



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

ANA JHOICE DE SANTANA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA LECTINA DE *Bothrops leucurus* (BIL) SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Gallus gallus domesticus***

Recife
2022

ANA JHOICE DE SANTANA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA LECTINA DE *Bothrops leucurus* (BIL) SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Gallus gallus domesticus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Morfotecnologia. Área de concentração: Morfologia: Métodos Clássicos e Avançados

Orientadora: Profa. Dra. Eliete Cavalcanti da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Mary Angela Aranda de Souza

Coorientador: Prof. Dr. André de Lima Aires

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Ferreira, Ana Jhoice de Santana

Avaliação da lectina de *Bothrops leucurus* (BIL) sobre o desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus* / Ana Jhoice de Santana Ferreira. - 2022.

51 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Eliete Cavalcanti da Silva.

Coorientadora: Profa. Dra. Mary Angela Aranda de Souza.

Coorientador: Prof. Dr. André de Lima Aires

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Recife, 2022.

Inclui referências e anexos.

1. Proteínas. 2. Lectinas. 3. Sistema nervoso central. I. Silva, Eliete Cavalcanti da (orientador). II. Souza, Mary Angela Aranda de (coorientador). III. Aires, André de Lima. IV. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022-102

ANA JHOICE DE SANTANA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA LECTINA DE *Bothrops leucurus* (BIL) SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Gallus gallus domesticus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em Morfotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 24.02.2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Eliete Cavalcanti da Silva
(Orientadora) Universidade Federal de
Pernambuco

Prof^a Dra. Fernanda das Chagas Angelo Mendes
Tenorio (Examinadora interna) Universidade Federal
de Pernambuco

Prof^a Dra. Noemia Pereira da Silva Santos
(Examinadora interna) Universidade Federal de
Pernambuco

Prof^a Dra. Marta Gersa Soares da Silva
(Examinadora externa) Universidade Federal de
Pernambuco

“Dedico à Deus, por me proporcionar forças e conquistas. À minha família e amigos pelo suporte incondicional que me deram.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser meu braço forte iluminando meu caminho em todo o momento. E que somente a Ele seja dada toda honra, glória e louvor.

Aos meus pais, por serem meus exemplos de caráter e por toda paciência, apoio, amor incondicional e orações realizadas em prol do meu futuro.

Ao meu melhor amigo Mauricio Pereira, por todo auxílio e incentivo na minha vida pessoal e acadêmica. Obrigada por todos os conselhos, bem como palavras motivacionais e puxões de orelha, sua amizade foi essencial para a minha trajetória.

À minha querida orientadora, professora Eliete Cavalcanti, pelos ensinamentos, paciência, incentivos e por sempre se fazer presente em todos os momentos de aflição e dúvidas nas pesquisas. Que Deus lhe recompense por tudo e te permita crescer cada vez mais, pois você merece. Obrigada por contribuir com minha formação profissional.

À minha coorientadora, professora Mary Aranda, pelo exemplo de competência. Agradeço imensamente a você por cada ensinamento e contribuições durante a pesquisa.

Ao meu coorientador, professor André Aires, por toda paciência e ensinamento transmitido nas suas sugestões e críticas construtivas.

À Professora Marta Gerusa, pela sua disponibilidade e contribuições na pesquisa.

Aos meus amigos do Laboratório de Embriotoxicidade (LET): Thiago Félix e Beathryz Guimarães, por me proporcionarem momentos maravilhosos dentro e fora da nossa rotina de pesquisa, pelas palavras de incentivo, carinho e brincadeiras que sempre me animaram nos momentos mais difíceis.

À Eliane Bandeira, técnica do Laboratório de Cultura de Tecidos, por todo auxílio prestado durante a rotina do laboratório de pesquisa.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia da UFPE, pela dedicação nas aulas teóricas.

À Emanuella Barros, professora que me incentivou durante a graduação, apoiando e ensinando com tanto amor e carinho! Obrigada pelos seus cuidados, sou infinitamente grata.

Aos meus amigos que torceram e intercederam por mim, Abraão Ítalo, Aline Santos, Amanda Albuquerque, Arthur Francis, César Mahone, Cleoneide Carvalho,

Elysa Canêjo, Iriston Santos, Isabela Lira e Leonardo Tibúrcio, João Victor, Juliana Georgia, Luiz Henrique, Maria Emily, Maria Isabella, Maria de Fátima, Stéphanny Silva, entre outros que me apoiaram durante esta fase.

À empresa G3 Agroavícola, por fornecer gentilmente todos os ovos fertilizados utilizados nesta pesquisa.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta, os meus profundos agradecimentos!

“...Eu vi o meu limite vir diante de mim
Eu enfrentei batalhas que eu não venci
Mas o troféu não é de quem, não fracassou
Eu tive muitas quedas, mas não fiquei no chão
E ao olhar pra trás, tudo que passou
Venho agradecer quem comigo estava
Ergo minhas mãos pra reconhecer
E hoje eu sou, quem eu sou
Pois Sua mão me acompanhava
Mas eu sei, não é o fim, é só o começo da jornada
Eu abro o meu coração, pra minha nova história!”
(Vocal livre, 2019).

RESUMO

As lectinas são proteínas que possuem alta especificidade em ligação à resíduos de carboidratos presentes em proteoglicanos, glicoproteínas e glicolipídios, desempenhando importantes funções como interação parasita-célula, comunicação célula-célula, desenvolvimento embrionário, reconhecimento e comunicação celular. Sendo encontradas na natureza, as lectinas foram utilizadas em diversas pesquisas no meio científico. A lectina *Bothrops leucurus* (BIL) utilizada nesse estudo, é uma proteína ligante de galactosídeo, sendo purificada a partir da peçonha da serpente *Bothrops leucurus*, endêmica da mata atlântica brasileira. Estudos apontam que a BIL apresenta importante atividade antibacteriana e anti-tumoral, além de possuir atividade leishmanicida sobre *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Para estudar os possíveis efeitos embriotóxicos da BIL, foi adotado o modelo experimental com embriões de *Gallus gallus domesticus*. Foram utilizados nesta pesquisa 180 ovos fertilizados de *G. gallus domesticus*, por oferecerem características que beneficiam seu uso no teste de toxicidade. Foram aplicadas as concentrações de 2,5 e 5 μ M BIL nos embriões, utilizando as técnicas de Montagem total, Corte Transversal e HET-CAM. Após os devidos períodos de cada técnica, os embriões foram analisadas através de microscopia óptica sendo observado que, independentemente das concentrações testadas na pesquisa, a BIL não acarretou irritabilidade na membrana cório-alantóide e não alterou a morfogênese do sistema nervoso central em embriões de *G. gallus domesticus*.

Palavras-chave: Embrião de galinha; Lectina; Morfologia; Sistema nervoso central; Toxicidade.

ABSTRACT

Lectins are proteins that have properties with high specificity of binding to carbohydrate residues present in proteoglycans, glycoproteins and glycolipids, performing important functions such as parasite-cell interaction, cell-cell communication, embryonic development, cellular recognition and communication. Being found in nature, lectins were used in several researches in the scientific environment. The *Bothrops leucurus* lectin (BIL) used in this study is a galactoside-binding protein, being purified from the venom of the *Bothrops leucurus* snake, endemic to the Brazilian Atlantic Forest. Studies indicate that BIL has important antibacterial and antitumor activity, in addition to having leishmanicidal activity against *L. braziliensis* and *L. amazonensis*. To study the possible embryotoxic effects of BIL, an experimental model with *Gallus gallus domesticus* embryos was adopted. 180 fertilized eggs of *G. gallus domesticus* were used in this research, as they offer characteristics that benefit their use in the toxicity test. The concentrations of 2.5 and 5 μ M BIL were applied to the embryos, using the techniques of Total Assembly, Cross Section and HET-CAM. After the appropriate periods of each technique, the embryos were analyzed by optical microscopy, and it was observed that, regardless of the concentrations tested in the research, BIL did not cause irritability in the chorio-allantoic membrane and did not alter the morphogenesis of the central nervous system in embryos of *G. gallus domesticus*.

Keywords: Chicken embryo; lectin; Morphology; Central nervous system; Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1–	Frações do ovo	22
Figura 2–	Etapas de pesagem e limpeza	27
Figura 3–	Etapas de processamento	28
Figura 4–	Esquema do processamento de coloração e desidratação	28
Figura 5–	Estádios 8-14 do desenvolvimento embrionário de <i>G. gallus domesticus</i>	30
Figura 6–	Fotomicrografia do embrião de <i>G. gallus domesticus</i> com Uma linha reta entre o diencéfalo e o seu lado oposto	31
Figura 7–	Fotomicrografia do embrião de <i>G. gallus domesticus</i> com Uma linha reta entre o mesencéfalo e o telencéfalo	31
Figura 8–	Fotomicrografia do tubo neural do embrião de <i>G. gallus domesticus</i>	31
Figura 9 –	Fotomicrografia durante aplicação da substância na membrana cório-alantóide do embrião de <i>G. gallus domesticus</i>	33
Figura 10–	Fotomicrografia de embrião <i>G. gallus domesticus</i> do grupo G1 com PBS	36
Figura 11–	Fotomicrografia de embrião <i>G. gallus domesticus</i> do grupo G2 com 2,5 µM/ml de BIL	36
Figura 12–	Fotomicrografia de embrião <i>G. gallus domesticus</i> do grupo G3 com 5,0 µM/ml de BIL	37
Figura 13–	Fotomicrografias de embriões de <i>G. gallus domesticus</i> , processados pela técnica de corte transversal, incubados por 48 horas	39
Figura 14–	Membrana cório-alantóide observada após 5 minutos de administração de substâncias	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Taxonomia da espécie <i>G. gallus domesticus</i>	22
Tabela 2–	Características presentes nos embriões de galinha de acordo com os estádios	29
Tabela 3–	Estádios embrionários de <i>G. gallus domesticus</i> com 48 horas de incubação	34
Tabela 4–	Porcentagem dos embriões por grupos em seus respectivos tratamentos	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Comparação da médias dos grupos experimentais, Referentes à Região cefálica I.	40
Gráfico 2-	Comparação das médias dos grupos experimentais, referentes à Região cefálica II.	40
Gráfico 3-	Comparação dos grupos experimentais, referentes às medidas selecionadas do tubo neural 10°;13°;15°;17°;20°.	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 LECTINAS	17
3.2 CLASSIFICAÇÃO DAS LECTINAS	17
3.3 LECTINA TIPO C	19
3.4 LECTINA DE <i>Bothrops leucurus</i>	19
3.5 USO DE EMBRIÕES DE AVES EM EXPERIMENTOS	20
3.6 EMBRIÕES DE <i>Gallus gallus domesticus</i>	21
3.7 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE <i>Gallus gallus domesticus</i>	22
3.8 MECANISMO TERATOGENICO	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 COMITÊ DE ÉTICA	26
4.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA LECTINA DA PEÇONHA DE <i>Bothrops leucurus</i>	26
4.3 HIGIENIZAÇÃO E DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	26
4.5 PROCESSAMENTO DOS EMBRIÕES	27
4.6 TÉCNICA DE MONTAGEM TOTAL	28
4.7 DETERMINAÇÃO DO ESTÁGIO EMBRIONÁRIO	28
Tabela 2- Características presentes nos embriões de galinha de acordo com os estádios.	28
4.8 ANÁLISE ANATOMO-MORFOLÓGICA	30
4.9 CORTE TRANSVERSAL	31
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4.11 ANÁLISE DA MEMBRANA CÓRIO-ALANTÓIDE (HET-CAM)	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 ESTADIAMENTO DOS EMBRIÕES DE <i>G. gallus domesticus</i>	34
5.2 ANÁLISE DOS ASPECTOS ANATOMO-MORFOLÓGICOS DOS EMBRIÕES DE <i>G. gallus domesticus</i> SOBRE O EFEITO DA BIL	35
5.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS ESTRUTURAS DO SISTEMA NERVOSO DO EMBRIÃO DE <i>G. gallus domesticus</i> TRATADOS COM BIL	39
5.4 ANÁLISE DO EFEITO DA BIL NA MEMBRANA CÓRIO-ALANTÓIDE (HET-CAM)	42
6 CONCLUSÃO	Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS	45
ANEXO 01- Carta de Aprovação do Comitê de Ética para Pesquisa	51

1 INTRODUÇÃO

As lectinas são um grupo de proteínas bioativas que podem ser encontradas e extraídas de diversos organismos como plantas, fungos, bactérias e animais (WELCH et al., 2020). Essas glicoproteínas possuem diversas funções, sendo capazes de modular a morte celular programada, demonstrar atividade contra bactérias Gram-positivas, proteção contra patógenos, transporte e armazenamento de carboidratos, tais funções estão relacionadas a capacidade de reconhecimento e ligação a carboidratos presentes nas membranas das células (NUNES et al., 2011; EL- AASSAR et al., 2014; DE OLIVEIRA FIGUEIROA et al., 2017; VIANA, 2021).

