFTP, não foram detectados níveis significativos de IL-6 nos grupos que não foram estimulados com LPS. No entanto, quando estimulados, os níveis de IL-6 foram elevados, mas sem diferenças estatísticas entre os grupos. Esse resultado sugere que a rFTP não influencia a produção de IL-6 basal ou em macrófagos ativados num contexto de experimentação *in vitro*.

É válido citar que esse resultado pode inferir que embora a rFTP interaja com os receptores de carboidratos na superfície dos macrófagos, sua influencia não envolve a via clássica de ativação, que leva a respostas pró-inflamatórias, associadas à IL-6. Esse comportamento pode estar indicando um potencial efeito imunomodulador seletivo ou anti-inflamatório que, pode favorecer contextos terapêuticos que requerem o controle da inflamação excessiva e estados crônicos (JOHNSON, *et al.*, 2020).

A IL-6 é uma citocina essencial para a fase inflamatória, pois promove o recrutamento e ativação de leucócitos, aumenta a angiogênese e ativa a via STAT3, que está envolvida na promoção da migração e proliferação celular. A desregulação da IL-6 pode causar fibrose, dessa forma, a IL-6 é essencial para o equilíbrio no remodelamento. Estudos anteriores demonstraram que a rFTP foi capaz de promover a liberação de IL-6 em fibroblastos humanos (HSF) por meio da interação com o receptor TLR4 (DE SOUSA *et al.*, 2019b).

Em relação à IL-10, rFTP foi capaz de aumentar os níveis dessa citocina nos macrófagos ativados com LPS nas primeiras 24 horas. Artin M também foi capaz de aumentar os níveis de IL-10 no sobrenadante de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs), um modelo mais sensível e responsivo do que a linhagem imortalizada de Raw 264.7 (CUSTODIO *et al.*, 2011). Esse aumento inicial foi seguido de uma redução nos tempos subsequentes, indicando que a rFTP pode promover uma resposta anti-inflamatória precoce e modular o processo de cicatrização desde a primeira fase. Esses dados inferem que rFTP tem potencial imunomodulador e é capaz de regular a produção de citocinas.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória importante para a regulação da resposta imune, através da diminuição dos mediadores inflamatórios, como a proteína quimiotática de macrófagos, TNF- $\alpha$  e IL-6, reduzindo a infiltração de macrófagos e neutrófilos (SATO; OHSHIMA; KONDO, 1999). Além disso, está envolvida na promoção da angiogênese e remodelamento da matriz extracelular (XIAO *et al.*, 2019). Fisiologicamente, a capacidade de regular citocinas é essencial para uma cicatrização bem sucedida. O excesso de citocinas pró-inflamatórias pode causar danos teciduais e atraso na cicatrização.

Com base nesses achados, a incorporação da rFTP em um veículo biocompatível, permitiu a translação para análises *in vivo* e uma interpretação macroscópica mais complexa das suas propriedades bioativas no contexto da cicatrização. Dessa forma, optou-se pelas xiloglucanas, que são biopolímeros versáteis pertencentes ao grupo das hemiceluloses e derivadas das paredes celulares de plantas e particularmente abundantes nas sementes de *Tamarindus indica*. Sua cadeia principal é composta por resíduos de glicose unidos por ligações  $\beta$ -1,4 e possuem estrutura ramificada que facilita interações com biomoléculas, como proteínas, além de serem biodegradáveis e apresentarem baixa toxicidade. As suas propriedades mucoadesiva e gelificante têm ganhado destaque e impulsionado o uso de biomembranas de xiloglucana no campo da medicina regenerativa (DUTTA; GIRI; GIRI, 2020).

O resultado da taxa de contração das lesões em camundongos revelou que os grupos tratados com a biomembrana de xiloglucana contendo rFTP tiveram a redução da área da lesão significativamente mais acelerados nos dias iniciais em relação aos grupos controle Sham. É importante discutir que nas primeiras fases do processo cicatricial (3º e 7º dias), os camundongos tratado com a dose de 0,1% apresentaram a maior taxa de contração em comparação aos outros grupos tratados. No 11º dia, as doses de 0,5 e 1% alcançaram taxas

semelhantes, sugerindo que doses mais altas podem resultar em um efeito mais a longo prazo. No 14º dia, todos os grupos apresentaram resolução do processo cicatricial.

Esses resultados inferem uma ação da rFTP no processo de reparo tecidual, sugerindo uma interação ativa com as células epiteliais. É importante investigar se a rFTP poderia estar potencializando da atividade dos miofibroblastos, que são fundamentais para a estrutura tecidual e fechamento mecânico da ferida (SCHUSTER *et al.*, 2023). Estes emergem da diferenciação de fibroblastos como resposta a estímulos bioquímicos, tais como o TGF-  $\beta$ 1, que é o principal fator responsável por essa diferenciação, pela via sinalização intracelular Smad2/3, induzindo alterações no perfil de expressão gênica dos fibroblastos, incluindo a produção de proteínas contráteis, como a alfa-actina do músculo liso ( $\alpha$ -SMA), um marcador característico dos miofibroblastos. TGF-  $\beta$  também influencia a sinalização de cálcio por meio dos canais TRPV4, necessários para a diferenciação (WILKES *et al.*, 2005).

Além disso, o efeito acelerador pode estar associado à interação das lectinas como a matriz extracelular, favorecendo a proliferação dos queratinócitos para o fechamento da ferida. Estudos anteriores já relatam que lectinas e moléculas similares podem ser mediadores dessa interação celular com a matriz extracelular, promovendo uma resposta tecidual inicial mais rápida e eficiente (CAMPANA *et al.*, 2002). Essa interação baseia-se na capacidade das lectinas se ligarem a glicoconjungados específicos, como proteoglicanos ou polissacarídeos e modular a interface célula-ambiente, influenciando as atividades celulares e promovendo o desenvolvimento da matriz (COELHO *et al.*, 2017).

