ANA RITA DE TOLEDO PIZA

**Avaliação e caracterização proteica do muco de *Phyllocaulis
boraceiensis* sobre a capacidade proliferativa de fibroblastos,
células endoteliais e em modelos de cicatrização**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo

2012

ANA RITA DE TOLEDO PIZA

**Avaliação e caracterização proteica do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*
sobre a capacidade proliferativa de fibroblastos, células endoteliais e em
modelos de cicatrização**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr Durvanei Augusto Maria

Co-orientador: Dra Toshie Kawano (*in memorian*)

Versão corrigida. A versão original encontra-se
arquivada no serviço de comunicações do ICB

São Paulo

2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Toledo-Piza, Ana Rita de.

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

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Química de proteínas.

Versão do título para o inglês: Evaluation and protein characterization of *Phyllocaulis boraceiensis* mucus in proliferative capability in fibroblasts, endothelial cells and cicatrization model.

1. Proliferação 2. Colágeno 3. Muco 4. Ciclo celular 5. Moluscos
6. *Phyllocaulis boraceiensis* I. Maria, Prof. Dr. Durvanei Augusto II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa
de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto
Butantan III. Título.

ICB/SBIB0111/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Ana Rita de Toledo Piza.

Título da Tese: Avaliação e caracterização proteica do muco de *Phyllocaulis boraceinsis* sobre a capacidade proliferativa de fibroblastos, células endoteliais e em modelos de cicatrização.

Orientador(a): Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação das atividades biológicas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* e suas frações glicosiladas em culturas de fibroblastos humanos e nos processo cicatriciais" protocolo nº 621/09, sob a responsabilidade de Durvanei Augusto Maria e Ana Rita de Toledo Piza, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/05/2009.

We certify that the research entitled "Evaluation of biological activity of *Phyllocaulis boraceiensis* and its glycosylated fractions of mucus in human fibroblasts culture and wound process" protocol nº 621/09, under the responsibility of Durvanei Augusto Maria and Ana Rita de Toledo Piza, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 05/13/2009.

Vigência do Projeto: 06/2009 – 07/2012 Laboratório de Bioquímica	Nº de animais/espécie 80/ camundongos Balb/C fêmeas
---	---

São Paulo, 13 de Maio de 2009.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Aos meus pais, mecenas de todas as obras da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, *Sérgio* e *Ana Maria*, por me permitirem seguir meus sonhos e convicções, muitas vezes abdicando dos seus.

À *Dra Toshie Kawano* por me ensinar que ciência é muito mais que experimentos e artigos.

Ao *Dr Durvanei Augusto Maria* por dividir expectativas e resultados.

Às amigas *Lenita*, *Ludmila*, *Patrícia*, *Rebeca*, *Amanda* e *Fernanda* por me ensinarem a viver de uma forma mais leve.

Aos demais colegas de laboratório da Parasitologia e Bioquímica do Butantan pelo convívio.

Ao *Dr Ronaldo Zucatelli Mendonça* por toda a colaboração e pelo uso do equipamento de eletroforese bidimensional.

“Il faut bien que je supporte deux ou trois chenilles si je veux connaître les papillons.”

“É preciso que eu suporte duas ou três lagartas se eu quiser conhecer as borboletas.”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

TOLEDO-PIZA, A. R. **Avaliação e caracterização proteica do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* sobre a capacidade proliferativa de fibroblastos, células endoteliais e no modelo de cicatrização.** 2012. 184 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Gastrópodes terrestres secretam muco pela superfície corporal, quando se locomovem, para proteção do corpo contra injúria mecânica, dessecação ou contato com substâncias nocivas. O muco de moluscos tem sido estudado como fonte de novos compostos naturais com diversas atividades biológicas, entre elas a capacidade de induzir proliferação celular. O presente trabalho propôs o estudo do muco produzido pelas lesmas terrestres *Phyllocaulis boraceiensis* como agente indutor de proliferação celular e síntese de colágeno em cultura de fibroblastos humanos normais, células endoteliais e no reparo de processos cicatriciais no modelo de ferida cirúrgica da derme de camundongos. Fibroblastos tratados com proteínas do muco de *P. boraceiensis* em concentrações menores que 0,012 µg/µl apresentaram aumento nas taxas de proliferação avaliadas pelo método colorimétrico do MTT e em citometria de fluxo CSFE, mostrando um efeito dose-dependente. Os resultados obtidos mostraram que fibroblastos humanos normais e células endoteliais tratados com 0,012 µg/µl de proteínas do muco, aumentaram significativamente a produção e secreção de elementos da matriz extracelular, como as fibras de colágeno. Houve a redução da produção de radicais livres lipídicos poli-insaturados. O ensaio de cicatrização da derme lesionada de camundongos Balb-c tratados com proteínas do muco de *P. boraceiensis* na concentração de 0,012 µg/µl induziu o reparo da cicatrização com maior eficácia e em menor tempo quando comparado ao grupo controle e aos tratados com a concentração de 0,18 µg/µl. Esses resultados corroboram a premissa de que o muco de *P. boraceiensis*, assim como o de outros gastrópodes, apresenta propriedade proliferativa das células envolvidas nos processos de cicatrização.

Palavras chave: Proliferação. Colágeno. Muco. Ciclo celular. Moluscos. *Phyllocaulis boraceiensis*.

ABSTRACT

TOLEDO-PIZA, A. R. **Evaluation and protein characterization of *Phyllocaulis boraceiensis* mucus in proliferative capability in fibroblasts, endothelial cells and cicatrization model.** 2012. 184 p. Ph. D. Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Mucus of molluscs has been studied as a source of new natural compounds with diverse biological activities, as ability to induce cell proliferation. The aim of this study is the potential use of mucus produced by land slugs *Phyllocaulis boraceiensis* as a promoter of cell proliferation and collagen synthesis in human fibroblasts, endothelial cells and in repair processes of healing wound skin of mice. Fibroblasts treated with *P. boraceiensis* mucus at concentrations below 0.012 µg/µl have high rates of proliferation as evaluated by the MTT and CFSE flow cytometer assays, proliferative effect was dose-dependent. Fibroblasts and endothelial cells treated with 0.012 µg/µl mucus induced a significant increase in production and secretion of extracellular matrix such as collagen fibers. There was a reduction in polyunsaturated lipid production. Healing assay of lesions in mice treated with mucus at 0.012 µg/µl induce repair of the scar more effectively and in less time when compared to the control group and those treated 0.18 µg/µl. These findings support the premise that the *P. boraceiensis* mucus demonstrates proliferative properties in cells involved in the healing process.

Key words: Proliferation. Collagen. Mucus. Cell cycle. Molluscs. *Phyllocaulis boraceiensis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema estrutural da matriz extracelular.....	23
Figura 2 – Esquema estrutural da molécula de colágeno.....	25
Figura 3 – Esquema representativo do processo de angiogênese e vasculogênese.....	29
Figura 4 - Esquema representativo dos fatores indutores de angiogênese: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).....	29
Figura 5 – Perfil esquemático das fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo.....	30
Figura 6 – Adulto (a); Desova (b); Filhotes recém-eclodidos (c) e Filhotes com 10 dias (d) de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	39
Figura 7 – Viveiros de criação de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i> com tampa telada e fundo com terra.....	40
Figura 8 – <i>Phyllocaulis boraceiensis</i> adulto liberando muco pelo epitélio podal.....	41
Figura 9 – Aspecto geral da cultura de fibroblastos humanos normais, obtido em microscópio invertido.....	45
Figura 10 - Histograma representativo da aquisição da população de fibroblastos humanos normais em citômetro de fluxo <i>FACSCalibur</i> e analisadas pelo programa <i>Cell-Quest</i>	46
Figura 11 – Aspecto geral da cultura de células endoteliais humanas, obtido em microscópio invertido.....	48
Figura 12 - Histograma representativo da aquisição da população de células endoteliais humanas em citômetro de fluxo <i>FACSCalibur</i> e analisadas pelo programa <i>Cell-Quest</i>	49
Figura 13 – (A) Biotério do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan e (B) – Interior da gaiola de criação dos camundongos da linhagem Balb-c.....	56
Figura 14 – Dermatoscópio acoplado a câmera fotográfica Sony DSC W300 – USA.....	57
Figura 15 - (A) Animal após procedimento de tricotomia do dorso; (B) Animal após procedimento cirúrgico incisão de 1cm ² no dorso.....	59

Figura 16 – Camundongo Balb-c após receber uma aplicação da pomada de papaína na região da derme; grupo controle. Nota-se a área lesionada contendo a pomada de papaína.....	60
Figura 17 – Curva padrão da dosagem de proteínas pelo método de Bradford	64
Figura 18 - Perfil cromatográfico do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i> obtido em cromatógrafo de alta pressão “Akta Purifier” identificando-se um único pool proteico entre 18 e 27 min de retenção.....	65
Figura 19 – Gel de eletroforese bidimensional do muco de <i>P. boraceiensis</i> evidenciando 22 “spots” (em vermelho) proteicos.....	66
Figura 20 - Aspecto macroscópico da cultura primária de fibroblasto da derme humana.....	68
Figura 21 - Aspecto macroscópico da cultura primária de fibroblasto da derme humana, grupo tratado com 0,012 µg/µl de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	69
Figura 22 - Aspecto macroscópico da cultura primária de células endoteliais humanas.....	70
Figura 23 - Aspecto macroscópico da cultura primária de células endoteliais humanas, grupo tratado com 0,18 µg/µl de proteínas do muco do <i>P. boraceiensis</i>	71
Figura 24 – Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura controle de fibroblastos humanos normais após 24h de crescimento.....	73
Figura 25 – Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura de fibroblastos humanos normais após 24 h de tratamento com 0,18µg/µl de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	74
Figura 26 – Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura de fibroblastos humanos normais após 24 h de tratamento com 0,012µg/µl de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	75
Figura 27 – Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura de fibroblastos humanos normais após 24h de tratamento com 0,0007µg/µl de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	76
Figura 28 - Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura controle de células endoteliais humanas após 24 h de crescimento.....	78
Figura 29 – Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura de células endoteliais humanas normais após 24 h de tratamento com 0,18µg/µl de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	79

Figura 30 - Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura de células endoteliais humanas normais após 24 h de tratamento com 0,012 µg/µl de proteínas de muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	80
Figura 31 - Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura de células endoteliais humanas normais após 24 h de tratamento com 0,0007 µg/µl de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	81
Figura 32 – Avaliação da viabilidade/proliferação celular usando o método do MTT em fibroblastos humanos normais tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	83
Figura 33 – Avaliação da viabilidade/proliferação celular usando o método do MTT em células endoteliais humanas tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>P. boraceiensis</i>	84
Figura 34 - Curva padrão de produção de colágeno pelo método colorimétrico de Picrosirius, quatro amostras de colágeno tipo I humano, utilizada para o calculo da quantidade de colágeno produzida após o tratamento com o muco de <i>P. boraceiensis</i>	86
Figura 35 – Análise morfométrica das fibras de colágeno sintetizadas por fibroblastos humanos normais do grupo controle, adquiridas pelo sistema de captura de imagem (Image – J), após 24 h de cultura.....	87
Figura 36 – Análise morfométrica das fibras de colágeno sintetizadas por fibroblastos humanos normais tratados com muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i> , adquiridas pelo sistema de captura de imagem (Image -J), após 24 h de cultura....	88
Figura 37 – Produção de colágeno por fibroblastos humanos normais tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>P. boraceiensis</i> , obtido pelo método colorimétrico de Picrosirius em sobrenadante de cultura.....	89
Figura 38 – Produção de colágeno por células endoteliais humanas tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>P. boraceiensis</i> , obtido pelo método colorimétrico de Picrosirius em sobrenadante de cultura.....	90
Figura 39 - Curva basal da produção de peróxidos lipídicos das proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	92
Figura 40 – Produção de peróxidos lipídicos produzidos por fibroblastos humanos normais tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>P. boraceiensis</i>	92
Figura 41 – Produção de peróxidos lipídicos produzidos por células endoteliais humanas tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>P. boraceiensis</i>	94

Figura 42 – Exemplos de histogramas representativos das fases do ciclo celular obtido pelo citômetro de fluxo FACSCalibur.....	96
Figura 43 – Gráfico de barras representando a média e desvio padrão das fases do ciclo celular de fibroblastos humanos normais tratados com proteínas do muco de <i>P. boraceiensis</i>	98
Figura 44 – Gráfico de barras representando a média e desvio padrão das fases do ciclo celular de células endoteliais humanas tratadas com proteínas do muco de <i>P. boraceiensis</i>	100
Figura 45 – Histogramas representativos das populações celulares de fibroblastos humanos normais que se dividiram após a incorporação do CFSE analisado por citometria de fluxo após o tratamento com diferentes concentrações de muco de <i>P. Boraceiensis</i>	102
Figura 46 – Taxa de proliferação de fibroblastos humanos normais marcados com CFSE e tratados com diferentes concentrações de muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	103
Figura 47 – Histogramas representativos das populações de células endoteliais que se dividiram após a incorporação do CFSE analisado por citometria de fluxo, após o tratamento com diferentes concentrações de muco de <i>P. Boraceiensis</i>	105
Figura 48 – Taxa de proliferação de células endoteliais marcadas com CFSE e tratadas com diferentes concentrações de proteínas de muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	106
Figura 49 - Expressão de anexina V/PI em fibroblastos humanos tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	108
Figura 50 - Expressão de Bcl-2 em fibroblastos humanos tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	109
Figura 51 - Expressão de Caspase-3 em fibroblastos humanos tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	110
Figura 52 - Expressão de anexina V/PI em células endoteliais humanas tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	112
Figura 53 – Expressão de Bcl-2 em células endoteliais humanas tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	113
Figura 54 - Expressão de Caspase-3 em células endoteliais humanas tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	114
Figura 55 - Expressão de CD-34 em fibroblastos humanos tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	116

Figura 56 - Expressão de VEGF-R1 em fibroblastos humanos tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	117
Figura 57 - Expressão de CD-34 em células endoteliais tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	119
Figura 58 - Expressão de VEGF-R1 em células endoteliais tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	120
Figura 59 – Fechamento da ferida (WC - %) da derme de camundongos Balb-c do experimento controle em relação ao dia de tratamento pós-cirúrgico.....	122
Figura 60 – Fechamento da ferida (WC - %) da derme de camundongos Balb-c submetidos a tratamento com 0,18µg/µl de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i> em relação ao dia de tratamento pós-cirúrgico.....	123
Figura 61 – Fechamento da ferida (WC - %) da derme de camundongos Balb-c submetidos a tratamento com 0,012µg/µl de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i> em relação ao dia de tratamento pós-cirúrgico.....	124
Figura 62 - Avaliação clínica e de evolução da cicatrização cutânea da derme lesionada dos camundongos tratados.....	125
Figura 63 – Foto digitalização obtida em dermatoscopia da derme de camundongos tratados com 0,18 µg/µl de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	126
Figura 64 – Foto digitalização obtida em dermatoscopia da derme de camundongos tratados com proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	127
Figura 65 – Foto digitalização obtida em dermatoscopia da derme de camundongos tratados com proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	128
Figura 66 – Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura da derme de camundongos tratados com proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	129
Figura 67 – Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura da derme de camundongos tratados com proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	130
Figura 68 – Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura da derme de camundongos tratados com 0,18 µg/µl de proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	131
Figura 69 – Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura da derme de camundongos tratados com 0,012 µg/µl proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	132
Figura 70 – Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura da	

derme de camundongos tratados com 0,012 µg/µl proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	133
Figura 71 – Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura da derme de camundongos tratados com 0,012 µg/µl proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações de albumina bovina utilizada para a construção da curva padrão da dosagem de proteína pelo método de Bradford (1976).....	64
Tabela 2 – Concentração inibitória 50% (IC ₅₀) em fibroblastos humanos normais tratados com proteínas do muco de <i>P. boraceiensis</i> (µg/µl).....	82
Tabela 3 – Concentração inibitória 50% (IC ₅₀) em células endoteliais humanas tratadas com proteínas do muco de <i>P. boraceiensis</i> (µg/µl).....	85
Tabela 4 – Taxa da diminuição da formação de radicais lipídicos poli-insaturados (%) produzidos por fibroblastos humanos normais tratados com proteínas do muco de <i>P. boraceiensis</i> (µg/µl).....	93
Tabela 5 – Taxa da diminuição da formação de radicais lipídicos poli-insaturados (%) produzidos por células endoteliais tratadas com proteínas do muco de <i>P. boraceiensis</i> (µg/µl).....	95

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	20
1.1 Gastrópodes.....	21
1.2 Matriz Extracelular.....	23
1.3 Sistema Vascular.....	26
1.4 Processo de Cicatrização.....	30
1.5 Gastrópodes e Cicatrização.....	32
1.6 Contextualização.....	34
2 OBJETIVOS.....	36
2.1 Geral.....	37
2.2 Específicos.....	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 Manutenção dos espécimes.....	39
3.2 Processos de obtenção e solubilização do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>.....	40
3.3 Dosagem de proteínas.....	41
3.4 Fracionamento do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i> por cromatografia.....	42
3.5 Análise proteômica.....	42
3.5.1 Focalização isoeletrica (1ª dimensão).....	42
3.5.2 SDS-PAGE (2ª dimensão).....	43
3.5.3 Aquisição das imagens.....	43
3.6 Ensaios biológicos in vitro.....	44
3.6.1 Cultura de fibroblastos humanos.....	44
3.6.2 Cultura de células endoteliais humanas.....	47
3.6.3 Avaliação dos aspectos morfológicos das células tratadas com proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i> analisados em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura.....	50
3.6.4 Determinação da citotoxicidade das proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i> pelo método colorimétrico do MTT.....	50
3.6.5 Quantificação da produção de colágeno total pelo método colorimétrico de Picrosirius (Sirius-red) em sobrenadante.....	51
3.6.6 Determinação da formação de peróxidos lipídicos.....	51
3.6.7 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	53
3.6.8 Determinação da resposta proliferativa pelo método CFSE obtido por citometria de fluxo.....	54

3.6.9 Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de apoptose e necrose por citometria de fluxo.....	54
3.6.10 Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de angiogênese por citometria de fluxo.....	55
3.7 Ensaios biológicos in vivo.....	56
3.7.1 Animais.....	56
3.7.2 Análise dermatoscópica da derme.....	57
3.7.3 Procedimento cirúrgico para a realização dos experimentos de cicatrização.....	58
3.7.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	61
3.8 Análise estatística.....	61
4 RESULTADOS.....	62
4.1 Manutenção dos espécimes e obtenção de muco.....	63
4.2 Processos de obtenção e solubilização do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i>.....	63
4.3 Dosagem de proteínas.....	63
4.4 Fracionamento do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i> por cromatografia.....	65
4.5 Análise proteômica.....	66
4.6 Ensaios biológicos in vitro.....	67
4.6.1 Avaliação dos aspectos morfológicos das células tratadas com proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i> utilizando microscopia de luz.....	67
4.6.1.1 Fibroblastos humanos normais.....	68
4.6.1.2 Células endoteliais humanas.....	70
4.6.2 Avaliação dos aspectos morfológicos das células tratadas com proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i> utilizando microscopia eletrônica de varredura.....	72
4.6.2.1 Fibroblastos humanos normais.....	72
4.6.2.2 Células endoteliais humanas.....	77
4.6.3 Determinação da proliferação celular e da concentração inibitória 50% (IC ₅₀) das proteínas do muco de <i>Phyllocaulis boraceiensis</i> pelo método colorimétrico do MTT.....	82
4.6.3.1 Fibroblastos humanos normais.....	82
4.6.3.2 Células endoteliais humanas.....	84
4.6.4 Quantificação da produção de colágeno total pelo método colorimétrico de Picrosirius (Sirius-red) em sobrenadante.....	86

4.6.4.1 Fibroblastos humanos normais.....	87
4.6.4.2 Células endoteliais.....	90
4.6.5 <i>Determinação da formação de peróxidos lipídicos.....</i>	91
4.6.5.1 Fibroblastos humanos.....	92
4.6.5.2 Células endoteliais.....	94
4.6.6 <i>Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....</i>	96
4.6.6.1 Fibroblastos humanos normais.....	97
4.6.6.2 Células endoteliais.....	99
4.6.7 <i>Determinação da resposta proliferativa pelo método CFSE obtido por citometria de fluxo.....</i>	101
4.6.7.1 Fibroblastos humanos.....	101
4.6.7.2 Células endoteliais.....	104
4.6.8 <i>Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de apoptose e necrose por citometria de fluxo.....</i>	107
4.6.8.1 Fibroblastos humanos.....	107
4.6.8.2 Células endoteliais.....	111
4.6.9 <i>Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos na angiogênese por citometria de fluxo.....</i>	115
4.6.9.1 Fibroblastos humanos.....	115
4.6.9.2 Células endoteliais.....	118
4.7 Ensaios biológicos in vivo.....	121
4.7.1 Animais.....	121
4.7.2 <i>Análise dermatoscópica da derme.....</i>	126
4.7.3 <i>Microscopia eletrônica de varredura das cicatrizes.....</i>	129
5 DISCUSSÃO.....	135
6 CONCLUSÃO.....	153
7 REFERÊNCIAS.....	155
8 APÊNDICE.....	169

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Gastrópodes

Os produtos de origem animal têm sido fonte de compostos bioativos que podem agir como drogas terapêuticas de grande seletividade. Segundo Shen, Layer e McCabe (2000), cerca de 30 novos compostos coletados de organismos marinhos foram avaliados por instituições governamentais e universidades para iminente produção de novos fármacos. Nesse artigo os autores descrevem a existência de diversos peptídeos extraídos do veneno de gastrópodes marinhos do gênero *Conus* (cono-peptídeo), que atuam na defesa do animal, e estão sendo estudados como bloqueadores de canais de cálcio para a inibição da dor aguda. Stix (2005) afirma que um peptídeo extraído de *Conus magus* tornou-se alvo de estudos por ser eficiente no controle da dor aguda em pacientes terminais de câncer e AIDS. Molinski (2009) relata que em 2004 esse peptídeo, o ziconotide, foi sintetizado e liberado para consumo pelo “Food and Drugs Administration” (FDA) com nome comercial de Prialt® (Jazz Pharmaceuticals, Fridley, Minnesota, USA) e é utilizado em larga escala no tratamento de dor crônica em lesões de medula espinhal.

Vertebrados possuem mecanismos de defesa imunológica dependente de anticorpos, o que não ocorre nos invertebrados. Assim, esses organismos desenvolveram mecanismos alternativos de proteção (IIJIMA, KISUGI e YAMAZAKI, 1995), caso dos moluscos que possuem imunidade natural formada por uma barreira química e anatômica, o muco, que previne danos no tecido que recobre o corpo do animal impedindo a perda de fluido corporal e infecções de microorganismos e parasitas patogênicos (GLINSKY e JAROSZ, 1997). Cottrell, Henderson e Wright (1994) afirmam que caramujos e lesmas têm o corpo coberto por uma secreção mucosa abundante formada por uma mistura complexa de compostos (DEYRUP-OLSEN e MARTIN, 1982) exsudados pela região céfalo – pediosa do animal, que é ciliada e provida de numerosas células glandulares mucosas (RUPPERT, FOX e BARNES, 2005). Ainda, o muco impede a dessecação (DEYRUP-OLSEN, LUCHTEL e MARTIN, 1983), reduz o atrito durante a locomoção (DENNY, 1989), e protege o corpo contra injúrias mecânicas e substâncias nocivas (TRIEBSKORN e EBERT, 1989). Runham e Hunter (1970) descreveram dois tipos de muco: um secretado pela glândula mucosa unicelular do epitélio podal do animal, sendo delgada e líquida e outra, originária da glândula pedal que é liberada pela parte da frente do pé, sendo muito densa e viscosa. O epitélio podal desses animais apresenta vários tipos de

células, sendo algumas epiteliais unicelulares e outras glandulares subepidermal unicelular ou multicelular que se abrem no epitélio. Para ajudar na sua proteção, as lesmas se defendem usando um segundo tipo de muco, produzido pelo epitélio dorsal e de cor alaranjada que imediatamente após sua eliminação assume aspecto de borracha (PAWLICKI et al., 2004; SMITH, 2006) funcionando como um adesivo devido sua viscoelasticidade (GRENON e WALKER, 1980).

A quantidade de muco exsudado por lesmas aumenta quando são atacadas por competidores, predadores e alguns parasitas (REIDENBACH, VALA e CHAMIZI, 1989; ROLLO e WELLINGTON, 1979). A exsudação pode ser estimulada mecanicamente com facilidade (PAKARINEN, 1994), porém o fluxo cessa em poucos minutos e não mais se refaz antes de 24 horas (MARTIN e DEYRUP-OLSEN, 1986; DEYRUP-OLSEN e MARTIN, 1982). Pakarinen (1994) observou que espécimes das lesmas *Arion fasciatus* e *Deroceras reticulatum* levam quatro segundos, em média, para ativar o fluxo de muco após o estímulo mecânico. A autora também observou que o muco exsudado pelas glândulas dorsais protege essas lesmas de predadores como os besouros *Cychrus caraboides* e *Carabus violaceus*. Davies e Hawkies (1998) e Denny (1980) afirmam que mais de 35% da energia gasta pelos moluscos é para realizar a locomoção e isto está diretamente ligado à produção do muco. Ainda Deyrup-Olsen (1996); Luchtel, Deyrup-Olsen e Martin (1991) e Kapeleta et al. (1996) afirmam que as células secretoras da epiderme de lesma absorvem 300 vezes seu peso em volume de água. Já Deyrup-Olsen; Martin (1987) ao estudar os processos de formação do muco da lesma *Ariolimax columbianus* demonstraram que a taxa de secreção pode ser aumentada ou diminuída por neurotransmissores (acetilcolina, serotonina, entre outros), por prostaglandina E2 e indometacina. Ballance et al. (2001) estudaram os compostos químicos do muco de *Lymnaea stagnalis* e concluíram que este é responsável pela biodisponibilidade do terceiro elemento químico mais abundante na Terra, o alumínio. O perfil bioquímico do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* apresenta em sua composição cerca de 600 µg/ml de glicose, $6,9 \times 10^{-5}$ mg/ml de lipídios, $1,15 \times 10^{-4}$ mg/ml de proteínas e resíduo de todos os aminoácidos (TOLEDO-PIZA et al., 2010).

1.2 Matriz Extracelular

Os tecidos são constituídos por células e uma rede de proteínas fibrilares, reticuladas e globulares formando a matriz extracelular (MEC). A MEC (Figura 1) ou substância fundamental do tecido conjuntivo é um gel incolor, muito hidratado e transparente que preenche o espaço entre as células e as fibras do conjuntivo, constituindo um veículo para a passagem de células, moléculas hidrossolúveis e íons diversos, e uma barreira à penetração de microrganismos. É formada principalmente por proteoglicanas e glicoproteínas adesivas, assim chamadas porque participam da aderência entre as células, fibras e macromoléculas de matriz extracelular (STRAUSS III, 2012).

Figura 1 – Esquema estrutural da matriz extracelular

Fonte: Araújo (2009)

Os fibroblastos constituem um grupo heterogêneo de células que podem apresentar desde alta atividade sintética até um estado de quiescência. Essas células têm prolongamentos citoplasmáticos irregulares com núcleos apresentando cromatina pouco densa e nucléolo evidente. São responsáveis pela formação das fibras colágenas, reticulares e elásticas, além das proteoglicanas, portanto participam da formação da matriz extracelular.

A família de células do tecido conectivo compreende os fibroblastos, células ósseas (osteócitos e osteoblastos), condrócitos, adipócitos e células musculares

lisas. Os fibroblastos são as células menos diferenciadas desta família. Eles estão dispersos no tecido conectivo corporal onde secretam a MEC, rica em fibras colágenas tipo I e III (ALBERTS et al., 2010). O fibroblasto é considerado a mais versátil das células do tecido conectivo, demonstrando uma importante capacidade de se transformar em outros membros da família de células do tecido conectivo. Lorenz et al. (2008) demonstraram que os fibroblastos dérmicos preenchem as três principais características das células tronco mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells* – MSC): expressam de forma homogênea todos os antígenos de superfície relacionados às MSC; apresentam citoesqueleto e composição da matriz semelhantes aos das MSC; e se diferenciam em linhagens de células adipogênicas e osteogênicas.

