

ROBERT ROSOSTOLATO CARDOSO

**EFEITO DO EXTRATO DA PELE DA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)
NO PROCESSO DE REPARO CUTÂNEO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Reggiani Vilela Gonçalves

Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira
Mariáurea Matias Sarandy Souza
Sérgio Luis Pinto da Matta

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

C268e
2021
Cardoso, Robert Rosostolato, 1994-
Efeito do extrato de pele de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) no processo de reparo cutâneo / Robert Rosostolato Cardoso. – Viçosa, MG, 2021.

1 dissertação eletrônica (57 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Reggiani Vilela Gonçalves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Animal, 2021.

Referências bibliográficas: f. 46-55.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.211>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Peptídeos. 2. Hidrólise. 3. Peixes. 4. Tilápia (Peixe).
5. Curativos. 6. Células - Proliferação. 7. Cicatrização de ferimentos. 8. Pele - Ferimentos e lesões. I. Gonçalves, Reggiani Vilela, 1979-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. III. Título.

CDD 22. ed. 572.65

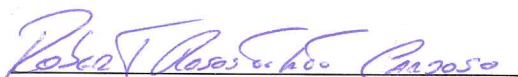
ROBERT ROSOSTOLATO CARDOSO

**EFEITO DO EXTRATO DA PELE DA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)
NO PROCESSO DE REPARO CUTÂNEO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de setembro de 2021.

Assentimento:



Robert Rosostolato Cardoso

Autor



Reggiani Vilela Gonçalves

Orientadora

“Obrigado por me guiar sem exitar através de muitos obstáculos em meu caminho, e por me manter determinado quando o mundo parecia perdido”.

AGRADECIMENTOS

A Deus por seu amor puro, misericordioso e bondoso, por ser o meu socorro nas horas da angustia, ter me guiado e estado presente em todos os momentos de minha vida.

A minha mãe Vera Lucia, por ter sempre me apoiado, me incentivado, me dado todo seu amor, carinho, compreensão, pelas orações e por ter sido meu refugio e fortaleza.

A minha irmã Larissa Rosostolato, por ter sido minha amiga e confidente.

A Samara Moreira, que foi mais que uma namorada, uma companheira, uma amiga, que esteve comigo e me ajudou durante a minha jornada dentro e fora do laboratório, proporcionando momentos maravilhosos, de amor sincero, cuidado, carinho e afeto que levarei para sempre comigo.

Aos meus tios Ednilson e Nelcineia, pelos conselhos, por sempre estarem dispostos a me ouvir e ajudar.

Aos meus amigos e técnicos de laboratório, Raul, Mariana, Donizete, Marcos, Maria Lúcia. Sem vocês a caminhada seria mais árdua, obrigado pela amizade, pelo apoio, pelas dúvidas sanadas e ajudas fornecidas ao longo desses anos, vocês foram maravilhosos.

Aos alunos (as) de IC do laboratório LAPEX, Alan, Aline e Eduarda, muito obrigado por dividirem comigo algumas tarefas e me auxiliar nas atividades que eu não possuía experiência, vocês foram essenciais para a conclusão desse projeto.

A minha estagiária e amiga, Isabella, pela amizade sincera, pela compreensão, por ter me auxiliando no biotério e no laboratório, e por todo apoio dentro e fora da universidade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À minha orientadora Dr^a. Reggiani Gonçalves Vilela, pela oportunidade, compreensão, apoio, ensinamentos, competência e pela confiança depositada em mim.

Ao Dr. Leandro Licursi de Oliveira, por acreditar nesse projeto, pela sua disponibilidade, pelos seus ensinamentos e sua competência.

À Dr^a. Mariáurea Matias Sarandy, por estar sempre disposta a ouvir e a ajudar, pela paciência e pela contribuição durante o meu trabalho.

Ao Dr. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho, pela disponibilidade e generosidade em ter fornecido as tilapias e sua ajuda para o presente projeto.

Ao Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta, pela amizade, confiança, acolhimento, suporte, apoio,

por sempre estar disposto a me ouvir e ajudar, e por ter cedido o biotério para que parte do experimento pudesse ser concluído.

Ao Dr. Edvaldo Barros, por ter concedido o laboratório do núcleo de análises de biomoléculas para o desenvolvimento de parte do experimento, além dos seus ensinamentos, a paciência, os conselhos e a amizade criada entre nós, o senhor foi peça chave na conclusão desse projeto.

Aos professores da banca avaliadora, pela disponibilidade e pelas considerações que contribuirão para a melhoria deste trabalho.