A ação biológica das lectinas pode ser influenciada por sua afinidade de ligação a uma porção particular de carboidrato na superfície celular (EL- AASSAR et al., 2014; MANNING et al., 2017). Reconhecendo com alta especificidade resíduos de carboidratos presentes em proteoglicanos, glicoproteínas e glicolipídios, os quais desempenham importantes funções tais como: interação parasita-célula, fertilização, desenvolvimento embrionário, reconhecimento e comunicação celular (SITOHY et al., 2007; BELLANDE et al., 2017; CHEN et al., 2019; WANG et al., 2019).

As lectinas se diferenciam em relação às sequências de aminoácidos, requerimentos de metais, peso molecular e estrutura tridimensional, apresentando então uma grande diversidade estrutural (SOUZA, 2012; TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Nas lectinas de animais, foram identificadas diversas sequências de aminoácidos com domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD), acarretando na categorização destas lectinas em famílias e superfamílias relacionadas estruturalmente. Na classificação das lectinas de animais, um subgrupo são as lectinas do tipo C (CTLs) do inglês “C-type lectins” sendo considerada a mais abundantes de todas as lectinas de animais (NUNES et al., 2011; NUNES et al., 2012; EBLE, 2019).

Foi extraída a lectina *Bothrops leucurus* (BIL) do tipo c, a partir da peçonha da jararaca *Bothrops leucurus*. Esta jararaca faz parte de um catálogo de 24 serpentes que integram o gênero *Bothrops*, notando-se que a maioria de acidentes ofídicos ocorridos no país é devido às espécies do gênero *Bothrops* (COSTA; BÉRNILS, 2014; PAULA, 2017). A BIL apresenta importante atividade contra bactérias gram-positivas e citotoxicidade contra diversas linhagens tumorais humanas (K562, NCI-

292 e Hep-2) (NUNES et al., 2012; DE OLIVEIRA FIGUEIROA et al., 2017; ZHANG et al., 2018).

Apesar do potencial da BIL como agente microbicida, anti-tumoral e seu efeito leishmanicida, a sua atividade embriotóxica permanece em um campo a ser explorado (ARANDA-SOUZA et al., 2018; ARANDA-SOUZA et al., 2019). Para estudar os possíveis efeitos teratogênicos da BIL, foi adotado o modelo experimental com embriões de *Gallus gallus domesticus*.

A utilização dos embriões de aves são considerados uma ferramenta valiosa para estudar os efeitos de substâncias químicas ou como agentes de controle alternativo sobre o desenvolvimento embrionário, visto que, os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário das aves e nos humanos se assemelham (POPP; DEBIASI; D'AGOSTINI, 2016; SILVA et al., 2021). Os embriões de *G. gallus domesticus* possuem uma sensibilidade a exposição de agentes químicos, principalmente no início do desenvolvimento, além disto, possuem outras vantagens como, fácil acesso e um rápido desenvolvimento se tornando uma metodologia viável em diversos campos de pesquisa (POPP et al., 2016; KOHL et al., 2019).

Desta forma, o presente estudo objetiva avaliar a atividade da lectina BIL sobre os embriões de *G. gallus domesticus*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade da lectina BIL sobre a morfogênese do sistema nervoso central do embrião de *G. gallus domesticus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer o estadiamento dos embriões de *G. gallus domesticus*;
- Analisar os aspectos anátomo-morfológicas do embrião de *G. gallus domesticus* sobre o efeito da BIL;
- Realizar análise morfométrica das estruturas do sistema nervoso do embrião de *G. gallus domesticus* tratados com BIL.
- Analisar efeito da BIL na membrana cório-alantóide (HET-CAM).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 LECTINAS

A palavra Lectina, derivada do latim “Legere”, significa selecionar, define uma classe de proteínas que se ligam a carboidratos específicos (WELCH et al., 2020; ALVES, 2021). Possui propriedade de precipitar polissacarídeos ou glicoproteínas devido à sua característica polivalente, no qual apresenta no mínimo um sítio de ligação a carboidratos, denominado domínio de reconhecimento de carboidratos, gerando interação entre as células (KOMATH et al., 2006; GANATRA et al., 2021).

São encontradas em diversos organismos, e possuem funções importantes em diversos processos fisiológicos, tais como: adesão e sinalização celular, dobramento das glicoproteínas, tráfego de proteínas, além de permitir a ligação de vírus e bactérias aos seus alvos celulares. Devido a sua capacidade de se ligar a carboidratos específicos, a lectina tem sido uma ferramenta útil no estudo de glicoconjugados da superfície celular, tornando-se assim bastante exploradas no cenário de células cancerígenas como agentes terapêuticos através da indução da apoptose das células do tecido tumoral, além de ser útil na avaliação e entendimento de diversos sistemas biológicos (NUNES et al., 2012; GANATRA et al., 2021).

É interessante ressaltar que existem diversos tipos de lectinas, os quais se diferenciam através da sequência de aminoácidos presentes na sua estrutura, peso molecular e estrutura tridimensional. Ademais, a especificidade da lectina é determinada através da conformação dos sítios de ligação, com isso, a modificação desse sítios presentes na estrutura dessa proteína, ocasiona diferentes graus de especificidade da lectina, sem alterar a sua estrutura tridimensional (PAULA, 2017; ALVES, 2021).

3.2 CLASSIFICAÇÃO DAS LECTINAS

As lectinas podem ser classificadas quanto a sua estrutura tridimensional, especificidade, similaridade dos aminoácidos e quanto ao nível de glicosilação (BARBOSA, 2014). Inicialmente as lectinas foram classificadas pela especificidade por monossacarídeos da seguinte maneira: **Grupo I-** lectinas com afinidade por L-

Frutuse; **Grupo II** - lectinas com afinidade por galactose/N-Acetilgalactosamina; **Grupo III** - lectinas com afinidade por Glicose e Xilose; **Grupo IV** - lectina com afinidade em N-Acetilgalactosamina e **Grupo V**- lectinas com afinidade por ácido siálico (MAKELA, 1957; MONTEIRO, 2004).

No entanto, Peumans & Van Damme (1998) classificaram as lectinas de acordo com a estrutural geral e suas especificidades por carboidratos, separando em quatro grupos: **Merolectinas** - lectinas com apenas um sítio de ligação a carboidratos e não apresentam atividade hemaglutinante. Como a haveína, isolada do látex da seringueira (VAN PARIJS et al., 1997); **Hololectinas** - as lectinas deste grupo apresentam ao menos dois domínios de reconhecimento a carboidratos, estas lectinas são chamadas de “hemaglutinas” por serem capazes de aglutinar células; **Quimerolectinas** - lectinas com um ou mais domínio(s) de ligação a carboidratos, além de domínio com atividade biológica como, por exemplo, atividade enzimática, independentemente da ligação a carboidratos, como por exemplo a ricina, obtida de *Ricinus communis* L. (VAN DAMME et al. 1998) e **Super-lectinas** -. estas lectinas apresentam dois ou mais domínios de reconhecimento de carboidratos, como as hololectinas, porém com estruturas diferenciadas, como a lectina TGL da *Tulipa gesneriana* L. (VAN DAMME et al. 1998).

Entretanto, vale destacar que a classificação lectina-carboidrato, que se propõe a identificar e agrupar lectinas quanto aos mecanismos de reconhecimento lectina-carboidrato, ocorrendo da seguinte maneira (ELGAVISH & SHAANAN, 1997; TSANEVA): **Grupo 1**: os sítios ligantes glicídios das lectinas encontram-se topologicamente mais internos e apresentam características próprias. Tratam-se de lectinas de transporte, tendo mesma função que proteínas transmembranas; **Grupo 2**: os sítios ligantes das lectinas são localizados mais externamente e topologicamente mais rasos, formando uma depressão superficial que tem função de acomodar o carboidrato ligante. É o grupo onde encontram-se as lectinas mais conhecidas, divididas de acordo com sua procedência ou especificidade glicídica (ELGAVISH & SHAANAN, 1997; TSANEVA; VAN DAMME, 2020).

Sendo de extrema importância essa classificação uma vez que a topologia do sítio ligante glicídico define a atividade da lectina, visto que a acessibilidade do ligante ao sítio de reconhecimento vai determinar os mecanismos de reconhecimentos distintos. Na classificação de lectinas do grupo II em famílias, podem ser visualizadas lectinas de plantas como em legumes e cereais de

especificidade diversa e em NacGlc respectivamente. E nas lectinas de animais encontramos lectinas do tipo-S com especificidade em Galactose e lectinas do tipo-C com especificidade diversa (ALVES, 2021).

3.3 LECTINA TIPO C

A lectina tipo C é um subgrupo das lectinas de animais, a que possui maior diversidade entre as famílias de lectinas encontradas em animais. Apresentam uma forma estrutural com a presença de um domínio de ligação a carboidratos (CRD) e possui um padrão de dobramento específico: domínio da lectina tipo C (CTLD). Além disso, está diretamente relacionada com ligação aos íons de Ca^{++} o que torna a propriedade de ligação a açúcares dependente desses íons, esse tipo de lectina é frequentemente encontrada no veneno de serpentes e são exclusivamente homodímeros ou homooligômeros (ZELENSKY; GREASY, 2005; PAULA, 2017; EBLE, 2019).

Vale ressaltar que a lectina tipo-C possui como carboidratos ligantes a manose, galactose, fucose, N-acetilglucosamina e N-acetilgalactosamina. Além disso, os receptores que contêm o domínio de carboidratos do tipo-C são frequentemente encontrados no sistema imunológico, no qual exerce as seguintes funções: adesão celular, reconhecimento do patógeno, na imunidade inata e adquirida e eliminação de glicoproteínas (ZARBOCK et al, 2011; LUHN; WILD, 2012; PAULA, 2017; ZHANG et al., 2018).

3.4 LECTINA DE *Bothrops leucurus*

Bothrops leucurus conhecida por Jararaca-de-rabo-branco é endêmica no nordeste Brasileiro, na peçonha da *B. leucurus* foi encontrada uma lectina do tipo-C (BIL), que foi isolada através de processos de cromatografias. No Brasil as serpentes foram descritas no grupo Caenophidia, dividido em quatro famílias: *Viperidae*, *Elapidae*, *Colubridae* e *Dipsadidae*. A família *Viperidae* é dividida em duas subfamílias (*Viperinae* e *Crotalinae*) sendo os gêneros *Bothrops* (jararacas), *Bothrocophias*, *Lachesis* (surucucus) e *Crotalus* (cascavéis), pertencentes à subfamília *Crotalinae* (COSTA; BÉRNILS, 2014; PAULA, 2017).

A lectina de *Bothrops leucurus* (BIL) apresentou atividades antibacteriana

contra bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*) e atividades citotóxicas contra diversas linhagens de células tumorais (K562, NCI-292 e Hep-2) (TARAPHDAR; ROY; BHATTACHARYA, 2001; NUNES et al. 2012). A morte celular induzida por BIL tem sido atribuída a aumentos prévios nas concentrações de cálcio intracelular e de espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondrial em células neoplásicas (Nunes et al., 2012).

A BIL também demonstrou ser capaz de inibir o crescimento e a viabilidade de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*, diminuindo a sobrevivência dos parasitas intracelulares para ambas as espécies, sem danos aparente às células hospedeiras, tal fato ocorre pela quebra da homeostase do Ca^{2+} que leva a morte celular por apoptose ou necrose. A regulação das concentrações intracelulares de Ca^{2+} nos tripanosomatídeos é de extrema importância, pois estes parasitas possuem uma única mitocôndria, que ocupa 12% do volume total do parasita e que é capaz de acumular grandes quantidades de Ca^{2+} (ARANDA-SOUZA et al., 2018).

3.5 USO DE EMBRIÕES DE AVES EM EXPERIMENTOS

Os embriões de aves possuem estágios similares a de outros embriões, observa-se que as etapas de gastrulação e neurulação, proporcionam a sua utilização em diversas pesquisas, pois estruturas como a presença de notocorda, coração ventral, sistema nervoso dorsal e cauda pós-anal, permitem estudos comparativos entre espécies divergentes devido a tais semelhanças nas etapas de desenvolvimento (LIMA, 2017; GILBERT; BARRESI, 2019; SILVA et al., 2021).