Especificamente os fibroblastos dérmicos representam um componente essencial da pele, eles não apenas produzem e organizam a matriz extracelular da derme, mas também se comunicam entre si e com outros tipos celulares desenvolvendo um papel crucial na regulação da fisiologia cutânea. Duas subpopulações de fibroblastos estão localizadas em duas camadas distintas da derme: a derme papilar e a derme reticular. Uma terceira subpopulação de fibroblastos está localizada em torno dos folículos pilosos (SORREL, BABER e CAPLAN, 2008 e SORREL e CAPLAN, 2004). Fibroblastos “maduros” com uma menor capacidade de transformação podem, por exemplo, existir lado a lado com fibroblastos “imaturos” (frequentemente denominados células mesenquimais) que podem desenvolver uma variedade de tipos celulares (ALBERTS et al., 2010).

Estudos em culturas celulares tridimensionais demonstraram que os fibroblastos dérmicos, assim como os queratinócitos, apresentam um papel fundamental na expressão dos componentes da membrana basal, sugerindo que os fibroblastos dérmicos produzem laminina e colágenos do tipo IV e VII, ou influenciam os efeitos dos queratinócitos na formação da membrana basal (LEE e CHO, 2005; LEE e YANG, 2009). Os fibroblastos são importantes produtores de imunomoduladores e podem exacerbar a resposta inflamatória. Sua habilidade de migrar para os tecidos lesionados tornou os fibroblastos elemento celular facilmente passível de serem mantidos em cultura. Estas características têm tornado os fibroblastos células de escolha para estudos biológicos celulares (ALBERTS et al., 2010 e ALMQVIST et al., 2009).

As moléculas de colágeno são compostas de três cadeias polipeptídicas denominadas α , numeradas em ordem cronológica e formadas por até três cadeias polipeptídicas (α_1 , α_2 e α_3). Essas cadeias α estabelecem uma relação helicoidal (Figura 2). A combinação de diferentes cadeias α pode formar grande variedade de moléculas de colágeno. Atualmente são conhecidos aproximadamente 20 tipos diferentes de moléculas de colágeno. A mais estudada é a do tipo I, que é formada por duas cadeias α_1 e uma α_2 . Na derme, 80% do colágeno são compostos por colágeno tipo I e 10% por colágeno tipo III. As fibras colágenas são as principais responsáveis pelo aspecto saudável da pele, pois mantêm o tônus e a elasticidade da mesma. Ainda, o fibroblasto produz elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, estas responsáveis pelo debridamento e remodelamento fisiológico do tecido (VAN WINKLE, 1967).

Figura 2 – Esquema estrutural da molécula de colágeno

1.3 Sistema Vascular

A derme humana representa um tecido complexo que promove suporte mecânico e sustento da epiderme avascular, promovendo distribuição de nutriente e regulação térmica das células epidérmicas. Isto é possível graças uma elaborada microvascularização na derme papilar (BRAVERMAN, 2000). Esta microvascularização é fisicamente suportada por elementos do tecido conectivo sintetizados por fibroblastos locais que exercem papel importante na restauração do plexo vascular no proceso de reparação de feridas, através da produção de fatores angiogênicos (SORREL, BABER e CAPLAN, 2008).

O sistema vascular é uma complexa rede de vasos conectando o coração a diversos órgãos e tecidos para manter a sua homeostase em reposta a mudanças fisiológicas e patológicas. As células endoteliais constituem a chamana camada intima da parede arterial e desempenha um papel muito importante no remodelamento do sistema vascular, manutenção do tônus, fluidez sanguínea, coagulação, troca de nutrientes e desenvolvimento de órgãos (FLAVAHAN, 1992). São células achatadas de espessura variável que recobrem o interior dos vasos sanguíneos, especialmente os capilares, formando assim parte da sua parede. Os capilares apresentam-se constituídos apenas por uma camada de células endoteliais, enroladas em forma de tubo. O calibre dos capilares geralmente oscila entre 9 e 12 μm . Quando cortado transversalmente, observa-se que a parede do capilar é em geral formada por 1 a 3 células, que se apóiam sobre uma lâmina basal e prendem-se umas as outras, lateralmente, por meio de zônulas de oclusão. Essas regiões apresentam variações na permeabilidade a macromoléculas, conforme o vaso sanguíneo considerado, o que tem importante papel em condições normais e patológicas. As zônulas entre as células endoteliais das vênulas são as mais permeáveis. É principalmente nas vênulas que ocorre a saída de líquido do sangue para os tecidos levando à formação de edemas nas inflamações.

Em condições normais, as células endoteliais proliferam em um ritmo muito lento, apresentando longevidade acentuada. No organismo adulto somente 0,01% das células endoteliais encontram se normalmente em processo de divisão, um valor bastante diferente daquele observado no epitélio intestinal, onde, aproximadamente, 14% das células encontram-se em processo mitótico (HANAHAN e FOLKMAN, 1996). O processo de desenvolvimento tissular implica concomitante, no aumento na

demanda de oxigênio. Em resposta à ocorrência de regiões de hipóxia, os tecidos secretam sinais que estimulam os mecanismos de proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais, o que resulta no surgimento de vasos sanguíneos, ou no rápido crescimento dos vasos pré-existentes, processos denominados de vasculogênese e angiogênese, respectivamente (TOBELEM, 1990).

A angiogênese, processo de formação de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes que ocorre em condições fisiológicas e patológicas, é um fenômeno complexo no qual participam inúmeras moléculas que estimulam e inibem a formação dos neovasos. A neovascularização ocorre em situações patológicas como uma tentativa de reparação de danos teciduais através da formação local de neovasos. (DAMICO, 2007).

Várias moléculas estimuladoras da angiogênese já foram caracterizadas, entre elas, o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fatores de crescimento ligados à heparina, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fatores de necrose tumoral alfa e beta (TNF α e TNF β) e fator de transformação de crescimento alfa (TGF α), entre outros. O que mais se destaca é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um potente mitógeno envolvido na angiogênese. Sua atuação parece estar relacionada com a regulação endógena deste processo (BUNONE et al., 1999; FERRARA, 2002; POURGHOLAMI; MORRIS, 2008; KERBEL, 2008). O VEGF atua através de sua ligação a receptores específicos do tipo tirosina quinase (RTK), promovendo uma cascata de eventos intercelulares, que incluem a proliferação, invasão e atividade quimiotática endotelial. Esta molécula é uma citocina mediadora da permeabilidade vascular (THOMAS, 1996), que quando ligado ao seu receptor inicia a sinalização intracelular de transdução, ativando proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) (GEE, MILKIEWICZ e HAAS, 2010), associadas a diversas atividades celulares incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência/morte e transformação (DHILLON et al., 2007; TORII et al., 2006) conforme demonstrado na figura 3.

Na vasculogênese, precursores das células endoteliais denominados angioblastos (Figura 4), surgem no mesoderma da vesícula vitelínica. Essas células organizam-se em agregados celulares ou ilhotas sanguíneas, diferenciando-se em uma rede vascular primordial onde os canais endoteliais apresentam tamanho relativamente uniforme. Posteriormente, durante a angiogênese, ocorre uma

remodelagem da vascularização primária e novos capilares surgem a partir dos vasos primordiais, organizando uma rede vascular estável e complexa com vasos sanguíneos de tamanhos diferentes. A remodelagem vascular envolve tanto o crescimento como a regressão de vasos, eventos fisiológicos importantes principalmente na infância, durante o crescimento de tecidos e órgãos dos diferentes sistemas orgânicos. A remodelagem seguida do crescimento vascular também está presente no adulto, por exemplo, no crescimento dos cabelos, no reparo do tecido lesionado (cicatrização) e no ciclo reprodutivo feminino, vascularização nos ovários, vias genitais, glândulas mamárias e na organização da placenta (JONES et al., 2001).

No organismo do adulto, a vascularização normalmente estável pode ser reativada por diversos fatores angiogênicos e desencadear a formação de vasos sanguíneos (neovascularização). Perturbações no delicado equilíbrio entre o crescimento e a regressão dos vasos existentes no organismo adulto podem contribuir para o desenvolvimento de diversos processos patológicos. O crescimento de tumores, por exemplo, depende da neovascularização, induzida direta ou indiretamente pelas próprias células tumorais, durante a transição entre os estágios de hiperplasia para neoplasia, a exemplo dos hemangiomas - tumores vasculares comuns e incapacitantes (CARMELIET e JAIN, 2000). Durante a ramificação angiogênica, o estímulo à migração desencadeado pelos fatores angiogênicos implica alterações marcantes na arquitetura das células endoteliais. O citoesqueleto é mobilizado e ocorre secreção de enzimas proteolíticas, metaloproteinases que degradam a matriz extracelular permitindo assim, mobilidade celular para efetivação do processo morfogênético de tubulogênese (BRENTANI, 1992).

Figura 3 – Esquema representativo do processo de angiogênese e vasculogênese

Fonte: SistemaNervoso.com (2005)

Figura 4 - Esquema representativo dos fatores indutores de angiogênese: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)

Fonte: Cook (2012)

1.4 Processo de Cicatrização

A cicatrização constitui um conjunto dinâmico de alterações teciduais importantes na manutenção da integridade do organismo, que envolve inflamação, quimiotaxia, proliferação celular, diferenciação e remodelação (CARRICO, MEHRHOF e COHEN, 1984) (Figura 5). Estas fases são separadas apenas didaticamente, ocorrendo na realidade superposição e transição contínua e gradual de uma fase para outra. Surge como resposta tecidual às lesões, sejam induzidas por traumatismo ou por procedimentos cirúrgicos. É o componente necessário ao processo de reparação, por proporcionar os mecanismos pelos quais o tecido lesado é preparado para a reconstrução (BANKS, 1992). Este fenômeno é usualmente multifatorial, localizado, transitório e autolimitado. No entanto, quando o estímulo inflamatório não pode ser eliminado ou removido, desencadeia-se uma resposta complexa envolvendo todo o organismo e levando ao processo inflamatório crônico, o qual muitas vezes pode ser deletério (CONTRERA et al., 1985).

Figura 5 – Perfil esquemático das fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo

Fonte: Adaptado de Broughton, et al. (2006)

Herndon et al. (1992) definiram os processos de cicatrização de feridas como um processo contínuo e ordenado de coagulação, inflamação e reparo, que envolve uma série de fatores de crescimento. Regulam a infiltração inflamatória, proliferação celular, ativação e interferência na cicatrização das feridas, na dependência do fator envolvido. A resposta imediata a qualquer dano tecidual é a formação de um coágulo de fibrina e ativação plaquetária. As plaquetas, ao se degranularem, liberam citocinas e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) que, atuando nos tecidos lesados, promovem migração e proliferação, resultando em uma resposta inflamatória local (CROMACK, PORRAS-REYES e MUSTOE, 1990). Neutrófilos, linfócitos e macrófagos são as células especificamente envolvidas neste processo. Os macrófagos produzem FGF, que estimula a proliferação de fibroblastos e a formação de colágeno. Os fibroblastos também liberam FGF para efetivar a renovação do colágeno depositado no ferimento, promovendo a contração da ferida e aumentando a síntese de proteoglicanos e componentes da matriz extracelular (MEC) por até seis meses após o dano tecidual. Para McGrath (1990) a formação da matriz e a fase de remodelação também dependem do FGF, ativado pelas células endoteliais e dos epitélios, contribuindo igualmente com a angiogênese, reepitelização e proliferação celular. Os fibroblastos e as células endoteliais liberam FGF que ajudam na coordenação dos estágios finais da cicatrização (McGRATH, 1990; SCHWEIGERER, 1988).

As falhas no processo cicatricial são aquelas que ocorrem no estágio inicial que levam a acentuação do edema, redução da proliferação vascular e diminuição da quantidade de elementos celulares, tais como leucócitos, macrófagos e fibroblastos. Tais alterações nestes eventos contribuem para a baixa síntese de colágeno e também para o aumento do risco de infecção entre pacientes diabéticos (CARVALHO, MAZZER e BARBIERI, 2003). Interação de diferentes tipos celulares, proteína da matriz extracelular e seus receptores estão envolvidos neste processo biológico que é mediado por citocinas e fatores de crescimento (LERCO, SPADELLA e MACHADO, 2003). A diminuição da presença de fatores de crescimento afeta o recrutamento, ativação, mitogênese, migração e diferenciação de vários tipos de células em feridas (McDONALD, 1989). Tais fatores incluem inadequado suprimento sanguíneo devido à insuficiência venosa e vascular (COHEN, WU e COHEN, 1997), diminuição do potencial proliferativo dos fibroblastos (VANDE BERG, ROBSON e

MIKHAIL, 1995), diminuição da mudança inflamatória e falha da migração dos macrófagos (MOORE, RUGE e HARDING, 1991).

A perda tecidual pode atingir a derme completa ou incompletamente, ou mesmo atingir todo o órgão, chegando ao tecido celular subcutâneo. Aplicando-se assim a definição do tipo de ferida. As *feridas de espessura parcial* (derme incompleta) ocorrem após muitos procedimentos dermatológicos como a dermoabrasão, o *resurfacing* por *laser* ou *peelings* químicos. Podendo também ser causada por traumatismos. A reparação faz-se pela reepitelização dos anexos epiteliais ou epitélio derivado da pele adjacente não acometida. Como resultado final tem-se uma cicatriz praticamente imperceptível. Já as *feridas de espessura total* (derme completa ou estendida ao tecido celular subcutâneo) necessitam da formação de um novo tecido, o tecido de granulação; a epitelização, base da cicatrização nas feridas de espessura parcial, acontece apenas nas margens da ferida. Nesse caso, a cicatriz é totalmente perceptível e, muitas vezes, pronunciada (COLEMAN et al., 2000).

1.5 Gastrópodes e Cicatrização

Reutter (1916) na revisão sobre o uso de caracóis como medicamento relata que o filósofo Celso afirmava que caracóis esmagados com a concha serviam como agentes de cura e que Plínio, "o Velho" afirmava que a carne de caracol "é um remédio eficaz para tratar a dor relacionada a queimaduras, abscessos e outras feridas". Desde o século 18, várias formulações usando caracóis, foram empregadas de forma tópica nos cuidados dos distúrbios dermatológicos (DWEK et al., 2001 e REUTTER, 1916). Badiu et al. (2008) estudando o conteúdo lipídico, dos moluscos *Mytilus galoprovincialis* e *Rapana venosa*, aplicado em camundongos com feridas provocadas por queimaduras, observaram que o processo de cicatrização apresentou redução significativa de tempo nos animais tratados e isto provavelmente deve-se a presença dos fatores $\omega 3$ e $\omega 6$, intimamente ligados ao processo de redução inicial da fase inflamatória e promoção da recuperação dos tecidos danificados.

Ledo, de las Heras e Ledo (1999) ao estudar o muco do molusco *Cryptomphalus aspersa* observaram que o mesmo apresenta propriedade regenerativa quando aplicado na derme de ratos com radiodermatite aguda. Brieva

et al. (2008) observou que o muco do mesmo molusco aplicado em cultura de fibroblastos humanos normais, revelou promoção da sobrevivência e proliferação dos mesmos, aumentando a matriz extracelular (MEC) tanto quando o muco foi acrescentado sozinho ou adicionado com fibronectina. Mouriès et al. (2002) avaliou a camada orgânica do nácar de conchas do molusco *Pinctada máxima*, e sugeriu que esta substância é capaz de enviar sinais químicos que podem ativar osteoblastos, células responsáveis pelo crescimento e regeneração de ossos, além de promover o crescimento de culturas de fibroblastos humanos normais. Christianakis (2008), ao implementar uma nova técnica de prepucioplastia sem sutura em 87 meninos que no período pós-operatório (do 11º ao 20º dia) receberam aplicações do creme Elicina® (LCN Cosmetics, Cidade de Santiago, Santiago, Chile), cujo princípio ativo é o muco de *Helix aspersa*, usado para acelerar a cicatrização, cuja composição apresenta alantoína, colágeno, elastina, ácido glicólico, esteróides e vitaminas A, D e E.

Segundo Pons et al. (1999) o extrato de *Helix pomatia*, conhecido como “Helicidina”, apresentou atividade bronco-relaxante quando aplicada em amostras de epitélio traqueal íntegro de cobaias. Esta atividade é independente da integridade do epitélio e é parcialmente mediada pela liberação de prostaglandina E₂. A aglutinina ligada a lectina extraída do muco de *Helix pomatia* é um potencial indicador de metástases de câncer de colo-retal (SCHUMACHER, 1994), gástrico (KAKEJI, 1991), esofágico (YOSHIDA, OKAMURA e SHIRAKUSA, 1993), de próstata (SHIRAISHI, ATSUMI e YATANI, 1992) e de mama (BROOKS e LEATHEM, 1991 e THOMAS et al., 1993).

MARTINS et al. (2003), aplicaram muco puro ou pomada a base do muco de *Achatina fulica* em lesões provocadas na pele de coelhos e demonstraram com estudos clínicos e histológicos que o processo de cicatrização foi mais rápido, ou seja, a presença de fibras de colágeno ocorreu após 72 h. González et al., (2004) relatam que em uma criação de caracóis *Helix aspersa* no Chile, os manipuladores dos animais afirmaram que o muco liberado por esses animais age no processo cicatricial de machucados nas mãos. Para comprovar esta propriedade, realizaram um experimento para comparar a atividade cicatricial de dois cremes comerciais à base do muco deste caracol, o Elicina® e o Novobase® (Cidade de Santiago, Santiago, Chile). O estudo envolveu 36 pacientes divididos em dois grupos com dezoito pessoas que apresentavam enxertos e cicatrizes de queimaduras na face,

pescoço e mãos. Os autores observaram que quatorze pacientes tratados com Elicina[®] apresentaram maior despigmentação parcial dos enxertos, sete apresentaram diminuição no tamanho das cicatrizes e ainda três apresentaram mudanças na textura do enxerto. Já no grupo tratado com Novobase[®], um paciente apresentou despigmentação parcial do enxerto, um apresentou diminuição das cicatrizes e em nenhum deles foi observado mudanças na textura do enxerto. Concluindo que cremes manipulados com o muco de caracóis são eficientes para o tratamento de queimados. Corroborando estes resultados, Tsoutsos, Kakagia e Tamparopoulos (2009) realizaram um estudo com vinte e sete pacientes vítimas de queimaduras parcialmente profundas no rosto, observaram que o tempo médio de reconstrução epitelial do grupo tratado com Elicina[®] foi 11($\pm$ 2) dias enquanto para o grupo controle foi 15($\pm$ 3) dias. Atestam ainda que, cremes com muco de *Helix aspersa* aceleram o processo de apoptose do tecido queimado e a epitelização de queimaduras parcialmente profundas.

Bonnemain (2005) em uma revisão histórica sobre o uso terapêutico de caracóis, concluiu que desde a antiguidade até o presente, a humanidade vem considerando os moluscos uma fonte surpreendentemente numerosa de compostos com propriedade terapêutica e biológica, o que torna original a realização desta tese.

1.6 Contextualização

O filo *Mollusca* com aproximadamente 100 mil espécies é o segundo filo mais numeroso em termos de táxons e como vem sendo demonstrado reúne espécies potencialmente produtoras de substâncias bioativas. Greff (1987) e Abad (1996) afirmam que inúmeras patentes indicam o potencial do uso do muco de gastrópodes terrestres em cosmeceutica e aplicações terapêuticas, particularmente para os cuidados com a pele, como o BioskincareTM (Andes Natural LLC, Carson City, Nevada, USA) que é baseado no muco do caracol terrestre *Helix aspersa*. Na revisão realizada por Molinski (2009) sobre o desenvolvimento de drogas a partir de organismos marinhos, fica clara a importância do estudo de fontes alternativas para obtenção de fármacos, o autor apresenta inúmeros compostos isolados de plantas e invertebrados.

O muco do caracol *Helix aspersa* vem há muito tempo sendo usado como agente hidratante, cicatrizante e redutor de rugas de expressão no tecido endotelial. Seu uso é advento do conhecimento popular e nos últimos anos diversos produtos foram formulados e comercializados sem validação científica. A substância mais abundante no muco do caracol *Helix aspersa* é a alantoína, sabidamente um composto de ação regenerativa do tecido epitelial. No entanto, está disponível no mercado o creme Elicina[®] que desde meados dos anos 90, vem sendo utilizado em larga escala e com o aval do órgão fiscalizador de higiene e saúde do Chile.

Em comunicação pessoal o Sr. Fernando Bascuñán Ygualt, responsável pela produção do creme Elicina[®], relatou-nos que o produto vem sendo aplicado em pacientes com queimaduras ou em cicatrizes cirúrgicas recentes, promovendo a redução em mais de 90% das cicatrizes. Segundo Thomé (1972) a lesma terrestre *Phyllocaulis boraceiensis* distribui-se entre o sudeste de Minas Gerais e o norte de Santa Catarina, e apresenta um longo e único período de reprodução anual entre os meses de julho e setembro (THOMÉ et al., 1998). É um animal nativo da fauna brasileira, contrariamente ao *Helix aspersa* e ao *Achatina fulica*, que apesar de largamente distribuídos no Brasil são de fauna exótica e considerados praga da agricultura. Portanto sua escolha prestigia nossa fauna e abre espaço para uma ampla linha de pesquisa.

Em razão da procura por novos compostos naturais, que possam representar alternativas à síntese química, inclusive com vantagens em termos de relação custo-benefício, a identificação e caracterização do muco de gastrópodes terrestres, marinhos e límnicos e o estudo de suas propriedades, somada ao fato de que a maioria das espécies encontradas no país não foi estudada sob esse aspecto, justifica a realização do presente estudo interdisciplinar de pesquisa. Este trabalho contribuiu para a geração de conhecimentos, formação de pessoal especializado na investigação de fármacos de origem animal e na descoberta de substâncias para aplicações diversas, principalmente nas áreas de cicatrização e reparo de danos teciduais encontrados em diversas patologias humanas, como diabetes, pacientes portadores de imunodeficiências adquiridas ou inatas, cânceres entre outras doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o potencial das proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* na indução da capacidade proliferativa de fibroblastos e células endoteliais *in vitro* e no efeito terapêutico de reparação dos danos teciduais em modelo de cicatrização.

2.2 Objetivos Específicos

- Gerar perfis de expressão proteica do muco;
- avaliar a capacidade proliferativa de fibroblastos humanos normais e células endoteliais humanas na presença de proteínas do muco;
- avaliar a síntese de colágeno total produzido por fibroblastos humanos normais e células endoteliais humanas;
- determinar a expressão de receptores na superfície dos fibroblastos e células endoteliais, tratados com proteínas de muco, que modulam as seguintes atividades biológicas: proliferação celular, apoptose; necrose e angiogênese;
- avaliar a regeneração tecidual de feridas cirúrgicas em modelos experimentais de cicatrizes agudas no tecido da derme de camundongos Balb-c;
- analisar o processo de reepitelização da ferida cirúrgica *in vivo*; e
- estudar a arquitetura da derme lesionada de camundongos Balb-c tratados após a aplicação epicutânea de proteínas do muco.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção dos espécimes

Espécimes da lesma terrestre *Phyllocaulis boraceiensis* (Figura 6) provenientes de criação em cativeiro no Laboratório de Malacologia do Instituto Butantan foram utilizados para a coleta do muco utilizado nos experimentos. Os animais foram mantidos em viveiros de plástico contendo terra *in natura* e com tampa telada e (Figura 7), em ambiente de laboratório livre de poluição com controle de temperatura a $\pm 24^{\circ}\text{C}$ e 85% de umidade relativa do ar. Todos os espécimes foram alimentados com pequenas quantidades de vegetais diversos (alface, cenoura e batata), segundo recomendação de Santos e Thomé (2000) e a higienização dos viveiros foi realizada a cada dois dias.

Figura 6 – Adulto (a); Desova (b); Filhotes recém-eclodidos (c) e Filhotes com 10 dias (d) de *Phyllocaulis boraceiensis*

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 7 – Viveiros de criação de *Phyllocaulis boraceiensis* com tampa telada e fundo com terra

Fonte: Toledo-Piza (2012)

3.2 Processos de obtenção e solubilização do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Seguindo recomendação de Li e Graham (2007), antes da coleta do muco os animais foram transferidos para uma placa de Petri grande e nebulizados com água destilada. A eliminação do muco (Figura 8) foi estimulada por processos mecânicos que não causaram morte ou danos aos espécimes (PAKARINEN, 1994). Os animais ficaram livres por 5 minutos na superfície lisa de uma placa de Petri, contendo uma fina camada de solução salina (NaCl-0,06%). A adição dessa solução nas placas de coleta facilitou a liberação e a remoção do muco, que foi retirado com o auxílio de uma espátula e transferido para o recipiente de armazenamento em freezer a -80°C .

As amostras de muco foram submetidas à liofilização para remoção completa de água e da solução salina usada no processo de coleta. A amostra pulverizada foi reidratada em solventes orgânicos, sendo que para 1 mg de muco liofilizado foi adicionado 100 μl de monoamina, 350 μl de etanol, 500 μl de metanol completando-se com água destilada para o volume final de 6 ml.

Figura 8 – *Phyllocaulis boraceiensis* adulto liberando muco pelo epitélio podal

Fonte: Toledo-Piza (2012)

3.3 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada utilizando-se o método de Bradford (1976) e uma curva padrão foi construída para fazer a comparação dos resultados obtidos com o muco de *P. boraceiensis*.

Foram avaliadas quatro amostras do muco bruto liofilizado e reidratado, das quais foram utilizados 50 μ l adicionados a 750 μ l de tampão Tris e 200 μ l de reagente de Bradford. Dois tubos com 200 μ l de reagente de Bradford e 800 μ l de tampão Tris foram preparados para zerar o equipamento. As leituras da absorbância do padrão e das amostras foram feitas em espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Mountain View, California, USA), com comprimento de onda ajustado para 595 nm. Todos os reagentes utilizados foram da marca (Sigma-Aldrich Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA).

3.4 Fracionamento do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* por cromatografia

O fracionamento das proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* foi realizado por cromatografia de gel filtração em coluna “Superdex 75” e cromatografia de troca iônica em coluna “Resource Q”, utilizando um cromatógrafo de alta pressão “AKTA Purifier” (GE Healthcare Life Science - Waukesha, Winsconsin, United States, USA).

Resumidamente, 1 ml de muco solubilizado foi aplicado em uma coluna de cromatografia de gel filtração “Superdex 75” em tampão Tris (20 mM) e NaCl (150 mM) com um fluxo de 0,5 ml/min. Para melhor purificação e identificação das proteínas, as frações foram aplicadas em colunas de troca iônica em tampão Tris (20 mM) NaCl (0,5 M) com um fluxo de 1 ml/min. A separação das proteínas na coluna foi realizada com um gradiente de NaCl até a concentração final de 1 M.

3.5 Análise proteômica

Entre todas as técnicas de análise proteômica de uso atual, a mais utilizada é a eletroforese bidimensional (2DE-PAGE). Seus principais atributos são separar, visualizar e analisar de forma reprodutível, misturas complexas de proteínas, obtidas a partir de células, tecidos ou organismos (RABILLOUD, 2002).

3.5.1 Focalização isoeletrica (1ª dimensão)

Uma amostra de 2,5 mg de muco liofilizado foi solubilizado diretamente na solução de hidratação e adicionados 1,5 µl de Tampão IPG (pH 3-10) e 2,5 µl de inibidor de protease. Depois de aplicada a amostra na fita, foram acrescentados 5 ml de óleo mineral no cassete de hidratação para evitar evaporação dos reagentes durante a reidratação. As fitas de IPG (*immobilized pH gel*) foram reidratadas no aparato para a focalização isoeletrica durante 12 h a 20 °C. A focalização foi feita utilizando gradiente de pH imobilizado segundo as seguintes condições: 150 V-500 Vh, 1000 V - 800 Vh, 8000 V – 11300 Vh, 8000 V – 4400 Vh. Após a focalização as fitas foram lavadas com água bidestilada e armazenadas a -80 °C (SOUZA, 2002).