*“Combati o bom combate, terminei a corrida,
mantive a fé”.*

(Paulo de Tarso)

BIOGRAFIA

Robert Rosostolato Cardoso, filho de Vera Lucia Rosostolato Cardoso e Marcio Elias Cardoso, nasceu em Carangola, Minas Gerais, no dia 05 de maio de 1994.

Em 2014 formou-se em Técnico de Enfermagem pela Escola Técnica Enf. Ciência.

Em 2014 foi aprovado em 7º lugar no concurso público da Prefeitura Municipal de Carangola para o cargo de Técnico de Enfermagem.

Em 2018 graduou-se em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, pela Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG, Carangola-MG. Durante a graduação trabalhou e desenvolveu trabalhos de pesquisa e monitoramento em saúde pública.

Iniciou o curso de Pós-graduação (mestrado) em Biologia Animal pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, em março de 2019, e defendeu a dissertação em setembro de 2021.

RESUMO

CARDOSO, Robert Rosostolato, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2021. **Efeito do extrato da pele da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no processo de reparo cutâneo.** Orientadora: Reggiani Vilela Gonçalves. Coorientadores: Leandro Licursi de Oliveira, Mariáurea Matias Sarandy Souza e Sérgio Luis Pinto da Matta.

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito dos compostos obtidos a partir da pele da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) por hidrólise enzimática no processo de cicatrização de feridas cutâneas em camundongos (C57) knockout IL-10. Através da hidrólise enzimática utilizando a enzima tripsina, foram obtidos cinco compostos em diferentes tempos de digestão (T0, T2, T4, T6 e T19). Nas análises *in vitro* foram realizados ensaios de citotoxicidade/proliferação e o ensaio de arranhadura. As análises foram realizadas com a linhagem celular macrófagos RAW 264.7. Nas análises *in vivo* foram quantificadas neovascularização e celularidade, além do potencial antioxidante e anti-inflamatório do composto através da dosagem de citocinas e proteínas marcadas com anticorpos específicos, importantes no processo cicatricial. Camundongos knockout IL-10 machos (n = 30) foram divididos em três grupos com dez animais cada (CEUA/UFV: 02/2020), e uma ferida cutânea (12 mm² de diâmetro) foi criada no dorso dos animais. Os grupos foram os seguintes: Grupo: C, recebeu água destilada (controle); T1, composto peptídico T19 25 µL (18,75 µg/mL) e T2, composto peptídico T19 50 µL (37,5 µg/mL). As aplicações foram realizadas diariamente, e os tecidos das feridas foram removidos após 9 dias. As análises *in vitro* demonstraram que o composto que apresentou melhor resultado foi o T19, o qual não foi citotóxico para macrófagos RAW 264.7, além de ter contribuído para o aumento da proliferação e migração celular nas análises de MTT e de arranhadura respectivamente. Os resultados *in vivo*, demonstraram aumento de celularidade e vasos sanguíneos. Os resultados das análises de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) apresentaram aumento significativo nos grupos T1 e T2 nas áreas lesionadas após 9 dias, sugerindo ter um papel importante na regulação da ação antimicrobiana e no preparo do local da lesão para o reparo desejável. Além disso, houve um aumento das citocinas pró-inflamatórias (IL-2 e IFN γ) e antiinflamatórias (IL-4), nos animais do grupo T2. Por fim, o composto peptídico T19 aumentou o número de células positivas marcadas para PCNA⁺ e KI67⁺, ambos sinalizando o aumento de proliferação celular, acelerando e contribuindo para o fechamento de feridas no tecido lesado. Os resultados das marcações de CD31⁺, CD163⁺ e COX-2⁺, sinalizaram um aumento no número de novos vasos e redução da inflamação na lesão cutânea, sugerindo seu efeito antiinflamatório. Nossos resultados indicam que ambas as doses do T19

podem modular o processo de reparo da pele, mas os melhores efeitos foram observados após a exposição à dose mais elevada.

Palavras-chave: Peptídeos. Hidrólise. Peixes. Tilápia-do-Nilo. Curativo. Feridas cutâneas. Proliferação celular. Cicatrização.

ABSTRACT

CARDOSO, Robert Rosostolato, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2021. **Effect of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin extract on the skin repair process.** Advisor: Reggiani Vilela Gonçalves. Co-advisors: Leandro Licursi de Oliveira, Mariáurea Matias Sarandy Souza and Sérgio Luis Pinto da Matta.