Na perspectiva microscópica, durante a avaliação histológica do 14º dia, observou-se que os grupos que foram tratados com rFTP, especificamente na dose de 0,1% desenvolveram um epitélio mais espesso em relação aos grupos controle Sham e controle somente com a biomembrana de xiloglucana. É válido ressaltar que as doses de 0,5 e 1% também tiveram resultados promissores, embora menores que a dose de 0,1%, indicando que, possivelmente, doses mais altas de rFTP podem atingir um platô na capacidade de estimular a proliferação epitelial. O fenômeno de platô é comum nos sistemas biológicos, podendo estar relacionado à saturação dos receptores-alvo da lectina, ativação de mecanismos de feedback negativo ou à limitação na sinalização intracelular (KATZUNG; TREVOR, 2018). É válido considerar que concentrações mais altas da rFTP podem induzir sinais discretos de estresse celular ou, até mesmo, interferir na liberação da lectina a partir da biomembrana, afetando a eficácia do tratamento.

O aumento da espessura do epitélio é um indicador relevante para a cicatrização de feridas, pois reflete uma maior proliferação e organização de queratinócitos, células fundamentais para a reepitelização. A rFTP apresenta uma significativa homologia estrutural com Artin M, uma lectina de *Artocarpus integrifolia*, que foi amplamente estudada por seus efeitos biológicos promissores. Dentre eles, A Artin M acelerou a cicatrização de feridas na mucosa oral de ratos, aumentando a proliferação celular, a reepitelização e a deposição de colágeno do tipo I (KIM, SANG YONG; NAIR, 2019). Essa capacidade está relacionada aos seus receptores de manose presente em queratinócitos e macrófagos (DE SOUZA *et al.*, 2016).

É importante citar que ainda não há estudos específicos que abordem a interação da rFTP com queratinócitos humanos, mas a Fratalina, outra lectina derivada das sementes de *Artocarpus altilis*, apresentou resultados valiosos sobre o potencial dessas proteínas em aplicações dermatológicas e cicatrizantes, como curativos de celulose bacteriana, que estimularam a migração de fibroblastos sem causar citotoxicidade em baixas concentrações (DA SILVA, *et al.*, 2024).

Outras lectinas foram associadas a uma melhora na reepitelização e organização tecidual em modelos murinos de feridas cutâneas, tais como a ConA, extraída de *Canavalia ensiformis*, que foi capaz de melhorar a organização tecidual através da diminuição do infiltrado inflamatório e liberação de estímulos que impulsionaram a polarização de macrófagos para o fenótipo M2 (DOS SANTOS SILVA *et al.*, 2019). Esses estudos reforçam a hipótese que a rFTP pode apresentar efeitos semelhantes no processo de cicatrização de feridas.

Na avaliação microscópica do infiltrado inflamatório, observou-se um escore maior nos grupos Sham e Controle quando comparado aos grupos tratados, indicando uma modulação importante da rFTP na fase inflamatória. Essa atenuação do microambiente inflamatório é fundamental para a progressão para a fase proliferativa, levando a uma regeneração tecidual mais rápida e eficiente e menor risco de cronicidade (RODRIGUES, MELANIE *et al.*, 2019).

A análise dos resultados nos parâmetros de eficiência de reepitelização, como maior taxa de contração da lesão e maior espessura epitelial, justificaram a dose de 0,1% com base nos parâmetros macro e microscópicos, que revelaram sua capacidade de equilibrar satisfatoriamente a transição para a fase proliferativa e resolução da cicatrização. Assim, a investigação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias demonstrou a modulação química que a rFTP induziu no microambiente da lesão nas fases inflamatórias e proliferativa.

No que se refere às dosagens dos mediadores inflamatórios, especificamente os níveis de TNF- $\alpha$ , no terceiro dia do processo cicatricial, não apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos Sham e controle, sugerindo que rFTP não altera a produção desse mediador na fase inflamatória. No entanto, no sétimo dia foi observado uma redução significativa dos níveis desta citocina em relação aos controles, indicando que a lectina contribuiu para a modulação do processo inflamatório na fase proliferativa.

Esse resultado é bastante relevante, pois o TNF- $\alpha$  é essencial na fase inicial do processo inflamatório, por ser responsável pelo recrutamento e ativação de células imunes no local da lesão, bem como produção de outros mediadores inflamatórios garantindo um processo controlado e preparado para conter possíveis agentes patogênicos invasores. No entanto, a presença prolongada desse mediador pode prolongar a fase inflamatória, gerando a sua cronificação, podendo intensificar os danos teciduais associados (WEBSTER; VUCIC, 2020).

Por outro lado, a redução do TNF- $\alpha$  no sétimo dia indica uma transição para a fase proliferativa satisfatória e no momento adequado, equilibrando a inflamação e propiciando um ambiente favorável ao estabelecimento da fase proliferativa (YUSUF, *et al.*, 2024). Artin M também demonstrou capacidade de reduzir os níveis de TNF- $\alpha$  em modelos murinos, sendo relacionado a uma melhora na reepitelização e organização tecidual (KIM, YEON JUNG *et al.*, 2020c).

Em relação aos níveis de IL-1 $\beta$ , semelhantemente no terceiro dia, não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo Sham e Controle, indicando que a rFTP não interfere na produção dessa citocina na fase inflamatória. No sétimo dia, no entanto, houve uma redução significativa dos níveis desse mediador inflamatório em relação ao controle, sugerindo a contribuição da lectina na fase intermediária da cicatrização.