3.5.2 SDS-PAGE (2ª dimensão)

Após a focalização isoeletrica, as fitas IPG foram lavadas com água bidestilada, equilibradas em duas soluções redutoras de pontes de dissulfetos. A primeira solução foi composta por Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), uréia 6 M, glicerol 30% (v:v), SDS 2% e DTT 2%. A segunda solução foi composta por Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), uréia 6 M, glicerol 30% (v:v), SDS 2%, iodoacetamida 2,5% (GÖRG et al., 1987) e azul de bromofenol 0,005%. As fitas IPG foram equilibradas por 15 min em cada solução. A segunda dimensão da eletroforese foi feita em um gel vertical homogêneo de acrilamida (180 x 160 x 1,5 mm) 12,5% Bis-acrilamida (37,5:1 – m:m), Tris-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,05% conforme descrito por Laemmli (1970) modificado. Depois de equilibradas, as fitas IPG foram colocadas sobre o gel da segunda dimensão e cobertas com uma solução de agarose 0,5% em tampão de corrida Tris-glicina (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%).

A separação eletroforética das proteínas foi feita a 10 °C, em cuba SE 600 Ruby (Amersham Pharmacia Biotech). Na primeira etapa, foi utilizado 100 V e 25 mA por gel durante 30 min ou até que as proteínas da amostra fossem transferidas da fita IPG para o gel. Na segunda etapa, foi utilizado 600 V e 50 mA por gel durante 5,5 h ou até que a solução de agarose (0,5%), indicador da corrida, alcançasse a base do gel. Após o fim da corrida, os géis foram lavados em água bidestilada por 5 min, e as proteínas coradas com prata (GHARAHDAĞHI et al., 1999).

3.5.3 Aquisição das imagens

As imagens do gel contendo as manchas de proteína do muco de *P. boraceiensis* detectadas por eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida foram obtidas por varredura, utilizando-se o ImageScanner™ III (GE Healthcare) e analisadas utilizando o programa Image Master™ 2D versão 6.0 (Amersham Pharmacia Biotech). As massas moleculares aparentes das proteínas foram determinadas utilizando-se padrões de massa molecular (BioRad, Hercules, California, USA). Como padrão de ponto isoeletrico foi utilizado o mapa teórico do proteoma total de *Xylella fastidiosa* (O'FARRELL, 1975).

3.6 Ensaios biológicos *in vitro*

Os experimentos envolvendo cultivo celular foram realizados no Laboratório de Biofísica e Bioquímica do Instituto Butantan, São Paulo.

3.6.1 Cultura de fibroblastos humanos

As amostras de fibroblastos humanos normais (Figura 9) utilizadas são provenientes de cultura de blefaroplastia de pálpebra no laboratório de bioquímica e biofísica do Instituto Butantan.

Essas células, quando em cultura, são fusiformes, aderentes, uninucleadas, que se dispõem em monocamada. As células em fase exponencial de crescimento foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 2 mM de L-glutamina e antibióticos. Foram incubadas a uma atmosfera de 37 °C, 5% de gás carbônico (CO₂) e examinadas ao microscópio invertido 3 vezes por semana. O meio de cultura foi trocado neste mesmo intervalo de tempo. Ao atingirem subconfluência, as células foram tripsinizadas (0,005% de tripsina) para serem desprendidas dos frascos de cultura. Em seguida foram centrifugadas duas vezes, ressuspensas em meio de cultura e a concentração celular ajustada para 5x10⁵ células/ml após a contagem em câmara de Mallassez. Após transferência para placas de 96 poços, aguardou-se 24 h para que as células aderissem à placa, atingissem confluência celular e recebessem o tratamento com as doses de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*.

Na figura 10 é apresentado o histograma da aquisição da população de fibroblastos humanos normais, em citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD – USA) e analisadas pelo programa *Cell-Quest*.

Figura 9 – Aspecto geral da cultura de fibroblastos humanos normais, obtido em microscópio invertido

Notam-se células alongadas, em divisão celular (seta preta), de aspecto fusiforme (seta vermelha), em alta densidade e aderidas à placa de cultura. Aumento de 40X.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 10 - Histograma representativo da aquisição da população de fibroblastos humanos normais em citômetro de fluxo *FACSCalibur* e analisadas pelo programa *Cell-Quest*

Nota-se uma única população de célula, com grande homogenia em seu volume e granulosidade, utilizada para a definição da população de fibroblastos normais. (A) histograma do controle positivo, anti-fibroblasto; (B) controle negativo, anti-isotópico anti-mouse CD3.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

3.6.2 Cultura de células endoteliais humanas

As culturas de células endoteliais humanas (HUVEC) foram isoladas a partir da veia de cordões umbilicais humanos provenientes da linhagem comercial ATCC código CRL-1730 (Figura 11) cujos padrões de coleta seguem o proposto por Jaffe et al. (1973) e mantidas em cultura no laboratório de bioquímica e biofísica do Instituto Butantan.

As células em fase exponencial de crescimento foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 2 mM de L-glutamina, antibióticos e incubadas a uma atmosfera de 37 °C e 5% de gás carbônico (CO₂) e examinadas ao microscópio invertido, 3 vezes por semana. O meio de cultura foi trocado neste mesmo intervalo de tempo. Essas células apresentam-se uniformes, arredondadas, aderentes, uninucleadas com disposição em monocamada. Ao atingirem subconfluência, as células foram tripsinizadas (0,005% de tripsina) para serem desprendidas do frasco de cultura. Em seguida foram centrifugadas duas vezes, ressuspensas em meio de cultura e a concentração celular ajustada para 5x10⁵ células/ml após a contagem em câmara de Mallassez. Após transferência para placas de 96 poços, aguardou-se 24 h para que as células aderissem à placa e atingissem confluência celular e recebessem o tratamento com as proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*.

Na figura 12 é apresentado o histograma da aquisição da população de células endoteliais humanas, em citômetro de fluxo FACSCalibur™ e analisadas pelo programa *Cell-Quest*.

Figura 11 – Aspecto geral da cultura de células endoteliais humanas, obtido em microscópio invertido

Notam-se células alongadas (seta vermelha), em divisão celular (seta preta), elípticas (seta amarela), em alta densidade e aderidas à placa de cultura. Aumento de 40X.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 12 - Histograma representativo da aquisição da população de células endoteliais humanas em citômetro de fluxo *FACSCalibur* e analisadas pelo programa *Cell-Quest*

Nota-se uma única população de célula, com grande homogeneia em seu volume e granulosidade, utilizada para a definição da população de células endoteliais humanas. (A) controle positivo, antiCD31; (B) controle negativo isotópico, anti-mouse CD3

Fonte: Toledo-Piza (2012)

3.6.3 Avaliação dos aspectos morfológicos das células tratadas com proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* analisados em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura

A avaliação das alterações morfológicas das células submetidas ao tratamento com proteínas do muco de *P. boraceiensis* foi realizada utilizando a microscopia de luz e eletrônica de varredura.

Após a observação em microscópio de luz invertido (Olympus America Incorporation, Center Valley, Pennsylvania, USA), as amostras de culturas de fibroblastos e células endoteliais tratadas com proteínas do muco de *P. boraceiensis* durante 24 h, foram lavadas com tampão PBS três vezes e fixadas com solução de glutaraldeído (3%) em PBS e mantidas em temperatura ambiente “overnight”. As amostras foram fixadas em tetróxido de ósmio 1% (pH 7,4) a 4 °C durante 1 h, desidratadas, secas com secador de ponto crítico e impregnadas de ouro. As imagens foram obtidas usando um microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP SEM (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), capturadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.6.4 Determinação da citotoxicidade das proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* pelo método colorimétrico do MTT

A determinação da citotoxicidade das proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceieinsis* foi avaliada pela viabilidade celular dos fibroblastos humanos normais e das células endoteliais humanas através do método do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo) conforme descrito por Mosmann (1983). Resumidamente, após crescimento celular (10^4 células/orifício) por 24 h, as células foram transferidas para placas de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de *P. boraceieinsis*. Após 24, 48 e 72 h, foram adicionados 20 µl de MTT (5 µg/ml) a cada poço e as placas foram mantidas em ambiente escuro a 37 °C por 4 h. Posteriormente foi descartado o precipitado e os cristais de formazam foram eluídos com 150 µl de dimetil sulfóxido.

A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro para micro placas com comprimento de onda ajustado para 540 nm e filtro de referência de 630 nm. Os resultados expressaram a porcentagem média de células viáveis. O valor da média da densidade óptica do grupo controle foi considerado 100% de viabilidade celular e os resultados dos demais grupos experimentais foram comparados a este valor. Após confecção dos gráficos e obtenção das equações utilizando o programa *GraphPad Prism™ 5* (La Jolla, California, USA), calculou-se o valor da concentração inibitória 50% (IC₅₀) e os valores foram expressos em µg/µl.

3.6.5 Quantificação da produção de colágeno total pelo método colorimétrico de Picrosirius (Sirius-red) em sobrenadante

A quantificação de colágeno em sobrenadante de culturas celulares foi realizada utilizando a coloração de Picrosirius. Culturas celulares de fibroblastos humanos normais e células endoteliais foram tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de *P. boraceiensis* em diluição seriada. Após os intervalos de 24, 48 e 72 h, foi coletado o sobrenadante de cada poço que após serem transferidos para outra placa foram fixados com solução de Bouim por 1 h. Após este período o fixador foi removido e as fibras foram lavadas delicadamente com água, removendo-a em seguida. Após 2 h de secagem em temperatura ambiente, acrescentou-se o corante Picrosirius e após 1 h foram lavadas com HCl (0,01 M) e NaOH (0,1 M). A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro para micro placas com comprimento de onda ajustado para 550 nm.

3.6.6 Determinação da formação de peróxidos lipídicos

O processo de oxidação que ocorre nos sistemas biológicos, devido à formação de produtos do metabolismo intermediário, não é a única fonte de radicais livres. Há fatores externos que podem igualmente contribuir para a formação de um excesso de radicais e geralmente podem estimular a proliferação ou causar danos irreparáveis. Nestes sistemas, os radicais livres de oxigênio podem combinar com o DNA das células, alterando seu código genético e produzindo uma multiplicação celular inicialmente normal ou descontrolada. Os estudos sobre ação dos radicais livres foram motivados e impulsionados pela descoberta da sua ação sobre o

envelhecimento celular. Os radicais livres agem sobre as células, alterando suas membranas e dando-lhes um aspecto de células velhas que, normalmente, seriam eliminadas pelo sistema imunológico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). O processo de peroxidação lipídica é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e propagado por radicais peroxilas, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malonáldeído, 4-hidroxinonenal e isoprostanos, que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para avaliar o estresse oxidativo da célula (LIMA e ABDALLA, 2001).

A taxa de lipoperoxidação das células foi medida utilizando a técnica de Ohkawa et al. (1979) que se baseia na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), predominantemente o malonáldeído (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cisão beta dos ácidos graxos poliinsaturados peroxidados (AGPI), principalmente o ácido araquidônico. O MDA é volátil, possui baixo peso molecular ($C_3H_4O_2$ – PM = 72,07), tem uma cadeia curta 1, 3-dicarbonil e é um ácido moderadamente fraco (pK_a – 4,46). Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível (BENZIE, 1996; JANERO, 1990). A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos de coloração rosa que podem ser determinados por espectrofotometria em comprimento de onda ajustado para 535 nm. Utilizando-se esta técnica foi possível avaliar a degradação oxidativa de ácidos graxos presentes em sobrenadante das culturas de fibroblastos e células endoteliais nos grupos controle e tratados com proteínas do muco de *P. boraceiensis*.

Foram realizadas alíquotas de 50 μ l do sobrenadante da cultura primária de cada amostra celular tratada com extrato de muco e grupos controle nos intervalos de 24, 48 e 72 h. Duas séries de tubos (A e B) devidamente marcados, foram preparados com 200 μ l de TCA (ácido tricloroacético 20%) em A e 200 μ l de TBA (ácido tiobarbitúrico 0,86%) em B. As amostras foram mantidas por 20min em banho-maria a 100 °C. Após este período os tubos correspondentes de TCA e TBA foram imediatamente imersos em banho-de-gelo por 20 min e submetidos à centrifugação à 8000 rpm durante 4 min. Foram retirados 50 μ l do sobrenadante de cada amostra e acondicionados em placa de 96 poços. As leituras foram realizadas

em espectrofotômetro para micro placas com comprimento de onda ajustado para 530 nm.

O cálculo da taxa da lipoperoxidação foi realizado subtraindo os valores do branco de cada série. A absorbância média da série de TCA foi obtida pela diferença da absorbância da TCA/TBA e dividindo pelo coeficiente molar do malonáldo (MDA), conforme a expressão matemática que segue:

$$\text{LPO} = \frac{(\text{média da absorbância TCA} - \text{branco}) - (\text{média da absorbância TCA/TBA} - \text{branco}) \times 5}{0,0312 - \text{coeficiente molar (MDA)}}$$

Onde: TCA = ácido tricloroacético 20%; TBA = Ácido Tiobarbitúrico 20%; MDA = malonaldeído

Os resultados foram expressos em nmoles de MDA/ml formado no sobrenadante das culturas celulares.

3.6.7 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

De acordo com o proposto por Hsieh, Hernández-Ledesma e Lumen (2011) e Givan et al. (1999) após o tratamento por 24, 48 e 72 h com proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* as culturas de fibroblastos humanos normais e células endoteliais foram separadas $2,5 \times 10^5$ células/ml e ressuspensas em etanol 70% na presença de 1 µg de RNase (Sigma®) por 2 horas para a análise das fases do ciclo celular.

As suspensões celulares ($2,5 \times 10^5$ cel/ml) de fibroblastos e células endoteliais tratadas com proteínas do muco de *P. boraceiensis* e os controles foram centrifugadas duas vezes a 3000 rpm com solução PBS e incubadas em 200 µl de solução de iodeto de propídio (20 mg/ml, Sigma®), marcador fluorescente para a avaliação da quantidade e integridade do DNA nas fases do ciclo celular. Os gráficos foram adquiridos em citômetro de fluxo FACSCalibur™ e as fases do ciclo celular pré e pós-mitóticas (DNA fragmentado, G0/G1, fase S e G2/M) foram analisadas utilizando o programa *Cell-Quest*. Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa WinMDI 2.8. Os valores foram expressos em porcentagem média de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular.

3.6.8 Determinação da resposta proliferativa pelo método CFSE obtido por citometria de fluxo

A proliferação celular também foi avaliada utilizando o método de marcação do CFSE (5,6-carboxi-fluoresceína diacetato succinimidyl ester) adaptado do protocolo descrito por (MILOVANOV, 2004). Foram avaliadas amostras contendo fibroblastos e células endoteliais tratadas com 0,18, 0,09 e 0,045 µg/µl de proteínas do muco de *P. boraceiensis*, durante 24, 48 e 72 h. As células não coradas com CFSE foram consideradas controle.

Os métodos usados para a avaliação quantitativa da proliferação celular usando a marcação com CFSE foi descrita previamente por Bernard, Pujo-Menjouet e Mackey (2003); Lyons (2000); Lyons et al. (2001); Wells et al. (1997). As imagens foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCalibur™ e analisadas utilizando o programa *Cell-Quest*. Os resultados dos 50 mil eventos coletados foram analisados utilizando o programa ModFitLT 2.0. Os valores foram expressos em porcentagem média de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular.

3.6.9 Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de apoptose e necrose por citometria de fluxo

A análise da expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de apoptose e necrose foi realizada estudando o perfil de expressão dos marcadores anexina V/PI, Bcl-2 e caspase-3. Essa análise visa determinar quantitativamente a porcentagem de células que se submetem a apoptose por virtude da habilidade de se ligarem a anexina V e de excluir o Iodeto de Propídio (PI). A anexina V é uma proteína ligada a um fosfolípido dependente de cálcio com atividade anticoagulante vascular, encontrada na face citosólica das membranas plasmáticas. A utilidade da anexina V em aplicações de citometria de fluxo é derivada de sua afinidade seletiva para fosfolípidos negativamente carregados.

Após o desprendimento e centrifugação dos fibroblastos e células endoteliais, controle e tratadas com proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*, as células foram lavadas duas vezes em PBS a 4 °C. Em seguida, foram solubilizadas em 100 µl de tampão de ligação e incubadas por mais 30 min com 1 µg de anexina V-FITC

(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) e 20 µg/ml de solução de iodeto de propídio.

Alíquotas de 100 µl das suspensões celulares foram incubadas por 1 h, à 4 °C, com 1 µl de anticorpo específico para os marcadores celulares Bcl-2 e caspase-3. Foram adicionados 10 µl de Triton X-100 0,1% para permeabilizar a membrana celular. Após este período as células foram centrifugadas por 10 min á 1500 rpm e lavadas com PBS gelado. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” solubilizado em PBS contendo 0,1% de paraformaldeído. A leitura da avaliação de apoptose e necrose foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur™ em intensidade de fluorescência FL-1/FL-2 de acordo com cada anticorpo. Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa WinMDI 2.8.

3.6.10 Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de angiogênese por citometria de fluxo

Para o estudo das vias de angiogênese foram utilizados dois marcadores celulares, o CD-34 e o VEGF-R1. Após o desprendimento dos fibroblastos e células endoteliais controle e tratadas com proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*, as amostras foram centrifugadas por 10 min á 1800 rpm refrigerado a 4 °C, o sobrenadante foi descartado, o “pellet” solubilizado em PBS, e a amostra congelada em temperatura de -80 °C, mantendo-se esta condição até o momento do preparo das amostras para análise.

Alíquotas de 100 µl das suspensões celulares foram incubadas por 1 h, à 4 °C, com 1 µl de anticorpo específico para os marcadores celulares VEGF-R1 e CD 34. Foram adicionados 10 µl de Triton X-100 0,1% para permeabilizar a membrana celular. Após esse período as células foram centrifugadas por 10 min á 1500 rpm e lavadas com PBS gelado. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” solubilizado em PBS contendo 0,1% de paraformaldeído.

A leitura e análise da expressão dos marcadores foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur™ em intensidade de fluorescência FL-1/FL-2 de acordo com cada anticorpo. Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa WinMDI 2.8.

3.7 Ensaios biológicos *in vivo*

3.7.1 Animais

Foram utilizadas fêmeas de camundongos da linhagem BALB-c provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan, com aproximadamente 25 g, idade de 6 a 8 semanas. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan (Figura 13A) em gaiolas com maravalha de *Pinus* e com acesso a água e ração *ad libitum* (Figura 13B). O protocolo empregado no desenvolvimento dos experimentos foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) sob o número 621/09.

Figura 13 – (A) Biotério do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan e (B) – Interior da gaiola de criação dos camundongos da linhagem Balb-c

Fonte: Toledo-Piza (2012)

3.7.2 Análise dermatoscópica da derme

A dermatoscopia digital é uma técnica que possibilita analisar o tamanho, forma, cores e textura das lesões de pele e anexos. As imagens captadas pelo dermatoscópio podem ser aumentadas em até 50 vezes e contribuem para o diagnóstico de diversos processos inflamatórios que poderiam não ser detectado no exame clínico. Também chamada de microscopia de superfície, dermoscopia ou, ainda, microscopia de epiluminescência, é um método para visualização das estruturas localizadas abaixo do estrato córneo, apresentando como principal indicação o estabelecimento do diagnóstico das lesões *in situ* da derme e de processos inflamatórios, visando ao diagnóstico de evolução e infiltração (BRAUN et al., 2009).

Para a realização da análise dermatoscópica foi utilizada a metodologia proposta por Campos-do-Carmo e Ramos-e-Silva (2008) que consiste no emprego de aparelhagem ótica Optiview 10100 (Optiview CCTV Products, Jacksonville, Florida, USA), acoplado uma câmera digital Sony DSC W300 (Sony, Los Angeles, California, USA). O dermatoscópio (Figura 14), um aparelho portátil com aumento de 10x, emite um feixe luminoso por meio de uma lâmpada halógena que incide em ângulo de 20 graus, na superfície cutânea, previamente preparada com aplicação de um gel fluido na interface entre a epiderme e a lâmina de vidro do aparelho, a fim de eliminar a reflexão da luz, permitindo sua penetração e a visualização das características dermatoscópicas, resultantes principalmente da presença do pigmento melânico nas diferentes camadas da pele (epiderme e derme), hemoglobina dos vasos e fibrose dérmica.

Figura 14 – Dermatoscópio acoplado a câmera fotográfica Sony DSC W300 – USA

Fonte: Toledo-Piza (2012)

3.7.3 Procedimento cirúrgico para a realização dos experimentos de cicatrização

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com as normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais (lei 6638/08 - 05/1979) com os princípios éticos da experimentação animal (COBEA, 1991) em condições de assepsia e anestesia geral, seguindo metodologia proposta por Cabral (2003).

Segundo Schanaider e Silva (2004) o cloridrato de cetamina dependendo da via de administração e da associação deste com outros anestésicos produz um tipo de anestesia dissociativa entre o córtex e o tálamo. Reduz a nocicepção, bloqueando os canais dos receptores NMDA causando analgesia, sem perda total dos reflexos protetores. A xilasina também deve ser administrada junto com outro anestésico (ex: cetamina), pois atua na imobilização do animal.

A combinação cetamina e xilasina, por via intramuscular ou intraperitoneal, é uma das mais utilizadas em animais de pequeno porte e mantém o animal em plano anestésico de 40 a 60 min, com possibilidade de reforço da dose, caso prolongue o tempo cirúrgico (MANDELBAUM, Di SANTIS e MANDELBAUM, 2003a). Portanto todos os animais foram pesados e anestesiados, na região intramuscular da coxa, previamente à cirurgia, com 7,5 mg/kg de cloridrato de cetamina (Vetaset[®], Natal, Rio Grande do Norte, Brasil) e 150 mg/kg de cloridrato de xilazina (Sedafarm[®], Jaguariuna, São Paulo, Brasil). Após tricotomia do dorso (Figura 15A) e assepsia com etanol a 70%, os animais foram submetidos a uma incisão de 1 cm² (Figura 15B) com bisturi de lâmina fria.

Figura 15 - Animal após procedimento de tricotomia no dorso (A); Animal após procedimento cirúrgico com incisão de 1 cm² no dorso (B)

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos com dois animais cada: sendo um grupo controle com animais tratados com 500 mg de papaína; um grupo de animais tratados com 500 mg de pomada de papaína acrescida de 100µl de muco de *Phyllocaulis boraceiensis* a 0,18 µg/µl e um grupo de animais tratados com 500 mg de pomada de papaína acrescida de 100 µl de muco de *Phyllocaulis boraceiensis* a 0,012 µg/µl.

As feridas foram tratadas diariamente com porções de pomada de papaína adicionada de muco de *Phyllocaulis boraceiensis* (Figura16). As medidas da ferida de cada animal foram tomadas com o auxílio de um paquímetro digital no dia do procedimento cirúrgico (tempo inicial – T0) e nos dias 7º, 14º, 21º e 28º. As áreas foram calculadas, utilizando-se a equações geométricas. A porcentagem do fechamento das feridas (%WC = fechamento da ferida) foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\%WC = \frac{\text{área no dia x (7º, 14º, 21º, 28º)} - \text{área no dia T0}}{\text{Área no dia T0}} \times 100$$

Onde: WC = “Wound closing” (Fechamento da ferida); T0 = Tempo inicial

Figura 16 – Camundongo Balb-c após receber uma aplicação da pomada de papaína na região da derme; grupo controle.

Nota-se a área lesionada contendo a pomada de papaína

Fonte: Toledo-Piza (2012)

3.7.4 Microscopia eletrônica de varredura

Fragmentos do tecido das cicatrizes formadas foram lavados com tampão PBS três vezes e fixadas com solução de glutaraldeído (3%) em PBS e mantidas em temperatura ambiente “overnight”. Após três lavagens consecutivas com PBS, as amostras foram fixadas em tetróxido de ósmio 1% (pH 7.4) a 4 °C durante 1 h. As amostras foram desidratadas, secas com secador de ponto crítico e impregnadas de ouro. As imagens foram obtidas usando um microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP SEM (Carl Zeiss), capturadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism*™ 5 (USA). Os níveis de significância entre os diferentes grupos de tratamento determinada pelo método de variância ANOVA seguido do teste comparativo múltiplo de TUKEY (0,5%). As comparações foram consideradas não significativas (ns), significativas nos níveis (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,005$ ou (***) $p < 0,0001$.

4 RESULTADOS

4.1 Manutenção dos espécimes e obtenção de muco

Foram utilizados 40 espécimes da lesma *Phyllocaulis boraceiensis* criados em cativeiro no Vivário do Laboratório de Malacologia do Instituto Butantan, São Paulo. O protocolo empregado no desenvolvimento dos experimentos foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais do Instituto Butantan (CEUAIB) sob o número 621/09.

4.2 Processos de obtenção e solubilização do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Após liofilização de todo o muco coletado dos animais em dias diferentes, foram obtidos cerca de 20 mg de muco de *Phyllocaulis boraceiensis*. Imediatamente após o processo de liofilização, esse material foi reidratado em monoamida, etanol e metanol. Obtendo-se assim uma solução estoque contendo 120 ml de proteínas do muco de *P. boraceiensis*. Essa solução foi utilizada em todos os experimentos.

4.3 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas, feita pelo método de Bradford (1976) foi realizada a partir de seis alíquotas de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* e apresentou média de concentração proteica de 0,18 µg/µl. A curva padrão, plotada na figura 17, foi construída seguindo as concentrações constantes e respectiva absorbância na tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações de albumina bovina utilizada para a construção da curva padrão da dosagem de proteína pelo método de Bradford (1976)

Albumina bovina (µg/ml)	Tampão Tris 0,05M (pH = 7,0)	Reagente de Bradford	Concentração final (µg/ml)	Absorbância a 583nm
0 µl	800 µl	200 µl	0	0
25 µl	775 µl	200 µl	2,5	0,075
50 µl	750 µl	200 µl	5,0	0,090
100 µl	700 µl	200 µl	10,0	0,119
150 µl	650 µl	200 µl	15,0	0,148
200 µl	800 µl	200 µl	20,0	0,167
250 µl	550 µl	200 µl	25,0	0,185

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 17 – Curva padrão da dosagem de proteínas pelo método de Bradford

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.4 Fracionamento do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* por cromatografia

Após fracionamento de uma amostra do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* utilizando cromatografia de gel filtração, obteve-se o seguinte perfil cromatográfico (Figura 18) onde se notam picos proteicos entre 18 e 27 min de retenção, formando-se um único pool.

Figura 18 - Perfil cromatográfico do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* obtido em cromatógrafo de alta pressão “Akta Purifier” identificando-se um único pool proteico entre 18 e 27 min de retenção

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.5 Análise proteômica

A análise proteômica utilizando-se a técnica da eletroforese bidimensional realizada com o muco de *Phyllocaulis boraceiensis* gerou nove géis, sendo aqui apresentado apenas (Figura 19) o que evidenciou maior número de “spots” proteicos bem definidos e que poderão ser mais facilmente identificados. Deve-se levar em conta que a baixa concentração proteica das amostras dificultou a realização dos experimentos e acarretou a perda de 10 dos 12 géis confeccionados. No entanto quando foi aumentada a quantidade de proteínas para 2,5 mg de muco bruto liofilizado e solubilizado diretamente no tampão de amostra foi detectado vários “spots” proteicos bem definidos.

Figura 19 – Gel de eletroforese bidimensional do muco de *P. boraceiensis* evidenciando 22 “spots” proteicos (em vermelho)

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6 Ensaios biológicos *in vitro*

4.6.1 Avaliação dos aspectos morfológicos das células tratadas com proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* utilizando microscopia de luz

O microscópio de luz utiliza como fonte de iluminação a luz branca comum para permitir a observação de materiais. O aparelho é constituído basicamente por uma parte mecânica que serve de suporte, e uma parte óptica, constituída por três sistemas de lentes: o condensador, as objetivas e as oculares.

Após a cultura das células e tratamento com 0,18 µg/µl de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* em diluição seriada, as placas de experimento foram analisadas e fotografadas utilizando-se uma câmera fotográfica Sony DSC W300 acoplada ao microscópio de luz Olympus CKX41.

4.6.1.1 Fibroblastos humanos normais

A figura 20 apresenta uma cultura controle de fibroblastos humanos normais e a figura 21 apresenta estas mesmas células tratadas com 0,012 µg/µl de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*. A imagem demonstra uma cultura com alta densidade celular quando comparada ao controle.