The aim of this study was to investigate the effect of compounds obtained from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by enzymatic hydrolysis on the healing process of skin wounds in mice (C57) IL-10 knockout. Through enzymatic hydrolysis using trypsin enzyme, five compounds were obtained at different digestion times (T0, T2, T4, T6 and T19). In the in vitro analysis, cytotoxicity/proliferation assays and the scratch assay were performed. Analyzes were performed with the RAW 264.7 macrophage cell line. In vivo analysis quantified neovascularization and cellularity, in addition to the antioxidant and anti-inflammatory potential of the compound by measuring cytokines and proteins labeled with specific antibodies, which are important in the healing process. Male IL-10 knockout mice (n = 30) were divided into three groups of ten animals each (CEUA/UFV: 02/2020), and a skin wound (12 mm² in diameter) was created on the back of the animals. The groups were as follows: Group: C, received distilled water (control); T1, T19 peptide compound 25 µL (18.75 µg/mL) and T2, T19 peptide compound 50 µL (37.5 µg/mL). Applications were performed daily, and wound tissue was removed after 9 days. The in vitro analyzes showed that the compound that showed the best result was T19, which was not cytotoxic to RAW 264.7 macrophages, in addition to having contributed to the increase in cell proliferation and migration in the MTT and scratch analysis, respectively. The in vivo results showed an increase in cellularity and blood vessels. The results of the analysis of nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂) showed a significant increase in groups T1 and T2 in the injured areas after 9 days, suggesting that they play an important role in regulating the antimicrobial action and in preparing the lesion site for the desirable repair. Furthermore, there was an increase in pro-inflammatory (IL-2 and IFN γ) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines in animals from the T2 group. Finally, the peptide compound T19 increased the number of positive cells labeled for PCNA⁺ and KI67⁺, both signaling an increase in cell proliferation, accelerating and contributing to the closure of wounds in the injured tissue. The results of CD31⁺, CD163⁺ and COX-2⁺ labeling signaled an increase in the number of new vessels and a reduction in inflammation in the skin lesion, suggesting its anti-inflammatory effect. Our results indicate that both doses of T19 can modulate the skin repair process, but the best effects were observed after exposure to the highest dose.

Keywords: Peptides. Hydrolysis. Fish. Nile tilapia. Dressing. Skin wounds. Cell proliferation. Healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do modelo experimental de cicatrização de feridas de segunda intenção e evolução da ferida em relação ao tempo de exposição ao composto peptídico T19. A imagem superior mostra a distribuição da ferida excisional no dorso do animal (F1). A aparência geral da ferida inicial (dia 0) e a evolução da cicatrização no (dia 9) após receber o T19 é representado por fotomicrografias. A área da ferida foi calculada no dia 0 e 9 (média \pm DP), com base em imagens digitalizadas. 24

Figura 2. Efeitos dos hidrolisados em cultura de macrófagos RAW 264.7 no ensaio de citotoxicidade/proliferação. (a) Gráfico estatístico dos resultados da viabilidade celular. (b) fotomicrografias ilustrando a confluência de células macrófagos RAW 264.7 em C (grupo controle: células cultivadas em DMEM c/ SFB 10%) e grupo T19. Bar = 100 μ m. No gráfico, os dados são representados como média e desvio padrão. O símbolo # representa diferença estatística entre C (controle), HL (Homogenato liofilizado), T0, T2, T4 e T6. Teste paramétrico de Student- Newman-Keuls, $p < 0,05$ 33

Figura 3. Efeitos de diferentes tempos de hidrólises no ensaio de arranhadura in vitro com Macrófagos RAW 264.7. C: grupo controle (células cultivadas em DMEM c/SFB 10%) T0, T2, T4, T6 e T19 (grupos teste tratados com homogenato liofilizado da pele da tilápia-do-Nilo em diferentes tempos de hidrólises 0h, 2h, 4h, 6h e 19h). A avaliação da contração ocorreu após 24h. No gráfico, os dados são representados como média e desvio padrão. O símbolo * representa diferença estatística entre C (controle); e # representa diferença estatística entre T0. Teste paramétrico de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$ 34

Figura 4. Representação da área da ferida (mm^2) (a). ICF (%) = índice da contração da ferida em porcentagem (b). Grupo: C, recebeu 50 μ L de água destilada (controle); T1: recebeu 25 μ L do composto peptídico T19 (18,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e T2 recebeu 50 μ L do composto peptídico T19 (37,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Administração da dose por via tópica. Nos gráficos, os dados são representados como média e desvio padrão. O símbolo * representa diferença estatística entre o C (controle). Teste paramétrico de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$ 35

Figura 5. (a) celularidade, (b) vasos sanguíneos e (c) fotomicrografias mostrando células e vasos sanguíneos no tecido cicatricial de camundongos (C57) knockout IL-10 tratados com hidrolisado da pele da tilápia-do-Nilo no nono dia, bar = 100 μ m. Grupo: C, recebeu 50 μ L de água destilada (controle); T1: recebeu 25 μ L do composto peptídico T19 (18,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e T2 recebeu 50 μ L do composto peptídico T19 (37,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Nos gráficos, os dados são representados como média e desvio padrão. O símbolo * representa diferença estatística entre C (controle). Teste paramétrico de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$ 36