Os embriões de humanos e aves podem ser comparados até o surgimento das estruturas embrionárias características do segundo mês gestacional intrauterino, o começo da clivagem na ave ocorre cerca de 3 horas após a fecundação, em contrapartida nos humanos acontece em 24 horas após a fertilização. Em cerca de 72 horas os ovos fertilizados de aves estão desenvolvendo estruturas como cérebro, olhos, somitos e os componentes do sistema vascular, que se assemelha a terceira e quarta semana de gestação humana. O quarto dia de incubação dos ovos de aves corresponde ao segundo mês do desenvolvimento humano e posteriormente cada espécie começa a desenvolver suas particularidades (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016; SILVA et al., 2021).

Conhecida popularmente por galo e galinha, a utilização da espécie *Gallus gallus domesticus* nas pesquisas envolvem principalmente a sua fase embrionária, como em testes de xenobióticos devido a sua alta sensibilidade, para avaliação dos possíveis efeitos teratogênico (SILVA et al., 2021). Utilizar esses embriões em modelos experimentais trazem diversas vantagens como: baixo custo; curto período de desenvolvimento; o embrião se desenvolve fora do organismo materno, possibilitando um acompanhamento diário; facilidade para adquirir e manusear os ovos tornam essa metodologia uma escolha viável e prática para os pesquisadores (WOLPERT et al., 2000; RIVERO et al., 2006; YAMAMOTO et al., 2012; ZHENG et al., 2016; GOOD FELLOW et al., 2016; HUTCHINS; BRONNER, 2019; GILBERT; BARRESI, 2019).

3.6 EMBRIÕES DE *Gallus gallus domesticus*

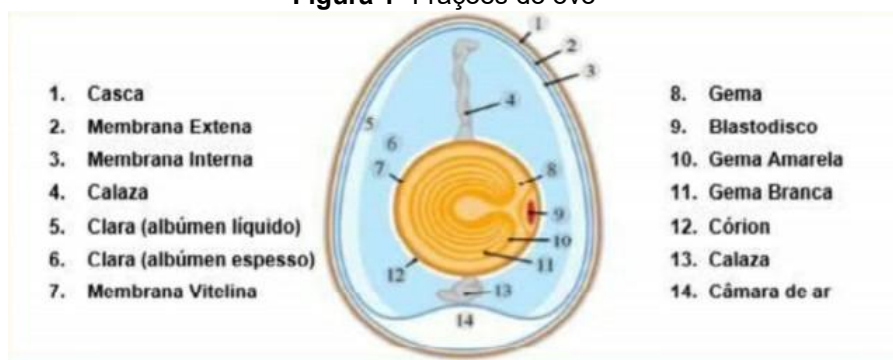
A taxonomia segundo Berguer (1971) dessa espécie está descrita abaixo na Tabela 1. Os ovos dessa espécie da raça Cobb possuem um peso médio de 60 gramas (Figura 1) e são formados por diversos constituintes como membranas internas e externas, calaza, blastodisco, câmara de ar e principalmente pela casca, clara e a gema (MARQUES, 2017; GILBERT; BARRESI, 2019; YIN et al., 2020).

Os três principais componentes: Casca (10%), é a parte do ovo que possui o papel de proteção, gerando resistência contra impactos, microrganismos e possíveis predadores (NYS; GUYOT, 2011; VARELIS; MELTON; SHAHIDI, 2019); Albúmen (60%), é constituída por água e proteínas, e seu pH > 8 gera uma capacidade inibitória do desenvolvimento de microrganismos (FERNANDES, 2014; MARQUES 2017); Gema (30%), é formada por água, lipídios, proteínas e sais minerais, sendo a responsável pela nutrição do embrião (MIRANDA, 2015; MARQUES, 2017; VARELIS; MELTON; SHAHIDI, 2019).

Tabela 1-Taxonomia da espécie *Gallus gallus domesticus*

Classe	Aves
Subclasse	Neornithae
Superordem	Neognathae
Ordem	Galliforme
Família	Phasianidae
Gênero	Gallus
Espécie	Gallus domesticus

Fonte: Adaptado de Berguer (1971).

Figura 1- Frações do ovo

Fonte: MARQUES (2017).

3.7 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Gallus gallus domesticus*

O início da formação das estruturas embrionárias precede a postura do ovo, todavia a continuidade do seu desenvolvimento acontecerá em condições favoráveis que estão diretamente relacionadas ao ambiente natural e/ou experimental como a manutenção de umidade, oxigenação e temperatura (WOLPERT; TICKLE; ARIAS, 2019; SILVA et al., 2021).

O ovo após ser fertilizado começa o processo de divisão celular, nomeada por clivagem, no oviduto da galinha, sendo o blastodisco visível a olho nu. Após a postura do ovo, o embrião se torna um disco bilaminar formado pelo epiblasto e o hipoblasto que futuramente dará origem ao assoalho da cavidade amniótica e o teto da cavidade exocelômica respectivamente e após irão originar o embrião e as estruturas extra-embrionárias, tendo assim origem a fase de gastrulação do embrião (GILBERT, 2001; YAMAMOTO, 2009; RALD et al., 2018; GILBERT; BARRESI, 2019).

A fase de gastrulação inicia-se com a formação da linha primitiva, ocorrendo uma migração das células para a região mais interior do disco. Já na porção anterior

da linha, é possível visualizar a formação do nó de Hansen, onde irá ocorrer invaginação das células e formar a fosseta primitiva. As células mesenquimais do epiblasto começam a migrar pela fosseta em direção cefálica do embrião onde ocorrerá processo notocordal e trazendo origem à notocorda. No fim da gastrulação, existem a formação dos três folhetos germinativos: ectoderme (formação da epiderme, seus anexos e o sistema nervoso), mesoderme (formação dos sistema musculo-esquelético, tecidos conjuntivos e órgãos internos como os rins e coração) e endoderme (formação do epitélio respiratório, da bexiga, do trato digestivo e seus derivados), (WOLPERT, 2000; GARCIA; FERNANDEZ, 2012).

Nos embriões da espécie de *G. gallus domesticus*, o processo de neurulação tem início com 16 a 18 horas de incubação e em cerca de 24 horas começa a formação da placa neural, que é induzida pela notocorda que irá se invaginar formando o sulco neural e associada à junção das dobras laterais neurais, formará o tubo neural (GOODRUM & JACOBSON, 1981; MOORE & PERSAUD, 2013; YAMAMOTO, 2009). De maneira simultânea aos eventos da neurulação, com cerca de 20 horas em incubação, à região do mesoderma paraxial sofre um processo diferenciação que origina os somitos, que são estruturas proeminentes e visíveis, e a sua contagem é utilizada para determinar a idade do embrião (YAMAMOTO, 2009; MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016; GILBERT; BARRESI, 2019; PRASAD et al., 2020).

Com aproximadamente 27 horas de incubação, à região que antecede o tubo neural vai se apresentar mais alargada com relação à região caudal pois, o dobramento e o fechamento do tubo neural não ocorrem de maneira simultânea ao longo de todo eixo corporal do embrião (GILBERT; BARRESI, 2019). As extremidades do tubo neural, vão corresponder aos neuroporos o anterior que é fechado com aproximadamente 33 horas de incubação, e o posterior após 43 horas (GARCIA; FERNANDEZ, 2012).

Logo após o fechamento do tubo neural, é notável um agrupamento de células migrando da sua porção dorsal e originando uma massa achatada e irregular, que será denominada por crista neural (WOLPERT; TICKLE; ARIAS, 2019). Essas células da crista neural, possuem uma alta capacidade de proliferação, migrando para diversos locais do embrião originando células como: os neurônios periféricos, as células da glia e também componentes dos tecidos esqueléticos (GILBERT;

BARRESI, 2019; PRASAD et al., 2020; SILVA et al., 2021).

Quando o embrião apresenta entre 12 e 36 pares de somitos serão formados os anexos embrionários, essas estruturas são importantes para funções consideradas vitais, como a digestão e respiração (GARCIA; FERNANDEZ, 2012; SILVA et al., 2017). Ao apresentar cerca de 37 ou 40 pares de somitos que ficam localizados ao longo da sua região dorsal. Os membros anteriores apresentarão o tamanho menor que os seus membros posteriores, a região da área cefálica em maior evidência, em relação à região caudal e a vesícula óptica demonstra uma pigmentação tênue (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; LI et al., 2019).

No tempo que resta durante seu processo de incubação, o embrião aumenta o seu tamanho e os seus órgãos internos se desenvolvem. Ocorrerá a formação de estruturas específicas dessa espécie como o bico e as asas. Com cerca de 21 dias o ovo eclode e o pinto nasce (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; WOLPERT; TICKLE; ARIAS, 2019; SILVA et al., 2021).

3.8 MECANISMO TERATOGENICO

Teratógeno trata-se de algo que provoca uma deformação ou uma anomalia no feto, ou seja, a teratogênese está associada à ação de um agente sobre um embrião, sendo necessário identificar e compreender os seus mecanismos, aqueles que podem acarretar alguma anomalia no desenvolvimento fetal (SCHÜLER-FACCINI et al., 2002). Esses possíveis teratógenos podem ser analisados através de modelos embrionários de aves da espécie *G. gallus domesticus*, por causa das suas similaridades morfológicas com os embriões de mamíferos (HICKMAN et al., 2016; KMECICK et al., 2019; SILVA et al., 2021).

A ação do agente teratogênico depende de vários fatores, entre os quais, o estágio de desenvolvimento, podendo acarretar em malformações ou no aborto espontâneo do embrião por ser incompatível com a vida. As anomalias podem ser divididas em fatores genéticos (que são anormalidades de nível cromossômico), nos fatores ambientais (que são adquiridos no uso de drogas, por vírus) e da herança multifatorial onde os fatores genéticos e ambientais colaboram para a formação da anomalia (MOORE, 2013).

Nos embriões de *G. gallus domesticus* a morfogênese do sistema nervoso central (SNC) ocorre entre 16-18 horas de incubação (GOODRUM & JACOBSON,

1981). A partir de 33 a 38 horas de incubação é possível visualizar as três vesículas cerebrais primárias, prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, que se encontram evidentes a partir das 38 horas. Essas vesículas se dividem e formam cinco vesículas, o prosencéfalo se divide gerando telencéfalo e diencéfalo, não há divisão da vesícula mesencéfalo, e o rombencéfalo subdivide-se em metencéfalo e mielencéfalo (HAMBURGER & HAMILTON,1951; WOLPERT; TICKLE; ARIAS, 2019).

Os agentes considerados tóxicos podem afetar diretamente o SNC, por serem formados com muitos receptores considerados sensíveis à ação de substâncias químicas, que podem gerar efeitos neurotóxicos nesses embriões. Os danos estruturais no desenvolvimento em diversas regiões do embrião podem ser associados a toxicidade neonatal devido permeabilidade vascular, com o objetivo de garantir a segurança e eficácia das substâncias, existe a necessidade de serem avaliados quanto aos seus aspectos toxicológicos. Os testes de embriotoxicidade servem para observar a associação da substância com a teratogênese (COLE & LEE,1997; KOHL et al., 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COMITÊ DE ÉTICA

Todo processo experimental para realização da análise com embriões de *G. gallus domesticus*, foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob o Protocolo n° 23076.010939/2018-31 (Anexo 1).

4.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA LECTINA DA PEÇONHA DE *Bothrops leucurus*

A lectina BIL foi isolada a partir da peçonha de *Bothrops leucurus*, gentilmente cedida pelo Laboratório de Animais Peçonhentos (UFPE). Um breve relato do isolamento e purificação. O veneno bruto liofilizado de *Bothrops leucurus* (60 mg) foi dissolvido em tampão CTBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM e CaCl₂ 5 mM, pH 7,5), centrifugado para remoção do material insolúvel, a lectina foi isolada e purificada como estabelecido por Nunes et al. (2011), posteriormente a concentração da proteína foi determinada de acordo com Bradford (1976).

4.3 HIGIENIZAÇÃO E DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram executados no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT), no Departamento de Histologia e Embriologia (DHE), localizado no Centro de Biociências da UFPE. Antes dos experimentos serem realizados, os ovos foram pesados (Figura 2A) e em seguida foi realizado o processo de higienização (Figura 2B). Utilizando algodão umedecido com álcool a 70% para impedir a proliferação de microorganismos infectantes, após o procedimento os ovos foram levados à incubadora por 2 horas, para despertar o desenvolvimento embrionário.

Após o período de incubação (Figura 2C), os 180 ovos foram separados em três grupos experimentais, com 60 unidades em cada grupo e identificados. No grupo controle (G1) foram injetadas solução de PBS, no grupo G2 e G3 soluções de 2,5 µM/ml e 5µM/ml de BIL respectivamente, sendo aplicado 100 µM/ml de volume total nos ovos.

Figura 2- Etapas de pesagem e limpeza. A) Pesagem; B) Higienização; C) Incubação.



Fonte: Autora (2022).