A IL-1 $\beta$  é uma citocina que desempenha um papel importante na amplificação da resposta inflamatória inicial, regulando positivamente a angiogênese através do fator de crescimento endotelial vascular-A (VEGF-A) em macrófagos M2 (DOS *et al.*, 2021; SHARIFIAGHDAM *et al.*, 2021). Dessa forma, também é crucial a modulação dos níveis desse mediador para garantir a transição para a fase proliferativa. A lectina ConA também foi capaz de diminuir os níveis de IL-1 $\beta$  em feridas cutâneas e favorecer a fase proliferativa, promovendo a reepitelização (ARRUDA *et al.*, 2021).

Os níveis de IL-6 no terceiro dia foram significativamente maiores nos grupos Controle e rFTP em relação ao Sham, sugerindo uma ativação mais robusta da resposta inflamatória. No

sétimo dia, os níveis do grupo controle permaneceram elevados, sem diferença significativa em relação ao grupo Sham, enquanto que o grupo tratado apresentou uma redução substancial da produção desse mediador inflamatório durante a fase proliferativa.

Como já foi discutido, o estudo de De Sousa (2017) apresentou o aumento dos níveis de IL-6 em sobrenadante de fibroblastos da pele Humana (3T3) tratados com rFTP. Neste trabalho, foi demonstrado que a lectina interage diretamente com o receptor TRL4 e induz a produção desse mediador. A IL-6 desempenha um papel dual no processo de cicatrização de feridas, sendo fundamental na fase inflamatória para estimular o recrutamento de células e a transição para a fase proliferativa. Porém, níveis altos dessa citocina na fase proliferativa estão associados à fibrose e formação de quelóides (LIU *et al.*, 2022).

Em relação a IL-10, no terceiro dia, os níveis foram significativamente elevados em comparação ao grupo Sham e Controle, indicando uma ativação precoce dessa citocina anti-inflamatória. Esses níveis permaneceram elevados, sugerindo uma modulação anti-inflamatória sustentada. A IL-10 desempenha um papel fundamental na modulação da inflamação, inibindo o recrutamento excessivo de células inflamatórias e induzindo a polarização dos macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório (SINGAMPALLI *et al.*, 2020). Além disso, contribui para a atividade dos fibroblastos e promoção da sua diferenciação em miofibroblastos, que é essencial para a deposição de colágeno (MEI *et al.*, 2020). Ademais, a IL-10 também induz a promoção da angiogênese ao aumentar o recrutamento de célula progenitoras endoteliais, impulsionando a neovascularização e reepitelização (SHORT *et al.*, 2022).

É importante ressaltar que o grupo controle, representado pela biomembrana de Xiloglucana sem o ativo, demonstrou uma resposta passiva e menos eficiente quando se compara o cenário geral dos ensaios realizados com esses grupos, sugerindo o protagonismo da rFTP. Essa hipótese baseia-se nos indicadores taxa de contração da lesão, espessura do epitélio e níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias com resultados mais pronunciados e favoráveis a cicatrização nos grupos tratados com rFTP em detrimento do grupo controle.

Os resultados obtidos sugerem o potencial biomédico da rFTP como uma alternativa terapêutica para o tratamento de feridas. No entanto, mesmo que os achados sejam promissores, ainda é necessário a realização de mais estudos, visando esclarecer os mecanismos moleculares da ação rFTP, como a investigação de mediadores adicionais, como TGF- $\beta$  e VEGF, bem como o papel imunomodulador da rFTP em células imunológicas, como macrófagos e linfócitos T.

Dessa forma, esses estudos podem respaldar o avanço da pesquisa para ensaios clínicos (CAMPANA *et al.*, 2002).

Portanto, o uso de biomembranas de Xiloglucana contendo rFTP foi consideravelmente eficaz na modulação do processo de cicatrização em feridas excisionais de camundongos *BALB/c*. A abordagem deste trabalho soma as propriedades da rFTP de interagir especificamente com carboidratos de membrana com a biocompatibilidade e estabilidade de biomembranas de xiloglucana, oferecendo, portanto, uma estratégia inovadora e abrindo novas perspectivas para tratamentos promissores na medicina regenerativa (TROY *et al.*, 2021).

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que a frutapina recombinante (rFTP) pode ser considerada como um potencial agente a ser explorado para a cicatrização de feridas, demonstrando capacidade de modular a inflamação e aumentar da espessura epitelial, promovendo uma cicatrização tecidual mais acelerada em modelos murinos. Portanto, é válido considerar a realização de mais estudos experimentais para obter uma compreensão mais profunda dos mecanismos moleculares envolvidos na atividade biológica da rFTP para, assim, avançar para a aplicação em ensaios clínicos. Ademais, este trabalho contribui para o avanço no conhecimento biotecnológico com o desenvolvimento de ativos novos e eficazes, além promover a sustentabilidade com a utilização de um subproduto que seria descartado.

## REFERÊNCIAS

- ARRUDA, Isabel R. S. et al. Xyloglucan and Concanavalin A based dressings in the topical treatment of mice wound healing process. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, v. 2, 25 dez. 2021.
- AUTH, Janina et al. Lectin from *Triticum vulgaris* (WGA) inhibits infection with SARS-CoV-2 and its variants of concern alpha and beta. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 19, 1 out. 2021.
- BARBOSA, Paula Perazzo de Souza et al. *Leguminosae* Lectins as Biological Tools in Medical Research: a Review. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 64, p. 1–13, 2021a.
- BARBOSA, Paula Perazzo de Souza et al. *Leguminosae* Lectins as Biological Tools in Medical Research: a Review. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 64, p. 1–13, 2021b.
- BEDIAN, Luis et al. Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. [S. l.]: Elsevier B.V., 1 maio 2017.
- BERTHIAUME, François; HSIA, Henry C. Regenerative Approaches for Chronic Wounds. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-010220->.
- BHUTIA, Sujit K. et al. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. *Pharmacological Research*. [S. l.]: Academic Press, 1 jun. 2019.
- BLECHER, Karin et al. Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing in NOD-SCID mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 8, n. 8, p. 1364–1371, nov. 2012.
- BREHMER, F. et al. Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm® VU-2010): Results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 29, n. 1, p. 148–155, 1 jan. 2015.