Figura 6. Níveis de (a) superóxido dismutase (SOD), no tecido cicatricial de camundongos (C57) knockout IL-10 tratados com hidrolisado da pele da tilápia-do-Nilo. Grupo: C, recebeu 50 μ L de água destilada (controle); T1: recebeu 25 μ L do composto peptídico T19 (18,75

µg/mL) e T2 recebeu 50 µL do composto peptídico T19 (37,5 µg/mL). No gráfico, os dados são representados como média e desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os grupos. Teste paramétrico de Student-Newman-Keuls, $p > 0,05$ 36

Figura 7. Níveis de (a) peróxido de hidrogênio (H₂O₂), (b) óxido nítrico (NO) e (c) malondialdeído (MDA), no tecido cicatricial de camundongos (C57) knockout IL-10 tratados com hidrolisado da pele da tilápia-do-Nilo. Grupo: C, recebeu 50 µL de água destilada (controle); T1: recebeu 25 µL do composto peptídico T19 (18,75 µg/mL) e T2 recebeu 50 µL do composto peptídico T19 (37,5 µg/mL). No gráfico, os dados são representados como média e desvio padrão. O símbolo * representa diferença estatística entre o C (controle); e # representa diferença estatística entre T1. Teste paramétrico de Student-Newman-Keuls. $P < 0,05$ 37

Figura 8. Níveis de citocinas pró-inflamatórias: a-Interleucina-2 (IL-2), b-Interferon gama (INF-gama) e citocinas anti-inflamatórias: c-Interleucina-4 (IL-4) no tecido cicatricial de camundongos (C57) knockout de IL-10 no dia 9. Grupo: C, recebeu 50 µL de água destilada (controle); T1: recebeu 25 µL do composto peptídico T19 (18,75 µg/mL) e T2 recebeu 50 µL do composto peptídico T19 (37,5 µg/mL). No gráfico, os dados são representados como média e desvio padrão. O símbolo * representa diferença estatística entre o C (controle); e # representa diferença estatística entre T1. Teste paramétrico de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$ 38

Figura 9. Níveis de marcações positivas: a) CD31⁺; b) CD163⁺; c) COX-2⁺; d) Ki67⁺; e) PCNA⁺ e f) fotomicrografia ilustrando os marcadores no tecido de camundongos (C57) knockout de IL-10 nos dias 0 e 9. Grupo: C, recebeu 50 µL de água destilada (controle); T1: recebeu 25 µL do composto peptídico T19 (18,75 µg/mL) e T2 recebeu 50 µL do composto peptídico T19 (37,5 µg/mL). Os resultados são apresentados como quantidade de pixels por mm² por campo analisado. No gráfico, os dados são representados como média e desvio padrão. O símbolo * representa diferença estatística entre o C (controle); e # representa diferença estatística entre T1. Teste paramétrico de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$ 39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Sequências de peptídeos que se alinham as proteínas provenientes do hidrólido da pele da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). 29
- Tabela 2. Sequências de peptídeos que se alinham as proteínas não caracterizadas oriundas da pele da tilápia-do-Nilo identificadas a partir do BLASTp. 31
- Tabela 3. Composição e quantificação de aminoácidos derivado dos peptídeos que se alinham as proteínas de colágeno tipo I (alfa 1, 2 e 3) presentes na pele da tilápia-do-Nilo.32

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
2.1.	Preparação da tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) para obtenção da pele.....	19
2.2.	Preparação do hidrolisado da pele da tilápia-do-Nilo (<i>O. niloticus</i>) para obtenção dos peptídeos	20
2.3.	Análise de LC/MS-MS.....	20
2.3.1.	Identificação das Proteínas.....	21
2.3.2.	Caracterização da composição de aminoácidos dos MCP's	21
2.4.	Ensaio <i>in vitro</i>	22
2.4.1.	Ensaio de Citotoxicidade/ Proliferação.....	22
2.4.2.	Ensaio de Arranhadura (<i>Scratch assay</i>).....	22
2.5.	Ensaio <i>in vivo</i>	23
2.5.1.	Animais	23
2.5.2.	Delineamento Experimental.....	23
2.5.3.	Feridas Cirúrgicas.....	24
2.5.4.	Cálculo da área e da taxa de contração da ferida.....	24
2.5.5.	Análise Histológica.....	24
2.6.	Análises dos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes.....	25
2.6.1.	Produção de Peróxido de Hidrogênio	25
2.6.2.	Análise de Óxido Nítrico	25
2.6.3.	Determinação de Malondialdeído.....	26
2.6.4.	Atividade de Superóxido Dismutase	26
2.6.	Análise de expressão de citocinas.....	26
2.7.	Análise de Imunohistoquímica	26
2.8.	Análise Estatística.....	27
3.	RESULTADOS	27
3.1.	Hidrólise Enzimática.....	27
3.2.	Análise de LC/MS-MS.....	27
3.2.1.	Caracterização dos peptídeos	27
3.2.2.	Composição de aminoácidos de MCP's	28
3.3.	Análises <i>in vitro</i>	32
3.3.1.	Ensaio de Citotoxicidade/Proliferação.....	32