4.5 PROCESSAMENTO DOS EMBRIÕES

Após o período de incubação de 48 horas, os ovos foram retirados da incubadora com cautela, sem movimentação brusca para não causar danos aos embriões e colocados sob refrigeração a 4°C durante 20 minutos, com finalidade de dessensibilizar o embrião, para que o mesmo não venha sofrer durante o processamento. Em seguida foram abertos com auxílio de pinças, a parte transparente e fluida (clara), composta por água e albumina foi retirada com uma seringa, diminuindo a porção de líquidos favorecendo a visualização do disco embrionário (Figura 3A).

Para facilitar a retirada das membranas fetais, foi gotejado o fixador Bouin por cima do disco embrionário, com o objetivo de enrijecer o tecido, facilitando o corte, o fixador preserva os tecidos, garantindo a integridade na hora do manejo em que ocorre a retirada de membranas que recobrem o embrião e o descarte de vitelo. Em seguida o embrião é colocado em uma placa de Petri com água deionizada para que seja retirado os resquícios de vitelo e posteriormente, é retirado a membrana corioalantóide que protege o embrião (Figura 3B). Os embriões que foram submersos no fixador Bouin por duas horas, são lavados em água deionizada e armazenados em um recipiente com álcool a 70%, onde são acondicionados até o momento do processamento histológico (Figura 3C).

Figura 3- Etapas de Processamento A) D = Disco embrionário; B) Retirada dos resquícios de vitelo e membrana corioalantóide; C) Embriões em placa de Petri com álcool 70%



Fonte: Autora (2022).

4.6 TÉCNICA DE MONTAGEM TOTAL

Os embriões foram retirados do armazenamento e lavados com água destilada e posteriormente colocados em placas de Petri para corar em hematoxilina por um período de 10 segundos e após lavados em água corrente para fixar a coloração. Em seguida, foi realizado um processo de desidratação com banhos progressivos de álcool, com duração de 10 minutos em cada banho alcoólico iniciando pelo álcool 70%, 80%, 90% e por fim 100% (Figura 4). Após a desidratação, foram submersos em Xilol por 20 minutos em seguida retirados com pinça e depositados em lâmina. Por cima dos embriões foram colocados Entellan® para a montagem da preparação permanente, com a lamínula por cima, preservando a amostra.

Figura 4- Esquema do processo de coloração e desidratação



Fonte: Autora (2022).

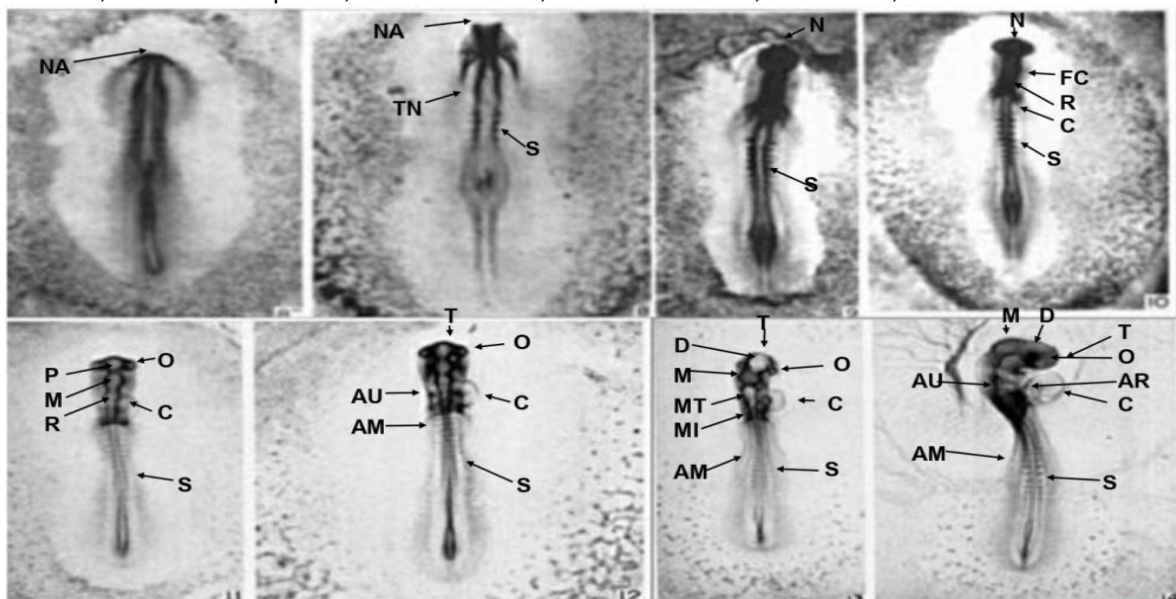
4.7 DETERMINAÇÃO DO ESTÁGIO EMBRIONÁRIO

Tabela 2- Características presentes nos embriões de galinha de acordo com os estádios.

Estádios	Características
08	<ul style="list-style-type: none"> • 4 pares de somitos; • Dobras neurais presentes a nível de mesencéfalo; • Ilhotas sanguíneas visíveis na metade posterior do embrião.
09	<ul style="list-style-type: none"> • 7 pares de somitos; • Vesículas ópticas primárias estão presentes; • Os pares primórdios do coração começam a se unir.
10	<ul style="list-style-type: none"> • 10 pares de somitos; • Primeira indicação da flexura craniana; • 3 vesículas cerebrais primárias são visíveis.
11	<ul style="list-style-type: none"> • 13 pares de somitos; • Leve curvatura craniana; • As vesículas ópticas estão constringidas nas bases; • Coração inclinado para direita.
12	<ul style="list-style-type: none"> • 16-18 pares de somitos; • Neuróporo anterior fechado; • Telencéfalo presente; • Fenda auditiva é profunda mas, se encontra aberta; • O coração possui levemente um formato de S.
13	<ul style="list-style-type: none"> • 19-21 pares de somitos; • A cabeça é em parte voltada para esquerda; • Telencéfalo ampliado.
14	<ul style="list-style-type: none"> • 22-23 pares de somitos; • Flexura cervical se inclina completamente; • Rotação corporal até os somitos 7-8; • Abertura da fenda auditiva contraída.

Fonte: Adaptado de Hamburger & Hamilton (1951).

Figura 5- Estádios 8-14 do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus*: AM=Âmnion; AU=Vesículas auditivas; AR= Arcos branquiais; C= Coração; D= Diencefalo; FC= Flexura craniana; M=Mesencéfalo; MI=Mielencéfalo; MT=Metencéfalo; N/NA=Neuróporo anterior; O=Vesículas ópticas; P=Prosencéfalo; R=Rombencéfalo; S=Somitos; T=Telencéfalo.



Fonte: HAMBURGUER & HALMITON (1951).

4.8 ANÁLISE ANÁTOMO-MORFOLÓGICA

As análises anátomo-morfológicas dos embriões foram realizadas utilizando um sistema de captura e registro de imagem, constituído por um microscópio acoplado a uma câmera MOTICAM10001.3M Pixel-USB2.0, QUIMIS e conectado a um computador com uma ferramenta de *Software MOTIC ImagePlus 2.0*.

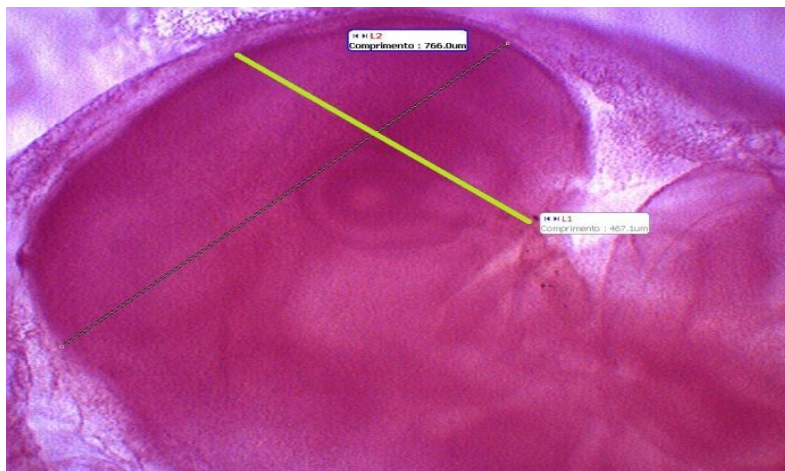
A primeira medida da região cefálica, denominada “Região cefálica I” foi realizada em todos os embriões do estágio 14, traçando uma linha reta entre o diencefalo e o seu lado oposto tendo como referência a vesícula óptica. As fotomicrografias da montagem total foram realizadas com a objetiva de 10x (Figura 6).

A segunda medida da região cefálica, denominada “Região cefálica II” foi realizada em todos os embriões do estágio 14, traçando uma linha reta entre o mesencéfalo e o telencéfalo tendo como referência a vesícula óptica. As fotomicrografias da montagem total foram realizadas com a objetiva de 10x (Figura 7).

A largura do tubo neural foi medida em todos os embriões, pertencentes ao estágio 14, na altura dos pares de somitos 10º, 13º, 15º, 17º e 20º com a finalidade de padronizar a análise. As fotomicrografias da montagem total foram realizadas

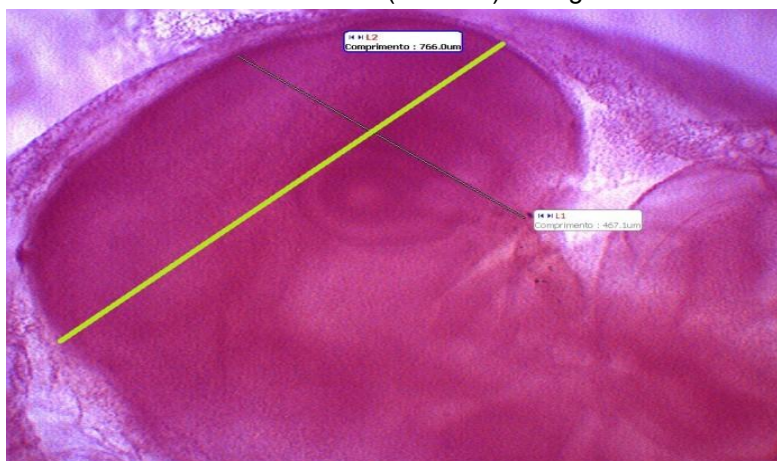
com a objetiva de 10x (Figura 8).

Figura 6- Fotomicrografia do embrião *G. gallus domesticus*, com uma linha de distância da região cranial em direção dorsal (amarela) intercruzando acima da vesícula óptica.



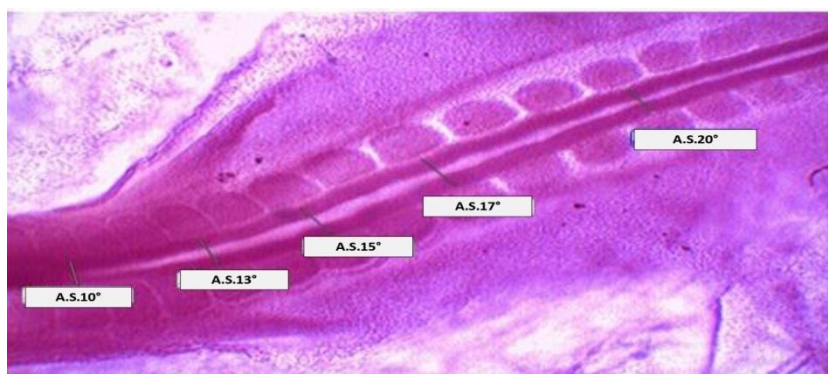
Fonte: Autora (2022)

Figura 7- Fotomicrografia da região cefálica do embrião *G. gallus domesticus*, com uma linha de distância (amarela) da região cranial em direção ventral.



Fonte: Autora (2022)

Figura 8- Fotomicrografia do tubo neural do embrião *Gallus gallus domesticus*: A.S.10° = altura do par de somitos 10°; A.S.13° = altura do par de somitos 13°; A.S.15° = altura do par de somitos 15°; A.S.17° = altura do par de somitos 17°; A.S.20° = altura do par de somitos 20°.



Fonte: Autora (2022)

4.9 CORTE TRANSVERSAL

Após a realização do processamento dos ovos, os embriões permanecem armazenados em etanol 70%. No procedimento histológico foi realizada uma bateria crescente de etanol, 70% por 20 minutos e 80%, 90% e 100% por dez minutos para remover a água das células. Em seguida os embriões foram depositados no xilol por dez minutos e foram impregnados na parafina líquida.

Com o auxílio de uma pinça, e imerso em parafina líquida nos esquadros de Leuckart. Cada bloco foi identificado e após 30 minutos secando em temperatura ambiente foi retirado do molde. Para realizar as secções transversais os blocos foram colocados no micrótomo, sendo realizados cortes com 4 μ m de espessura. Em seguida cada corte foi colocado no banho histológico com a temperatura de 40°C e capturado com uma lâmina.