- BRUSTEIN, V. P. et al. A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. *Inflammopharmacology*, v. 20, n. 6, p. 315–322, dez. 2012.
- BÜNTZEL, Judith; MICKE, Oliver; BÜNTZEL, Jens. How to transfer traditional knowledge about medicinal herbs? or TCM plants: a black box for modern oncologists. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 147, n. 2, p. 351–359, 1 fev. 2021.
- BURNS, David Anthony; ROOK, Arthur J. *Rook's Textbook of Dermatology*. Vol. 1. [S. l.]: Wiley-Blackwell, 2010.
- CAGLIARI, Rafael; KREMER, Frederico Schmitt; PINTO, Luciano da Silva. Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. [S. l.]: Elsevier B.V., 1 nov. 2018.
- CAMPANA, Patricia T. et al. Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin. *European Journal of Biochemistry*, v. 269, n. 3, p. 753-758, 2002.
- CAO, Yuqi et al. Advances and Challenges in Immune-Modulatory Biomaterials for Wound Healing Applications. *Pharmaceutics*. [S. l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 ago. 2024.
- CEVOLI, Chiara et al. Rheological characterisation of selected food hydrocolloids by traditional and simplified techniques. *Food Hydrocolloids*, v. 33, n. 1, p. 142-150, 2013.
- CIOCE, Angela et al. Role of the skin immune system in wound healing. *Cells*, v. 13, n. 7, p. 624, 2024. DOI: 10.3390/cells13070624. Acesso em: 6 maio 2025.
- CHAHUD, Fernando et al. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 90, n. 2, p. 166-173, abr. 2009.
- CHOLLETTI, V.; ILYAS, M. A prospective study of clinical factors (BMI, DM) influencing healing of abdominal incisions correlated with tissue expression of MMP2, MMP9 and TIMP. *American Journal of Sociology*, v. 3, p. 142-148, 2020. DOI: 10.47008/ajs/2020.3.1.31. Acesso em: 6 maio 2025.
- CHOPRA, M.; BHAGWANI, A.; KUMAR, H. Proveniência, providência e posição das células endoteliais na patologia vascular da medula espinhal lesionada. *Neurobiologia Celular e Molecular*, v. 43, p. 1519-1535, 2022. DOI: 10.1007/s10571-022-01266-9. Acesso em: 3 maio 2025.

- COELHO, Luana Cassandra Breitenbach Barroso et al. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. [S. l.]: Hindawi Limited, 2017.
- COLTRI, Kely C. et al. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. *American Journal of Pathology*, v. 173, n. 2, p. 423-432, 2008.
- CUSTODIO, Luiz Antonio et al. Protective effect of Artin M from extract of *Artocarpus integrifolia* seeds by Th1 and Th17 immune response on the course of infection by *Candida albicans*. *International Immunopharmacology*, v. 11, n. 10, p. 1510-1515, out. 2011.
- DAI, Christina; SHIH, Shawn; KHACHEMOUNE, Amor. Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review. *Journal of Dermatological Treatment*. [S. l.]: Taylor and Francis Ltd., 17 ago. 2020.
- DAI, Jiezhi et al. IL-1  $\beta$  Impaired Diabetic Wound Healing by Regulating MMP-2 and MMP-9 through the p38 Pathway. *Mediators of Inflammation*, v. 2021, 2021.
- DAS, Subhamoy; BAKER, Aaron B. Biomaterials and nanotherapeutics for enhancing skin wound healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 31 out. 2016.
- DA SILVA, T. F. et al. Loading of bacterial cellulose dressing with frutalin, a lectin from *Artocarpus incisa* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 276, p. 133774, 2024. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.133774. Acesso em: 6 maio 2025.
- DE SOUSA, Felipe Domingos et al. Frutapin, a lectin from *Artocarpus incisa* (breadfruit): Cloning, expression and molecular insights. *Bioscience Reports*, v. 37, n. 4, 31 ago. 2017.
- DE SOUZA, Leandro Peixoto Ferreira et al. Lectins from *Synadenium carinatum* (ScLL) and *Artocarpus heterophyllus* (ArtinM) Are Able to induce beneficial immunomodulatory effects in a murine model for treatment of *Toxoplasma gondii* infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 6, n. NOV, 25 nov. 2016.
- DINIZ, Flavia Resende et al. Correction: Silver Nanoparticles-Composing Alginate/Gelatine Hydrogel Improves Wound Healing In Vivo (Nanomaterials, (2020), 10, (390), 10.3390/nano10020390). *Nanomaterials*. [S. l.]: MDPI, 1 nov. 2022.