3.3.2.	Efeito do T19 no ensaio de Arranhadura (<i>Scratch assay</i>)	33
3.4.	Análises <i>in vivo</i>	34
3.4.1.	Área da ferida e índice de contração.....	34
3.4.2.	Resultados Histopatológicos	35
3.5.	Resultados dos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes	36
3.5.1.	Enzima Antioxidante	36
3.5.2.	Avaliação de marcadores de estresse oxidativo	37
3.6.	Análise de citocinas pró e antiinflamatórias em tecido cicatricial.....	38
3.7.	Imunohistoquímica	38
4.	DISCUSSÃO	40
5.	REFERÊNCIAS.....	46
6.	APÊNDICE 1	56

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e possui a função de revestimento e barreira química, física, termorreguladora, microbiana, proteção imunológica, percepção sensorial (calor, frio, tato, dor), estética e de regulação hemodinâmica [1]. Devido as funções que desempenha, está sujeita a sofrer agressões oriundas de fatores intrínsecos e extrínsecos que podem levar a alterações estruturais, tais como as feridas cutâneas. As lesões abertas na pele geralmente são caracterizadas pela ruptura da estrutura anatômica e funcional do tecido, cuja gravidade pode variar de acordo com a profundidade e extensão da lesão, podendo levar à incapacidade funcional do indivíduo [2]. Atualmente o número de pacientes acometidos por feridas cutâneas é alto em todo o mundo, dados de recentes levantamentos revelam que essas lesões chegam a acometer 5% da população adulta do mundo ocidental, gerando altos custos para o serviço de saúde [3–5], principalmente devido ao crescente número de patologias crônicas associadas, como diabetes e câncer [6]. As feridas cutâneas, podem ser consideradas um problema de saúde pública, visto que acometem a população de uma forma geral, independente de sexo, idade ou etnia, elevando os custos do sistema de saúde [7]. Quando a pele sofre uma lesão, é necessário que ocorra o reparo rápido do local da ferida, para que o organismo não fique exposto ao ambiente externo, frequentemente hostil [8]. O processo de reparo normalmente ocorre em três fases distintas, mas sobrepostas, sendo elas: inflamação, proliferação e remodelação, que é altamente regulada pela liberação de vários fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e células inflamatórias e de matriz [9].

Na primeira fase ocorre a hemostasia, com recrutamento de neutrófilos e macrófagos, que vão atuar como fagócitos, mediar a liberação de citocinas e substâncias antimicrobianas e proteinases [10]. Assim, durante a hemostasia ocorre o estancamento do sangramento, devido a cascata de coagulação intrínseca e extrínseca. As plaquetas, agregam e desencadeiam a vasoconstrição para reduzir a perda de sangue, o que resulta em hipóxia, aumento da glicólise e alterações de pH [11]. A vasoconstrição, desencadeada pelas plaquetas, ajuda a reduzir a perda de sangue e preencher a lacuna de tecido com um coágulo sanguíneo que serve como uma matriz provisória da ferida, fornecendo uma estrutura para a migração de diferentes fatores celulares [8,12]. Além disso, o coágulo sanguíneo contém moléculas de fibrina, fibronectina, vitronectina e trombospondinas, formando a matriz provisória como uma estrutura de suporte para a migração de leucócitos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais abastecidas de fatores de crescimento [13]. As plaquetas também influenciam a quimiotaxia de leucócitos pela liberação de citocinas e fatores de crescimento, iniciando o processo inflamatório, estimulam a síntese de

colágeno, ativando a transformação de fibroblastos em miofibroblastos e iniciando a angiogênese, servindo como apoio para o processo de reepitelização [14].