Na etapa de coloração as lâminas foram colocadas na chapa aquecedora a 60°C para derreter a parafina. Após o derretimento as lâminas foram imersas em dois banhos de xilol, por cinco minutos cada, e em seguida em uma solução de etanol 100% e xilol por 30 segundos e logo após seguiu para uma bateria etanólica decrescente (100%, 90% e 70%) por 30 segundos cada. As lâminas foram imersas em água por 30 segundos e em seguida na hematoxilina por dois minutos e colocadas na água, por um minuto, para remover o excesso dos corantes. Para realização da desidratação dos cortes foi realizado uma bateria crescente de etanol (70%, 90% e 100%) com um tempo de 30 segundos em cada etapa, em seguida houve a imersão das lâminas em uma solução de etanol 100% e xilol por 30 segundos. No processo de diafanização as lâminas receberam dois banhos consecutivos de xilol por um tempo de 30 segundos cada. Para finalizar na montagem das preparações foi adicionado Entellan® sobre os cortes transversais dos embriões e a lamínula foi colocada levemente sem pressão sobre a amostra.

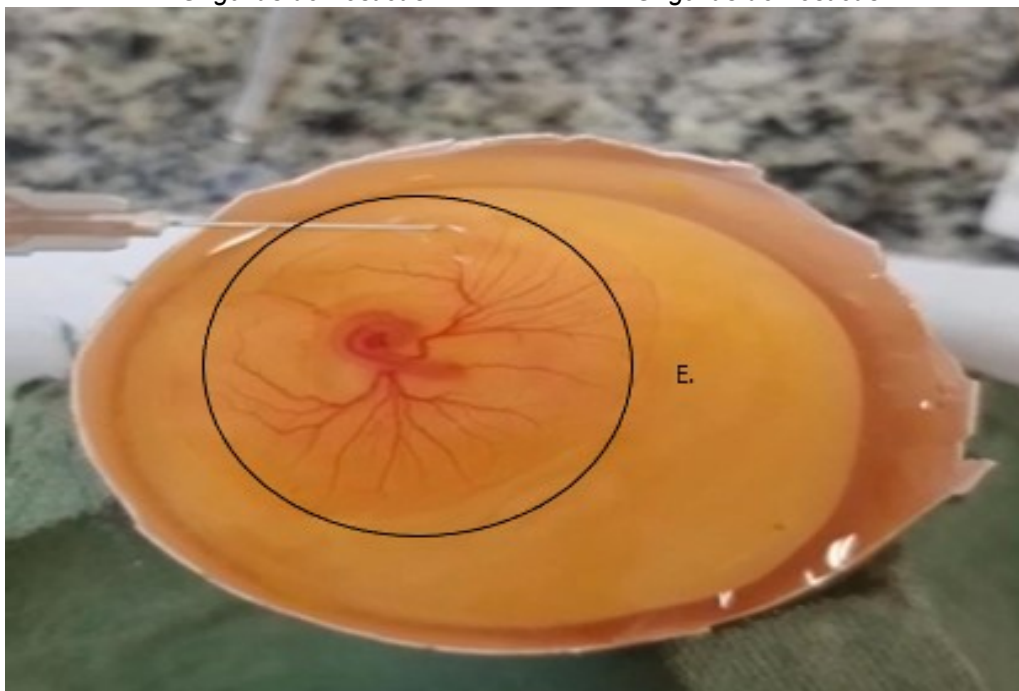
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de dados foi realizada com o teste One Way (ANOVA). Valores de probabilidade $p \leq 0,05$ foram considerados para indicar diferença significativa.

4.11 ANÁLISE DA MEMBRANA CÓRIO-ALANTÓIDE (HET-CAM)

O teste foi adaptado de Budai et al. (2021), os 60 ovos embrionados foram inseridos na incubadora com uma temperatura em cerca de 37 °C, após um período de 72 horas, os ovos foram separados em 4 grupos distintos: G1(PBS, controle negativo); G4 (NaOH 0,1M controle positivo); G2 e G3 (2,5 µM/ml e 5µM/ml de BIL). Em seguida, foram aplicados 300 µl das substâncias nos ovos, cada um no seu respectivo grupo, observando por 5 minutos se acarretava em irritabilidade (Figura 9). Durante o teste foi possível visualizar eventos vasculares como hiperemia, hemorragia e coagulação, que podem ocorrer na membrana cório-alantóide (CAM) do ovo embrionado de galinha após a exposição da substância (SÁ, 2017; LIMA, 2019).

Figura 9- Fotomicrografia durante aplicação da substância na membrana cório-alantóide do embrião de *G. gallus domesticus*. E.= Embrião de *G. gallus domesticus*



Fonte: (Autora 2022).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTADIAMENTO DOS EMBRIÕES DE *G. gallus domesticus*

No presente estudo, os ovos fertilizados de *G. gallus domesticus* foram utilizados para avaliação da toxicidade da lectina de *Bothrops leucurus* (BIL) no desenvolvimento do sistema nervoso central de embriões. A escolha do embrião de *G. gallus* como modelo experimental tem respaldo na literatura, devido a similaridade de seu desenvolvimento embriológico inicial com o humano (SILVA et al., 2021).

A utilização de 20 ovos embrionados por grupo experimental foi superior ao descrito na literatura, nos quais foram usados 15 e 10 ovos fertilizados por grupo. (ERTEKIN et al., 2019; ATAY et al., 2020). Tais estudos confirmam que para obter um resultado de confiabilidade não é preciso uma grande quantidade desses embriões, respaldando a quantidade de embriões analisados neste experimento.

Foi observada vários estádios 12, 13 e 14 nos embriões de *G. gallus domesticus* (Tabela 3). Estas variações são comuns, devido a alguns fatores como a janela de tempo entre o armazenamento, a postura e a incubação dos ovos, além disto, o tamanho da incubadora e suas possíveis oscilações de temperatura influenciam nesta variação (POKHREL et al., 2018; SILVA et al., 2021). Sendo observado também por Kmecick et al. (2019), a presença de vários estádios (16, 17, 18 e 19) ao avaliar os efeitos do ácido perfluorooctanóico e do cádmio, em embriões com 72 horas de desenvolvimento.

Tabela 3. Estádios embrionários de *G. gallus domesticus* com 48 horas de incubação.

Estádio Embrionário	G1(PBS)	G2 (2,5 µM/ml de BIL)	G3 (5 µM/ml de BIL)	Total
12HH	-	-	4%	4%
13HH	14%	23%	11%	48%
14HH	20%	14%	14%	48%

Fonte: Autora (2022)

5.2 ANÁLISE DOS ASPECTOS ANÁTOMO-MORFOLÓGICOS DOS EMBRIÕES DE *G. gallus domesticus* SOBRE O EFEITO DA BIL

Dentre os 60 ovos incubados, 17% ovos não apresentaram embriões e 10% dos ovos foram perdidos durante o processamento, restando um total de 44 ovos (73%). Vale ressaltar que apesar das diversas vantagens que o modelo experimental apresenta, os embriões de *G. gallus domesticus* podem apresentar certa fragilidade durante o processamento, chegando a ser observado, por vezes, tecidos rasgados, acarretando na perda de amostras, conforme também descrito por Yamamoto (2009).

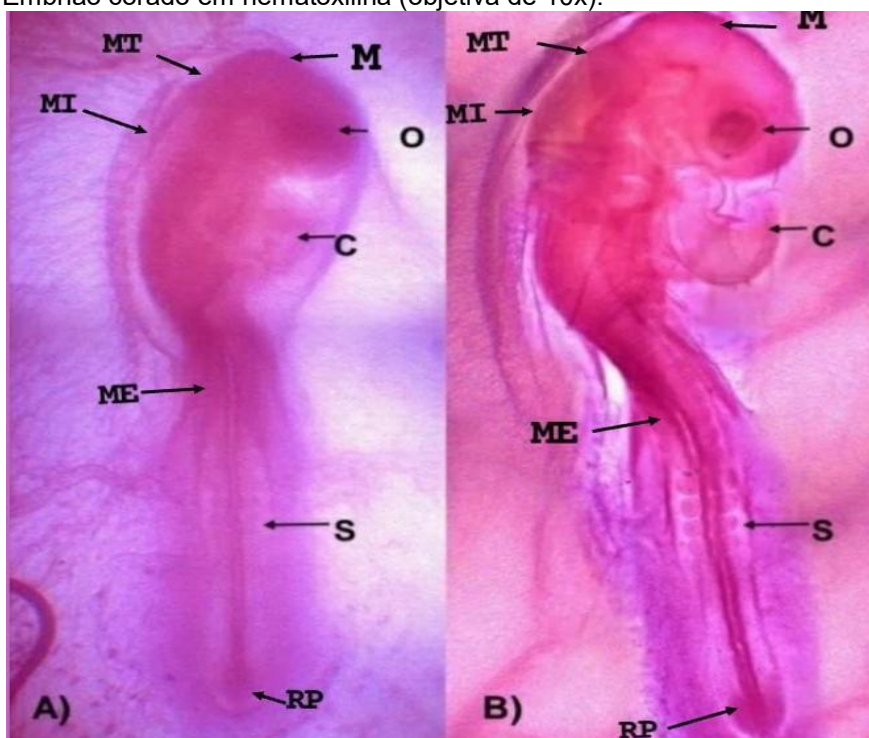
Os embriões foram classificados em: Embriões desenvolvidos; Embriões não desenvolvidos; Embriões perdidos durante o manejo, levando em consideração seus respectivos grupos de tratamento (Tabela 4). O estágio 14 foi escolhido para observação da embriotoxicidade da Lectina Bothrops leucurus (BIL), dos três grupos experimentais (Figura 10-12).

Tabela 4. Porcentagem dos embriões por grupos em seus respectivos tratamentos

	G1 (PBS)	G2 (2,5 µM/ml de BIL)	G3 (5µM/ml de BIL)
Embriões Desenvolvidos	30%	28%	25%
Embriões não desenvolvidos	3%	5%	9%
Embriões perdidos durante o manejo	5%	2%	3%
Total	25%	27%	21%

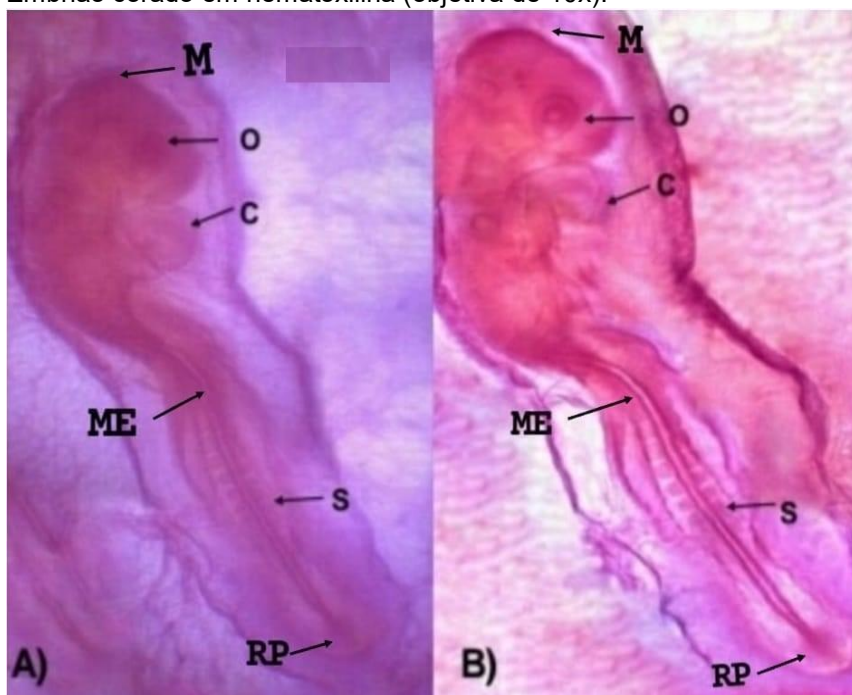
Fonte: Autora (2022)

Figura 10- Fotomicrografia de embriões *G.gallus domesticus* do grupo G1 com PBS: C= Coração; O= Vesículas ópticas; S= Somitos; M= Mesencéfalo; MT=Metencéfalo; MI= Miencéfalo; ME= Medula espinhal; RP= Resquício da linha primitiva. A) Embrião corado em hematoxilina (objetiva de 4x); B) Embrião corado em hematoxilina (objetiva de 10x).