Figura 20 - Aspecto macroscópico da cultura primária de fibroblasto da derme humana

Notam-se células alongadas (seta preta), fusiformes, distribuídas em feixes, reorganizadas e com alta densidade celular (seta vermelha), aderidas à placa de cultura. Fotomicrografia em microscopia invertida com aumento 40X.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 21 - Aspecto macroscópico da cultura primária de fibroblasto da derme humana, grupo tratado com 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Notam-se células alongadas (seta preta), fusiformes, distribuídas em feixes, reorganizadas e com alta densidade celular (seta vermelha), aderidas à placa de cultura. Fotomicrografia em microscopia invertida com aumento 40X.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.1.2 Células endoteliais humanas

As células endoteliais humanas são células responsáveis pela formação dos vasos sanguíneos. A figura 22 apresenta o aspecto geral de uma placa de cultura controle de células endoteliais humanas e na figura 23 é possível observar esta mesma cultura após o tratamento com 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*.

Figura 22 - Aspecto macroscópico da cultura primária de células endoteliais humanas

Notam-se células alongadas (seta preta), elípticas, distribuídas em feixes, reorganizadas e com alta densidade celular (seta vermelha), aderidas à placa de cultura. Detalhe do aspecto geral da placa de cultura. Fotomicrografia obtida após 48 horas de cultura em microscopia invertida com aumento 40X.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 23 - Aspecto macroscópico da cultura primária de células endoteliais humanas, grupo tratado com 0,18 μ g de proteínas do muco do *P. boraceiensis*

Notam-se células alongadas (seta em preto), elípticas, distribuídas em feixes, reorganizadas e com alta densidade celular (seta em vermelho), aderidas à placa de cultura. Fotomicrografia em microscopia invertida com aumento 40X.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.2 Avaliação dos aspectos morfológicos das células tratadas com proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* utilizando microscopia eletrônica de varredura

O microscópio eletrônico de varredura é capaz de produzir imagens de alta resolução de amostra, já que as imagens criadas apresentam um aspecto tridimensional útil para a avaliação da estrutura superficial das células.

4.6.2.1 Fibroblastos humanos normais

Os fibroblastos são células predominantes da segunda camada da pele humana e sua função primordial é a produção de fibras de colágeno. Ao microscópio de luz são caracterizados como células que apresentam núcleo volumoso e elíptico; de cromatina frouxa e um ou mais nucléolos evidentes; prolongamentos citoplasmáticos irregulares, de difícil observação, se insinuam entre as fibras depositadas durante a atividade de síntese de matriz extracelular (CARVALHO e COLLARES-BUZATO, 2005).

Imagens das culturas de fibroblastos tratados com 0,0007, 0,012 e 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas do muco de *P. boraceiensis* durante 24 h foram adquiridas em microscópio eletrônico de varredura. A figura 24 apresenta o aspecto geral de uma placa de cultura de fibroblastos sem tratamento evidenciando células alongadas e fusiformes, em alta densidade. A morte celular foi apresentada na figura 25 onde se notam fibroblastos com ultraestrutura desorganizada, evento observado após o tratamento da cultura com 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, sendo evidente a toxicidade do composto. Nas figuras 26 e 27 nota-se a proliferação celular e formação de fibras colágenas dispostas perpendicularmente à superfície da cultura.

Figura 24 – Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura controle de fibroblastos humanos normais após 24 h de crescimento

Notam se células alongadas e fusiformes.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 25 – Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura de fibroblastos humanos normais após 24 h de tratamento com 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Notam-se células mortas com modificações importantes, como a forma esférica e a presença de debris celulares.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 26 – Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura de fibroblastos humanos normais após 24 h de tratamento com 0,012 µg/µl de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Nota-se a formação de túbulos de colágeno recém-sintetizados na matriz extracelular.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 27 – Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura de fibroblastos humanos normais após 24 h de tratamento com 0,0007 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Nota-se o adensamento da produção de fibras colágenas dispostas perpendicularmente à superfície da célula.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.2.2 Células endoteliais humanas

As células endoteliais são do tipo achatado e de espessura variável que recobre o interior de vasos sanguíneos. Assim imagens das amostras de culturas de células endoteliais tratadas com 0,0007, 0,012 e 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas do muco de *P. boraceiensis* durante 24 h foram adquiridas em microscópio eletrônico de varredura.

A figura 28 apresenta o aspecto geral da placa controle de cultura de células endoteliais humanas, evidenciando células achatadas, alongadas e elípticas. Observa-se na figura 29 a toxicidade das proteínas do muco de *P. boraceiensis* quando aplicado na concentração de 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, observando-se células mortas em toda a cultura. Na figura 30 observa-se manutenção da matriz extracelular enquanto na figura 31 além da preservação da matriz extracelular observa-se formação de vasos sanguíneos.

Figura 28 - Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura controle de células endoteliais humanas após 24 h de crescimento

Notam-se células achatadas, alongadas e elípticas.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 29 – Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura de células endoteliais humanas normais após 24 h de tratamento com 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Notam-se células mortas, esféricas e a presença de inúmeros debris celulares.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 30 - Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura de células endoteliais humanas normais após 24 h de tratamento com 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas de muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Nota-se a integridade da matriz extracelular com formação de microfibrilas de colágeno.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 31 - Fotomicrografia obtida em microscopia eletrônica de varredura de cultura de células endoteliais humanas normais após 24 h de tratamento com 0,0007 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Nota-se matriz celular preservada e a formação de vasos sanguíneos.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.3 Determinação da proliferação celular e da concentração inibitória 50% (IC_{50}) das proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* pelo método colorimétrico do MTT

O teste colorimétrico do MTT avalia a atividade de enzimas que reduzem o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo) a cristais de formazan. Esses cristais foram eluídos e mensurados com o uso de um espectrofotômetro para micro placas.

4.6.3.1 Fibroblastos humanos normais

A figura 32 apresenta a taxa de proliferação de fibroblastos humanos normais quando comparadas às células tratadas com proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*. A resposta proliferativa foi observada em concentrações inferiores a 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, sendo dose-dependente, enquanto em concentrações superiores a 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ houve toxicidade.

A concentração inibitória 50% (IC_{50}) das proteínas do muco de *P. boraceiensis* para fibroblastos humanos normais nos três tempos de tratamento estão expostos na tabela 2.

Tabela 2 – Concentração inibitória 50% (IC_{50}) em fibroblastos humanos normais tratados com proteínas do muco de *P. boraceiensis* ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Períodos de tratamento	Concentração Inibitória
24 h	0,09
48 h	0,11
72 h	0,10

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 32 – Avaliação da viabilidade/proliferação celular usando o método do MTT em fibroblastos humanos normais tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.3.2 Células endoteliais humanas

As células endoteliais tratadas com proteínas do muco de *P. boraceiensis* quando comparadas ao controle não apresentaram aumento significativo na taxa de proliferação em 24 h de tratamento (Figura 33). Após 48 h de tratamento, as taxas de proliferação foram 50% superiores aos apresentados no controle, apresentando resposta dose-dependente. As células endoteliais tratadas com muco de *P. boraceiensis* por 72 h apresentaram toxicidade. Os valores da concentração inibitória 50% (IC₅₀) para células endoteliais humanas estão apresentados na Tabela 3.

Figura 33 – Avaliação da viabilidade/proliferação celular usando o método do MTT em células endoteliais humanas tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de *P. boraceiensis*

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Tabela 3 – Concentração inibitória 50% (IC₅₀) em células endoteliais humanas tratadas com proteínas do muco de *P. boraceiensis* (µg/µl)

Períodos de tratamento	Concentração Inibitória
24 h	0,13
48 h	0,16
72 h	0,14

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.4 Quantificação da produção de colágeno total pelo método colorimétrico de Picrosirius (Sirius-red) em sobrenadante

O colágeno tem um papel fundamental na manutenção da integridade estrutural e na determinação da função dos diversos tecidos. Assim, os métodos para detectar, quantificar e analisar o colágeno são importantíssimos. No entanto, historicamente as colorações empregadas para identificar colágeno apresentam desvantagens, principalmente a baixa especificidade das fibras finas. No entanto o método que utiliza a coloração de Picrosirius “red” apresenta a capacidade de detectar fibras finas como as estudadas neste trabalho.

A figura 34 apresenta a curva padrão da produção de colágeno utilizada para a obtenção da equação da reta e do coeficiente de correlação (r^2) para o cálculo da quantidade de colágeno tipo I humano (Sigma Co. – USA).

Figura 34 - Curva padrão de produção de colágeno pelo método colorimétrico de Picrosirius, quatro amostras de colágeno tipo I humano, utilizada para o cálculo da quantidade de colágeno produzida após o tratamento com o muco de *P. boraceiensis*

4.6.4.1 Fibroblastos humanos normais

Quando comparados as células não tratadas (Figura 35) os fibroblastos humanos normais submetidos a tratamento com proteínas do muco de *P. boraceiensis* (Figura 36) apresentaram um aumento da produção de colágeno em mais de 6 vezes (Figura 37), principalmente em concentrações entre 0,09 µg/µl e 0,023 µg/µl.

Figura 35 – Análise morfométrica das fibras de colágeno sintetizadas por fibroblastos humanos normais do grupo controle, adquiridas pelo sistema de captura de imagem (Image – J), após 24 h de cultura

Nota-se em vermelho a expressão das fibras de colágeno polarizadas delimitadas pelo arcabouço celular. Aumento 60X.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 36 – Análise morfométrica das fibras de colágeno sintetizadas por fibroblastos humanos normais tratados com muco de *Phyllocaulis boraceiensis*, adquiridas pelo sistema de captura de imagem (Image-J), após 24 h de cultura

Nota-se em vermelho a significativa expressão das fibras de colágeno polarizadas delimitadas pelo arcabouço celular. Aumento 60X.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 37 – Produção de colágeno por fibroblastos humanos normais tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de *P. boraceiensis*, obtido pelo método colorimétrico de Picrosirius em sobrenadante de cultura

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.4.2 Células endoteliais

As células endoteliais humanas quando tratadas com proteínas do muco de *P. boraceiensis* não apresentaram produção significativa de colágeno (Figura 38) em relação às células não tratadas foi observado apenas a produção basal das células.

Figura 38 – Produção de colágeno por células endoteliais humanas tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de *P. boraceiensis*, obtido pelo método colorimétrico de Picrosirius em sobrenadante de cultura

Nota-se produção insignificante em todos os tratamentos e tempos.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.5 Determinação da formação de peróxidos lipídicos

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada segundo a metodologia de Ohkawa et al. (1979). A construção da curva da curva basal da produção de radicais livres existentes no muco total de *P. boraceiensis* (Figura 39) auxiliou os cálculos da produção de ácido tiobarbitúrico (TBARS) predominantemente o malonaldeído (MDA).

Figura 39 - Curva basal da produção de peróxidos lipídicos das proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.5.1 Fibroblastos humanos

A taxa de produção de peróxidos lipídicos produzidos por fibroblastos humanos normais tratados com concentrações inferiores a 0,09 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas do muco de *P. boraceiensis* apresentou redução significativa chegando a 48% após 48h de tratamento quando comparado ao experimento controle (Figura 40).

O cálculo da taxa da diminuição da formação de peróxidos lipídicos poliinsaturados em porcentagem (%) para fibroblastos humanos comparados ao experimento controle, após os três períodos de tratamento, encontra-se na Tabela 4.

Figura 40 – Produção de peróxidos lipídicos produzidos por fibroblastos humanos normais tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de *P. boraceiensis*

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Tabela 4 – Taxa da diminuição da formação de radicais lipídicos poliinsaturados (%) produzidos por fibroblastos humanos normais tratados com proteínas do muco de *P. boraceiensis* ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Períodos de tratamento	Diminuição da formação de LPO
24 h	26
48 h	48
72 h	34

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.5.2 Células endoteliais

A taxa de produção de peróxidos lipídicos produzidos por células endoteliais tratadas com concentrações inferiores a 0,045 µg/µl de proteínas do muco de *P. boraceiensis* apresentou redução significativa e quando tratados com concentrações superiores a esta houve produção de peróxidos lipídicos semelhantes à taxa apresentada pelo experimento controle (Figura 41).

As proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* apresentou redução de 65% da produção de peróxidos lipídicos produzidos por célula endoteliais após 24 h de tratamento. O cálculo da taxa da diminuição da formação de peróxidos lipídicos poliinsaturados em porcentagem (%) para células endoteliais comparados ao experimento controle, após os três períodos de tratamento, encontra-se na Tabela 5.

Figura 41 – Produção de peróxidos lipídicos produzidos por células endoteliais humanas tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de *P. boraceiensis*

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Tabela 5 – Taxa da diminuição da formação de radicais lipídicos poliinsaturados (%) produzidos por células endoteliais tratadas com proteínas do muco de *P. boraceiensis* ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Períodos de tratamento	Diminuição da formação de LPO
24h	65
48h	49
72h	37

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.6 Avaliação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

Usando a metodologia proposta por Hsieh, Hernández-Ledesma e Lumen (2011), a citometria de fluxo foi aplicada neste estudo para determinar os parâmetros cinéticos das populações celulares e obter a porcentagem de células nas fases G0/G1, S, G2/M e apoptose (DNA fragmentado). Os experimentos foram realizados usando as concentrações de 0,18, 0,09, 0,045 e 0,0007 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, concentrações da curva dose-resposta que apresentaram efeitos biológicos com magnitudes distintas.

O histograma da figura 42 representa a distribuição das fases do ciclo celular obtido por citometria de fluxo. Os quadrantes obtidos pelo programa de análise destacados na figura representam respectivamente as seguintes fases do ciclo: M1 = fase G2/M; M2 = fase S; M3 = fase G0/G1 e M4 = DNA fragmentado.

Figura 42 – Exemplos de histogramas representativos das fases do ciclo celular obtido pelo citômetro de fluxo FACSCalibur

Amostras de fibroblastos (A) e células endoteliais (B).

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.6.1 Fibroblastos humanos normais

A avaliação da distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular de fibroblastos humanos normais tratados com o muco de *P. boraceiensis* mostrou quantidades de células na fase de fragmentação de DNA semelhantes aos experimentos controle, sendo ligeiramente maior nas concentrações testadas (Figura 43). Também houve grande quantidade de células na fase G0/G1 acima dos dados obtidos com os experimentos controle, ou seja, presença de síntese de proteínas e formação de organelas. A população de células na fase S apresentou pouco aumento no número de células, exceto após 72 h de tratamento quando apresentou um aumento na quantidade de células comparado ao experimento controle. A quantidade de células na população em G2/M aumentou significativamente em todos os períodos de tratamento quando comparados aos experimentos controle. O resultado da análise do ciclo celular demonstrou que o muco de *P. boraceiensis* é indutor da proliferação de células em fase de replicação e divisão além de não induzir significativamente a fragmentação de DNA.

Figura 43 – Gráfico de barras representando a média e desvio padrão das fases do ciclo celular de fibroblastos humanos normais tratados com proteínas do muco de *P. boraceiensis*

Análise das culturas celulares tratadas por 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.6.2 Células endoteliais

A avaliação da distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular das células endoteliais humanas tratadas com muco de *P. boraceiensis* apresentou altas quantidades de células na fase de fragmentação de DNA e aumento significativo na população de células em fase G0/G1 após 24 h de tratamento (Figura 44). Não houve aumento significativo no número de células na população celular na fase S, porém após 48 h de tratamento houve um aumento significativo no número de células da população em G2/M. Os resultados mostram que o muco de *P. boraceiensis* é indutor da fragmentação de DNA, não sendo favorável para o uso como indutor da proliferação deste tipo celular.

Figura 44 – Gráfico de barras representando a média e desvio padrão das fases do ciclo celular de células endoteliais humanas tratadas com proteínas do muco de *P. boraceiensis*

Análise das culturas celulares tratadas por 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C).

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.7 Determinação da resposta proliferativa pelo método CFSE obtido por citometria de fluxo

A determinação da divisão celular utilizando o método de coloração com CFSE (5,6-carboxi-fluoresceína diacetato succinimidyl ester) foi utilizada pois este fluorocromo tem fluorescência muito brilhante e é facilmente localizado nas células após a divisão celular permitindo a análise simultânea do número celular, posição, bem como o status de divisão.

4.6.7.1 Fibroblastos humanos

Foram adquiridos perfis de proliferação celular de fibroblastos humanos normais tratados com proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* em três períodos de exposição (Figura 45). O percentual da proliferação celular foi calculado utilizando-se o programa ModFitLT 2.0 e estão apresentados na figura 46.

Os resultados evidenciaram a proliferação celular de fibroblastos quando tratados com diversas concentrações de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* confirmando com precisão os dados de proliferação celular, já obtidos nos experimentos de viabilidade celular utilizando o método colorimétrico do MTT.

Figura 45 – Histogramas representativos das populações celulares de fibroblastos humanos normais que se dividiram após a incorporação do CSFE analisado por citometria de fluxo após o tratamento com diferentes concentrações de muco de *P. boraceiensis*

Os histogramas foram analisados pelo programa WinMDI 2.8, para o cálculo do índice de proliferação.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 46 – Taxa de proliferação de fibroblastos humanos normais marcados com CFSE e tratados com diferentes concentrações de muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.7.2 Células endoteliais

Os perfis de proliferação das células endoteliais tratadas com diversas concentrações de proteínas de muco de *Phyllocaulis boraceiensis* encontram-se na figura 47. Está expressa na figura 48 o percentual de proliferação de células endoteliais calculado utilizando os dados obtidos pelo programa ModFitLT 2.0.

Os valores obtidos com o método de coloração com CFSE confirmaram os dados de toxicidade do composto para células endoteliais já obtidos nos experimentos de viabilidade celular utilizando o método colorimétrico do MTT.

Figura 47 – Histogramas representativos das populações de células endoteliais que se dividiram após a incorporação do CSFE analisado por citometria de fluxo, após o tratamento com diferentes concentrações de muco de *P. boraceiensis*

Os histogramas foram analisados pelo programa WinMDI 2.8, para o cálculo do índice de proliferação

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 48 – Taxa de proliferação de células endoteliais marcadas com CFSE e tratadas com diferentes concentrações de proteínas de muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.8 Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos nas vias de apoptose e necrose por citometria de fluxo

4.6.8.1 Fibroblastos humanos

A análise dos gráficos de porcentagem da expressão dos marcadores celulares (fosfatidilserina) envolvidos nas vias de morte celular por apoptose e necrose em fibroblastos humanos após o tratamento com as concentrações de 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* nos diferentes períodos de tratamento estão apresentados na figura 49.

Os resultados representados em média e os “dot plots” foram analisados e comparados com o grupo controle e mostraram que os tratamentos induziram morte celular por necrose, demonstrando o efeito citotóxico deste tratamento nos diferentes períodos. Sendo que após 72 h de tratamento há um aumento significativo de células em necrose. Não foram encontradas diferenças significativas no número de células em apoptose inicial ou tardia.

Os marcadores envolvidos no tipo de morte celular em fibroblastos humanos foram acompanhados após o tratamento com as proteínas do muco pela ativação da caspase-3 e da expressão do marcador da via intrínseca mitocondrial como o Bcl2 (Figura 50). Nesse tipo celular a ativação da caspase-3 (Figura 51) ocorre somente no grupo de células tratadas com 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*, após 72 h de exposição que foram acompanhadas pela diminuição significativa do marcador Bcl2. Portanto demonstrando o efeito indutor de morte celular na concentração do muco utilizada.

Figura 49 - Expressão de anexina V/PI em fibroblastos humanos tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Gráfico de barras representando a média (%) e o desvio padrão ($\pm$) da expressão do marcador: (A) experimento controle; (B) tratados com 0,18 µg/µl; (C) tratados com 0,012 µg/µl.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 50 - Expressão de Bcl-2 em fibroblastos humanos tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Histogramas representativos obtidos pelo programa WinMDI 2.8 da expressão de Bcl-2 (A). Gráfico de barras representando a porcentagem de expressão do marcador (B).

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 51 - Expressão de Caspase-3 em fibroblastos humanos tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Histogramas representativos obtidos pelo programa WinMDI 2.8 da expressão de Caspase-3 (A). Gráfico de barras representando a porcentagem de expressão do marcador (B).

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.8.2 Células endoteliais

A avaliação da proporção de células mortas pela expressão da fosfatidilserina (Anexina V) e Iodeto de propídio (PI) por citometria de fluxo em células endoteliais mostrou diferença significativa nas células mortas por necrose e apoptose após o tratamento com proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*.

A proporção de células mortas por apoptose após 48 h nas concentrações de 0,18 µg/µl e 0,012 µg/µl foi aumentada significativamente em relação ao grupo controle, que também apresentou células em apoptose (Figura 52). Esse aumento ocorrido após 48h de tratamento manteve-se até 72 h em ambas as concentrações de muco.

Neste tipo celular a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 em comparação ao grupo controle, nas diferentes concentrações de proteínas do muco nos períodos de 24, 48 e 72 h mostraram diminuição significativa em sua expressão (Figura 53). Entretanto, a ativação da caspase-3 não foi significativamente diferente em nenhum período de tempo analisado, como também independentemente da concentração de proteínas utilizada (Figura 54).

Figura 52 - Expressão de anexina V/PI em células endoteliais humanas tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Gráfico de barras representando a média (%) e desvio padrão ($\pm$) da expressão do marcador: (A) Grupo controle; (B) tratados com 0,18 µg/µl; (C) tratados com 0,012 µg/µl.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 53 – Expressão de Bcl-2 em células endoteliais humanas tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Histogramas representativos obtidos pelo programa WinMDI 2.8 da expressão de Bcl-2 (A). Gráfico de barras representando a porcentagem de expressão do marcador (B).

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 54 - Expressão de Caspase-3 em células endoteliais humanas tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Histogramas representativos obtidos pelo programa WinMDI 2.8 da expressão de Caspase-3 (A). Gráfico de barras representando a porcentagem de expressão do marcador (B).

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.9 *Análise da expressão de marcadores celulares envolvidos na angiogênese por citometria de fluxo*

4.6.9.1 Fibroblastos humanos

A expressão de marcadores de células progenitoras CD34+ em fibroblastos humanos após o tratamento com a concentração de 0,18 µg/µl de proteínas do muco de *P. boraceiensis* mostrou diminuição significativa em comparação ao grupo controle e a concentração de 0,012 µg/µl. Essa diminuição na concentração de 0,18 µg/µl foi tempo dependente (Figura 55). Por outro lado, a expressão do receptor para a formação de novos vasos VEGF-R1 (Figura 56) demonstra a diminuição significativa da marcação da população de células positivas após 48 e 72 h do tratamento, nas duas concentrações de proteínas do muco do gastrópode.

Figura 55 - Expressão de CD-34 em fibroblastos humanos tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Histogramas representativos obtidos pelo programa WinMDI 2.8 da expressão de CD-34 (A). Gráfico de barras representando a porcentagem de expressão do marcador (B).

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 56 - Expressão de VEGF-R1 em fibroblastos humanos tratados com diferentes concentrações de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Histogramas representativos obtidos pelo programa WinMDI 2.8 da expressão de VEGF-R1 (A). Gráfico de barras representando a porcentagem de expressão do marcador (B).

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.6.9.2 Células endoteliais

Nas células endoteliais tratadas com proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*, a expressão dos marcadores CD34 foi em média de $18,7 \pm 3,7$ e de $58,3 \pm 8,2$ para o receptor de VEGF-R1; característica constatada neste estudo e devida possivelmente às concentrações da linhagem celular durante seu estabelecimento e imortalização.

O tratamento com as proteínas do muco nas concentrações de $0,18 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ e $0,012 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ aumentaram a expressão do marcador CD34 no período de 24 h e após os períodos de 48 e 72 h reduziram significativamente sua expressão (Figura 57).

A expressão do receptor R1 para o VEGF na concentração de $0,18 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas do muco de *P. boraceiensis* mostrou diferença significativas em todos os períodos analisados em maior proporção que a concentração de $0,012 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ em todos os períodos de cultura (Figura 58).

Figura 57 - Expressão de CD-34 em células endoteliais tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Histogramas representativos obtidos pelo programa WinMDI 2.8 da expressão de CD-34 (A). Gráfico de barras representando a porcentagem de expressão do marcador (B).

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 58 - Expressão de VEGF-R1 em células endoteliais tratadas com diferentes concentrações de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Histogramas representativos obtidos pelo programa WinMDI 2.8 da expressão de VEGF-R1 (A). Gráfico de barras representando a porcentagem de expressão do marcador (B).

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.7 Ensaios biológicos *in vivo*

4.7.1 Animais

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados igualmente em todos os camundongos fêmeas Balb-c e todos retornaram após a sedação no tempo esperado, cerca de 1 h da aplicação do anestésico. Diariamente os animais foram pesados e tiveram as áreas dos ferimentos medidas com o auxílio de um paquímetro digital. As áreas lesionadas dos diferentes grupos experimentais foram fotografada com o auxílio de um dermatoscópio acoplado em uma câmara digital.

Os gráficos de setores representam a porcentagem diária da área de fechamento da ferida (Figuras 59A, 60A e 61A). Os gráficos de dispersão apresentam a linha de tendência usada para a obtenção da equação da reta para o cálculo da metade do fechamento de cada ferida (Figuras 59B, 60B e 61B).

A análise dos gráficos de fechamento das feridas permite observar que os camundongos tratados com a pomada de papaína acrescida de 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas do muco de *P. boraceiensis* apresentaram fechamento da ferida em menor tempo que os demais animais do grupo controle e tratados. Aplicando a equação da reta para o cálculo de fechamento de metade da ferida, verificou-se que os camundongos do grupo controle tiveram metade da ferida fechada no 10º dia e os camundongos dos grupos tratados, tanto com 0,18 como 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*, apresentaram fechamento de metade da ferida no 7º dia de tratamento.

A avaliação clínica e de evolução da cicatrização cutânea foi dividida em três intervalos de tempo para a realização da análise quantitativa: 5º, 11º e 16º dias após o início do tratamento. Foram avaliados os seguintes aspectos macroscópicos das áreas centrais e bordas da ferida: formação de edema, hiperemia, sangramento, tecido de cicatrização e de granulação e a formação da crosta. Foram atribuídas à presença e ausência desses processos a seguinte *score*: de *baixa intensidade* (+), *moderada intensidade* (++) e *de alta intensidade* (+++). Obtidas das médias de cada grupo experimental, sendo: controle (Figura 62A); tratado com 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Figura 62B) e 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Figura 62C) de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*.

Figura 59 – Fechamento da ferida (WC - %) da derme de camundongos Balb-c do experimento controle em relação ao dia de tratamento pós-cirúrgico

Gráfico de setor representando a porcentagem diária de fechamento da ferida dos camundongos (A). Linha de tendência e equação da reta para o cálculo da metade do fechamento da ferida de camundongos.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 60 – Fechamento da ferida (WC - %) da derme de camundongos Balb-c submetidos a tratamento com 0,18 µg/µl de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* em relação ao dia de tratamento pós-cirúrgico

Gráfico de setor representando a porcentagem diária de fechamento da ferida dos camundongos (A). Linha de tendência e equação da reta para o cálculo da metade do fechamento da ferida de camundongos.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 61 – Fechamento da ferida (WC - %) da derme de camundongos Balb-c submetidos a tratamento com 0,012 µg/µl de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* em relação ao dia de tratamento pós-cirúrgico

Gráfico de setor representando a porcentagem diária de fechamento da ferida dos camundongos (A). Linha de tendência e equação da reta para o cálculo da metade do fechamento da ferida de camundongos.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 62 - Avaliação clínica e de evolução da cicatrização cutânea da derme lesionada dos camundongos tratados

A - Variações da Ferida Cirúrgica	Tempo pós-lesão – Grupo Controle		
	5º Dia	11º Dia	16º Dia
Edema	Presente (+++)	Presente (+)	Ausente
Hiperemia	Presente (+++)	Presente (++)	Ausente
Sangramento	Presente (+++)	Presente (+++)	Ausente
Tecido Cicatricial	Ausente	Presente (+)	Presente (+++)
Tecido de Granulação	Ausente	Presente (+)	Presente (+++)
Crosta	Ausente	Ausente	Presente (+++)

B - Variações da Ferida Cirúrgica	Tempo pós-lesão – Animais tratados com 0,18 µg/µl		
	5º Dia	11º Dia	16º Dia
Edema	Presente (+++)	Presente (+++)	Ausente
Hiperemia	Presente (+++)	Presente (+++)	Ausente
Sangramento	Presente (+++)	Presente (+++)	Ausente
Tecido Cicatricial	Ausente	Ausente	Presente (+++)
Tecido de Granulação	Ausente	Ausente	Presente (+++)
Crosta	Ausente	Ausente	Presente (++)

C - Variações da Ferida Cirúrgica	Tempo pós-lesão – Animais tratados com 0,012 µg/µl		
	5º Dia	11º Dia	16º Dia
Edema	Presente (+++)	Ausente	Ausente
Hiperemia	Presente (+++)	Ausente	Ausente
Sangramento	Presente (+++)	Ausente	Ausente
Tecido Cicatricial	Ausente	Presente(++)	Presente (+++)
Tecido de Granulação	Ausente	Presente(++)	Presente (+++)
Crosta	Presente(+)	Presente(++)	Presente (+++)

Animais do grupo controle (A); tratados com 0,18µg/µl (B) e tratados com 0,012µg/µl(C).