- DOS, Anderson et al. Avanços na utilização de lectinas vegetais no tratamento de lesões teciduais: uma revisão. [S. l.: s. n.], [s. d.]. Disponível em: [www.conbracis.com.br](http://www.conbracis.com.br).
- DOS SANTOS SILVA, Priscila Marcelino et al. Insights into anti-pathogenic activities of mannose lectins. *International Journal of Biological Macromolecules*. [S. l.]: Elsevier B.V., 1 nov. 2019.
- DUTTA, Pallobi; GIRI, Saumyakanti; GIRI, Tapan Kumar. Xyloglucan as green renewable biopolymer used in drug delivery and tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. [S. l.]: Elsevier B.V., 1 out. 2020.
- ELBIALY, Zizy I. et al. Collagen extract obtained from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) skin accelerates wound healing in rat model via up regulating VEGF, bFGF, and  $\alpha$ -SMA genes expression. *BMC Veterinary Research*, v. 16, n. 1, p. 352, 24 set. 2020.
- GABIUS, Hans-J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*, 2001.
- GALLAGHER, Lauren T. et al. Platelet releasates mitigate the endotheliopathy of trauma. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 20 nov. 2024.
- GANIKO, Luciane et al. Lectin KM<sup>+</sup>-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1721, n. 1-3, p. 152-163, 19 jan. 2005.
- GAO, X. et al. Role of macrophage polarisation in skin wound healing. *International Wound Journal*, v. 20, p. 2551-2562, 2023. DOI: 10.1111/iwj.14119. Acesso em: 6 maio 2025.
- GOLDSMITH, L. A. (Ed.). *Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin*. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1991.
- GILLIVER, Stephen C.; ASHWORTH, Jason J.; ASHCROFT, Gillian S. The hormonal regulation of cutaneous wound healing. *Clinics in Dermatology*, v. 25, n. 1, p. 56-62, jan. 2007.
- GOMES-DA-SILVA, Janaína et al. Brazilian Flora 2020: Leveraging the power of a collaborative scientific network. *Taxon*, v. 71, n. 1, p. 178-198, 1 fev. 2022.
- GONZAGA, Henrique Tomaz. *Universidade Federal de Uberlândia estrongiloidíase humana*. 2011.

- GOULETSOU, P. et al. Cicatrização de feridas incisionais de primeira intenção em cães e gatos: um ensaio controlado de Dermapliq e mel de Manuka. *Veterinary Sciences*, v. 11, n. 2, 2024. DOI: 10.3390/vetsci11020064. Acesso em: 30 maio 2024.
- GULZAR, Haseena et al. Semi-Quantification of Lectins in Rice (*Oryza sativa L.*) Genotypes via Hemagglutination. *Agronomy*, v. 11, n. 10, 1 out. 2021.
- GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, v. 89, n. 3, p. 219-229, mar. 2010.
- GUO, Wei Yi et al. Mannose-binding lectin levels could predict prognosis in IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 28, n. 11, p. 3175-3181, 1 nov. 2017.
- GURTNER, Geoffrey C. et al. Wound repair and regeneration. *Nature*, 15 maio 2008.
- HASHIMOTO, K. The ultrastructure of human embryos. X. Merkel tactile cells in the finger and nail. *Journal of Anatomy*, v. 111, p. 99-120, 1972.
- HOFMANN, E. et al. Modelos de pele humana in vitro para cicatrização de feridas e distúrbios da cicatrização de feridas. *Biomedicines*, v. 11, 2023. DOI: 10.3390/biomedicines11041056. Acesso em: 30 maio 2024.
- HWANG, Hyun Ju et al. Functional expression and characterization of the recombinant n-acetyl-glucosamine/n-acetyl-galactosamine-specific marine algal lectin BPL3. *Marine Drugs*, v. 16, n. 1, 1 jan. 2018.
- JAIN, M. et al. Evaluation of risk factors associated with hard-to-heal wound infection in a tertiary care hospital. *Journal of Wound Care*, v. 33, n. 3, p. 180-188, 2024. DOI: 10.12968/jowc.2024.33.3.180. Acesso em: 6 maio 2025.
- JIN, R.; LUO, L.; ZHENG, J. The trinity of skin: skin homeostasis as a neuro-endocrine-immune organ. *Life*, v. 12, 2022. DOI: 10.3390/life12050725. Acesso em: 9 dez. 2024.
- JOHNSON, B. et al. The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines*, v. 8, n. 5, p. 101, 2020. DOI: 10.3390/biomedicines8050101. Acesso em: 6 maio 2025.
- KIM, Hyunjin et al. Lectins isolated from mushroom *Fomitella fraxinea* enhance MHC-restricted exogenous antigen presentation. [S. l.: s. n.], [s. d.].

- KIM, Sang Yong; NAIR, Meera G. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunology and Cell Biology*. [S. l.]: John Wiley and Sons Inc., 1 mar. 2019.
- KIM, Yeon Jung et al. Topical application of lectin Artin M improves wound healing in defects created in the palatal mucosa: an in vivo study in dogs. *Odontology*, v. 108, n. 4, p. 560-568, 1 out. 2020b.
- KIM, K. et al. Efeito terapêutico de pericitos na cicatrização de feridas diabéticas. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 9, 2022. DOI: 10.3389/fcvm.2022.868600. Acesso em: 3 maio 2025.
- KOH, Timothy J.; DIPIETRO, Luisa Ann. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2011.
- KOLIMI, P.; NARALA, S.; NYAVANANDI, D.; YOUSSEF, A.; DUDHIPALA, N. Innovative Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent Advancements. *Cells*, [S. l.], v. 11, n. 15, p. 2439, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells11152439>. Acesso em: 9 jul. 2024.
- KRZYSZCZYK, Paulina et al. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Frontiers in Physiology*. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 1 maio 2018.
- KULKARNI, Abhijeet D. et al. Xyloglucan: A functional biomacromolecule for drug delivery applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. [S. l.]: Elsevier B.V., 1 nov. 2017.
- KUMAR, Kiran et al. Biological role of lectins: A review. *Journal of Orofacial Sciences*, v. 4, n. 1, p. 20, 2012.
- LAGARDA-DIAZ, Irlanda; GUZMAN-PARTIDA, Ana Maria; VAZQUEZ-MORENO, Luz. Legume lectins: Proteins with diverse applications. *International Journal of Molecular Sciences*. [S. l.]: MDPI AG, 12 jun. 2017.
- LANGORD, D. J. et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, v. 7, n. 6, p. 447–449, 2010. Disponível em: [\[https://www.nature.com/articles/nmeth.1455\]](https://www.nature.com/articles/nmeth.1455). Acesso em: 08 jul. 2025.