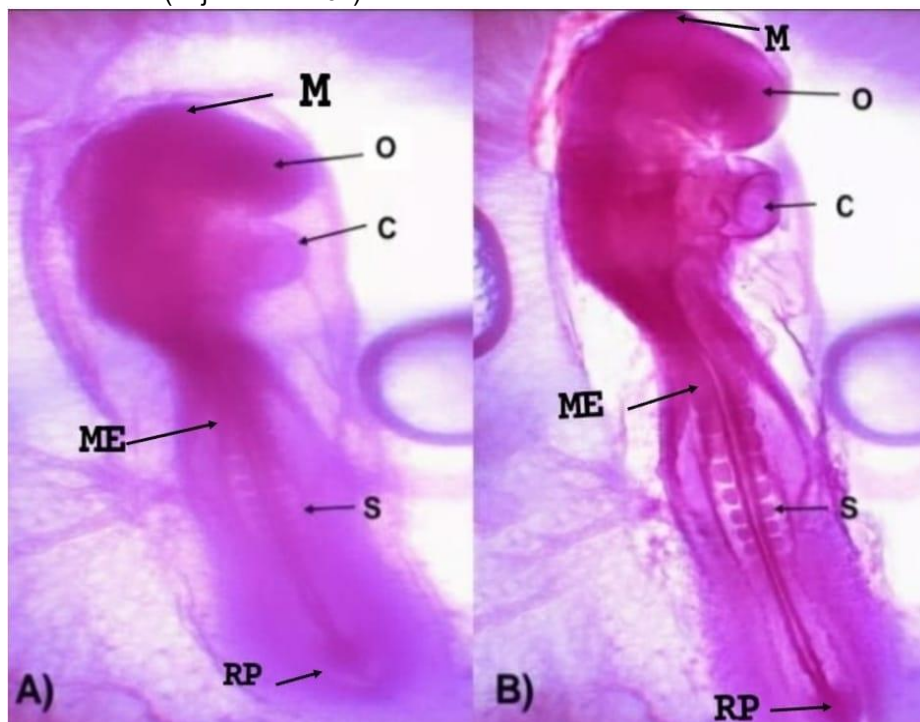
Fonte:Autora (2022)

Figura 11- Fotomicrografia de embriões *G.gallus domesticus* do grupo G2 com 2,5 μ M/ ml de BIL: C= Coração; O= Vesículas ópticas; S= Somitos. A) Embrião corado em hematoxilina (objetiva de 4x); B) Embrião corado em hematoxilina (objetiva de 10x).



Fonte:Autora (2022)

Figura 12- Fotomicrografia de embriões *G.gallus domesticus* do grupo G3 com 5 μ M/ ml BIL: M= Mesencéfalo C= Coração; ME= Medula espinhal; O= Vesículas ópticas; S= Somitos; RP= Resquício da linha primitiva. A) Embrião corado em hematoxilina (objetiva de 4x); B) Embrião corado em hematoxilina (objetiva de 10x).



Fonte: Autora (2022).

Na técnica de montagem total, na região cefálica os principais pontos observados foram o mesencéfalo e vesículas ópticas, não foram observadas alterações morfológicas. Demais autores que utilizaram desta metodologia, obtiveram alterações na região cefálica, sendo observada a ausência de desenvolvimento da vesícula e placóide óptico ou malformações dos mesmos (RIVERO et al., 2006; YAMAMOTO, 2009). Como em DEBIASI (2011) foi observado que, os embriões expostos ao cloreto de manganês, obtiveram alterações na formação do encéfalo ou apresentaram algum atraso no desenvolvimento do encéfalo.

As alterações na região cefálica podem acarretar em atrasos de desenvolvimento do encéfalo, pois o mesmo coordena e regula as atividades corporais. As anomalias congênitas ocorridas nesta região podem gerar efeitos sobre todo o organismo, a microcefalia por exemplo, pode causar um retardo no desenvolvimento cognitivo, motor e na fala, além de acarretar em problemas de visão e audição (HAMBURGER & HAMILTON, 1951; SILVA et al., 2021).

Os resultados obtidos nas análises da região caudal sugerem que a BIL não desempenha efeitos no início do processo de somitogênese, visto que, os somitos

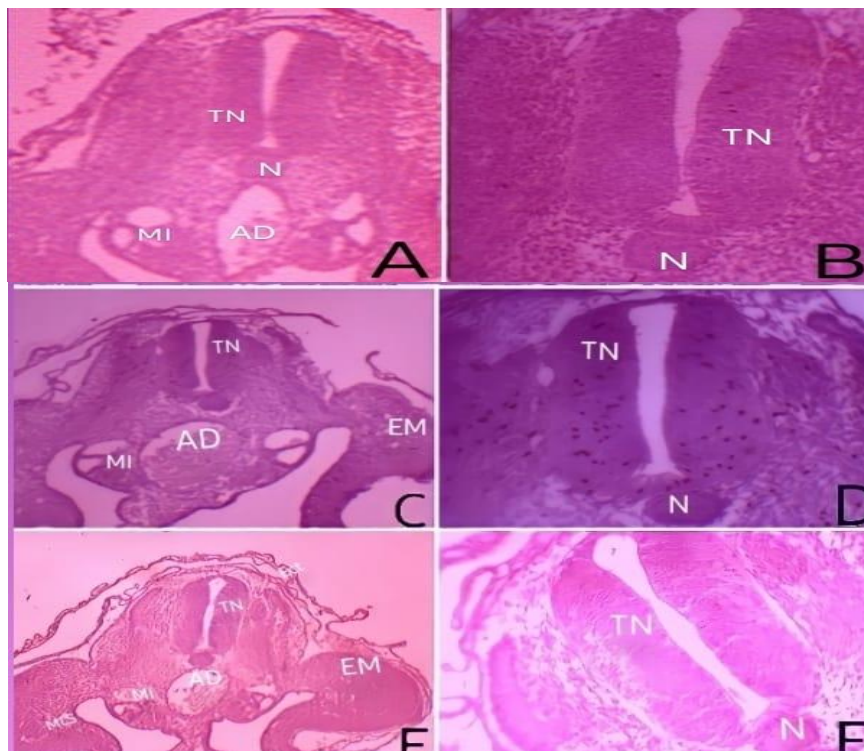
apresentavam características cubóides considerados dentro da normalidade (HAMBURGER & HAMILTON, 1951; BRAZ et al., 2020). Ocorrências de efeitos ocasionados por substâncias químicas podem acarretar em falhas na formação de somitos durante o seu desenvolvimento, causando problemas como malformações esqueléticas axiais (DRAGA et al., 2019; DUESS et al., 2020).

Dos 60 ovos reservados para a técnica histológica de corte transversal, 48 continham embriões, e destes, 35 foram analisados morfológicamente. Em todos os embriões analisados, a aorta dorsal e o tubo neural apresentaram morfologia normal (Figura 13).

No corte transversal é possível visualizar algumas estruturas do embrião que são necessárias para o desenvolvimento embrionário como aorta, este vaso sanguíneo vai estabelecer uma conexão com a rede vascular extraembrionária, possibilitando assim a circulação sanguínea e o fornecimento de nutrientes do saco vitelino até o embrião (TAKASE; TAKAHASHI, 2019).

O tubo neural dos embriões analisados estavam dentro da normalidade, sendo observado o teto e o assoalho mais delgados do que as paredes laterais, e a notocorda com o seu característico formato arredondado (Figura 13). Divergindo do resultado deste trabalho, o estudo de KMECICK (2017) que ao avaliarem embriões tratados com cádmio e ácido perfluorooctanóico, observaram defeitos no tubo neural.

Figura13- Fotomicrografias de embriões de *G. gallus domesticus*, processados pela técnica de corte transversal, incubados por 48 horas, sendo G1 (A e B), G2 (C e D) e G3 (E e F). Em (A, C e E) podem ser visualizados o folheto embrionário ectoderma (Ect); aorta dorsal (AD); Esboços dos membros (EM) originados do mesodermo lateral somático (MLS); tubo neural (TN). Em (B, D e F) nota-se o teto e o assoalho do tubo neural (TN) com espessura delgada; a notocorda (N) apresenta uma delimitação normal. Coloração hematoxilina. (A, C e E) Aumento de 100x. (B, D e F) Aumento de 400x.



Fonte: Autora (2022)

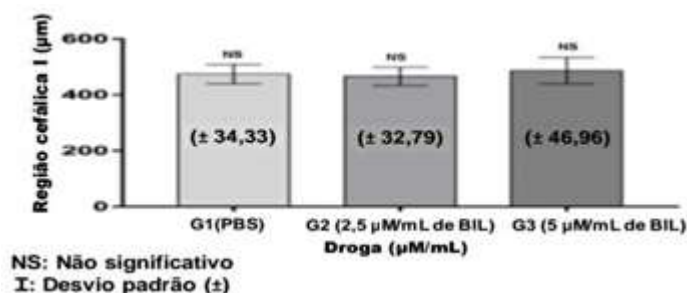
5.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS ESTRUTURAS DO SISTEMA NERVOSO DO EMBRIÃO DE *G. gallus domesticus* TRATADOS COM BIL

As análises morfométricas da região cefálica, que foram realizadas através da montagem total em dois pontos, sendo o primeiro entre o diencéfalo e o lado oposto, o segundo entre o mesencéfalo e o telencéfalo, ambas tendo como referência a vesícula óptica. As regiões cefálicas selecionadas não apresentaram diferença estatística, constatando que a substância BIL não causou danos anátomo-morfológicos na região cefálica do embrião. Na região cefálica I, não houve diferença estatística (ns) entre nenhum dos grupos: G1 vs G2 ($p=0,9177$), G1 vs G3 ($p=0,8065$) e G2 vs G3 ($p=0,6258$). Apresentando uma média nos grupos de: G1= 474,1 μ m; G2= 466,2 μ m; G3= 486 μ m. Dentro desses parâmetros experimentais a BIL não interferiu no desenvolvimento embrionário (Gráfico 1).

Na região cefálica II, não houve diferença estatística (ns) entre nenhum dos

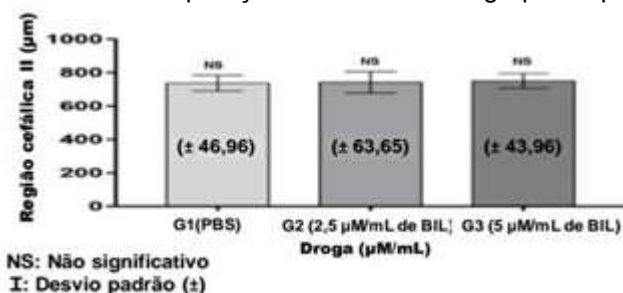
grupos: G1 vs G2 ($p = 0,9835$), G1 vs G3 ($p = 0,8767$) e G2 vs G3 ($p = 0,9551$). Apresentando a média nos grupos de: G1= 737,4 μ m; G2= 742,1 μ m; G3=750,7 μ m. Os três grupos experimentais não apresentaram diferença significativa sendo confirmada pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) (Gráfico 2).

Gráfico 1- Comparação das médias dos grupos experimentais referentes à Região cefálica I.



Fonte: Autora (2022)

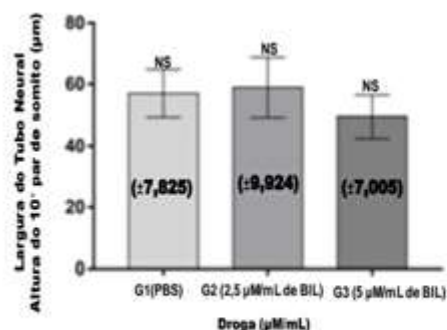
Gráfico 2- Comparação das médias dos grupos experimentais, referentes à Região cefálica II.



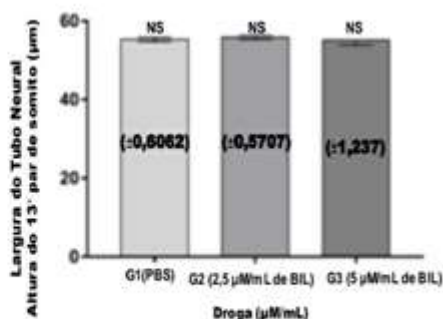
Fonte: Autora (2022)

Todos os embriões incubados por 48 horas apresentaram as suas estruturas preservadas, com similaridade morfológica entre os grupos e ausência de malformações, tanto na região cefálica como também na região caudal. Na análise do tubo neural foi observado as alturas dos pares 10°, 13°, 17° e 20° que não demonstraram diferença estatística (ns) entre nenhum dos grupos (Gráfico 3). Todavia na altura do 15° do tubo neural, houve diferença estatística entre os grupos G1 e G2 e entre G2 e G3.