Na próxima fase, conhecida como proliferação, ocorre a cobertura da superfície da ferida com a migração de fibroblastos ao longo da rede de fibrina, restauração da rede vascular, através da angiogênese, e substituição da matriz provisória da ferida [15]. Durante esta fase, os fibroblastos sintetizam e depositam nova matriz extracelular, que dá suporte às células e novos vasos sanguíneos, formando o tecido de granulação [16]. Este tecido de granulação serve como arcabouço para a migração e organização de macrófagos, queratinócitos, além de vasos sanguíneos, e fibras de colágeno, que recuperam parcialmente a estrutura e a função da pele lesionada [15,17]. A restauração do sistema vascular da pele, corresponde a uma cascata complexa de eventos celulares, humorais e moleculares no leito da ferida. Nesta etapa, a ligação de fatores de crescimento aos seus receptores nas células endoteliais, ativam as cascatas de sinalização intracelular, fazendo com que o endotélio secrete enzimas proteolíticas que dissolvem a lâmina basal, permitindo as células proliferar e migrar para o leito da ferida. No final desta fase, o número de células totais diminui, em especial as que sofrem maturação e diferenciação em miofibroblastos, além de sofrerem apoptose finalizando a fase proliferativa [18,19].

Finalmente, ocorre a fase de remodelação, cujo objetivo principal é que o tecido alcance a máxima resistência à tração através da reorganização de suas fibras, além disto, ocorre degradação e síntese da matriz extracelular (MEC), especialmente a substituição de colágeno III por colágeno I pela enzima lisil Oxidase com a resolução da inflamação e remodelação gradual do tecido de granulação para formação do tecido cicatricial [20,21]. Essa fase pode durar muitos anos após o ferimento, e geralmente ocorre a recuperação de 80% da força original do tecido antes da lesão [22]. Assim que a superfície da lesão é coberta por uma monocamada de queratinócitos, a migração epidérmica destas células cessa e uma nova epiderme estratificada com uma lâmina basal subjacente é restabelecida das bordas da ferida até sua porção interna [23].

Atualmente no tratamento de feridas, uma variedade de medicamentos é utilizada, como sulfadiazina de prata e acetato de mafenide. No entanto essas drogas têm algumas desvantagens importantes, como alguns efeitos colaterais graves, sendo ineficientes para feridas profundas, formação de cicatrizes claras e um alto custo no tratamento [24,25]. Tendo em vista os elevados gastos anuais na área da saúde com o tratamento de lesões cutâneas, faz-se necessário o desenvolvimento de novas formas de intervenção. Neste contexto, o uso de biofármacos têm aumentado muito, já que são eficientes na promoção do processo cicatricial e representaria uma

alternativa de tratamento menos oneroso [26–29]. Estudos recentes apontam resultados positivos utilizando peptídeos presentes na pele da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) em feridas infectadas e queimaduras, devido as suas ações antibacteriana [30], anti-hipertensiva [31] e neuroprotetora [32], gerando a possibilidade de ser utilizada também para o tratamento de lesões [33]. Assim a pele da tilápia-do-Nilo representa uma alternativa de baixo custo que apresenta efeitos benéficos na cicatrização de feridas cutâneas [34].

A pele da tilápia, possui a derme composta por feixes de colágeno compactados, longos e organizados, predominantemente do tipo I [35], que estimula Fatores de Crescimento de Fibroblastos (FGF), e liberam Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF), que são duas citocinas importantes e imprescindíveis para o fechamento das feridas [36]. Além disto, o peixe produz Peptídeos Marinhos Antimicrobianos (AMPs) como parte de seu sistema imunológico como piscidina, defensina, hepcidina, cathelicidin e histona que possuem efeitos antimicrobianos e que são importantes para manter a área da ferida livre de infecções [37].

Atualmente, existem poucos estudos que visam identificar as propriedades antioxidantes e antiinflamatórias desses peptídeos, que auxiliam na aceleração do tempo de cura das lesões da derme. Além disso, ainda não se sabe quais são os principais componentes da pele da tilápia-do-Nilo envolvidos no processo de cura de feridas cutâneas, e muito menos quais os principais mecanismos celulares e moleculares envolvidos neste processo. Afim de contribuir com o desenvolvimento de novos tratamentos para feridas cutâneas, com alternativas de baixo custo e acessíveis, neste estudo objetivou-se extrair peptídeos da pele da tilápia-do-Nilo hidrolisados em diferentes tempos, e avaliar seus efeitos sobre os componentes celulares e teciduais envolvidos no processo de cura das lesões.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparação da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção da pele

Foram utilizados 14 exemplares machos de tilápias-do-Nilo, com 240 dias (8 meses), com peso médio de 210g, proveniente do Viveiro do Setor de Piscicultura DBA/UFV. Esses animais foram mantidos em aquário de 250L dotado de filtro mecânico e biológico, mantidos a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, por um período de aclimação de sete dias. Os peixes foram alimentados, 3 vezes ao dia, com ração comercial extrusada de 32% de proteína bruta (PB). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV: 02/2020). As tilápias-do-Nilo foram pesadas e eutanasiadas no Laboratório de Patologia