LEFÈVRE, Lise et al. The C-type Lectin Receptors Dectin-1, MR, and SIGNR3 Contribute Both Positively and Negatively to the Macrophage Response to *Leishmania infantum*. *Immunity*, v. 38, n. 5, p. 1038-1049, 23 maio 2013.

LIU, Ye et al. Fibroblasts: Immunomodulatory factors in refractory diabetic wound healing. *Frontiers in Immunology*. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 5 ago. 2022.

LINDER, B. et al. Cryo-electron tomography of Birbeck granules reveals the molecular mechanism of langerin-induced membrane zippering. *eLife*, v. 9, 2020. DOI: 10.7554/eLife.79990. Acesso em: 9 dez. 2024.

LUO, Jian Dong; CHEN, Alex F. Nitric oxide: A newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacologica Sinica*, mar. 2005.

MARQUES, R. et al. Integrating factors associated with complex wound healing into a mobile application: findings from a cohort study. *International Wound Journal*, v. 21, 2023. DOI: 10.1111/iwj.14339. Acesso em: 6 maio 2025.

MASSON-MEYERS, D. et al. Modelos e métodos experimentais para avaliação da cicatrização de feridas cutâneas. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 101, p. 21-37, 2020. DOI: 10.1111/iep.12346. Acesso em: 29 maio 2024.

MEI, Fengfeng et al. Collagen Peptides Isolated from *Salmo salar* and *Tilapia nilotica* Skin Accelerate Wound Healing by Altering Cutaneous Microbiome Colonization via Upregulated NOD2 and BD14. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 68, n. 6, p. 1621-1633, 12 fev. 2020.

MENKE, Nathan B. et al. Impaired wound healing. *Clinics in Dermatology*, v. 25, n. 1, p. 19-25, jan. 2007.

MIRHAJ, Marjan et al. Emerging treatment strategies in wound care. *International Wound Journal*. [S. l.]: John Wiley and Sons Inc., 1 nov. 2022.

MIHAILA, A. et al. Neutrófilos anti-inflamatórios reprogramam macrófagos em direção a um fenótipo pró-cicatrização com capacidade aumentada de eferocitose. *Células*, v. 13, 2024. DOI: 10.3390/cells13030208. Acesso em: 10 abr. 2025.

MISHRA, Abtar et al. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food and Chemical Toxicology*, v. 134, 1 dez. 2019.

- MPHANDE, Fingani Annie. *Skin Disorders in Vulnerable Populations*. Singapore: Springer, 2020.
- MUSHTAQ, Sadaf et al. Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents. *EXCLI Journal*. [S. l.]: Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors, 4 maio 2018.
- MYUNG, Peggy; ANDL, Thomas; ATIT, Radhika. The origins of skin diversity: lessons from dermal fibroblasts. *Development*, v. 149, n. 23, 2022. DOI: 10.1242/dev.200298. Acesso em: 9 dez. 2024.
- NEGUT, I.; GRUMEZESCU, V.; GRUMEZESCU, A. Treatment strategies for infected wounds. *Molecules*, [S. l.], v. 23, n. 9, p. 2392, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23092392>. Acesso em: 9 jul. 2024.
- NIKOLAEV, Yury A. et al. 3D architecture and a bicellular mechanism of touch detection in mechanosensory corpuscle. 2023. Disponível em: [www.science.org](http://www.science.org).
- OLIVEIRA, Carla; TEIXEIRA, José A.; DOMINGUES, Lucília. Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application - The frutalin case study. *Frontiers in Plant Science*. [S. l.]: Frontiers Research Foundation, 8 ago. 2014.
- OPNEJA, Aman; KAPOOR, Sargam; STAVROU, Evi X. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. *Thrombosis Research*. [S. l.]: Elsevier Ltd, 1 jul. 2019.
- PANUNTO-CASTELO, Ademilson et al. KM+, a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/C mice resistance to infection. *Glycobiology*, 2001.
- PARNELL, L.; VOLK, S. A evolução dos modelos animais na pesquisa de cicatrização de feridas: 1993-2017. *Avanços no Tratamento de Feridas*, v. 8, n. 12, p. 692-702, 2019. DOI: 10.1089/wound.2019.1098. Acesso em: 29 maio 2024.
- PETITI, Jessica; REVEL, Laura; DIVIETO, Carla. Standard Operating Procedure to Optimize Resazurin-Based Viability Assays. *Biosensors*. [S. l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 abr. 2024.