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.7.2 Análise dermatoscópica da derme

Antes da aplicação da porção diária de pomada de papaína, todos os animais tiveram suas feridas fotografadas com o auxílio do dermatoscópio com o intuito de acompanhar o processo de cicatrização em nível tecidual. São apresentadas aqui as imagens dos camundongos que apresentaram melhor processo de cicatrização e nos dias onde houve alterações teciduais relevantes.

Todos os animais apresentaram fragilidade capilar após a cirurgia, sendo que os do grupo tratado com 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ apresentaram até o oitavo dia de tratamento, ao ser encostado o dermatoscópio na ferida, havia extravasamento sanguíneo e a formação de coágulos (Figura 63); o grupo controle apresentou fragilidade capilar até o terceiro dia de tratamento e o grupo tratado com 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ até o segundo dia de tratamento.

Figura 63 – Foto digitalização obtida em dermatoscopia da derme de camundongos tratados com 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Observa-se a formação de coágulos (seta vermelha) após extravasamento sanguíneo: (A) 2º dia de tratamento; (B) 6º dia de tratamento

Fonte: Toledo-Piza (2012)

O processo de remodelação tecidual e deposição de colágeno foram iniciados no grupo controle no quinto dia de tratamento (Figura 64A), no grupo tratado com 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ no sexto dia de tratamento (Figura 64B) e no grupo tratado com 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ iniciou no terceiro dia de tratamento (Figura 64C).

Figura 64 – Foto digitalização obtida em dermatoscopia da derme de camundongos tratados com proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Observa-se o início do processo de remodelação tecidual (seta vermelha): (A) 5º dia no grupo controle; (B) 6º dia no grupo tratado com 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; e (C) 3º dia no grupo tratado com 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

O fechamento total das feridas foi observado para o grupo controle e para o grupo tratado com 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ no 16º dia (Figura 65A e B) e no grupo tratado com 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ no 15º dia (Figura 65C), onde se pode observar apenas um eritema na região.

Figura 65 – Foto digitalização obtida em dermatoscopia da derme de camundongos tratados com proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Observa-se o aspecto das feridas (seta vermelha) dos camundongos no 15º dia de tratamento. (A) grupo controle; (B) grupo tratado com 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ com presença de “trombo”; (C) fechamento total da ferida no grupo tratado com 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

4.7.3 Microscopia eletrônica de varredura das cicatrizes

Após o 16º dia de experimentação, período final do processo de cicatrização, todos os camundongos foram sacrificados e fragmentos da cicatriz do tecido epitelial foram separados para a análise das imagens por microscopia eletrônica de varredura.

Os fragmentos de cicatriz da derme dos animais do grupo controle apresentaram manutenção da matriz extracelular (Figura 66).

Figura 66 – Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura da derme de camundongos tratados com proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Observa-se a manutenção da matriz extracelular de fragmento da cicatriz de um animal do grupo controle.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Os fragmentos de cicatriz da derme dos animais tratados com 500 mg de pomada de papaína acrescidos de 100 μ l de muco de *Phyllocaulis boraceiensis* a 0,18 μ g/ μ l apresentaram inúmeras células mortas (Figura 67) demonstrando o potencial tóxico desta concentração; células do sangue devido fragilidade capilar em todo período de tratamento (Figura 68).

Figura 67 – Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura da derme de camundongos tratados com proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Observa-se a presença de inúmeras células mortas (setas vermelhas) em fragmento de cicatriz de animal tratado com 0,18 μ g/ μ l de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 68 – Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura da derme de camundongos tratados com 0,18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Observa-se a presença de células sanguíneas (seta vermelha) em fragmento de cicatriz da derme.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Os fragmentos de cicatriz da derme dos animais tratados com 500 mg de pomada de papaína acrescidos de 100 μ l de muco de *Phyllocaulis boraceiensis* a 0,012 μ g/ μ apresentaram manutenção da matriz extracelular (Figura 69), crescimento de pelos (Figura 70) e intensa formação de fibras colágenas (Figura 71).

Figura 69 – Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura da derme de camundongos tratados com 0,012 μ g/ μ proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Observa-se a manutenção da matriz extracelular.

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 70 – Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura da derme de camundongos tratados com 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Observa-se o crescimento de pelos em fragmento de borda de cicatriz da derme de camundongos. Em detalhe: pelos (seta vermelha); bulbo (seta amarela); fibras de colágeno (seta verde) e discreta presença de células inflamatórias (seta azul).

Fonte: Toledo-Piza (2012)

Figura 71 – Fotomicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura da derme de camundongos tratados com 0,012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*

Observa-se intensa formação de fibras colágenas em fragmento de cicatriz da derme de camundongos. Em detalhe: pêlo (seta vermelha); microfibrilas (círculo amarelo) e discreta presença de células inflamatórias (setas azuis).

Fonte: Toledo-Piza (2012)

5 DISCUSSÃO

Os produtos naturais, secreções animais e seus extratos têm sido a maior fonte de inspiração para diversas áreas da química e da ciência de um modo geral. Usando, copiando ou modificando as moléculas sintetizadas pelos seres vivos, o homem tem obtido inovações para o seu benefício em diversas áreas e, entre elas, a produção de fármacos (COSTA-LOTUFO, WILKE e JIMENEZ, 2009). Atualmente, os organismos invertebrados são investigados pelo seu potencial para a biotecnologia (STEPAN et al., 2012). Neste contexto, os organismos terrestres são os responsáveis por quase a totalidade dessas substâncias. Os escassos estudos químicos e farmacológicos realizados com secreções de gastrópodes e suas implicações científicas tornam importante a realização deste estudo para favorecer a descoberta de novos produtos naturais com ação em alvos moleculares peculiares, além da utilização desse conhecimento pela indústria farmacêutica no processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.

Os resultados apresentados nesta tese foram produzidos para gerar conhecimento sobre os efeitos biológicos pró e anti-proliferativos do muco do gastrópode *Phyllocaulis boraceiensis*, in vitro e in vivo no estudo do processo de cicatrização de feridas cirúrgicas. Esses resultados permitiram sua comparação com estudos já realizados em gastrópodes como *Helix aspersa* e *Achatina fulica*, ambas as espécies exóticas no Brasil, no entanto sabidamente produtores de muco capaz de renovar tecidos queimados e diminuir manchas e rugas (GONZÁLEZ et al., 2004; TSOUTSOS, KAKAGIA e TAMPAROPOULOS, 2009).

Como relatado por Toledo-Piza, et al. (2010), o muco do gastrópode *Phyllocaulis boraceiensis* é altamente glicosilado, apresentando em sua composição 600 µg/ml de glicose. No ato da liberação do muco, este se apresenta alaranjado e bastante viscoso, o que faz deste composto um material complexo para ser trabalho, pois sua viscosidade dificulta o manuseio das amostras. Para solucionar esse problema, as amostras de muco foram submetidas à liofilização para remoção completa da água. A amostra pulverizada foi reidratada em solventes orgânicos, sendo para 1 mg de muco liofilizado foi adicionado 100 µl de monoamina, 350 µl de etanol, 500 µl de metanol completando-se com água destilada para o volume final de 6 ml. A liofilização permite que o material da secreção na forma pulverizada facilite a realização dos experimentos. Assim as amostras, após sua solubilização, passaram a ter um aspecto líquido e transparente diferentemente do produto *in natura*. Esta solução estoque com concentração de 0,18 µg/µl foi utilizada para a realização dos

experimentos de viabilidade celular, determinação da produção de colágeno e peróxidos lipídicos, sempre em diluição seriada. Os demais experimentos *in vitro* foram realizados com as concentrações que apresentaram resultados mais significativos, destas, duas concentrações foram escolhidas (0,18 µg/µl e 0,012 µg/µl) para a realização dos ensaios de cicatrização em camundongos por serem as concentrações que apresentaram efeitos biológicos com magnitudes distintas.

Os fibroblastos são as principais células envolvidas na cicatrização e têm como principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular. São estimulados a produzir e a depositar componentes da matriz extracelular e, na pele, esses eventos são necessários para permitir e promover a reepitelização (AMADEU et al., 2003). Essas células sofrem modificações normais devido às forças mecânicas que são submetidas durante situações patológicas ou fisiológicas, assim, organizam as fibras colágenas e estão diretamente relacionados à formação do tecido de granulação. Além de produzirem colágeno, os fibroblastos produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, responsáveis pelo remodelamento normal da célula (HILDEBRAND et al., 2005). Durante a formação do tecido de granulação, os fibroblastos e as células endoteliais proliferam e se movem para o interior da ferida, produzindo matriz extracelular e angiogênese (SINGER e CLARK, 1999). Essas células adquirem alguns aspectos morfológicos e bioquímicos de células musculares lisas, onde essas modificações originam os miofibroblastos. Os miofibroblastos participam na síntese da matriz extracelular e na produção de força mecânica, com influência na reorganização da matriz e na contração da ferida (TOMASEK et al., 2002). Segundo Gabbiani (2003), sua atividade contrátil é responsável pelo fechamento das feridas após as lesões, processo conhecido como contração da ferida.

Os fibrócitos são fibroblastos inativos cuja atividade celular é a fibrose; no processo cicatricial contribuem no mecanismo de formação do granuloma; na atividade antigênica, na produção de colágeno e na matriz proteica participam da remodelagem; e na inflamação como fonte rica de citocinas (ABE et al., 2001 e QUAN, 2004), na produção de fatores de crescimento, na produção de fatores angiogênicos, na contribuição na formação de novos vasos sanguíneos e em algumas desordens fibróticas (METZ, 2002 e QUAN, 2004). Os fibroblastos desempenham um papel central na cicatrização de feridas devido à sua capacidade

de migração para o local da injúria, produção e remodelamento de componentes da MEC, como o colágeno, assim como estímulo parácrino no processo de cicatrização de feridas, incluindo angiogênese (ALBERTS et al., 2010).

Em fibroblastos humanos normais tratados com o muco de *Phyllocaulis boraceiensis* as taxas de proliferação de fibroblastos humanos normais mostraram que o de muco *P. boraceiensis* apresenta capacidade de indução do crescimento celular em baixas concentrações.

Durante o desenvolvimento humano, elementos essenciais ao crescimento, como nutrientes e oxigênio, são consumidos continuamente. À medida que há divisão celular ainda na vida embrionária, o sistema vascular sofre expansão para garantir o aporte destas substâncias a todo o organismo em formação, em um processo denominado angiogênese (GUPTA e ZHANG, 2005; KHAKOO e FINKEL, 2005; MILKIEWICZ et al., 2006). As células endoteliais maduras que irão compor a parede dos vasos originam-se do mesoderma esplâncnico do embrião e posteriormente se diferenciam em estruturas vasculares nos diferentes tecidos e órgãos (FIDLER e ELLIS, 2004). A neoformação vascular é essencial não somente durante o desenvolvimento fetal, mas também no ciclo reprodutivo feminino, e tem seu papel de destaque no reparo tecidual (PEREIRA et al., 2008). A proliferação de células endoteliais foi observada apenas 48 h após o tratamento com proteínas do muco de *P. boraceiensis*, efeitos adversos dependentes do tempo e da concentração utilizada.

O colágeno é a maior classe de proteína fibrosa insolúvel encontrada na matriz extracelular e nos tecidos conectivos. É uma família de proteínas relacionadas, geneticamente diferente, cuja principal função é estrutural. São sintetizados como pró-colágenos. Após a secreção dessas moléculas, seus fragmentos terminais são clivados por meio de enzimas extracelulares chamadas colagenases e liberados à circulação. Com a clivagem, são formadas as moléculas de colágeno que se polimerizam para formar fibrilas colágenas que, por sua vez, se agregam para constituir as fibras colágenas (VARGAS, AUDÍ e CARRASCOSA, 1997). Os fibroblastos desempenham um papel central na cicatrização de feridas devido à sua capacidade de migração para o local da injúria, produção e remodelamento de componentes da MEC, como o colágeno, assim como estímulo parácrino no processo de cicatrização de feridas, incluindo angiogênese (ALBERTS et al., 2010).

O aumento significativo na produção de colágeno pelos fibroblastos humanos normais tratados sugere que o muco de *P. boraceiensis* apresenta capacidade indutora da regeneração de tecidos podendo ser comparada com o proposto por Christianakis (2008), quando testou uma nova técnica de prepucioplastia sem sutura e observaram que as crianças tratadas com o creme Elicina[®], manipulado com o muco do gastrópode *Helix aspersa*, composto que contém alantoína, colágeno, elastina, ácido glicólico e vitaminas A, D e E, apresentou aceleração no processo de cicatrização. Tsoutsos, Kakagia e Tamparopoulos (2009) demonstraram que formulações com o muco de *H. aspersa* acelera o processo de apoptose em tecidos da derme lesionadas por queimaduras superficiais como também promove a epitelização de queimaduras parcialmente profundas. Nesses estudos não foram mencionados quantificação precisa de colágeno. Diferentes tipos celulares podem sintetizar colágeno, dependendo de cada tecido.

Neste trabalho foi demonstrado um aumento significativo da capacidade de proliferação de colágeno induzida em fibroblastos normais após o tratamento com o muco de *Phyllocaulis boraceiensis*. As células endoteliais tratadas com o muco do gastrópode, não apresentaram produção significativa de colágeno por não ser uma célula cuja origem seja a produção desta molécula para fins de reparo tecidual. Entretanto o endotélio produz os fatores indutores da colagênese.

O aumento na taxa de proliferação celular, bem como o aumento na produção de colágeno em culturas de fibroblastos humanos normais tratados com proteínas do muco de *P. boraceiensis* são aspectos que reforçam os efeitos deste composto como um agente indutor do processo de cicatrização em feridas. Portanto pode-se afirmar que quanto maior a quantidade de fibroblastos maior será a produção de colágeno. Os resultados da avaliação das fases do ciclo celular corroboram aqueles obtidos nos experimentos de viabilidade celular realizados pelo teste colorimétrico do MTT.

Os efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes biológicos já eram conhecidos no final de século XIX (LORRAIN-SMITH, 1899), tornando-se objeto de intensas investigações nos últimos anos (HALLIWELL, 2000). Estes efeitos são resultantes da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídios, principalmente ácidos graxos poli-insaturados, mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio, conhecidas genericamente como radicais livres (GILLER e SIGLER, 1995; ROMERO

et al., 1998). A formação de espécies reativas é equilibrada naturalmente pela existência de compostos e sistemas antioxidantes. A busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas.

A geração de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria é um processo contínuo e em condições aeróbias normais. Essa organela possui um eficiente sistema de defesa antioxidante, representada pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase, glutathione reductase, NAD transhydrogenase, e outros compostos tais como glutathione (GSH), NADPH e vitaminas “E” e “C”. Em condições fisiológicas, os sistemas oxidante e antioxidante da organela estão em equilíbrio, mas em condições em que um excesso de reativos do oxigênio é produzido e/ou o sistema de defesa antioxidante é esgotado, portanto, um estado de estresse oxidativo é disponibilizado. A produção aumentada de ROS produzindo diversas alterações de componentes da membrana mitocondrial, tais como na peroxidação de lipídeos ou na oxidação de grupos tiol de proteína, leva a permeabilização mitocondrial e consequente disfunção (BROOKES et al., 2004).

Segundo Vigo-Pelfrey (1991) todos os componentes celulares são suscetíveis à ação dos radicais livres, porém a membrana celular é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas. Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo das organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com diferentes respostas celulares, entre elas a indução de morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos. Assim, como na formação dos radicais livres, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória.

O malonaldeído (MDA) é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). A formação de malonaldeído ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos (BONNES e GUÉRIN, 1992). A

lipoperoxidação pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre lipídios insaturados das membranas celulares gerando principalmente radicais alquila, alcoila e peroxila, levando a destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, a morte celular. A LPO pode ser avaliada e utilizada como um indicador do estresse oxidativo celular (BENZIE, 1996).

O estresse oxidativo de longa duração causado pela superprodução de radicais livres pode induzir necrose. Por exemplo, a alta reatividade do radical hidroxila tem sido considerada como um dos mais potentes condutores de morte celular por necrose. No processo de apoptose, os radicais livres tem um papel maior na determinação do “status” redox e muitas formas de indução de apoptose envolvem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Alguns antioxidantes como tocoferol e carotenos, peroxidases contendo heme como a catalase, glutathione-peroxidase, superóxido dismutase, e mecanismos reparadores de DNA são algumas das defesas que têm sido utilizadas para minimizar os efeitos deletérios dos radicais livres e atenuar o processo de apoptose (HARMAN, 2001; POLLACK e LEEUWENBURGH, 2001).

Assim, compostos com estas características são importantes quando o foco é acelerar a regeneração tecidual melhorando a qualidade de vida e recuperação de pacientes vítimas de queimaduras ou para aqueles que apresentam feridas difíceis de serem fechadas, assim como em pacientes portadores de deficiências do metabolismo ósseo. Neste sentido a pesquisa de produtos naturais que proporciona a descoberta de novos fármacos que possam agir sobre as diferentes espécies oxidantes geradas no organismo é de grande importância para a saúde pública (VELLOSA, BARBOSA e OLIVEIRA, 2007).

As células endoteliais e fibroblastos humanos normais tratados com muco de *P. boraceiensis* apresentaram uma redução significativa na produção de radicais livres, quando medida a taxa de produção de malonaldeído. A baixa produção de malonaldeído pelos fibroblastos e células endoteliais tratadas com muco de *P. boraceiensis* correlacionadas à diminuição da taxa de produção de radicais lipídicos quando comparada aos resultados do experimento controle, demonstra que o uso deste composto é recomendado no tratamento de feridas, uma vez que este composto demonstrou ser indutor de proliferação celular e capaz de reduzir a produção de radicais livres de forma significativa.

O ciclo celular é o mecanismo essencial pelo qual todos os seres vivos se reproduzem. Alguns detalhes variam entre os organismos e entre as diferentes fases de sua vida, mas certas características são universais: há duplicação dos cromossomos na fase S do ciclo celular; na fase M os cromossomos são segregados em núcleos individuais, seguido de divisão da célula em duas (citocinese); geralmente as fases S e M são separadas por fases de intervalo denominadas G1 (entre as fases M e S) e G2 (entre as fases S e M), nas quais sinais intracelulares e extracelulares regulam a progressão do ciclo celular. Condições desfavoráveis podem retardar a progressão da fase G1, mantendo as células em um estado de repouso especializado denominado G0 (ALBERTS et al., 2010).

As células eucarióticas desenvolveram uma complexa rede de proteínas reguladoras, as quais controlam a progressão do ciclo celular, sendo conhecidas em conjunto como sistema de controle do ciclo celular. O sistema de controle ativa a progressão do ciclo celular em três principais pontos, denominados pontos de verificação. O primeiro ponto é o início, no final da fase G1, no qual a célula entra no ciclo celular e duplica seus cromossomos. O segundo é o ponto de verificação G2/M, no qual seguem os eventos mitóticos e alinhamento dos cromossomos no fuso durante a metáfase. O terceiro é a transição entre a metáfase e anáfase, onde o sistema de controle estimula a separação das cromátides-irmãs, com término da mitose e da citocinese. O sistema de controle responde a sinais intra e extracelulares, bloqueando a progressão do ciclo celular se as condições ambientais ou intracelulares forem desfavoráveis. A progressão do ciclo celular é regulada por ciclinas dependentes de cinases (Cdks) e suas proteínas ativadoras, as ciclinas, assim como por inibidores de Cdks (GUPTA, HUSSAIN e MUKHTAR, 2003). Neste contexto, as proteínas do muco de *P. boraceiensis* demonstraram-se ser indutoras da proliferação de fibroblastos na fase de replicação e divisão além de não induzir significativamente a fragmentação de DNA. Contrariamente, quando aplicado em culturas de células endoteliais, o mesmo composto originou um aumento significativo no número de células com DNA fragmentado, em necrose como demonstrado pelos experimentos com os marcadores celulares para a avaliação das vias de morte celular.

As células que expressam a fosfatidilserina na face exterior das membranas celulares se ligam a anexina V e as células com uma membrana celular comprometida permitem que o Iodeto de propídio se liga ao DNA celular. As células

resultantes, quando analisadas imediatamente por citometria de fluxo, apresentam quatro potenciais populações: as células vivas não marcadas com nenhum fluorocromo, células necróticas marcadas somente com PI, células que se encontram no início do processo de apoptose que marcadas somente com o reagente FITC da anexina V e quando há a dupla marcação (iodeto de propídio e Anexina V) há apoptose em fase tardia.

As mitocôndrias desempenham papéis essenciais na ativação do processo de apoptose em células de mamíferos. Os membros da família Bcl-2 regulam a libertação de proteínas a partir do espaço entre a membrana mitocondrial interna e externa que, uma vez no citosol, ativa proteases de caspases que desmontam as células e sinalizam para a fagocitose (WANG e YOULE, 2009). O processo de apoptose ou morte celular programada é um acontecimento comum, tanto em situações patológicas, contribuindo para fenômenos de inflamação e de disfunção orgânica, como em situações fisiológicas, no decurso de processos de embriogênese e metamorfose. Este processo pode ser dividido em duas principais vias: a intrínseca ou via mitocondrial e a extrínseca ou via do receptor de morte (QIAO e WONG, 2009). As caspases, uma família das proteases de cisteínas, atuam em ambas as vias com funções cruciais e sua ativação resulta na execução da apoptose (SALVESEN e RIEDL, 2008). A família Bcl-2 consiste de ambos os membros, pró e antiapoptótica. Sabe-se que o aumento na expressão demasiada da proteína antiapoptótica, Bcl-2, neutraliza os sinais apoptóticos, enquanto a pró-apoptótica, BAX, transfere um sinal apoptótico para a execução do processo de apoptose. Esse evento de morte celular é também essencial na eliminação de células descontroladas. Vários eventos, tais como, dano no DNA ou anormalidades cromossômicas levam ao funcionamento da apoptose em células normais. Já as células tumorais adquirem mutações em seus genomas que as forçam a sobreviver destes sinais apoptóticos (SOUSSI e WIMAN, 2007). A expressão demasiada da proteína antiapoptótica Bcl-2, por exemplo, devido à translocação cromossômica resulta em câncer de mama e linfomas de células B (LESSENE, CZABOTAR e COLMAN, 2008). Além disso, a alta desregulação da expressão das caspases inibidoras também previne as células tumorais na submissão a apoptose (LACASSE et al., 2008). As células do câncer são caracterizadas por vários processos desregulados resultando no desequilíbrio entre sobrevivência celular e apoptose.

A via mitocondrial envolve membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, que é o fator de regulação do processo de apoptose que a suprime em uma variedade de sistemas celulares: regula a morte celular controlando a permeabilidade da membrana mitocondrial e funciona em um sistema de “feedback” com caspase-3 (TSUJIMOTO, 1998). O marcador celular de caspase-3 é uma das proteínas envolvidas na cascata de ativação sequencial das caspases, e desempenha um papel central na fase de execução do processo de apoptose celular. As caspases residem na célula sob pró-formas inativas, sendo, na maioria dos casos, ativadas por clivagem proteolítica. Essa ativação consiste na remoção do pró-domínio aminoterminal e na clivagem do polipeptídeo restante, resultando numa subunidade grande e em uma subunidade pequena, que constituirão a enzima funcional. A via maioritária de ativação das “caspases executoras” processa-se segundo a ação de outras proteases, designadas de “caspases iniciadoras”, requerendo a ajuda de proteínas adaptadoras, as quais se ligam aos motivos de interação proteica localizados ao nível dos pró-domínios. A ligação do adaptador promove, assim, a ativação das “caspases iniciadoras” que, em seguida, podem clivar e ativar as “caspases executoras”.

A necrose ocorre quando existe um colapso da homeostasia celular, isto é, sempre que a célula sofre variações extremas das suas condições fisiológicas, como a hipotermia ou a hipóxia, sendo acompanhada por lise da membrana celular e subsequente libertação de componentes intracelulares para o exterior. Como consequência deste processo catastrófico, a necrose provoca quase sempre inflamação. Contrariamente, a apoptose é um processo de morte celular ativo, mas silencioso, que ocorre em condições fisiológicas, de resposta a uma variedade de estímulos fisiológicos ou patológicos e em que a célula participa na sua própria destruição. Normalmente, como não há perda da integridade da membrana, a apoptose não é acompanhada de reações inflamatórias drásticas (SOLÁ et al., 2001).

Os resultados dos experimentos realizados para a determinação da expressão dos marcadores de morte celular (Bcl2 e caspase-3) demonstraram um aumento significativo da morte celular por necrose em fibroblastos humanos tratados com proteínas do muco de *P. boraceiensis* a 0,18 µg/µl. Aqueles tratados com a concentração de 0,012 µg/µl apresentaram aumento significativo apenas após o período de 72 h de tratamento. As células endoteliais tratadas com as mesmas

concentrações apresentaram aumento no número de células em processo de apoptose.

O estudo das vias de angiogênese foi realizado utilizando dois marcadores celulares, o CD-34 e o VEGF-R1. O marcador CD34 é uma glicoproteína que funciona como fator de adesão celular e também atua mediando a ligação de células-tronco hematopoéticas à matriz extracelular ou às células do estroma. O marcador VEGF-R1, também uma glicoproteína, evidencia fator de crescimento vascular endotelial ou angiogênese. Além de ser potente mitógeno de células endoteliais, o VEGF aumenta a permeabilidade vascular, inibindo a apoptose das células endoteliais e promovendo a migração de precursores de células endoteliais. O VEGF não é a única molécula cuja expressão está aumentada na angiogênese patológica. O fator de crescimento de fibroblasto ("basic fibroblast growth factor", bFGF), as angiopoetinas, o fator derivado do epitélio pigmentado ("pigment epithelium-derived factor", PEDF) e os fatores de adesão relacionados à matriz extracelular também exercem papel importante no balanço entre fatores pró- e antiangiogênicos (DAMICO, 2007).

O fator de crescimento vascular endotelial estimula o crescimento de vasos sanguíneos em diversos tecidos e órgãos. O VEGF foi inicialmente chamado de fator de permeabilidade vascular, em face da sua habilidade em promover o aumento da permeabilidade e da proliferação entre as células endoteliais. Atualmente, é considerado um fator preponderante na formação de vasos, tanto no período de vasculogênese como na angiogênese, quando também são requeridos os sinais Ang1 ou Ang4 e Eph-B2, na tarefa de remodelagem e estabilização da vascularização imatura inicial. Um dos aspectos avaliados nesta tese, células endoteliais tratadas com as proteínas do muco de *P. boraceiensis* sofreram modificações significativas na expressão destes receptores para o crescimento vascular, que possivelmente seja um dos fatores envolvidos na eficácia do tratamento nas feridas cirúrgicas. O receptor VEGFR-2 parece mediar a maior parte das respostas angiogênicas - inicialização, alongamento e permeabilidade de vasos sanguíneos - do VEGF-A, enquanto o VEGFR-1 exerceria apenas uma função moduladora no processo, principalmente sequestrando o sinal ligante (VEGF) sem efetivar uma resposta positiva na vascularização (DIAS, 2002).

O CD34 é uma glicofosfoproteína expressa em células-tronco hematopoiéticas primitivas e nas precocemente comissionadas a diferenciação

celular, células progenitoras, células do endotélio da microvascularização e fibroblastos. Também está presente nas células endoteliais de pequenos vasos e em fibroblastos embrionários em diferentes proporções (KRAUSE et al., 1996). As células que apresentam em sua membrana a molécula CD34 perfazem cerca de 1 a 3% das células mononucleares da medula óssea e entre 0,01 e 0,1% das células nucleadas do sangue (DRENOU, 1996). A prova de que a molécula CD34 caracterizava a célula-tronco hematopoiética veio da evidencia de que células CD34+ purificadas podem iniciar culturas de longo prazo e também reconstituir a hematopoese em cobaias (BAECH e JOHNSON, 2000). Esta molécula está presente não só na célula-tronco hematopoiética primitiva como também nas células progenitoras formadoras de colônias (*colony-forming unit* – CFU) macrofágicas, CFU granulocítica, CFU granulocítica-macrofágica, CFU megacariótica, etc. (DRENOU, 1996). Suas funções na célula são adesão/localização das células-tronco na medula óssea e regulação na diferenciação (SIENA et al., 2000).