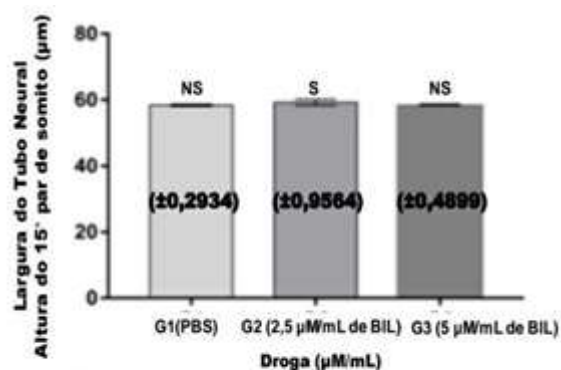
Gráfico 3- Comparação dos grupos experimentais, referentes às medidas selecionadas do tubo neural 10°; 13°; 15°; 17° e 20°.



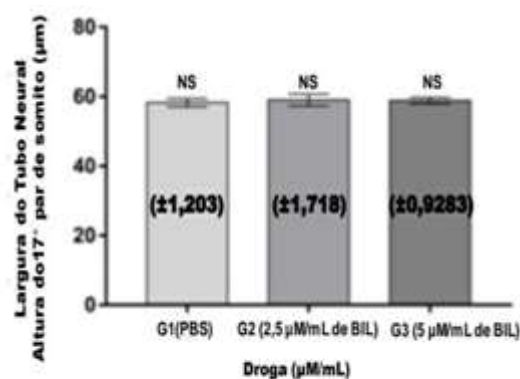
NS: Não significativo
I: Desvio padrão (±)



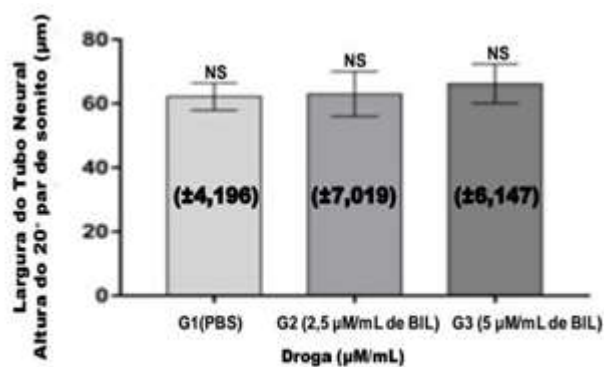
NS: Não significativo
I: Desvio padrão (±)



S: Significativo
NS: Não significativo
I: Desvio padrão (±)



NS: Não significativo
I: Desvio padrão (±)



NS: Não significativo
I: Desvio padrão (±)

Sendo analisado que o G3 possui a maior dosagem da substância de BIL com 5 µM/ml, foi constatado que a diferença estatística visualizada no G2 que possui 2,5 µM/ml de BIL, foi acarretada por questões morfológicas, podendo ser explicado devido a organização do tubo neural que não ocorre simultaneamente ao longo de todo eixo corporal, podendo ser visualizado em embriões de 27 horas, onde a região

cefálica do tubo neural apresenta-se alargada quando comparada com regiões mais caudais, estando o processo de neurulação mais adiantado na região anterior (HAMBURGER & HAMILTON, 1951; SCHATZ et al., 2003; SILVA et al., 2021).

Foram analisados morfologicamente a largura do tubo neural de todos os embriões pertencentes ao estágio 14, em cinco alturas dos pares de somitos 10°; 13°; 15°; 17° e 20°, sendo constatado que a substância não acarretou em surgimentos de anomalias. Investigações morfológicas desse tipo têm grande relevância, uma vez que os defeitos do tubo neural podem ocorrer quando não há um fechamento ou quando existe uma imperfeição que pode acarretar na oclusão incompleta da região do tubo neural (HAMBURGER & HAMILTON, 1951; SILVA et al., 2021).

A BIL atua como agente microbicida e anti-tumoral (EL-AASSAR et al., 2014; NUNES et al., 2011; NUNES et al., 2012; DE OLIVEIRA FIGUEIROA et al., 2017; ARANDA-SOUZA, 2018; CRUZ et al., 2020), apesar ter apresentado um efeito leishmanicida gerando uma nova alternativa terapêutica, existe a necessidade de comprovar se a mesma é embriotóxica. Dentro dos aspectos experimentais dos parâmetros que foram utilizados, a BIL não apresentou uma atividade de interferência no desenvolvimento do sistema nervoso, já que não apresentou variação significativa entre os grupos experimentais. Sendo confirmado pelo Teste de Tukey quando $P < 0,05$, nos pontos analisados durante a morfometria da região cefálica e do tubo neural.

5.4 ANÁLISE DO EFEITO DA BIL NA MEMBRANA CÓRIO-ALANTOIDE (HET-CAM)

O Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) é um teste considerado simples, rápido e de fácil manipulação, além de possuir um custo relativamente baixo. O método é utilizado como parte de ensaios que ajuda na avaliação de um potencial irritante, ou seja, é uma técnica para testar a toxicidade avaliando o potencial de irritação ocular de uma grande diversidade de substâncias ou produtos (VIERA et al., 2022).

Segundo SPIELMANN et al. (1993) o teste de HET-CAM demonstrou ser um procedimento de triagem valioso e robusto para a previsão de propriedades que acarretam em irritações, identificando produtos químicos levemente irritantes. Essa

metodologia corresponde a um modelo experimental alternativo conhecido por teste de Draize, no qual a irritabilidade de substâncias químicas incluindo novos cosméticos era avaliada em olhos de coelhos. Este teste é controverso, pois alguns pesquisadores consideram uma técnica que causa dor e sofrimento ao animal tornando a metodologia de HET-CAM um método alternativo válido para pesquisas de potenciais de irritantes oculares (SPIELMANN et al., 1993; VIERA et al., 2022).

No teste HET-CAM foram utilizados 60 ovos, sendo observado após 5 min que os grupos G1, G2 e G3 foram considerados “não irritante” para a membrana cório-alantóide (Figura 14).

O grupo G4, considerado positivo, identificado como “severamente irritante” após a observação de 5 min da membrana cório-alantóide, o mesmo resultado foi visualizado nas pesquisas de Barros (2021) e CAMONES, GUERRA e CASTAÑEDA (2013). O teste HET-CAM foi considerado aceitável, visto que, o grupo G1 que possuía PBS, sendo o controle negativo foi identificado como “não irritante” para a membrana cório-alantóide e o grupo G4 sendo o controle positivo identificado como “severamente irritante” para a membrana cório-alantóide corroborando com o estudo de BUDAI et al. (2021).

Os grupos G2 e G3 que possuíam a substância BIL, não apresentaram macroscopicamente hemorragia ou qualquer irritação visível a olho nu, na membrana cório-alantoide.

Figura 14. Membrana cório-alantóide observada após 5 minutos da administração de substâncias: A) Grupo G4 (positivo), sendo observado hemorragia; B) Grupo G1 (controle/negativo); C) Grupo G2, soluções de 2,5 μ M/ml de BIL D) Grupo G3, 5 μ M/ml de BIL.



Fonte: Autora (2022).

6 CONCLUSÃO

O estudo realizado com embriões de *G. gallus domesticus*, submetidos ao tratamento com a lectina de *Bothrops leucurus* (BIL), não promoveu nenhuma alteração no desenvolvimento do sistema nervoso, dentro dos parâmetros que foram utilizados. A BIL não apresentou ser um potencial irritante no teste de HET-CAM pois, não acarretou irritabilidade na membrana cório-alantoide.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Antônio Willame da Silva. Lectina *Codium isthmocladum* 1 (CiL-1): Interações com N-glicanos explicam atividades antinociceptiva e anti-inflamatória em zebrafish adulto (*Danio rerio*). 2021.
- ARANDA-SOUZA, Mary Ângela et al. In vitro effect of *Bothrops leucurus* lectin (BLL) against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* infection. **International journal of biological macromolecules**, v. 120, p. 431-439, 2018.
- ARANDA-SOUZA, Mary Ângela et al. A C-type lectin from *Bothrops leucurus* snake venom forms amyloid-like aggregates in RPMI medium and are efficiently phagocytosed by peritoneal macrophages. **Toxicon**, v. 157, p. 93-100, 2019.
- ATAY, E.; ERTEKIN, A.; BOZKURT, E.; ASLAN, E. Impact of Bisphenol A on neural tube development in 48-hr chicken embryos. **Birth Defects Research**, v. 112, n. 17, p. 1386-1396, 2020.
- BELLANDE, Kevin et al. Plant lectins and lectin receptor-like kinases: how do they sense the outside?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1164, 2017.
- BERGER, A. J. Bird Study, **Systematics**. New York: Dover, 1971.
- BRADFORD, M. (1976) **Analytical Biochemistry**. 72, 248-254.
- BRAZ, Beatriz Maria de Almeida et al. Estudo transversal para toxoplasmose em galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) de área de Mata Atlântica do estado de Alagoas, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, 2020.
- BUDAI, Péter et al. Comparative evaluation of HET-CAM and ICE methods for objective assessment of ocular irritation caused by selected pesticide products. **Toxicology in Vitro**, v. 74, p. 105150, 2021.
- CHEN, Y.H.; LIU, X.W.; HUANG, J.L.; BALOCH, S.; XU, X.; PEI, X.F. Microbial diversity and chemical analysis of Shuidouchi, traditional Chinese fermented soybean. **Food Res**, [S.l.], v. 116, p. 1289–1297, 2019.
- COLE, G. J & LEE, J. Immunocytochemical localization of a novel radial glial intermediate filament protein. **Developmental Brain Research**, v. 101, n. 1-2, p. 225-238, 1997.
- COSTA, H.C.; BERNILS, R.S. Répteis brasileiros: Mudanças taxonômicas. Versão 2014.2. Disponível em **Sociedade Brasileira de Herpetologia**.
- CRUZ, Joelton Igor Oliveira da et al. **Potenciais aplicações farmacológicas de lectinas**. 2020.
- DE MEJÍA, Elvira González; PRISECARU, Valentin I. Lectinas como proteínas vegetais bioativas: um potencial no tratamento do câncer. **Revisões críticas em ciência de alimentos e nutrição**, v. 45, n. 6, p. 425-445, 2005.

- DE OLIVEIRA FIGUEIROA, Evellyne et al. Lectin-carbohydrate interactions: implications for the development of new anticancer agents. **Current medicinal chemistry**, v. 24, n. 34, p. 3667-3680, 2017.
- DOS SANTOS NUNES, Erika et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from Bothrops leucurus snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 159, n. 1, p. 57-63, 2011.
- EBLE, Johannes. Structurally Robust and Functionally Highly Versatile-C-Type Lectin (-Related) Proteins in Snake Venoms. **Toxins**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 136, 1 mar. 2019.
- EL-AASSAR, M. R. et al. Microencapsulation of lectin anti-cancer agent and controlled release by alginate beads, biosafety approach. **International journal of biological macromolecules**, v. 69, p. 88-94, 2014.
- ELGAVISH, Sharona; SHAANAN, Boaz. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in biochemical sciences**, v. 22, n. 12, p. 462-467, 1997.
- ERTEKIN, T.; BILIR, A.; ASLAN, E.; KOCA, B.; TURAMANLAR, O.; ERTEKIN, A.; ALBAY, S. The effect of diclofenac sodium on neural tube development in the early stage of chick embryos. **Folia morphologica**, v. 78, n. 2, p. 307-313, 2019.
- FERNANDES, E. A. Características físicas e químicas de ovos provenientes de diferentes sistemas de produção. **Universidade de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária**, 2014.
- GANATRA, Mehul B. et al. A bi-specific lectin from the mushroom Boletopsis grisea and its application in glycoanalytical workflows. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2021.
- GARCIA, S.M.L.; FERNANDEZ, C. G. Embriologia. 3. ed. Porto Alegre: **Editora Artmed**, 2012.
- GILBERT, Scott F.; BARRESI, Michael JF. **Biologia do desenvolvimento**. Artmed Editora, 2019.
- GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. Massachusetts: Sinauer, 2001.
- GOODFELLOW, F. et al. Zika Virus Induced Mortality and Microcephaly in Chicken Embryos. **Stern Cells and Development**, v. 25, n. 22, p. scd.2016. 023, 2016.
- GOODRUM, G. R.; JACOBSON, A. G. Cephalic Flexure Formation in the Chick Emryo. **Journal Experimental Zoology**, v. 216, 1981.
- GONZÁLEZ LEÓN, Sergio; CASO DE ARMAS, Damaris; GONZÁLEZ CHÁVEZ, Ailen. Lectina: una biomolécula que promete em las ciencias biomédicas. **Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río**, v. 15, n. 2, pág. 3-12, 2011.
- GUVENY, Y. et al. Os efeitos de levetiracetam no desenvolvimento do tubo neural na fase inicial de embriões de galinha. **Turco Neurosurg**, v. 23, p. 617-622, 2013.
- GUVENY, Y. et al. Defeitos no Tubo Metamisole sódio induz neurais em um modelo de embriões de galinha. **Turco Neurosurg**, v. 26, pp. 445, 2016.