- PEUMANS, Willy J.; VAN DAMME, Els J. M. Plant Lectins: Versatile Proteins with Important Perspectives in Biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 15, n. 1, p. 199-228, 1 abr. 1998.
- PRAJAPATI, Vipul D. et al. Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydrate Polymers*, 15 fev. 2013.
- QIU, X. et al. Da hemostasia à proliferação: acelerando a cicatrização de feridas infectadas por meio de uma estratégia de reparo abrangente baseada em hidrogel GA/OKGM carregado com nanofolhas de MXene@TiO<sub>2</sub>. *Biomaterials*, v. 308, p. 122548, 2024. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2024.122548. Acesso em: 8 abr. 2025.
- RAKITA, A. et al. Reepitelização e comportamento de células imunes em um modelo de pele humana ex vivo. *Scientific Reports*, v. 10, 2020. DOI: 10.1038/s41598-019-56847-4. Acesso em: 30 maio 2024.
- RAZIYEVA, Kamila et al. Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*. [S. l.]: MDPI AG, 1 maio 2021.
- RITSU, Masae et al. Critical role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the early process of wound healing in skin. *Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery*, v. 21, n. 1, p. 14-19, jan. 2017.
- ROCHA, B. A. et al. Purification and characterization of a glucose/mannose-specific lectin from *Artocarpus heterophyllus* and its effects on human cancer cell lines. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 148, p. 1214-1222, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.180.
- RODRIGUES, Delane C. et al. Emulsion films from tamarind kernel xyloglucan and sesame seed oil by different emulsification techniques. *Food Hydrocolloids*, v. 77, p. 270-276, 1 abr. 2018.
- RODRIGUES, Melanie et al. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological Reviews*, v. 99, p. 665-706, 2019. Disponível em: [www.prv.org](http://www.prv.org).
- S., Krupa; KARIGAR, C. S.; MURTHY, K. R. Siddalinga. Pharmacology and Phytochemistry of *Artocarpus* Family: A Review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 10, n. 3, p. 48-55, 2020.

- SANCHEZ, Martina M. et al. Development of a Vascularized Human Skin Equivalent with Hypodermis for Photoaging Studies. *Biomolecules*, v. 12, n. 12, 1 dez. 2022.
- SATO, Yasunori; OHSHIMA, Tohru; KONDO, Toshikazu. Regulatory Role of Endogenous Interleukin-10 in Cutaneous Inflammatory Response of Murine Wound Healing. 1999. Disponível em: <http://www.idealibrary.com>.
- SHAUL, Y. D.; SEGER, R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1773, n. 8, p. 1213-1226, 2007. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.10.005.
- SCHILRREFF, Priscila; ALEXIEV, Ulrike. Chronic Inflammation in Non-Healing Skin Wounds and Promising Natural Bioactive Compounds Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. [S. l.]: MDPI, 1 maio 2022.
- SCHMÖLZ, Lisa; WALLERT, Maria; LORKOWSKI, Stefan. Optimized incubation regime for nitric oxide measurements in murine macrophages using the Griess assay. *Journal of Immunological Methods*, v. 449, p. 68-70, 1 out. 2017.
- SCHUSTER, Ronen et al. The Role of Myofibroblasts in Physiological and Pathological Tissue Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 15, n. 1, 1 jan. 2023.
- SEN, Chandan K. Human Wound and Its Burden: Updated 2020 Compendium of Estimates. *Advances in Wound Care*. [S. l.]: Mary Ann Liebert Inc., 1 maio 2021.
- SHARIFIAGHDAM, Maryam et al. Macrophage reprogramming into a pro-healing phenotype by siRNA delivered with LBL assembled nanocomplexes for wound healing applications. *Nanoscale*, v. 13, n. 36, p. 15445-15463, 28 set. 2021.
- SHORT, Walker D. et al. IL-10 promotes endothelial progenitor cell infiltration and wound healing via STAT3. *FASEB Journal*, v. 36, n. 7, 1 jul. 2022.
- SINGAMPALLI, Kavya L. et al. The Role of an IL-10/Hyaluronan Axis in Dermal Wound Healing. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 17 jul. 2020.
- SMOLNIKOVA, M.; TERESHCHENKO, S. Proteínas da via da lectina na ativação do sistema complemento: funções imunobiológicas, genética e envolvimento na patogênese de doenças humanas. *Revista Russa de Infecção e Imunidade*, [S. l.], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-POT-1777>. Acesso em: 09 jul. 2025.

SOLIMAN, A.; BARREDA, D. Inflamação aguda na cicatrização tecidual. *Revista Internacional de Ciências Moleculares*, v. 24, 2022. DOI: 10.3390/ijms24010641. Acesso em: 10 abr. 2025.

SOUZA, M. A. et al. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconjugate Journal*, v. 30, n. 7, p. 641-657, 2013. DOI: 10.1007/s10719-012-9425-7.

SUAZO, Iván et al. The Lamellar Cells of Vertebrate Meissner and Pacinian Corpuscles: Development, Characterization, and Functions. *Frontiers in Neuroscience*. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 9 mar. 2022.

TROY, Eoin et al. Nature-based biomaterials and their application in biomedicine. *Polymers*. [S. l.]: MDPI, 1 out. 2021.

TSOUKNIDAS, Alexander. Advancements in Biomaterials for Bioengineering and Biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*. [S. l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 jul. 2024.

UD-DIN, S.; BAYAT, A. Modelos não animais de cicatrização de feridas em reparo cutâneo: modelos in silico, in vitro, ex vivo e in vivo de feridas e cicatrizes em pele humana. *Wound Repair and Regeneration*, v. 25, 2017. DOI: 10.1111/wrr.12513. Acesso em: 30 maio 2024.

VARDAKOSTAS, D. et al. Expression of tissue remodeling- and inflammation-related factors during the wound-healing process in humans. *Journal of Personalized Medicine*, v. 15, p. 14, 2025. DOI: 10.3390/jpm15010014. Acesso em: 6 maio 2025.

VESTITA, M.; TEDESCHI, P.; BONAMONTE, D. Anatomy and physiology of the skin. In: *Textbook of plastic and reconstructive surgery*. 2022. DOI: 10.4324/9780203450505\_chapter\_1. Acesso em: 9 dez. 2024.

VERONESE, Sheila et al. Hypodermis involvement in skin disorders: Imaging and functional imaging diagnostic tools. *Skin Research and Technology*. [S. l.]: John Wiley and Sons Inc., 1 jul. 2021.