Estes dois marcadores celulares foram utilizados neste trabalho para estudar a quantidade de células tratadas com as proteínas do muco de *P. boraceiensis* que foram sensíveis à expressão deste marcador em células endoteliais e suas relações após o tratamento com as diferentes concentrações de proteínas do muco nos diferentes períodos de cultura. Os fibroblastos tratados com 0,012 µg/µl de proteínas do muco de *P. boraceiensis* apresentaram um sutil aumento na expressão do marcador CD34. Contrariamente, os experimentos com células endoteliais nesta mesma concentração apresentaram um aumento significativo na expressão de CD34 e VEGF-R1, demonstrando que este composto atua como indutor da angiogênese.

Os ensaios biológicos *in vivo* são utilizados para avaliar grande parte dos riscos potenciais envolvidos, seja irritação, alergia ou efeitos sistêmicos, de forma a oferecer aos consumidores o máximo de segurança com o menor risco, garantindo as melhores condições de uso do produto (CHORILLI, 2009). Justifica-se, assim, a realização de experimentos *in vivo* neste trabalho já que as perspectivas apresentadas pelos resultados demonstram sua aplicabilidade na área médica.

A papaína é uma mistura complexa de enzimas proteolíticas e peroxidases extraída do látex das folhas e dos frutos do mamão verde (*Carica papaya*) (AJLIA et al., 2010; NAYAK et al., 2012). Encontram-se relatos na literatura descrevendo sobre sua ação bactericida, bacteriostática (DALKINS et al., 2003), antioxidante e anti-inflamatória, sendo tradicionalmente usada no tratamento de feridas (GUPTA,

HUSSAIN e MUKHTAR, 2003). Suas enzimas provocam dissociação de moléculas de proteína não viáveis, liquefazendo o tecido necrótico. O seu uso apresenta resultados positivos em estudos clínicos e existe consenso quanto aos seus benefícios, além do baixo custo (FERREIRA et al., 2005, 2008; LIMA et al., 2011).

No ensaio de cicatrização deste trabalho utilizando proteínas do muco de *P. boraceiensis*, a papaína, foi utilizada como umectante natural impedindo que o tecido das cicatrizes ressecasse. Segundo MANDELBAUM, DI SANTIS e MANDELBAUM (2003a) em uma revisão sobre o processo cicatricial, afirmam que feridas abertas formam crosta e epitelizam mais lentamente e que inúmeros curativos são utilizados para produzir umidade local, melhorando de 35% a 45% a taxa de reepitelização de feridas profundas. Dentre várias estratégias para melhorar a qualidade do tecido reparado, o produto Elicina[®] de ação cicatrizante, é eficiente em manter o leito úmido, facilitar a neoangiogênese e formação de tecido de granulação (MANDELBAUM, DI SANTIS e MANDELBAUM, 2003b).

A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e reconstrução do tecido. É o resultado de um conjunto de fenômenos celulares, moleculares, fisiológicos e bioquímicos, sucessivos e inter-relacionados, resultantes da integração dos processos de quimiotaxia, neovascularização, proliferação, depósito e reorganização da matriz extracelular. Dois processos estão envolvidos; o reparo e a regeneração. A regeneração é a substituição do tecido lesado que ocorre em tecidos com grande poder mitótico, enquanto que o reparo é o processo pelo qual a lesão é substituída por uma cicatriz não funcional (ORTONNE e CLÉVY, 1994).

A restauração da pele ocorre por um meio dinâmico, contínuo, complexo e interdependente imediatamente após o surgimento da ferida. Essa fase depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação, que ocorre devido à influência nervosa, como descargas adrenérgicas, e à ação de mediadores oriundos da degranulação de mastócitos, causando vasoconstrição como primeira resposta. A injúria do endotélio dispara uma sequência de eventos, iniciando a deposição das plaquetas, formando um trombo rico em plaquetas que tampona provisoriamente a lesão endotelial. O trombo é rapidamente infiltrado por fibrina, transformando-se em um trombo fibrinoso branco que, através da adesão dos eritrócitos, forma um trombo vermelho, principal responsável pela oclusão do vaso rompido. A formação do

coágulo serve para coaptar as bordas da ferida, como também, para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida. Intimamente ligado à fase anterior, a inflamação depende, além de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias. A fase inflamatória conta com a síntese e formação de elementos da matriz extracelular, entre elas a fibronectina. Sintetizada por uma variedade de células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, ela adere simultaneamente à fibrina ao colágeno e a outros tipos de células. Importante na consolidação do coágulo de fibrina, as células e os componentes de matriz que culmina na indução de uma resposta proliferativa cicatricial (MANDELBAUN, DI SANTIS e MANDELBAUM, 2003a).

A fase de proliferação é a fase de reepitelização que tem início com a migração de queratinócitos não danificados da borda da ferida e dos anexos epiteliais. Fatores de crescimento localmente liberados são os prováveis responsáveis pela hiperplasia do epitélio. Sabe-se que o plano de movimento dos queratinócitos migrantes é determinado também pelo conteúdo de água no leito da ferida. Nesse sentido, o tratamento com as proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* poderia facilitar a hidratação do tecido lesionado e aumentar a permeação. Posteriormente a fase da proliferação ocorre a fibroplasia e formação da matriz que é extremamente importante na formação de tecido de granulação (coleção de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como a fibronectina, as glicosaminoglicanas e o colágeno). A formação do tecido de granulação depende dos fibroblastos responsáveis pelo debridamento e remodelamento fisiológico. E por último, ocorre a neovascularização, essencial para o suprimento de oxigênio e a para a demanda de nutrientes. A lesão contrai e este processo se deve ao movimento centrípeto das bordas da ferida (espessura total), a qual será renovada ou remodelada. Ocorre a síntese de colágeno e formação de uma nova matriz extracelular. O remodelamento das fibras de colágenos e a melhoria da reabsorção da água permitem a conexão entre a força da cicatriz e a sua espessura (CLARK, 1985). Deve-se salientar, que embora não foi objeto de análise neste estudo o desenvolvimento de compostos cicatrizantes a partir de produtos naturais também é influenciado por inúmeros fatores, como a idade, o estado nutricional, a existência de doenças de base, como diabetes, alterações cardiovasculares e de coagulação,

arterosclerose, disfunção renal, quadros infecciosos sistêmicos e uso de drogas sistêmicas. Dos fatores locais, interfere a técnica cirúrgica, formação de hematomas, infecção, reação de corpo estranho, uso de drogas tópicas e ressecamento durante a cicatrização (MANDELBAUM, Di SANTIS e MANDELBAUM, 2003a).

A eficácia no fechamento da ferida e a inexistência de infecção secundária contribuem para que o muco do gastrópode tenha uma aplicação terapêutica. Nesse sentido foi observado no experimento de cicatrização que camundongos tratados com proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* na concentração de 0,012 µg/µl apresentaram o melhor processo de cicatrização quando comparado ao experimento controle e aos tratados com a concentração de 0,18 µg/µl. No grupo de animais tratados com a concentração de 0,012 µg/µl, a primeira etapa da cicatrização, a coagulação, foi observada apenas até o segundo dia pós-cirúrgico. Momento no qual se observa o início da fase de proliferação sem apresentar células inflamatórias na região da ferida. Paralelamente a fase de proliferação, pode-se observar o início da fase de contração da ferida a partir do terceiro dia, culminando no fechamento da ferida no décimo quinto dia pós-cirúrgico. A partir da análise das imagens de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que o tecido cicatricial destes animais apresentou manutenção adequada da matriz extracelular, formação de pêlo, intensa deposição de fibras colágenas e discreta presença de células mortas, como também a discreta presença de células inflamatórias. Além disso, nessa análise constatou-se a organização dimensional das fibras colágenas na reparação da lesão.

Os camundongos do experimento controle apresentaram fechamento da ferida após o décimo sexto dia pós-cirúrgico, porém a fase de coagulação e inflamação durou três dias, momento que iniciou a proliferação. Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura observa-se que os animais apresentaram integridade na matriz extracelular, porém baixa deposição de colágeno e imaturidade das fibras dimensionalmente, quando comparada a do grupo de animais tratados com proteínas do muco de *P. boraceiensis* na concentração de 0,012 µg/µl.

Os camundongos tratados com proteínas do muco na concentração 0,18 µg/µl que apresentou efeito citotóxico *in vitro* e na intensidade celular, apresentaram maior período de inflamação e também a presença de coagulação (oito dias) após análise dermatoscópica. Este tecido apresentou-se frágil após a aplicação da pomada de papaína, pois a essa formulação possivelmente aumentou a permeabilidade

vascular. As imagens da ultraestrutura da derme capturadas por microscopia eletrônica de varredura evidenciaram que o tecido cicatricial dos camundongos mostrou inúmeras células mortas e abundantes células do tecido sanguíneo infiltradas, oriundos da fragilidade capilar e toxicidade do composto na formulação aplicada.

Há evidências consistentes de que mecanismos complexos regulam a relação de inflamação e coagulação. As células endoteliais respondem a citocinas expressas e liberadas por leucócitos ativados. Essas células endoteliais são ainda capazes de expressar moléculas de adesão e fatores de crescimento que promovem e amplificam a resposta inflamatória e alteram a resposta da coagulação (ANRATHER et al., 1997). Além desses efeitos indiretos, sabe-se hoje que células endoteliais interferem diretamente com a produção de fibrina e seu “clearance”. As feridas cirúrgicas estudadas neste trabalho apresentaram a formação de um coágulo nas bordas das lesões que foram significativamente diminuídas após o tratamento com a concentração 0,012 µg/µl de proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*, após 6 dias de experimentação. Este fato corrobora com os achados obtidos nos experimentos *in vitro* realizados com células endoteliais, que apresentaram modificações quantitativas na expressão do marcador CD34, e o aumento na expressão de receptores de crescimento vascular (VEGF-R1). A coagulação gera proteases que interagem com receptores celulares específicos capazes de mediar respostas inflamatórias. Desta forma, os fatores de coagulação ativados FXa, trombina e fibrina ativam células endoteliais levando a síntese de citocinas como a IL-6 e a IL-8. Além disso, a trombina aumenta os níveis de mRNA de IL-8, MCP-1, E-selectina e PAI-1 em cultura de células endoteliais.

O mecanismo mais importante para a influência da coagulação na inflamação ocorre através dos receptores ativadores de proteases (PARs). Quatro tipos desses receptores foram descritos e PAR 1, 3 e 4 são receptores de trombina ao passo que PAR-2 é um receptor ativado pelo complexo pró- trombinase (TF-FVIIa). PARs encontram-se localizados em células do endotélio vascular, mononucleares, plaquetas, fibroblastos e musculatura lisa. A ligação de trombina a esses receptores celulares gera produção de fatores de crescimento e citocinas, que promovem o aumento da resposta inflamatória levando ao estresse oxidativo, expressão de moléculas de histocompatibilidade de classe II, moléculas de adesão e moléculas de diferenciação celular (COUGHLIN, 2000).

A técnica de dermatoscopia óptica é um método eficiente para captação de imagens da derme, porém como o composto utilizado aumentou a fragilidade do tecido, impediu a tomada de dados fidedignos sobre a evolução (em tempo) do fechamento da ferida. As análises foram realizadas nos experimentos *in vivo* para demonstrar a eficácia das proteínas do muco de *P. boraceiensis* formulados com papaína para tratamento de feridas cirúrgicas.

A análise proteômica é uma metodologia aplicada ao estudo de vários aspectos funcionais das proteínas, como modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, existência de isoformas, entre outras. Seu campo de atuação é a descoberta de novas drogas, terapias e diagnósticos. A pesquisa proteômica torna possível a identificação e caracterização de marcadores biológicos, ou seja, moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico. A capacidade de identificar essas moléculas é extremamente útil no diagnóstico precoce de doenças e na evolução do tratamento (CASH, 2002).

A cromatografia de filtração em gel consiste na passagem de uma solução proteica em uma coluna preenchida com uma resina (o tipo de resina específica a resolução, a velocidade do processo e, principalmente, a faixa de peso molecular a ser separado) que apresenta poros de uma determinada faixa de tamanho. Moléculas com diâmetro menor do que o diâmetro do poro são capazes de penetrar na resina, percorrendo então um caminho mais sinuoso e maior do que as moléculas que apresentam diâmetro molecular superior ao do poro, que não seriam retidas (ALMEIDA e KURTENBACH, 2002). Já a cromatografia de troca iônica, refere-se a métodos modernos e eficientes de separação e determinação de íons com base em resinas trocadoras de íons.

A partir da análise proteômica do muco de *P. boraceiensis* foram obtidos resultados importantes na descrição deste produto natural como um potencial fármaco. O gel de eletroforese bidimensional apresentado revelou 22 “spots” proteicos que juntamente com os demais resultados produzidos pela cromatografia atestam que seu estudo é favorável ao proposto.

O fracionamento de uma amostra do muco do gastrópode utilizando cromatografia de gel filtração apresentou picos proteicos entre 18 e 27 min de retenção, formando-se um único pool. Há a possibilidade de que se trate de alguns aminoácidos ligados ou peptídeos e não uma proteína.

A dificuldade de adequar as amostras de muco de *Phyllocaulis boraceiensis* as condições necessárias à técnica, não permitiu que resultados mais expressivos fossem obtidos. Diversas tentativas foram realizadas, porém finalizando com algum problema ou na quantidade e expressão de proteína, ou na coloração eficaz dos géis. Assim, esses resultados indicam a necessidade da realização de estudos em relação ao sequenciamento, identificação e análise dos aminoácidos formadores das proteínas presentes no muco do gastrópode.

Os dados dos efeitos proliferativos das proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis*, isolados e associados em preparações farmacêuticas mostraram-se significativos em fibroblastos e células endoteliais humanas. A eficácia e a melhora na evolução dos processos cicatriciais são de suma importância para o desenvolvimento de moléculas-alvo bioativas obtidas de secreções de gastrópodes. Neste estudo os produtos contidos no muco mostrou ser um modelo eficaz para o desenvolvimento dessas moléculas com menor custo de produção e maior especificidade.

6 CONCLUSÃO

- O muco de *Phyllocaulis boraceiensis* foi solubilizado com sucesso;
- presença de inúmeros “spots” proteicos que quando comparados aos resultados da cromatografia, apresentou massas moleculares semelhantes. Possivelmente o composto em questão é constituído por alguns aminoácidos formando um peptídeo;
- as taxas de proliferação de fibroblastos humanos normais mostraram que o muco de *P. boraceiensis* apresenta capacidade de indução do crescimento celular em baixas concentrações e toxicidade em altas concentrações;
- os fibroblastos humanos normais tratados com proteínas do muco de *P. boraceiensis* apresentaram um aumento significativo na produção de colágeno;
- o muco de *Phyllocaulis boraceiensis* demonstrou ser capaz de reduzir a produção de radicais livres lipoperoxidados;
- as proteínas do muco de *P. boraceiensis* na concentração de 0,18 µg/µl induzem ao processo de necrose, enquanto nas células endoteliais induzem ao processo de apoptose;
- houve aumento significativo da angiogênese nas células endoteliais tratadas com 0,012 µg/µl de muco de *P. boraceiensis*; e
- o processo de cicatrização e o tempo de fechamento das feridas foi mais eficiente após a aplicação diária das proteínas do muco de *Phyllocaulis boraceiensis* na concentração de 0,012 µg/µl. Em altas concentrações há efeitos tóxicos no debridamento e reparo das feridas.

7 REFERÊNCIAS

*ABAD, R. **Therapeutic and cosmetic compositions for treatment of skin**. US, Nº 5538740. 1996.

ABE, R.; DONNELLY, S. C.; PENG, P.; BUCALA, R.; METZ, C. N. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. **J. Immunol.**, v. 166, n. 12, p. 7556-7562, 2001.

AJLIA, S. A.; MAJID, F. A.; SUVIK, A.; EFFENDY, M. A.; NOURI, H. S. Efficacy of papain-based wound cleanser in promoting wound regeneration. **Pak. J. Biol. Sci.**, v. 13, n. 12, p. 596-603, 2010.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 5th Ed. New York: Garland Science, 2010. 1725 p.

ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E. Como purificar proteínas? O exemplo das defensinas antifúngicas de ervilha. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 24, p. 30-35, 2002.

ALMQVIST, S.; WERTHÉN, M.; JOHANSSON, A.; TORNQVIST, T.; AGREN, M. S.; THOMSEN, P. Evaluation of a near-senescent human dermal fibroblast cell line and effect of amelogenin. **Br. J. Dermatol.**, v. 160, n. 6, p. 1167-1171, 2009.

AMADEU, T. P.; COULOMB, B.; DESMOULIERE, A.; COSTA, A. M. A. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. **Int. J. Low Extrem. Wounds**, v. 2, n. 2, p. 60-68, 2003.

ANRATHER, D.; MILLAN, M. T.; PALMETSHOFER, A.; ROBSON, S. C.; GECZY, C.; RITCHIE, A. J.; BACH, F. H.; EWENSTEIN, B. M. Thrombin activates nuclear factor-kappa β and potentiates endothelial cell activation by TNF. **J Immunol.**, v. 159, p. 5620–5628, 1997.

ARAÚJO, M. **O reino animal**. Disponível em:

<http://www.google.com/imgres?q=matriz+extracelular&start=194&hl=en&biw=1093&bih=538&tbnid=BReXSDdMcLX8M:&imgrefurl=http://www.infoescola.com/biologia/introducaooreinoanimal/&docid=g7oEO2_snWB0DM&imgurl=http://www.infoescola.com/wpcontent/uploads/2009/11/animalia.jpg&w=633&h=198&ei=DQ_uT6Krl oO88ASR2NS8DQ&zoom=1&iact=hc&vpx=39&vpy=261&dur=98&hovh=125&hovw=402&tx=244&ty=53&sig=115442750976238752505&page=15&tbnh=63&tbnw=203&ndsp=15&ved=1t:429,r:0,s:194,i:6> Acesso em 31 mai 2012)

BADIU, D. L.; BALU, A. M.; BARBES, L.; LUQUE, R.; NITA, R.; RADU, M.; TANASE, E.; ROSOIU, N. Physico-chemical characterisation of lipids from *Mytilus galloprovincialis* (L.) and *Rapana venosa* and their healing properties on skin burns. **Lipids**, v. 43, p. 829-841, 2008.

BAECH, J.; JOHNSON, H. E. Technical aspects and clinical impact of hematopoietic progenitor subset quantification. **Stem Cell**, v. 18, p. 76-86, 2000.

BALANCE, S.; PHILLIPS, P. J.; McCROHAN, C. R.; POWELL, J. J.; JUGDAOSINGH, R.; WHITE, K. N. Influence of sediment biofilm on the behaviour of

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

aluminium and its bioavailability to the snail *Lymnaea stagnalis* in neutral freshwater. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 58, p. 1708-1715, 2001.

BANKS W. J. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Ed. Manole, 1992. 629 p.

BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nutrition.**, v. 47, p. 233-261, 1996.

BERNARD, S.; PUJO-MENJOUET, L.; MACKEY, M. C. Analysis of cell kinetics using a cell division marker: Mathematical modeling of experimental data. **Biophys J.**, v. 84, p. 3414-3424, 2003.

BONNEMAIN, B. Helix and Drugs: Snails for western health care from antiquity to the present. **Evid-based Compl. Alt.**, v. 2, n. 1, p. 25-28, 2005.

BONNES, T.; GUÉRIN, T. Is malonaldehyde a valuable of peroxidation? **Biochem. Pharm.**, v. 44, n. 5, p. 985-988, 1992.

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAUN, R. P.; OLIVIERO, M.; KOLM, I.; FRENCH, L. E.; MARGHOOB, A. A.; RABINOVITZ, H. Dermatoscopy: What's new? **Clin. Dermatol.**, v. 27, p. 26-34, 2009.

BRAVERMAN, I. M. The cutaneous microcirculation. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, v. 5, p. 3-9, 2000.

BRENTANI, R. B. Cell-matrix interaction: An update. **Ciência e Cultura**, v. 44 n. 4, v. 246-252, 1992.

BRIEVA, A.; PHILIPS, N.; TEJEDOR, R.; GUERRERO, A.; PIVEL, J. P.; ALONSO-LEBRERO, J. L.; GONZALEZ, S. Molecular basis for the regenerative properties of a secretion of the mollusk *Cryptomphalus aspesa*. **Skin Pharmacol. Physiol.**, v. 21, p. 15-22, 2008.

BROOKES, P. S.; YOON, Y.; ROBOTHAM, J. L.; ANDERS, M. W.; SHEU, S. S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 287, p. C817-C833, 2004.

BROOKS, S. A.; LEATHEM, A. J. C. Prediction of lymph node involvement in breast cancer by detection of altered glycosylation in the primary tumour. **Lancet**, v. 338, p. 71-74, 1991.

BROUGHTON, G. II, JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg.**, v. 117, n. 7, p. 12S-34S, 2006. Suppl.

BUNONE, G.; VIGNERI, P.; MARIANI, L.; BUTÓ, S.; COLLINI, P.; PILOTTI, S. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. **Am. J. Pathol.**, v. 155, n. 6, p. 1967-1976, 1999.

CABRAL, L. M.; FERREIRA, L. M.; SIMÕES M. J.; MORA, O. A. Experimental model of double wounds on the rats back, in order to study the skin cicatrization process on rat treated with cellulose coat. **Acta Cir. Bras.** vol. 18, n. esp., 2003.

CAMPOS-DO-CARMO, G.; RAMOS-E-SILVA, M. Dermoscopy: basic concepts. **Int. J. Dermatol.**, v. 47, p. 712-719, 2008.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407 p. 249–257, 2000.

CARRICO, T. J.; MEHRHOF JR., A. I.; COHEN, I. K. Biology of wound healing. **Surg Clin North Am.**, v. 4, n. 4, p. 721-733, 1984.

CARVALHO H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. **Células: uma abordagem multidisciplinar.** São Paulo, Ed. Manole, 2005. 465 p.

CARVALHO, P. T. C.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H. Morphometric analysis of the percentage of collagen and number of macrophages highlighted by immunohistochemistry, in cutaneous wounds in diabetic and non-diabetic rats treated through HeNe laser. **Lasers Med. Sci.**, v. 18, n. 2, p. 26-36, 2003.

CASH, P. Proteomics: the protein revolution. **Biologist**, v. 49, p. 58-62, 2002.

CHORILLI, M.; TAMASCIA, P.; ROSSIM, C.; SALGADO, H.R.N. Ensaio biológico para avaliação de segurança de produtos cosméticos. **Rev. Ciênc Farm. Básica Apl.**, v. 30, n. 1, p. 19-30, 2009.

CHRISTIANAKIS, E. Sutureless prepuceplasty with wound healing by second intention: An alternative surgical approach in children's phimosis treatment. **BMC Urology**, v. 8, p. 6, 2008.

CLARK, R. A. F. Cutaneous tissue repair. Basic biologic considerations I. **J Am Acad Dermatol.**, v. 13, p. 701-725, 1985.

COHEN, M. P.; WU, V. Y.; COHEN, J. A. Glycated albumin stimulates fibronectin and collagen IV production by glomerular endothelial cells under normoglycemic conditions. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 239, p. 91–94, 1997.

COLEMAN, W. P., HANKE, C. W., ALT, T. H., ASKEN, S. **Cirurgia cosmética - princípios e técnicas.** Rio de Janeiro: Ed. Revinter, 2000. 459 p.

CONTRERA, A.; BERNARDI, A. C.; POZETTI, G. L.; LOPES, R. A.; CONTRERA, M. G. D. Ação da tintura-mãe de *Lichnophora ericoides*, *Aristolochia esperanzae* e *Solidago microglossa*, em feridas cutâneas de ratos. **Rev. Esc. Farm. Odont.**, v. 11, p. 157-160, 1985.

- COOK, G. **Targeting cancer pathways**. Available from: <http://www.nature.com/nrc/posters/pathways/index.html>> Acesso em 15 jun 2012
- COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFÂNIO, R. A. Marine organisms as a source of new pharmaceuticals: history and perspectives. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.
- COTTREL, J. M.; HENDERSON, I. F.; WRIGHT, D. J. Studies on the glycosaminoglycan component of trail mucus from the terrestrial slug, *Arion ater* L. **Comp. Biochem. Phys.**, v. 107 (B), p. 285-296, 1994.
- COUGHLIN, S. R. Thrombin signaling and protease-activated receptors. **Nature**, v. 407, p. 258-264, 2000.
- CROMACK, D. T.; PORRAS-REYES, B.; MUSTOE, T. A. Current concepts in wound healing: growth factor and macrophage interaction. **J. Trauma**, v. 30, n. 12, p. S129-S133, 1990.
- DAMICO, F. M. Angiogenesis and retinal diseases. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 70, n. 3, p. 547-533. 2007.
- DAVIES, M. S.; HAWKINS, S. J. Mucus from marine molluscs. **Adv. Mar. Biol.**, v. 34, p. 1-73, 1998.
- DAWKINS, G.; HEWITT, H.; WINT, Y.; OBIEFUNA, P. C.; WINT, B. Antibacterial effects of *Carica papaya* fruit on common wound organisms. **West Indian Med. J.**, v. 52, n. 4, p. 290-292, 2003.
- DENNY, M. W. Invertebrate mucous secretions: functional alternatives to vertebrate paradigms. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, v. 43, p. 337-366, 1989.
- DENNY, M. W. Locomotion: the cost of gastropod crawling. **Science**, v. 208, p. 1288-1290, 1980.
- DEYRUP-OLSEN, I. Product release by mucous granules of land slugs. 2. Species diversity in triggering of mucous granule rupture. **J. Exp. Zool.**, v. 276, n. 5, p. 330-334, 1996.
- DEYRUP-OLSEN, I.; LUCHEL, D. L.; MARTIN, A. W. Components of mucus of terrestrial slugs (Gastropoda). **Am. J. Physiol. Regul. Physiol.**, v. 243, n. 3, p. R448-R452, 1983.
- DEYRUP-OLSEN, I.; MARTIN, A. W. Processes in formation of mucus by the body wall of *Ariolimax columbianus*. **Biorheology**, v. 24, n. 6, p. 571-576, 1987.
- DEYRUP-OLSEN, I.; MARTIN, A. W. Surface of exudation in terrestrial slugs. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 72C, p. 45-51, 1982.
- DHILLON, A. S.; HAGAN, S.; RATH, O.; KOLCH, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, p. 3279-3290, 2007.

DRENOU, B. Flow cytometry for CD34 determination in hematopoietic grafts. *Hematol. Cell Ther.*, v. 38, p. 505-512, 1996.

DWEK, M. V.; ROSS, H. A.; STREETS, A. J.; BROOKS, S. A.; ADAM, E.; TITCOMB, A.; WOODSIDE, J. V.; SCHUMACHER, U.; LEATHEM, A. J. *Helix pomatia* agglutinin lectin-binding oligosaccharides of aggressive breast cancer. *Int J Cancer*, v. 95, p. 79-85, 2001.

FERRARA, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer*, v. 2, p. 795-803, 2002.

FERREIRA, A. M.; OLIVEIRA, K. A.; VIEIRA, L. C.; ROL J. L. Revisão de estudos clínicos de enfermagem: utilização de papaína para o tratamento de feridas. *Rev. Enferm. UERJ*, 13, n. 3, p. 382-389, 2005.

Ferrato.com **Colágeno**. Disponível em:

<http://www.google.com/imgres?q=col%C3%A1geno&hl=en&sa=X&biw=1093&bih=538&tbnm=isch&prmd=imvnsb&tbnid=JnDEgvRbWwNMqM:&imgrefurl=http://www.ferrato.com/wiki/index.php/Col%25C3%25A1geno&docid=v255onnBHsygWM&imgurl=http://www.ferrato.com/wiki/images/8/8c/20080630_mgb_Col%2525C3%2525A1geno_.jpg&w=321&h=284&ei=321&vpy=148&dur=2623&hovh=211&hovw=239&tx=156&ty=121&sig=115442750976238752505&page=1&tbnh=153&tbnw=173&start=0&ndsp=10&ved=1t:429,r:1,s:0,i:78> Acesso em 31 mai 2012.