HAMBURGER, Viktor; HAMILTON, Howard L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, Washington, v. 88, n. 1, 1951.

HICKMAN, C. P. Jr.; ROBERTS, L. S.; KEEN, S. L.; EISENHOUR, D. J.; LARSON, A.; l'ANSON, H. *Princípios Integrados de Zoologia*. 16. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2016.

HUTCHINS, Erica J.; BRONNER, Marianne E. Draxin alters laminin organization during basement membrane remodeling to control cranial neural crest EMT. **Developmental biology**, v. 446, n. 2, p. 151-158, 2019.

KMECICK, M.; COSTA, M. C. V.; RIBEIRO, C. A. O.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Morphological evidence of neurotoxic effects in chicken embryos after exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) and inorganic cadmium. **Toxicology**, v. 427, p. 152286, 2019.

KOHL, A.; GOLAN, N.; CINNAMON, Y.; GENIN, O.; CHEFETZ, B.; SELADONENFELD, D. A proof of concept study demonstrating that environmental levels of carbamazepine impair early stages of chick embryonic development. **Environment international**, v. 129, p. 583-594, 2019.

KOMATH, Sneha Sudha; KAVITHA, Mannem; SWAMY, Musti J. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 4, n. 6, p. 973-988, 2006.

LI, S.; BAI, S.; QIN, X.; ZHANG, J.; IRWIN, D. M.; ZHANG, S.; WANG, Z. Comparison of whole embryonic development in the duck (*Anas platyrhynchos*) and goose (*Anser cygnoides*) with the chicken (*Gallus gallus*). **Poultry science**, v. 98, n. 8, p. 3278-3291, 2019.

LIMA, Luciano Souza de. Avaliação do efeito do composto (O-Metil)-N-(2, 6-Diidroxibenzoil)-tiramina (Riparina III) da planta Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) sobre a morfogênese do sistema nervoso central em embrião de *Gallus gallus*. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

LÜHN, Kerstin; WILD, Martin K. **Human deficiencies of fucosylation and sialylation affecting selectin ligands**. In: *Seminars in immunopathology*. Springer-Verlag, 2012. p. 383-399.

MAKELA, OLAVI. Studies in hemagglutinins of Leguminosae seeds. In: **Annales medicinae et experimentalis et biologiae Fenniae**. 1957. p. 1-133.

MANNING, J.C.; ROMERO, A.; HABERMANN, F.A.; CABALLERO, G.G.; KALTNER, H.; GABIUS, H.J. Lectins: a primer for histochemists and cell biologists. **Histochem. Cell Biol**, [S.l.], v.147, p.199–222, 2017.

MARQUES, Rita Maria Castro Reis. Impacto da adição de ácidos gordos ómega- 3 e das temperaturas de conservação na qualidade de ovos de galinha. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar Processamento de Alimentos) Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2017.

- MIRANDA, J. M. et al. (2015). Egg and egg-derived foods: Effects on human health and use as functional foods. **Nutrients**, v. 7, n. 1, 2015.
- MONTEIRO, Ana Maria de Oliveira. Alterações renais causadas pela lectina de sementes de *Vatairea Macrocarpa*. 2004.
- MOORE, Keith L; PERSAUD, T. V. N. Embriologia Clínica. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2013.
- MOORE, Keith L; PERSAUD, T. V. N; TORCHIA, Mark G. Embriologia básica. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2016.
- NUNES, Erika S. et al. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**, v. 59, n. 7-8, p. 667-671, 2012.
- NUNES, E. S. et al. Paiva, PMG; Silva, RML; Silva-Lucca, RA; Oliva, MLV;Guarnieri, MC & 22 Correia, MTS (2011). Purification of a lectin with antibacterial activity from 23 *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology PartB**,v.24,p.57-63,21.
- NYS, Y.; GUYOT, N. Egg formation and chemistry. In: Improving the safety and quality of eggs and egg products. **Woodhead Publishing**, 2011. p. 83-132.
- PAULA, Raiana Apolinário de. Estudo da dinâmica molecular das lectinas de veneno de *Bothrops jararaca* (BJL), *Bothrops jararacussu* (BJcuL) e *Bothrops leucurus*(BIL). 2017. Dissertação de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco
- PEREIRA JÚNIOR, Francisco Nascimento. Caracterização estrutural parcial e biológica de uma lectina de sementes de *Dioclea reflexa* **Hook F**. 2014.
- POPP, Nathalia et al. ANÁLISE MORFOLÓGICA DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *GALLUS GALLUS* SUBMETIDOS AO CLORETO DE MANGANÊS. **Jornada Integrada em Biologia**, p. 21-28, 2016.
- PRASAD, M. S.; URIBE-QUEROL, E.; MARQUEZ, J.; VADASZ, S.; YARDLEY, N.; SHELAR, P. B.; CHARNEY, R. M.; GARCÍA-CASTRO, M. I. Blastula stage specification of avian neural crest. **Developmental biology**, v. 458, n. 1, p. 64-74, 2020.
- RALDI, A. B. et al. Características dos componentes de ovos da linhagem Ross de Tidades diferentes via análise multivariada. **Rev. de Ciências Agrárias**, Lisboa,v. 41, n. 2, p. 291-300, 2018.
- RIVERO, L. B. D. Exposição de embriões de *gallus domesticus* ao acetato de chumbo e seus efeitos sobre a histologia cerebelar e o comportamento no período pós-natal. Dissertação programa de pós-graduação Neurociências da **Universidade Federal de Santa Catarina**. Florianópolis-SC, 2005.
- RIVERO,L.B.D.O,SCHATZJ.C.,CARVALHOM.S.L.,DECARVALHOM.C.; RAUH MÜLLER Y. M. Ação do acetato de chumbo sobre o padrão de desenvolvimento de embriões de *gallus domesticus*. Florianópolis, SC. J. **Braz.Soc.Eco toxicol**.v. 1, n.1, p 83-87, 2006.
- SCHATZ, Janaína Chaves et al. Caracterização morfológica de embriões de *Gallus*

domesticus, expostos ao acetato de chumbo, com ênfase na sua ação em nível tecidual e celular na medula. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, v. 1, n. 1, 2004.

SCHÜLER-FACCINI, L.; LEITE, J. C. L.; SANSEVERINO, M. T. V.; PERES, M. R. Avaliação de teratógenos potenciais na população brasileira. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 65-71, 2002.

SILVA, Jessé de Oliveira et al. UTILIZAÇÃO DO ENSAIO HET-CAM COMO ALTERNATIVA PARA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE PRODUTOS OFTÁLMICOS. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 17, n. 2, 2021.

SILVA, Thiago Felix et al. Embryotoxicity of Yangambin Isolated from *Ocotea duckei* Vattimo-Gil in *Gallus gallus domesticus* Embryos **Pharmacognosy Research**, v. 13, n. 3, 2021.

SITOHY, Mahmoud; DOHEIM, Mahmoud; BADR, Haitham. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. **Food chemistry**, v. 104, n. 3, p. 971-979, 2007.

SOUZA, Mary Ângela Aranda de. **Avaliação do mecanismo de morte celular induzida pela lectina da peçonha de *Bothrops leucurus* (BIL): correlação com transição de permeabilidade mitocondrial**. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

SPIELMANN, Horst. HET-CAM Test. In: **In Vitro Toxicity Testing Protocols**. Humana Press, 1995. p. 199-204.

TAKASE, Y.; TAKAHASHI, Y. Blood flow-mediated gene transfer and siRNA-knockdown in the developing vasculature in a spatio-temporally controlled manner in chicken embryos. **Developmental biology**, v. 456, n. 1, p. 8-16, 2019.

TARAPHDAR, Amit K.; ROY, Madhumita; BHATTACHARYA, RK Produtos naturais como indutores de apoptose: Implicações para a terapia e prevenção do câncer. **Ciência atual**, p. 1387-1396, 2001.

TSANEVA, M.; VAN DAMME, E.J.M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconj J**, [S.l.], v.37, p.533–551, 2020.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectin: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological role. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 17, p. 575-692. 1998.

VARELIS, P.; MELTON, L.; SHAHIDI, F. Encyclopedia of Food Chemistry. v. 3. Oxford: **Elsevier**, 2019.

VIANA, Lucas Alecrim Amorim. Purificação, caracterização bioquímica e estrutura primária parcial de uma lectina da esponja marinha ***Aplysina cauliformis***. 2021.

VIERA, Luciana Madureira de Araújo Lowndes et al. Comparação dos diferentes protocolos do Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) avaliando o

potencial de irritação ocular de surfactantes. **Toxicologia in Vitro** , v. 78, p. 105255, 2022.

WAGENINGEN, N. V. *et al.* A incubação de ovos por galinhas e na incubadora. **Fundação agromisa**, 2004.

WANG, L.; WANG, J.; QIAO, X.; JU, D.; LIN, Z. Effect of ambient temperature on the microexplosion characteristics of soybean oil droplet: the phenomenon of evaporation induced vapor cloud. **Int J Heat Mass Transf**, [S.l.], v.139, p.736–746, 2019.

WELCH, C.J.; TALAGA, M.L.; KADAV, P.D.; EDWARDS, J.L.; BANDYOPADHYAY, P.; DAM, T.K. A capture and release method based on noncovalent ligand cross-linking and facile filtration for purification of lectins and glycoproteins. **J Biol Chem**, Nebraska, v.295, p.223–236, 2020.

WINTER, Gordon et al. Imagens multimodais de PET e RM no modelo de membrana corioalantóica de teste de ovo de galinha (HET-CAM) para testes iniciais in vivo de radioligantes específicos de alvo. **Cânceres** , v. 12, n. 5, pág. 1248, 2020.

WOLPERT, L. *et al.* Princípios de Biologia do Desenvolvimento. 1ª edição, **Artmed**, Porto Alegre, 2000.

WOLPERT, L.; TICKLE, C.; ARIAS, A. M. Principles of development. 6.ed. **New York: Oxford university press**, 2019.

YIN, Z.; LIAN, L.; ZHU, F.; ZHANG, Z. H.; HINCKE, M.; YANG, N.; HOU, Z. C. The transcriptome landscapes of ovary and three oviduct segments during chicken (*Gallus gallus*) egg formation. *Genomics*, v. 112, n. 1, p. 243-251, 2020.

ZARBOCK, Alexander et al. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*, **The Journal of the American Society of Hematology**, v. 118, n. 26, p. 6743- 6751, 2011.

ZELENSKY, Alex N.; GREASY, Jill E. A superfamília de domínio semelhante a lectina do tipo C. **A revista FEBS** , v. 272, n. 24, pág. 6179-6217, 2005.

ZHANG, W.; ZHOU, Y.; LI, X.; XU, X.; CHEN, Y.; ZHU, R.; YIN, L. Macrophage-targeting and reactive oxygen species (ROS) responsive nanopolyplexes mediate anti-inflammatory siRNA delivery against acute liver failure (ALF). *Biomater Sci*, [S.l.], v.6, p.1986–1993, 2018.

ZHANG, Xiao-Wen et al. Identification of a C-type lectin possessing both antibacterial and antiviral activities from red swamp crayfish. **Fish & shellfish immunology**, v. 77, p. 22-30, 2018.

ZHENG, Lei et al. Arsenic trioxide inhibits viability and induces apoptosis through reactivating the Wnt inhibitor secreted frizzled related protein-1 in prostate cancer cells. **OncoTargets and therapy**, v. 9, p. 885, 2016.

ANEXO 01- Carta de Aprovação do Comitê de Ética para Pesquisa



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
FONE (81) 3326-8840 / 3326-8331
www.ccb.ufpe.br

Recife, 13 de junho de 2018.

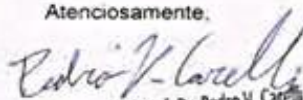
Ofício nº 37/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Eliete Cavalcanti da Silva**
Departamento de Histologia e Embriologia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.010939/2018-31

Certificamos que a proposta intitulada "**Caracterização morfológica de embriões de Galos gallus domesticus L. exposta a produtos naturais e sintéticos bioativos com ênfase no desenvolvimento dos sistemas nervoso e cardiovascular e teratogênese**", Registrada com o nº 23076.010939/2018-31 sob a responsabilidade de **Prof.ª Eliete Cavalcanti da Silva** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 06/06/2018

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	11/06/2018 a 01/05/2022
Espécie/linhagem/raça	Embriões de Galos gallus domesticus
Nº de animais	1200
Peso/Idade	Embriões
Sexo	Machos e fêmea
Origem	G-3 Agrovisícola Ltda

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carreira
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE
SIAPE 1801584