VOLOVAR, O. et al. Cicatrização de feridas e regeneração de tecidos moles: revisão de literatura. *Bukovinian Medical Herald*, 2023. DOI: 10.24061/2413-0737.27.3.107.2023.17. Acesso em: 3 maio 2025.

- WEBSTER, Joshua D.; VUCIC, Domagoj. The Balance of TNF Mediated Pathways Regulates Inflammatory Cell Death Signaling in Healthy and Diseased Tissues. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 21 maio 2020.
- WEINHEIMER-HAUS, Eileen M.; MIRZA, Rita E.; KOH, Timothy J. Nod-like receptor protein-3 inflammasome plays an important role during early stages of wound healing. *PLoS ONE*, v. 10, n. 3, 20 mar. 2015.
- WIBBE, Nicolina; EBNET, Klaus. Cell Adhesion at the Tight Junctions: New Aspects and New Functions. *Cells*. [S. l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 dez. 2023.
- WILKES, Mark C. et al. Transforming growth factor- $\beta$  activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer Research*, v. 65, n. 22, p. 10431-10440, 15 nov. 2005.
- WILKINSON, Holly N.; HARDMAN, Matthew J. Wound healing: Cellular mechanisms and pathological outcomes. *Advances in Surgical and Medical Specialties*. [S. l.]: Taylor and Francis, 2023a. p. 341-370.
- WILKINSON, Holly N.; HARDMAN, Matthew J. Wound healing: Cellular mechanisms and pathological outcomes. *Advances in Surgical and Medical Specialties*. [S. l.]: Taylor and Francis, 2023b. p. 341-370.
- WOO, K. et al. Exploring the effect of wound related pain on psychological stress, inflammatory response, and wound healing. *International Wound Journal*, v. 21, 2024. DOI: 10.1111/iwj.14942. Acesso em: 7 maio 2025.
- WOOD, Stephen et al. Pro-inflammatory chemokine CCL2 (MCP-1) promotes healing in diabetic wounds by restoring the macrophage response. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, 11 mar. 2014.
- XIAO, Shune et al. IL-10 Gene-modified human amniotic mesenchymal stem cells augment regenerative wound healing by multiple synergistic effects. *Stem Cells International*, v. 2019, 2019.
- YUSUF, Khadir. The Role of TNF-Alpha in the Wound Healing Process: Molecular and Clinical Perspectives - A Systematic Literature Review. *Jurnal RSMH Palembang*, v. 3, n. 2, p. 222-228, 25 abr. 2024.

WONG, N.; ZLOTY, D. Cicatrização por intenção secundária sobre osso exposto no couro cabeludo, testa e têmpora após cirurgia micrográfica de Mohs. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 26, p. 274-279, 2022. DOI: 10.1177/12034754221077903. Acesso em: 29 maio 2024.

ZHANG, X. et al. Application of lipopolysaccharide in establishing inflammatory models. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.135371. Acesso em: 3 maio 2025.

ZHU, Z. et al. Armadilhas extracelulares de neutrófilos na cicatrização de feridas. *Tendências em Ciências Farmacológicas*, 2024. DOI: 10.1016/j.tips.2024.09.007. Acesso em: 10 abr. 2025.

## ANEXOS



**FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ**  
**UNIVERSIDADE DE FORTALEZA**  
**ENSINANDO E APRENDENDO**

**COMISSÃO DE ÉTICA  
 NO USO DE ANIMAIS**

## FORMULÁRIO 1/4

CPF:	00897770340	Finalidade:	Pesquisa (Acadêmica)
Titulo do projeto:	avaliação do potencial cicatrizante da frutalina recombinante em filmes de polissacarídeo		
Titulo (Inglês):	wound healing potential of recombinant frutalin in polysaccharide films		
Responsável:	Felipe Domingos de Sousa		
Celular:	859997320003	e-mail:	fdsousa@yahoo.com.br
CV. Lattes:	<a href="http://lattes.cnpq.br/9542077634881460">http://lattes.cnpq.br/9542077634881460</a>		
Área:	Medicina Veterinária	Campus:	Fortaleza
Experiência:	Sim : 6 ano(s)	Treinamento:	Sim : 3 mes(es)
Vínculo:	Aluno de Pós-Graduação		
Obj. Acadêmico:	Pós-Doutorado	Patente:	Não
Grande área:	Biotecnologia	específica:	Biotecnologia
Patrocínio:	Institucional	Patrocinador:	FEQ
Orientador:	Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira	e-mail:	acomoreira@unifor.br
Chefe de Depto:	Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira	e-mail:	acomoreira@unifor.br

## FORMULÁRIO 2/4

Instituição participante: 1: Universidade de Fortaleza

**Resumo:** As lectinas vegetais são proteínas capazes de interagir especificamente e reversivelmente a carboidratos sem alterar a estrutura covalente dos mesmos. Devido a essa característica, essas proteínas interagem com glicanos presentes na superfície celular, causando alterações na fisiologia da membrana, levando à aglutinação celular, mitose ou mudanças bioquímicas nas células, das quais geram respostas ambas inflamatórias e anti-inflamatórias, além de imunoestimulantes e imunomoduladoras. A frutapina é a lectina com maior afinidade por glucose/manose presente em sementes de *Artocarpus incisa* (fruta-pão), porém apresenta baixo rendimento quando comparado à frutalina, lectina ligante à alfa-D-galactose e de maior abundância na mesma espécie. Com a produção e otimização da forma recombinante da frutapina pelo nosso grupo de pesquisa em 2017, temos a possibilidade de explorar o potencial desta molécula em aplicações biomédicas. Frutapina apresenta