FERREIRA, A. M.; WATANABE, E.; NASCIMENTO, A. P.; ANDRADE, D.; ITO, I. Y. Atividade antibacteriana *in vitro* de géis com diferentes concentrações de papaína. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, v. 10, n. 4, p. 1035-1040, 2008. Disponível em: <<http://www.fen.ufg.br/revista/v10/n4/v10n4a15.htm>>. Acesso em: jun/2012.

FIDLER, I. J.; ELLIS, L. M. Neoplastic angiogenesis - not all blood vessels are created equal. *N. Engl. J. Med.*, v. 351, n. 3, p. 215-216, 2004.

FLAVAHAN, N. A. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction: Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation*, v. 85, p. 1927-1938, 1992.

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.*, v. 200, n. 4, p. 500-503, 2003.

GEE, E.; MILKIEWICZ, M.; HAAS, T. L. p38 MAPK activity is stimulated by vascular endothelial growth factor receptor 2 activation and is essential for shear stress-induced angiogenesis. *J. Cell Physiol.*, v. 222, p. 120-126, 2010.

GHARAHDAAGHI, F.; WEINBERG, C. R.; MEAGHER, D. A.; IMAI, B. S.; MISCHKE, S. M. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*, v. 20, p. 601-605, 1999.

GILLER, G.; SINGLER, K. Oxidative stress and living cells. *Folia. Microbiol.*, v. 40, n. 2, p. 131-152, 1995.

GIVAN, A. L.; FISHER, J. L.; WAUGH, M.; ERNSTOFF, M. S.; WALLACE, P. K. A flow cytometric method to estimate the precursor frequencies of cells proliferating in response to specific antigens. **J. Immunol. Methods**, v. 230, p. 99-112, 1999.

GLINSKY, Z.; JAROSZ, J. Molluscan immune defenses. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 45, n. 2 e 3, p. 149-155, 1997.

GONZÁLEZ, M. A.; EGAÑA, M. P.; MUÑOZ, N.; CORRÊA, P. B. Caracol cream as adjuvant treatment treatment of burns and grafts scars. **Revista Chilena de Terapia Ocupacional**, v. 4, p. 5-10, 2004.

GÖRG, A.; POSTEL, W.; WESER, J.; GUNTHER, S.; STRAHLER, J. R.; HANASH, S. M.; SOMERLOT, L. Elimination of point streaking o silver-stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. **Plant Physiol.**, v. 68, p. 458-552, 1987.

GREFF, D. **Cosmetic composition containing gastropod glycoprotein, extracted from the mucus and digestive juices, with skin moisturising action.** FR, N° 2595247. 1987.

GRENON, J. F.; WALKER, G. Biomechanical and rheological properties of the pedal mucus of the limpet, *Patella vulgata* L. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 66 (B), p. 451-458, 1980.

GUPTA, K.; ZHANG, J. Angiogenesis: a curse or cure? **Postgrad. Med. J.** v. 81, n. 954, p. 236-242, 2005.

GUPTA, O. P.; SING, S.; BANI, S.; SHARMA, N.; MALHOTRA, S.; GUPTA, B. D.; BANERJEE, S. K.; HANDA, S. Antiinflammatory and anti-arthritic activities of silymarinacting through inhibition of 5-lipoxygenase. **Phytomedicine**, v. 7, v. 21-24, 2010.

GUPTA, S.; HUSSAIN, T.; MUKHTAR, H. Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallateinduced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 410, p. 177-185, 2003.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovas. Res.**, v. 47, p. 410-418, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HANAHAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the agiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, p. 353-364, 1996.

HARMAN, D. Aging: overview. **An. NY Acad. Sci.**, v. 928, p. 1-21, 2001.

HERNDON, D. N.; HAYWARD, P. G.; RUTAN, R. L.; BARROW, R. E. Growth hormones and factors in surgical patients. **Adv. Surg.**, v. 25, p. 65-97, 1992.

HILDEBRAND, K. A.; GALLANT-BEHM, C. L.; KYDD, A. S.; HART, D. A. The Basics of Soft Tissue Healing and General Factors that Influence Such Healing. **Sports Med. Arthr. Rev.**, v. 13, n. 3, p. 136-144, 2005.

HSIEH, C. C.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; LUMEN, B. O. Cell proliferation inhibitory and apoptosis-inducing properties of anacardic acid and lunasin in human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Food Chemistry**, v. 125, p. 630–636, 2011.

IJIMA, R.; KISUGI, J.; YAMAZAKI, M. Antifungal activity of aplysianin E, a cytotoxic protein of sea hare (*Aplysia kuroda*) eggs. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 19, p. 13-19, 1995.

JAFFE, E. A.; NACHMAN, R. L.; BECKER, C. G.; MINICK, C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: Identification by morphologic and immunologic criteria. **J. Clin. Invest.**, v. 52, p. 2745-2756, 1973.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 9, n. 6, p. 515-540, 1990.

JONES, N.; ILJIN, K.; DUMONT, D.; ALITALO, K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, n. 2, p. 257-267, 2001.

KAKEJI, Y.; TSUJITANI, S.; MORI, M.; MAEHARA, Y.; SUGIMACHI, K. *Helix pomatia* agglutinin binding activity is a predictor of survival time for patients with gastric carcinoma. **Cancer**, v. 68, p. 2438-2442, 1991.

KAPELETA, M. V.; JIMENEZ-MALLEBRERA, C.; CARCINER-RODRÍGUEZ, M. J.; COOK, A.; SHEPHARD, K. L. Production of mucous granules by the terrestrial slug *Arion ater* L. **J. Moll. Stud.**, v. 62, p. 251-256, 1996.

KERBEL, R. S., Tumor Angiogenesis. **N. Eng. J. Med.**, v. 358, p. 2039-2044, 2008.

KHAKOO, A. Y.; FINKEL, T. Endothelial progenitor cells. **Annu. Rev. Med.**, v. 56, p. 9-101, 2005.

KRAUSE, D. S.; FACKLER, M. J.; CIVIN, C. I.; MAY, W. S. CD34: Structure, biology and clinical utility. **Blood**, v. 87, p. 1-13, 1996.

LACASSE, E. C.; MAHONEY, D. J.; CHEUNG, H. H.; PLENCHETTE, S.; BAIRD, S., KORNELUK, R. G. IAP-targeted therapies for cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6252-6575, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 259, p. 680-685, 1970.

LEDO, E.; de las HERAS, M. E.; LEDO, A. Treatment for acute radiodermatitis with *Cryptomphalus aspersa* secretion. **Radioprotección**, p. 23, 1999.

LEE, D. Y.; CHO, K. H. The effects of epidermal keratocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three-dimensional culture systems. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 296, p. 296-302, 2005.

LEE, D. Y.; YANG, J. M. Dermal fibroblasts delay epidermal differentiation in three-dimensional culture models. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 23, p. 1346-1347, 2009.

LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes mellitus, induzido pela aloxana em ratos: estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 2, p. 132-142, 2003.

LESSENE, G.; CZABOTAR, P. E.; COLMAN, P. M. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 7, n. 12, p. 989-1000, 2008.

LI, D.; GRAHAM, L. D. Epidermal secretions of terrestrial flatworms and slugs: *Lehmanna valentiana* mucus contains matrilin-like proteins. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 148, n. 3, p. 231-244, 2007.

LIMA, A. P. G.; LIMA, C. G.; GONÇALVES, O.; OLIVEIRA, I. R. O uso terapêutico da papaína em úlceras por pressão. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão UNIPAM**, v. 1, n. 8, p. 12-31, 2011.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LORENZ, K.; SICKER, M.; SCHMELZER, E.; RUPF, T.; SALVETTER, J.; SCHULZ-SIGMUND, M.; BADER, A. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. **Exp. Dermatol.** v. 17, p. 925-932, 2008.

LORRAIN-SMITH, J. The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. **J. Physiol.**, v.24, p.19-35, 1899.

LUCHTEL, D. L.; DEYRUP-OLSEN, I.; MARTIN; A. W. Ultrastructure and lysis of mucin-containing granules in epidermal secretions of the terrestrial slug, *Ariolimax columbianus* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). **Cell Tissue Res.**, v. 266, p. 375-383, 1991.

LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **J. Immunol. Methods.**, v. 243, p. 147-154, 2000.

LYONS, A. B.; HASBOLD, J.; HODGKIN, P. D. Flow cytometric analysis of cell division history using dilution of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, a stably integrated fluorescent probe. **Methods Cell Biol.**, v. 63, p. 375-398, 2001.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part I. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003a.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part II. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 5, p. 525-542, 2003b.

MARTIN, A. W.; DEYRUP-OLSEN, I. Function of the epithelial channel cells of body wall of a terrestrial slug, *Ariolimax columbianus*. **J. Exp. Biol.**, v. 121, p. 301-314, 1986.

MARTINS, M. F.; CAETANO, F. A. M.; SÍRIO, O. J.; YIOMASA, M. M.; MIZUSAKI, C. I.; FIGUEIREDO, L. D.; PACHECO, P. Evaluation of the *Achatina fulica* snail mucoglycoproteic secretion in surgical injury in rabbits. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 40, p. 213-218, 2003.

McDONALD, J. A. Receptors for extracellular matrix components. **Am. J. Physiol. Lung Physiol.**, v. 257, p. L331-L337, 1989.

McGRATH, M. H. Peptide growth factors and wound healing. **Clin. Plast. Surg.**, v. 17, n. 3, p. 421-432, 1990.

METZ, C. N. Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 60, n. 7, p. 1342-1350, 2002.

MILKIEWICZ, M.; ISPANOVIC, E.; DOYLE, J. L.; HAAS, T. L. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 38, n. 3, p. 333-357, 2006.

MILOVANNOVA, T.; POPMA, S.; CHERIAN, S.; MOORE, J. S.; ROSSMAN, M. D. Flow cytometric test for beryllium sensitivity. **Cytometry B. Clin. Cytometry**, v. 60, p. 23-30, 2004.

MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S. L.; SALUDES, J. P. Drug development from marine natural products. **Nat. Rev.**, v. 8, p. 69-85, 2009.

MOORE, K.; RUGE, F.; HARDING, K. G. T lymphocytes and the lack of activated macrophages in wound margin biopsies from chronic leg ulcers. **Br. J. Dermatol.**, v. 137, p. 188-194, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURIÈS, L. P.; ALMEIDA, M. J.; MILET, C.; BERLAND, S.; LOPEZ, E. Bioactivity of nacre water-soluble organic matrix from the bivalve mollusk *Pinctada maxima* in three mammalian cell types: fibroblasts, bone marrow stromal cells and osteoblasts. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 132 (B), p. 217-229, 2002.

NAYAK, B. S.; RAMDEEN, R.; ADOGWA, A.; RAMSUBHAG, A.; MARSHALL, J. R. Wound-healing potential of an ethanol extract of *Carica papaya* (Caricaceae) seeds. **Int. Wound J.** 2012. *In press*.

O'FARRELL, P. H. High-resolution two dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

ORTONNE, J. P.; CLÉVY, J. P. Physiologie de la cicatrisation cutanée. **Rev. Prat.**, v. 44, n. 13, p. 1733-1744, 1994.

PAKARINEN, E. The importance of mucus as a defence against carabid beetles by the slugs *Arion fasciatus* and *Deroceras reticulatum*. **J. Moll. Stud.**, v. 60, p. 149-155, 1994.

PAWLICKI, J. M.; PEASE, L. B.; PIERCE, C. M.; STARTZ, T. P.; ZHANG, Y.; SMITH, A. M. The effect of molluscan glue proteins on gel mechanics. **J. Exp. Biol.**, v. 207, p. 1127-1135, 2004.

PEREIRA, J.; PEDROSO-MEIRELES, A. L. L.; GODOY, C. R. T.; CHAMONE, D. A. F. Papel da célula endotelial em neoplasias malignas hematológicas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 30, n. 3, p. 223-228, 2008.

POLLACK, M.; LEEUWENBURH, C. Apoptosis and aging: role of the mitochondria. **J. Gerontol. Biol. Sci.** v. 56(A), p. 475-482, 2001.

PONS, F.; KOENIG, M.; MICHELOT, R.; MAYER, M.; FROSSARD, N. L'effet bronchorelaxant de l' helicine, un extrait d' *Helix pomatia*, fait intervenir une libération de prostaglandine E₂. **Pathologie-Biologie**, v. 47, n. 1, p. 73-80, 1999.

POURGHOLAMI, M. H.; MORRIS, D. L., Inhibitors of vascular endothelial growth factor in cancer. **Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.**, v. 6, p. 343-347, 2008.

QIAO, L.; WONG, B. C. Y. Role of Notch signaling in colorectal cancer. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 12, p. 1979-1986, 2009.

QUAN, T. E.; COWPER, S.; WU, S. P.; BOCKENSTEDT, L. K.; BUCALA, R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, n. 4, p. 598-606, 2004.

RABILLOUD, T. Two dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but still climbs up the mountains. **Proteomics**, v.2, p. 3-10, 2002.

REIDENBACH, J. M.; VALA, J. C.; CHAMIZI, M. The slug-killing ciomyzidae (Diptera): potential agents in the biological control of crop pest molluscs. In: HENDERSON, **Slugs and snails in world agriculture**. Guildford: Lavenham Press, 1989. p. 273-280.

REUTTER, L. Des remèdes d'origine humaine et animale prescrits au temps des Romains en Europe. **Revue d'Histoire de la Pharmacie**, v. 4, n. 13, p. 201-204, 1916.

ROLLO, C. D.; WELLINGTON, W. G. Intra-and-inter-specific agonistic behaviour among terrestrial slugs (Pulmonata: Stylommatophora). **Can. J. Zool.**, v. 57, p. 846-855, 1979.

ROMERO, F. J.; BOSCH-MORELL, F.; ROMERO, M. J.; ROMERO, B.; MARIN, N.; ROMÁ, J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. **Environ. Health Perspect.** v.106, n. 5, p. 1229–1234, 1998.

RUNHAM, N. W.; HUNTER, P. J. **Terrestrial slugs**. Hutchinson University Library. London, 1970. 175 p.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. L.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 7ª ed. São Paulo: Ed. Roca, 2005. 1145 p.

SALVESEN, G. I.; RIED, S. J. Caspase Mechanisms. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 615, p. 13-23, 2008.

SANTOS, P. H.; THOMÉ, J. W. Estudo biométrico e avaliação da conversão alimentar das espécies de *Phyllocaulis boraceiensis* (THOMÉ) e *Phyllocaulis soleiformis* (ORBIGNY) (Veronicellidae, Gastropoda, Mollusca) **Biociências**, v. 8, n. 1, p. 85-101, 2000.

SCHANAIDER, A.; SILVA, P. C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 4, p. 441-447, 2004.

SCHUMACHER, U.; HIGGS, D.; LOIZIDOU, M.; PICKERING, R.; LEATHEM, A.; TAYLOR, I. *Helix pomatia* agglutinin binding is a useful prognostic indicator in colorectal cancer. **Cancer**, v. 74, p. 3104-3107, 1994.

SCHWEIGERER, L. Basic fibroblast growth factor as a wound healing hormone. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 9, n. 12, p. 427-428, 1988.

SHEN, G. S.; LAYER, R. T.; McCABE, R. T. Conopeptides: From deadly venoms to novel therapeutics. **Drug Discov. Today**, v. 5, n. 3, p. 98-106, 2000.

SHIRAISHI, T.; ATSUMI, S.; YATANI, R. Comparative study of prostatic carcinoma bone metastasis among Japanese in Japan and Japanese Americans and whites in Hawaii. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 324, p. 7-16, 1992.

SIENA, S.; SCHIAVO, R.; PEDRAZZOLI, P.; CARLO-STELLA, C. Therapeutic relevance of CD 34+ cell dose in I transplantation for cancer therapy. **J. Clin. Oncol.**, v. 18, p. 1360-1377, 2000.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.

sistemanervoso.com **Reparo dos tecidos**: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. Disponível em:

<http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=11&materia_id=207&materiaver=1> Acesso em 30 jun 2012.

SMITH, A. M. The biochemistry and mechanics of gastropod adhesive gels. In: SMITH, A. M.; CALLOW, J. A. (Ed). **Biological adhesives**. Berlin: Springer-Verlag, 2006, p. 167-182.

SOLÁ, S.; PEDRO, T.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, C. M. P. Apoptose: uma questão de vida ou morte. **Biológicas**, n. 2, p. 1-9, 2001.

SORREL, J. M.; BABER, M. A.; CAPLAN, A. I. Human dermal fibroblast subpopulation; differential interactions with vascular endothelial cells coculture: nonsoluble factors in the extracellular matrix influence interactions. **Wound Repair Regeneration**, v. 16, p. 300-309, 2008.

SORREL, J. M.; CAPLAN, A. I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **J. Cell. Sci.**, v.117, p. 667-675, 2004.

SOUSSI, T.; WIMAN, K. G. Shaping Genetic Alterations in Human Cancer: The p53 Mutation Paradigm. **Cancer Cell**, v. 12, p. 303-312, 2007.

SOUZA, S. L. **Análise do proteoma do fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum***. 2002, 84f. Tese (Doutorado em Agricultura). Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

STEPAN, H.; PABST, M.; ALTMANN, F.; GEYER, H.; GEYER, R.; STAUDACHER, E. O-Glycosylation of snails. **Glycoconj. J.**, v. 29, n. 4, p. 189-198, 2012.

STIX, G. Toxina contra a dor. **Scientific American Brasil**, v. 38, p. 80-85, 2005.

STRAUSS III, J. F. Extracellular Matrix Dynamics and Fetal Membrane Rupture **Reprod. Sciences**, v. 19, n. 2, p. 1-14, 2012.

THOMAS, K. A. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. **J Biol Chem.**, v. 271, p. 603-606, 1996.

THOMAS, M.; NOGUCHI, M.; FONSECA, L.; KITAGAWA, H.; KINOSHITA, K.; MIYAZAKI, I. Prognostic significance of *Helix pomatia* lectin and the c-erbB-2 oncoprotein in human breast cancer. **Br J. Cancer**, v. 68, p. 621-626, 1993.

THOMÉ, J. W. Uma nova espécie de *Phyllocaulis* do Brasil – (Veronicellidae, Gastropoda). **Iheringea: Série Zoologia**, v. 41, p. 59-68, 1972.

THOMÉ, J. W.; GOMES, S. R.; SILVA, R. S.; MARTINS, R. S.; PEDOTT, L. Adaptação reprodutiva de *Phyllocaulis boraceiensis* Thomé, 1972 (Mollusca, Gastropoda, Veronicellidae) ao ambiente de laboratório. **Biociências**, v. 6, n. 1, p. 159-167, 1998.

TOBELEM, G. Endothelial cell growth: biology and pharmacology in relation to angiogenesis. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 1, p. 703-705, 1990.

TOLEDO-PIZA, A. R.; LEBRUN, I.; FRANZOLIN, M. R.; NAKANO, E.; SANT'ANNA, O. A.; KAWANO, T. The mucus of mollusk *Phyllocaulis boraceiensis*: biochemical profile and the search of microbiological activity. **The Veliger**, 2010. *In press*.

TOMASEK, J.J.; GABBIANI, G.; HINZ B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R. A. Myofibroblast and mechano-regulation of connective tissue remodeling. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 3, n. 5, p. 349-363, 2002.

TORII, S.; YAMAMOTO, T.; TSUCHIYA, Y.; NISHIDA, E. ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. **Cancer Sci.**, v. 97, p. 697-702, 2006.

TRIEBSKORN, R.; EBERT, D. The importance of mucus production in slugs reaction to molluscicides and the impact of molluscicides on the mucus producing system. In: HENDERSON, I. **Slugs and snails in world agriculture**. Guildford: Lavenham Press, 1989. p. 373-378

TSOUTSOS, D.; KAKAGIA, D.; TAMPAROPOULOS, K. The efficacy of *Helix aspersa* Müller extract in the healing of partial thickness burns: A novel treatment for open burn management protocols. **J. Dermatol. Treat.**, v. 20, p. 219-222, 2009.

TSUJIMOTO, Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? **Genes to Cells**, v. 3, p. 697–707, 1998.

VAN WINKLE, W. The fibroblast in wound healing. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 124, p. 369-386, 1967.

VANDE BERG, J. S.; ROBSON, M. C.; MIKHAIL, R. J. Extension of the life span of pressure ulcer fibroblasts with recombinant human interleukin-1 beta. **Am. J. Pathol.**, v. 146, p. 1273-1282, 1995.

VARGAS, D. M.; AUDÍ, L.; CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 43, n. 4, p. 367-370, 1997.

VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Natural products research: Plants and free radicals. **Rev. Eletron. Farm.**, v. 4, n. 2, p. 119-130, 2007.

VIGO-PELFREY, C. **Membrane lipid oxidation**. Boca Raton: CRC, 1991. 240p.

WANG, C.; YOULE, R. J. The role of mitochondria in apoptosis. **Annu. Rev. Genet.**, v. 43, p. 95–118, 2009.

WELLS, A. D.; GUDMUNDSDOTTIR, H.; TURKA, L. A. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. **J. Clin. Invest.**, v. 100, p. 3173–3183, 1997.

YOSHIDA, Y.; OKAMURA, T.; SHIRAKUSA, T. An immunohistochemical study of *Helix pomatia* agglutinin binding on carcinomas of the oesophagus. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 177, p. 299-302, 1993.

8 APÊNDICE

Trabalho aceito para publicação na revista “Cell Proliferation”

Proliferation in fibroblasts and endothelial cells enhanced by mucus of *Phyllocaulis boraceiensis*

Ana Rita de Toledo-Piza¹, Eliana Nakano², Rose Eli Grassi Ricci³, Durvanei Augusto Maria¹

Abstract

The mucus of molluscs has been studied as a potential source of new natural compounds capable of inducing proliferation and remodelling tissue. The focus of this study is the potential use of the mucus released by *Phyllocaulis boraceiensis* as a compound to induce proliferation and enhance collagen synthesis in dermal fibroblast and human endothelial cell culture. Fibroblasts treated with *P. boraceiensis* mucus at concentrations below 0.012 µg/µl have high rates of proliferation as evaluated by the MTT assay, and the proliferative effect was dose-dependent. The production and secretion of extracellular matrix components and collagen type I fibres was enhanced after 24 h of treatment, revealing a hormesis effect, a biphasic dose response, a proliferative low dose and a toxic high dose. No significant change in proliferation was observed in the treated endothelial cells. The production of lipid polyunsaturated free radicals was low in both cell types. Treatment with *P. boraceiensis* mucus produces a pronounced change in fibroblast cell number and morphology and in the amount of well-ordered collagen deposition. These results support the premise that *Phyllocaulis boraceiensis* mucus demonstrates proliferative properties in cells involved in the healing process.

Keywords: proliferation, fibroblast, endothelial, mucus, collagen, lipoperoxidation.

1. Introduction

As a consequence of recent attempts to prospect natural sources for biotechnological use and drug discovery, it is becoming clear that many natural compounds are able to reach receptor sites on or within cells (1). Most of these natural products are found in invertebrates such as molluscs (2), the most successful example of which is *Conus magus*, a marine mollusc that releases a peptide efficient in controlling terminal phase pain in HIV-infected individuals and in cancer patients (3). This peptide, ziconotide, was approved in the United States in 2004 under the trade name Prialt® as an analgesic drug for the treatment of chronic pain in spinal cord injury (4,5). Terrestrial invertebrates have a long history as a source of bioactive compounds, as the therapeutic effect of *Helix aspersa* mucus (6). This author listed several instances of the use of snails to treat burns, abscesses, stomach pain and urine ardour of nephritis dating to 1700 and earlier, mentioning the philosophers Celse and Pliny “the Elder” and their theories that lacked scientific proof of efficacy. Thus, mankind has long considered molluscs a surprisingly robust source of compounds with biological and therapeutic properties.

In work using the pure mucus of *Achatina fulica* on injured rabbit skin a clinical and histological studies demonstrated a faster healing process and the presence of collagen fibre organisation (7). In a breeding of the snail *Helix aspersa* Müller in Chile, the animal handlers claimed that the mucus released by these animals acted to heal wounds in their hands (8). To verify this healing property, an experiment was performed to compare the cicatricial activity of two creams made of the mucus of this snail, Elicina® and Novobase®. This study involved 36 patients divided into two groups of 18 people who had burn scars and grafts on their face, neck and hands. The authors noted that 14 patients treated with Elicina® had higher partial pigmentation of the grafts, seven showed a decrease in the size of scars, and three had changes in texture of the graft. In the group treated with Novobase®, one patient had partial depigmentation of the graft, with a reduction in scarring, and no patient

demonstrated changes in the texture of the graft. Creams that contained the mucus of snails are effective for the treatment of burns. A study with 27 patients suffering from partially deep burns on the face and observed that the mean period of endothelial reconstruction was 11 ± 2 days for those treated with Elicina® and 15 ± 2 days for the control group. *Helix aspersa* mucus speeds up the apoptotic process in burned tissue and the epithelialisation of deep partial burns(9).

Wound healing is a dynamic set of tissue changes important for maintaining the integrity of the organism; it involves inflammation, chemotaxis, cell proliferation and differentiation and tissue remodelling (10,11). Wound healing is a necessary component of the repair process, providing mechanisms by which injured tissue is prepared for reconstruction. This phenomenon is usually multimediated, dynamic, transient and self-limited. However, when the inflammatory stimulus cannot be eliminated or removed, a complex response involving the whole body and leading to chronic inflammation that can often be deleterious is triggered (12).

The mucus of *Phyllocaulis boraceiensis*, a Brazilian slug, is being studied as a source of new therapeutic compounds (13). The mucus of this species is composed of a complex mixture of components (14). The mucus is released by skin gland cells located in the rear pedal region (15) and functions to prevent desiccation (16), reduce friction in locomotion (17) and protect the body against mechanical injuries and noxious substances (18). Modern societies have become more cognisant of holistic and natural treatments of disease and are embracing the development of such products (19). Although some people view these ideas as somewhat primitive or ignorant, many of the remedies are the result of thousands of years of empiric observation, which emphasises the importance of scientific studies to confirm the action of these natural products in wound healing.

To understand how normal human cells behave when treated with *Phyllocaulis boraceiensis* mucus, we studied the cell synthesis and proliferation capability of mucus-treated fibroblast and endothelial cell cultures.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Collection and preparation of mucus

The specimens of *Phyllocaulis boraceiensis* (20) originated from captive breeding at the Butantan Institute. Animals were kept in plastic boxes containing soil *in natura* in a pollution-free and temperature-controlled laboratory environment at 24°C and 85% relative humidity. The animals were fed daily with small amounts of different vegetables(21) and before the collection of mucus, the animals were transferred to a Petri plate and nebulised with distilled water to remove particles of soil and plants from their bodies, using forceps when necessary (22).

Phyllocaulis boraceiensis mucus was obtained by stimulating the pedal tissues. Animals were maintained freely moving in a glass plate with saline solution (NaCl-0.06%) for 5 minutes (13). Secretions were collected using a spatula and stored in plastic tubes at -80°C . Experiments were performed using lyophilised samples hydrated in organic solvent: 1 mg of lyophilised mucus, 100 ml of monoamine, 350 µl of ethanol and 500 µl of methanol, supplemented with distilled water to 6 ml.

2.2. Protein determination

The protein concentration was determined using Bradford's method (23) with bovine serum albumin as the standard (Bio-Rad Co - USA). Samples of the lyophilised mucus solubilised in organic solvents were analysed, the absorbance was measured in a

spectrophotometer (Pharmacia Ultrospec 2000) at λ 595 and 280 nm, and the concentrations were determined with the aid of a standard curve.

2.3. Cell culture

Dermal Fibroblast Normal (ATCC-PCS-201-010) and endothelial cell (ATCC-CRL-1730) cultures were cultivated in 75 cm² bottles of culture in RPMI-1640 medium supplemented with 10% inactivated foetal bovine serum, 2 mM of L-glutamine and antibiotics and incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were observed three times a week, and at these same times, the medium was total changed. The detached cells were centrifuged twice and rehydrated in growing medium, and the cellular concentration was adjusted to 5x10⁶ cells/ml and counted in a Mallassez chamber. The morphological aspects of the fibroblast and endothelial cells treated with *P. boraceiensis* were observed using an inverted light microscope (Olympus CKX41), and a digital camera (Sony DSC 300) was used to record digital micrographs.