Experimental (LAPEX), por excesso de anestésico (400 mg de óleo de cravo/ L de água); solução anestésica 1:9 de óleo de cravo: álcool absoluto [38]. Após a eutanásia, as peles foram retiradas das tilápias-do-Nilo e seccionadas em segmentos de 12 cm² na base da nadadeira dorsal e submetidas a lavagem na solução fisiológica estéril de Hickman (NaCL a 6,42 g/L; KCL a 0,15 g/L; CaCL₂ a 0,22 g/L; MgSO₄ 0,12 g/L; NaHCO₃ a 0,084 g/L e NaH₂PO₄ a 0,06 g/L), a mesma apropriada para Teleósteos de água doce [39]. Sendo posteriormente armazenadas em freezer -80°C até a sua utilização. As carcaças restantes dos animais foram armazenadas em freezer -20°C, e posteriormente recolhidos pela Divisão de Gerenciamento de Resíduo da UFV.

2.2. Preparação do hidrolisado da pele da tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*) para obtenção dos peptídeos

As peles limpas foram homogeneizadas com um homogeneizador manual na proporção 1g de pele limpa para 3mL de água destilada, posteriormente o homogenato foi centrifugado a 10000g, 4° C, por 10 minutos e liofilizado. O extrato liofilizado foi resuspenso em solução tamponada (0,6g Tris-HCL e 0,01g CaCl₂ preparada em 100mL de água destilada), na proporção 1:1 (5mg do extrato liofilizado + 5mL do tampão da amostra) e centrifugada a 2500g por 12min., coletado o sobrenadante, a enzima tripsina foi adicionada à mistura na proporção 1:0,2 (1000µL do extrato + 200µL de enzima) e incubada em banho maria em tempos distintos (0h, 2h, 4h, 6h e 19h) a 38° C, para digestão. A enzima foi desativada aquecendo a mistura a 100° C por 15 minutos. A mistura foi arrefecida até à temperatura ambiente e centrifugada a 9000g por 10 minutos, para remoção de detritos. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -80° C até sua posterior utilização. O nível de concentração peptídica dos hidrolisados foi medido usando o método de Bradford [40].

2.3. Análise de LC/MS-MS

A amostra do hidrolisado T19 foi analisada em um sistema LC-MS/MS, composto de um UPLC nanoAcquity (Waters, EUA) e um espectrômetro de massas modelo Amazon Ion Trap® (Bruker Daltonics, Alemanha). A amostra foi submetida a uma análise cromatográfica em uma coluna trap e uma coluna capilar C18 BEH130 1,7µm – 100µm x 100mm, operando com uma taxa de fluxo de 0,400 µL/min. Os peptídeos foram eluídos automaticamente e injetados em espectrômetro de massas, atuando no modo *online*, com o auxílio de uma agulha de ionização nanoESI. Nesta etapa, as soluções de fase móvel utilizadas para o programa de gradiente foram: (A) água e ácido fórmico 0,1% (v/v) e (B) acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v), com a

programação cromatográfica iniciando de um passo de dessalinização com a manutenção de 5% de (B) durante 5 min, em seguida, um gradiente consistindo de uma rampa de subida linear partindo de 5% até 50% de (B) durante 40 min, 50% de (B) durante 5 min, e uma rampa de subida linear partindo de 50% até 90% de (B) durante 10 min, 90% de (B) durante 5 min, rampa de descida linear partindo de 90% até 10% de (B) durante 5 min, seguido pela manutenção a 10% de (B) durante 5 min. Os íons foram escaneados em modo positivo para os espectros de MS1 na faixa de massas entre 300 e 1500m/z e MS2 entre 70 e 3000 m/z. A aquisição de dados teve a duração de, aproximadamente, 75 min. O espectrômetro IonTrap foi operado no modo auto-MSn, o qual adquiriu espectros de MS2 para os íons mais intensos em cada espectro de varredura completo, excluindo os íons de carga simples. A aquisição dos dados foi gerenciada pelo aplicativo Hystar, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha). Os espectros de massas foram processados com o auxílio dos aplicativos Data Analysis, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando-se as configurações padrões para proteômica. As listas de picos foram geradas no formato *extensible mark-up language* (*.mzXML) pelo aplicativo CompassXport, versão 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha).