2.4. Determination of cell cycle phases

Flow cytometry was applied to determine the kinetic parameters of the cell population and to provide the percentages of cells that were in the G0/G1, S, and G2/M phases as well as those undergoing apoptosis or DNA fragmentation (24). Human normal fibroblast and endothelial cells were treated with 100µl of 0.18, 0.09, 0.045 and 0.0007µg/µl *P. boraceiensis* mucus for 24, 48 and 72 h were transferred to flow cytometry tubes and stained with propidium iodide, and the cells were counted at different cell cycle phases using a FACSCalibur™ (BD - USA) flow cytometer.

2.5. Determination of the proliferative response

Dermal fibroblast normal and endothelial cells treated with 100 µl of *P. boraceiensis* mucus total protein at different concentrations (0.18 to 0.0007 µg/µl), were seeded at a density of 10⁵ cells/well in 96 well tissue culture plates (Corning Inc., NY) for 24, 48 and 72 h. Measurements of cell proliferation were obtained using the MTT method (25). MTT is now a widely accepted method that utilises the reduction of tetrazolium salts in the evaluation of both cell proliferation and cell death. The yellow tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) is reduced by metabolically active cells, partly by the action of dehydrogenase enzymes, to generate reducing equivalents of NADH and NADHP. The resulting intracellular formazan was solubilised and quantified by spectroscopic means. After fibroblast and endothelial culture medium elimination and dissolution of the crystals by dimethyl sulphoxide, a spectrophotometer (Biorad - USA) was used to measure the optical density at 570 nm, which was directly proportional to the number of live cells.

2.6. Determination of cell division rates following mucus treatment in fibroblast and endothelial cells

Proliferation determination by the CFSE (5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) labelling method was adapted from a previously described protocol (26) that allows for the direct detection of single proliferating cells and facilitates the quantification of cell division by flow cytometry according to the respective CFSE-dilution.

Samples of human normal fibroblast and endothelial cells treated with 0.18, 0.09 and 0.045 µg/µl of *P. boraceiensis* mucus total protein for 24, 48 and 72 h were analysed. Lymphocytes of Balb-c mice were used as a control group of phytohaemagglutinin-mitogen-stimulated cells. The principal of analysis of lymphocyte proliferation is as follows: CFSE is divided equally into daughter cells following cell division, and its fluorescence intensity is half that of the parental generation. Thus, in a whole cell population that is undergoing

proliferation, the fluorescence intensity declines by half in the following generation. Methods used to perform the proliferation analysis using CFSE have been described previously (27-30). CFSE flow cytometric data files were analysed using CellQuest™ acquisition/ analysis software (Becton Dickinson, San Jose, CA). Fifty thousand events were collected, and the population proliferation was analysed using ModFitLT 2.0 software (Proliferation Wizard Methods).

Lymphocyte proliferation assay: Lymph nodes normal from 2 Balb-c mice were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine (Cambrex, Belgium), 500 μ M 2-mercaptoethanol (Sigma Aldrich, Germany), 10% heat-inactivated FCS, and 1% penicillin/streptomycin (Cultilab, Brazil) at a final concentration of 10^6 cells/ml. Cell (10^5) suspensions were cultured in U-bottom 96-well plates (Nunc, Denmark) with either 10 μ g/mL phytohaemagglutinin (PHA) (Sigma Aldrich, Germany) or medium alone. A pellet of 10^6 cells was resuspended in 1 ml of CFSE labelling solution with concentrations ranging from 10 μ M to 37 nM and incubated for 10 min at 37 °C in the dark. After labelling, the lymphocytes were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for 48-96 h. The samples were transferred to flow cytometry tubes, and the cells were counted using a FACSCalibur™ (BD - USA) flow cytometer (Figs. 1, 2A and 2B).

Fig. 1. Dose-response relationship of normal mouse lymphocyte proliferation (used as a control group) measured using the CFSE labelling method

Fig. 2. Dot plot representing a flow cytometry analysis of CFSE-labelled mouse lymphocytes from lymph nodes normal as follows: (A) without treatment with 10 μ g/ml phytohaemagglutinin (PHA) and (B) with treatment with 10 μ g/ml phytohaemagglutinin (PHA) (mitogenic stimulation).

2.7. Collagen production determination

The collagen production of human normal fibroblast and endothelial cells treated with 100 µl of 0.18 µg/µl *P. boraceiensis* mucus in serial dilution for 24, 48 and 72 h was measured using the Picrosirius method (31) reported to be a specific method for collagen detection (32) that utilises staining collagen and differentiation between the distinct forms of collagen fibres (33). Samples were stained for 1 h in 0.1% Sirius Red (Sigma-Aldrich Chemical). The dye was dissolved in saturated aqueous picric acid at 100 mg/100 ml. Bouin's fluid for cell fixation was prepared by mixing 15 ml of saturated aqueous picric acid with 5 ml of 35% formaldehyde and 1 ml of glacial acetic acid. Both reagents are stable for months, but we used freshly prepared dye reagent for each experiment. The cells were stained for 1 h with mild shaking on a microplate shaker. Thereafter, the dye solution was removed by suction, and the stained cell layers were extensively washed with 0.01 N hydrochloric acid to remove all non-bound dye. The cell morphology was photo documented before dissolving the stain. When 24-well culture dishes were used, the stained material was dissolved in 0.2–0.3 ml of 0.1 N sodium hydroxide using a microplate shaker for 30 min at room temperature. The dye solution was transferred to microtitre plates, and the optical density was measured using a spectrophotometer (BenchMark, Biorad) with the wavelength adjusted at 550 nm against 0.1 N sodium hydroxide as a blank.

2.8. Lipid peroxidation determination

The lipid peroxidation of human normal fibroblast and endothelial cells treated with different concentrations of *P. boraceiensis* mucus total protein for 24, 48 and 72 h was assayed by utilising malondialdehyde as a thiobarbituric acid (TBA)-reactive substance (34). In brief, H₃PO₄ (1%) and aqueous TBA solution (0.6%) were added to the 10% homogenate. The mixture was shaken and heated on a boiling-water bath for 45 min. After cooling, *n*-butanol was added, and the mixture was shaken. After separation of the butanol layer by centrifugation at 1200 g for 15 min, its optical density was determined in a spectrophotometer (Biorad - USA), with the wavelength adjusted to 530 nm. The difference between the results of the two optical density determinations was taken as the TBA value, and the amount of malondialdehyde (MDA) produced was calculated and compared with MDA standards and expressed as µMol MDA.

2.9. Scanning electron microscopy

Human normal fibroblast and endothelial cells treated with 0.18, 0.045 and 0.0007 µg/µl of *P. boraceiensis* mucus total protein for 24 h were rinsed with PBS twice and fixed with 3% glutaraldehyde in PBS overnight at room temperature. After washing with PBS three times, the samples were fixed with 1% osmium tetroxide (pH 7.4) at 4 °C for 1 h. The samples were dehydrated, dried in a critical point dryer and gold sputtered. Scanning electron microscopic (SEM) images were taken on a LEO 435 VP SEM (Carl Zeiss - Germany).

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad, USA), and the statistical significance of differences between groups was determined using the unpaired one-way ANOVA. The means were compared by Tukey's multiple comparison tests. Regression analysis was used to examine the data obtained and infer relations between a dependent variable and an independent variable. Comparisons were considered either non significant (ns) or significant at **p* < 0.05, ** *p* < 0.005 or *** *p* < 0.0001.

3. Results

Experiments were conducted using a fixed concentration of 0.18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of *Phyllocaulis boraceiensis* mucus, determined using the Bradford method, in serial dilutions (0.18, 0.09, 0.045, 0.023, 0.012, 0.006, 0.003, 0.0015 and 0.0007 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) applied to human normal fibroblast and endothelial cell cultures that were collected 24, 48 and 72 h after treatment. The results of the MTT colorimetric assay confirmed that *Phyllocaulis boraceiensis* mucus was significantly proliferative response in normal human fibroblast and endothelial cells treated with low concentrations of mucus and that cell growth was also stimulated compared to the control after 72 h.

Using an inverted microscope (40x magnification), cytological analysis was performed of human dermal fibroblast primary cultures (Fig. 3A) and cultures treated with 0.045 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of *P. boraceiensis* mucus total protein (Fig. 3B). The mucus-treated cells were elongated, spindle-shaped, divided into bundles, rearranged with a high cell density and adhered to the culture plate. Endothelial cells were also analysed; control endothelial cells (Fig. 3C) were compared to endothelial cells treated with 0.18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of *P. boraceiensis* mucus total protein after 48 h of treatment (Fig. 3D). We observed cell death in the mucus-treated cultures.

Fig. 3. Comparison of microscopic aspects of cultures submitted to different concentrations of mucus of *P. boraceiensis*. (A) Microscopic analysis of human dermal fibroblast primary cultures. Note the elongated cells that are spindle-shaped, divided into bundles, rearranged and adhered to the culture plate. (B) Microscopic analysis of human dermal fibroblast primary cultures treated with 0.045 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of mucus of *P. boraceiensis*. Note the elongated cells that are spindle-shaped, divided into bundles, rearranged with high cell density (filled arrow) and adhered to the culture plate. (C) Microscopic analysis of human endothelial cell primary cultures. Note the elliptical cells that are distributed in bundles, rearranged and adhered to the culture plate. (D) Microscopic analysis of human endothelial cells primary cultured with 0.18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of mucus of *P. boraceiensis*. Note the evidence of cellular death. Photomicrographs using an inverted microscope.

The cell cycle phase study is shown here in graphics and illustrates the comparison of the percentages of human normal fibroblast (Fig. 4A-C) and endothelial cells (Fig. 4D-F) that

were in G0/G1, S, G2/M phases and exhibited DNA fragmentation. This experiment was conducted using the original concentration in serial dilutions, although we show only the extreme results here; in other words, only the significant concentrations (0.18, 0.09, 0.045 and 0.0007 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) of *P. boraceiensis* are presented, making it easier to view the results.

The MTT colorimetric assay revealed high rates of proliferative response in human normal fibroblasts (Fig. 5A), primarily at concentrations less than 0.012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, and were revealed to be dose-dependent. Concentrations greater than 0.012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ exhibited toxicity. Endothelial cells (Fig. 5B) did not display any significant change in proliferation after 24 h of treatment when compared to the control. After 48 h of treatment, the proliferation rates were 50% higher than those presented by the control, displaying a dose-dependent response. Cells that were subjected to 72 h of *P. boraceiensis* mucus treatment revealed toxicity.

Fig. 4. Effects of *P. boraceiensis* mucus on fibroblast (A-C) and endothelial (D-F) cell cycle phase as assayed by flow cytometry. Cells were left untreated or were treated with 0.18, 0.09, 0.045 or 0.0007 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of *P. boraceiensis* mucus for 24, 48 and 72 h. The results are expressed as the mean percentage of cells at different phases of the cell cycle: G0/G1, S and G2/M. Data are presented as the means $\pm$ SD of triplicate experiments. ns = non significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, and *** $p < 0.0001$ compared to the control.

Lymphocytes were labelled with CFSE to be used as control group and cultured during 48, 72 and 96 hours; after culture, cells were harvested and analyzed by flow cytometry. Division is characterized by sequential halving of CFSE fluorescence, generating equally spaced peaks on a logarithmic scale. The peaks indicate the division cycle number. Similar results of MTT colorimetric assay were obtained using CFSE methodology, which accurately confirmed the rate of proliferation in normal human fibroblasts and the cytotoxic effects in endothelial cells in different periods of treatment with *P. boraceiensis* mucus. Fig. 6 presents the histograms acquired using the software ModFitLT 2.0, and the comparison of significant differences are shown in Fig. 7.

Fig. 5. Viability/cellular proliferation evaluation using the MTT test in human normal fibroblasts (A) and endothelial cells (B) treated with 0.18 µg/µl of *P. boraceiensis* mucus in serial dilution.

Fig. 6. Histograms represent the flow cytometric analyses of CFSE-labelled fibroblasts (A) and endothelial cells (B) treated with 0.18, 0.09 and 0.045 µg/µl of *P. boraceiensis* mucus for 24, 48 and 72 h.

Fig. 7. Proliferation rates in fibroblasts (A) and endothelial cells (B) treated with *P. boraceiensis* mucus for 24, 48 and 72 h determined using the ModFitLT 2.0 software.

Fibroblasts are mesenchymal cells that play a critical role in embryonic morphogenesis, wound repair, and tissue remodelling by synthesising and organising connective tissue components. Human normal fibroblasts showed an increase of collagen production of over 6-fold (Fig. 8A), mainly at concentrations between 0.09 and 0.023 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, while endothelial cells did not present a significant production of collagen (Fig. 8B), retaining basal levels. Lipid peroxidation, or free radical production, as assayed by measuring malondialdehyde production, presented a significant reduction when compared to the rates produced by the control test. The results are shown in Fig. 9A for human normal fibroblasts and in Fig. 9B for endothelial cells.

Fig. 8. Collagen produced by human normal fibroblasts (A) and endothelial cells (B) treated with 0.18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of *P. boraceiensis* mucus in serial dilution

Fig. 9. Free radicals produced by human normal fibroblasts (A) and endothelial cells (B) treated with 0.18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of *P. boraceiensis* mucus in serial dilution

The surface morphologies of fibroblast (Fig. 10 A-D) and endothelial cells (Fig. 11 A-D) treated with 0.18, 0.012 and 0.0007 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of *P. boraceiensis* mucus for 24 h were investigated by scanning electron microscopy.

Fig. 10. Morphological changes of fibroblast cells observed by scanning electron microscopy (SEM). (A) General view of the cell density in the control group. (B) After fibroblast exposure to 0.18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of *P. boraceiensis* mucus for 24 h, the treatment was found to be toxic; (C) preserved extracellular matrix after exposure to 0.012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of *P. boraceiensis* mucus; (D) cells treated with 0.0007 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ showed high cell confluence.

Fig. 11. Morphological changes of endothelial cells observed by scanning electron microscopy (SEM). (A) General view of the cell density in the control group; (B) cells treated with 0.18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ showed toxicity; (C) cells treated with 0.012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ showed enhanced proliferation capability and organisation of extracellular matrix fibres; (D) preserved extracellular matrix and blood vessel formation after exposure to 0.0007 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of *P. boraceiensis* mucus.

4. Discussion

These experiments were designed to yield knowledge about the mechanisms behind the effect of the mucus of *Phyllocaulis boraceiensis* in the proliferation of fibroblasts and endothelial cells, thereby allowing for comparisons with the results of non-scientific studies of mucus from molluscs such as *Helix aspersa* and *Achatina fulica*, both exotic species in Brazil that are known to be producers of mucus capable of renovating burned tissues (8,9).

The proliferative activity of *Phyllocaulis boraceiensis* mucus in human normal cells was studied using cell cycle phase analysis to compare the results obtained between cells treated with mucus and those not treated. The transition from the G1 to S phase requires the assembly and activation of a DNA replication complex to initiate DNA synthesis. Endothelial cells undergo contact inhibition of proliferation at confluence and become quiescent. The cell cycle in eukaryotes controls the progression between and within the phases through checkpoints that coordinate the growth of the cell with the surrounding environment (35) and help ensure the accuracy of DNA replication and division (36).

The arrest of the cell cycle stages was dependent on the mucus concentration, and an increase in the S phase was observed in human fibroblast cells treated for 24-48 h that was maintained until 72 h of treatment. Endothelial cells treated with mucus induced a G2/M arrest, this phenomenon can occur by a variety of mechanisms.

The measurement of cell proliferation with CFSE offers many advantages over conventional ³H-thymidine incorporation assays. Labelling cells with CFSE is a simple procedure that eliminates the use of radioactive materials and results in an extremely bright fluorescent signal that is easily detected by table top flow cytometers. Intracellular esterase hydrolyses CFSE into a fluorescent dye that binds covalently to cytoplasmic amino acid residues such as lysine (37); therefore, only viable cells are labelled. However, labelled cells that die during the culture period remain detectable until they disintegrate. These late apoptotic cells and cell fragments can cause an overall increased and less well-defined CFSE signal that may artificially affect results. The proliferative index determined by CFSE assay show effect in fibroblast and endothelial cells proliferative response when treated with *Phyllocaulis boraceiensis* mucus was similar to those obtained with MTT colorimetric assay. Validating the results for proliferation induced by treatment with *Phyllocaulis boraceiensis* mucus. The extracellular matrix (ECM) plays an important role in determining cell and organ function: it is an organising substrate that provides tissue tensile strength; it anchors cells and influences cell morphology and function via interaction with cell surface receptors; and it is a reservoir for growth factors (38). Overproduction of collagen by normal dermal fibroblasts demonstrates the capability of *P. boraceiensis* mucus to be a satisfactory inducer of tissue regeneration. This result can be compared with a new technique of suture-less prepuceplasty using "Elicina[®]", a cream composed of the mucus of *Helix aspersa* that contains allantoin, collagen, elastin, glycolic acid and vitamins A, D, and E and presented an acceleration in the healing process (39). Additionally, as mentioned here beforecreams composed of the mucus of *H. aspersa* accelerated the process of apoptosis in burned tissue and improved the epithelialisation of deep partial burns (9). Unfortunately, no scientific citations can precise collagen quantification, due to which it is impossible to establish a comparison between *P. boraceiensis* and *H. aspersa* mucus.

Fibroblasts are the main cells involved in wound healing and whose main function to maintain the integrity of tissue, by synthesis of extracellular matrix components. They are stimulated to produce and deposit extracellular matrix components, and at skin, these events are necessary to enable and promote re-epithelialization (40). *P. boraceiensis* mucus induces fibroblasts proliferation and produces more collagen to remodel extracellular matrix over a limited time. This procedure is usually not feasible over a long period because the

proliferation of fibroblast cells is closely linked with accelerated cell death and DNA damage caused by free radicals.

Both the high rates of cellular proliferation and the large production of collagen (700 µg/µl) in fibroblast cultures treated with *P. boraceiensis* mucus suggest that this compound can act as a wound-healing agent. In sum, the increase in fibroblasts increases collagen production and extracellular matrix remodelling. Thus, drugs with these capabilities are very interesting when the focus is on speeding up tissue regeneration and improving the quality of life and recovery of burn patients or those presenting difficult-to-close wounds. Endothelial cells and fibroblasts treated with *P. boraceiensis* mucus present a significant reduction in the production of free radicals when measured using malonaldehyde rates. The unsaturated lipid molecules of cell membranes are particularly susceptible to damage by free radicals and readily contribute to the uncontrolled chain reaction.

Studies in different animals have shown that ageing is frequently associated with the accumulation of the oxidised forms of proteins (41). The excessive production of free radicals causes damage to biological material and is an essential event in the etiopathogenesis of various diseases, and it could lead to defective energy production or, possibly, increases in the free radicals in cells, resulting in apoptosis (42). The results obtained show that wound-healing treatments involving the proteins of mucus of *Phyllocaulis boraceiensis* are recommended to show significantly reduction in production of free radicals.

The rates of proliferation in human normal fibroblasts show that *Phyllocaulis boraceiensis* mucus acts as an inducer of cellular growth at low concentrations, suggesting that a high quantity of protein from *P. boraceiensis* mucus is not necessary. High proliferation in endothelial cells was observed only after 48 h of treatment. The differential response of fibroblast and endothelial cells implied a hormesis effect, defined as a term used in toxicology studies to describe a biphasic dose response with low dose stimulation (beneficial effect) and high dose inhibition (toxic effect) (43). The response of a cell or organism to the low dose of the compound is considered an adaptive compensatory process following an initial disruption in homeostasis.

In order to conclude, these results support the premise that *Phyllocaulis boraceiensis* mucus demonstrates proliferative properties and enhance collagen synthesis in cells involved in the healing. Making this compound an effective model for the development of molecules with lower production costs and greater specificity.

5. Conflicts of interest

The author(s) declare that there are no conflicts of interest.

6. Acknowledgments

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for financial support.

7. References

- 1 Beutler JA (2009) Natural products as a foundation for drug discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **9**(11), 1-21.
- 2 Badiu DL, Balu AM, Barbes L, Luque R, Nita R, Radu M, Tanase E, Rosoiu N (2008) Physico-chemical characterization of lipids from *Mytilus galloprovincialis* (L.) and *Rapana venosa* and their healing properties on skin burns. *Lipids.* **43**, 829-41.

- 3 Stix G (2005) Toxina contra a dor. *Scien. Am. Brasil.* **38**, 80-85.
- 4 Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP (2009) Drug development from marine natural products. *Nat. Rev.* **8**, 69-85.
- 5 Bingham J-P, Mitsunaga E, Bergeron ZL (2010) Drugs from slugs - Past, present and future perspectives of ω -conotoxin research, *Chem.Biol. Interact.* **183**, 1-18.
- 6 Bonnemain B (2005) Helix and drugs: snails for western health care from antiquity to the present. *Evid-based Compl.. Alt.* **2**(1), 25-28.
- 7 Martins MF, Caetano FAM, Sírío OJ, Yiomasa MM, Mizusaki CI, Figueiredo LD, Pacheco P (1982) Evaluation of the *Achatina fulica* snail mucoglycoproteic secretion in surgical injury in rabbits. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* **40**, 213-18.
- 8 González MA, Egaña MP, Muñoz N (2004) Caracol cream as adjuvant treatment of burns and grafts scars. *Rev. Chil. Terapia Ocup.* **4**, 1-4.
- 9 Tsoutsos D, Kakagia D, Tamparopoulos K (2009) The efficacy of *Helix aspersa* Müller extract in the healing of partial thickness burns: A novel treatment for open burn management protocols. *J. Dermatol. Treat.* **20**, 219-222.
- 10 Carrico TJ, Mehrhof AlJr, Cohen IK (1984) Biology of wound healing. *Surg. Clin. North Am.* **4**(4), 721-33.
- 11 Fan K, Tang J, Escandon J, Kirsner RS (2011) State of the Art in Topical Wound-Healing Products. *Plast. Reconstr. Surg.* **127**(1S), 44-59.
- 12 Contrera A, Bernardi AC, Pozetti GL, Lopes RA, Contrera MGD (1985) Ação da tintura-mãe de *Lichnophora ericoides*, *Aristolochia esperanzae* e *Solidago microglossa*, em feridas cutâneas de ratos. *Rev. Esc. Farm. Odont.* **11**, 157-160.
- 13 Toledo-Piza AR, Lebrun I, Franzolin MR, Nakano E, Sant'anna OA, Kawano T (2010) The mucus of mollusc *Phyllocaulis boraceiensis*: Biochemical profile and the search of microbiological activity. *The Veliger. In press*
- 14 Deyrup-Olsen I, Martin AW (1982) Surface of exudation in terrestrial slugs. *Comp. Biochem. Physiol.* **72**(C), 45-51.
- 15 Ruppert EE, Fox RL, Barnes RD (2005) Zoologia dos Invertebrados. 7ª edição. São Paulo: Roca Ltda, 1145 p. book
- 16 Deyrup-Olsen I, Luchtel DL, Martin AW (1983) Components of mucus of terrestrial slugs (Gastropoda). *Am. J. Physiol.* **243**(3), 448-52.
- 17 Denny MW (1989) Invertebrate mucous secretions: functional alternatives to vertebrate paradigms. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **43**, 337-66.
- 18 Triebkorn R, Ebert D (1989) The importance of mucus production in slug's reaction to molluscicides and the impact of molluscicides on the mucus producing system. In: Slugs and snails in world agriculture (I. Henderson, ed.), 373-378. *Proceedings of British Crop Protection Council*, **41**, Lavenham Press Limited, Guildford.
- 19 Davis SC, Perez R (2009) Cosmeceuticals and natural products: wound healing. *Clin. Dermatol.* **27**, 502-6.
- 20 Thomé JW (1972) Uma nova espécie de *Phyllocaulis* do Brasil – (Veronicellidae, Gastropoda). *Iheringea, série Zoologia.* **41**, 59-68.
- 21 Santos PH, Thomé JW (2000) Estudo biométrico e avaliação da conversão alimentar das espécies de *Phyllocaulis boraceiensis* (THOMÉ) e *Phyllocaulis soleiformis* (ORBIGNY) (Veronicellidae, Gastropoda, Mollusca) *Biociências.* **8**(1), 85-101.
- 22 Li D, Graham LD (2007) Epidermal secretions of terrestrial flatworms and slugs: *Lehmanna valentiana* mucus contains matrilin-like proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* **148**(3), 231-44.
- 23 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- 24 Hsieh C, Hernández-Ledesma B, De Lumen BO (2011) Cell proliferation inhibitory and apoptosis-inducing properties of anacardic acid and lunasin in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Food Chem.* **125**, 630-36.
- 25 Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.

- 26 Milovanova T, Popma S, Cherian S, Moore JS, Rossman MD (2004) Flow cytometric test for beryllium sensitivity. *Cytometry B Clin. Cytometry*. 60: 23–30.
- 27 Bernard S, Pujo-Menjouet L, Mackey MC (2003) Analysis of cell kinetics using a cell division marker: Mathematical modeling of experimental data. *Biophys. J.* **84**, 3414–3424.
- 28 Lyons AB (2000) Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J. Immunol. Methods*. **243**, 147–154.
- 29 Lyons AB, Hasbold J, Hodgkin PD (2001) Flow cytometric analysis of cell division history using dilution of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, a stably integrated fluorescent probe. *Methods Cell Biol.* **63**, 375–398.
- 30 Wells AD, Gudmundsdottir H, Turka LA (1997) Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J Clin Invest.* **100**, 3173–3183.
- 31 Costa RA, Ruiz-De-Souza V, Azevedo JR, Vaz NM, Carvalho CR (2009) Effects of strain and age on ear wound healing and regeneration in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **42**, 1143–49.
- 32 Retamoso L, Knop L, Shintcovsk R, Maciel JV, Machado MA, Tanaka O (2011) Influence of anti-inflammatory administration in collagen maturation process during orthodontic tooth movement. *Microsc. Res. Techniq.* **74**(8), 709–713.
- 33 Coleman R (2010) Picrosirius red staining revisited. *Acta Histochem.* **113**(3), 231–233.
- 34 Shibamoto T (2006) Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**(1), 12–25.
- 35 Sherr CJ (2000) The Pezcoller lecture: cancer cell-cycles revisited. *Cancer Res.* **60**, 3698–3695.
- 36 Senderowicz AM, Sausville EA (2000) Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 376–87.
- 37 De Clerck LS, Bridts CH, Mertens AM, Moens MM, Stevens WJ (1994) Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. *J. Immunol. Methods*. **172**, 115–124.
- 38 Strauss J F 3rd 2012. Extracellular matrix dynamics and fetal membrane rupture. *Reprod. Sci.* **00**, 1–14.
- 39 Christianakis E (2008) Sutureless prepuceplasty with wound healing by second intention: An alternative surgical approach in children's phimosis treatment. *BMC Urology*. **8**, 6, 1–5.
- 40 Amadeu TP, Coulomb B, Desmouliere A, Costa AMA (2003) Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. *Int J Low Extrem Wounds*. **2**(2), 60–68.
- 41 Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MTD, Mazura M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochemis Cell Biol.* **39**, 44–84.
- 42 Juranek I, Bezek S (2005) Controversy of free radical hypothesis: Reactive oxygen species - Cause or consequence of tissue injury? *Gen. Physiol. Biophys.* **24**, 263–78.
- 43 Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L, Cedergreen N, Cherian MG, Chiueh CC, Clarkson TW, Cook RR, Diamond DM, Doolittle DJ, Dorato MA, Duke SO, Feinendegen L, Gardner DE, Hart RW, Hastings KL, Hayes AW, Hoffmann GR, Ives JA, Jaworowski Z, Johnson TE, Jonas WB, Kaminski NE, Keller JG, Klaunig JE, Knudsen TB, Kozumbo WJ, Lettieri T, Liu SZ, Maisseu A, Maynard KI, Masoro EJ, McClellan RO, Mehendale HM, Mothersill C, Newlin DB, Nigg HN, Oehme FW, Phalen RF, Philbert MA, Rattan SI, Riviere JE, Rodricks J, Sapolsky RM, Scott BR, Seymour C, Sinclair DA, Smith-Sonneborn J, Snow ET, Spear L, Stevenson DE, Thomas Y, Tubiana M, Williams GM, Mattson MP (2007) Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **222**, 122–28.