2.3.1. Identificação das Proteínas

As listas de massas foram confrontadas contra as sequências de proteínas do banco de dados referente ao táxon de *Oreochromis niloticus* (carregado em 13/09/2021, com 75.971 entradas). A comparação foi realizada pelo aplicativo PEAKS, versão 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá) [41]. Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina não considerando a ocorrência de clivagem perdida; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Tolerância de erro para o íon parental e para os fragmentos foi de 0,2 Da, considerando a análise de íons com carga +2, +3 e +4. As proteínas foram consideradas identificadas quando apresentassem, pelo menos, dois peptídeos únicos com FDR (*False Discovery Rate*) menor que um por cento. As sequências de peptídeos que não alinharam com nenhuma das proteínas foram preditas pelo método de sequenciamento *de novo*, por meio do algoritmo *de novo only*, o qual está inserido na plataforma do aplicativo PEAKS, versão 7.0 [42].

2.3.2. Caracterização da composição de aminoácidos dos MCP's

As sequências de aminoácidos dos peptídeos de colágeno marinho (MCP's), obtidas a partir dos dados de espectrometria de massa, foram submetidas a quantificação de aminoácidos

pela ferramenta ProtParam - ExPASy (SIB Swiss Institute of Bioinformatics., Suíça).

2.4. Ensaios *in vitro*

2.4.1. Ensaio de Citotoxicidade/ Proliferação

Os ensaios de citotoxicidade/proliferação foram realizados em triplicata com a linhagem celular de Macrófago RAW 264.7 para definição dos compostos extraídos da tilápia com efeitos mais promissores para o ensaio de proliferação e migração celular. As células foram suplementadas com Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) a 37 ° C em atmosfera com 5% de CO₂. As células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas a uma placa de cultura de 96 poços por um período de 24 horas a 37 ° C e 10% CO₂. Para realização dos testes, as células foram tratadas com homogenato com diferentes tempos de hidrólise (0h, 2h, 4h, 6h e 19h) diluídos em meio suplementado com 10% de SFB por um período de 24 horas. A estes diferentes hidrolisados demos o nome de T0, T2, T4, T6 e T19. Logo após, foi realizado o ensaio de MTT, previamente descrito por [43], para verificar a viabilidade celular. Para análise de MTT, os meios foram removidos dos poços após o período de 22 horas e adicionados 50 µL de brometo de metiltiazolildifeniltetrazólio (MTT) por poço, sendo novamente incubado por um período de 2 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, foi retirado 100 µL do sobrenadante e adicionado 90µL de DMSO por poço. As placas foram homogeneizadas por 5 minutos e a absorbância determinada a 570nm, utilizando um leitor de placa Multiskan™ FC. A taxa de viabilidade celular em porcentagem foi obtida pela seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular} - OD570 (\text{amostra}) / OD570 (\text{controle}) \times 100\%$$

Onde os valores de densidade óptica (OD) das amostras e o controle são codificados como OD570 (amostra) e OD570 (controle).

2.4.2. Ensaio de Arranhadura (*Scratch assay*)

Para o ensaio de arranhadura foi utilizada a linhagem celular de Macrófago RAW 264.7 cultivadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, suplementada com 10% de soro bovino fetal, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) a 37 ° C em atmosfera com 5% de CO₂. O ensaio foi realizado em triplicada. As células foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 5×10^3 células/poço e depois cultivadas durante 24h em monocamadas de células. Uma ponta de pipeta de 1000 µL foi usada para criar um arranhão uniforme na monocamada de células. Os resíduos de células não aderidas foram removidas por lavagem com PBS por duas vezes. O grupo controle foi tratado com DMEM + 10% de SFB, e os grupos testes foram realizados com (os compostos T0, T2, T4, T6 e T19). O fechamento do

arranhão foi observado usando um microscópio de luz invertido Leica, e a área dos arranhões calculada com o software Image J. A taxa de fechamento do arranhão em porcentagem foi obtida pela seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de fechamento do arranhão (\%)} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100\%, \text{ onde } A_0 \text{ é a área do arranhão no tempo } 0 \text{ e } A_t \text{ é a área do arranhão na hora designada.}$$

2.5. Ensaios *in vivo*

2.5.1. Animais

Foram utilizados 30 camundongos (C57) knockout para IL-10, com peso médio de 28 ± 2 g, com 20 semanas de idade. Os animais foram alocados aleatoriamente em grupos no Biotério do Departamento de Nutrição (Laboratório de Nutrição Animal /UFV). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com ciclos de 12 horas de claridade e 12 horas de escuridão e temperatura controlada (24 ± 2 ° C, 60-70% umidade). Os animais tiveram acesso a água e ração comercial *ad libitum*. Todos procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal para o Uso de Animais em pesquisa, adotada pela Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV: 02/2020).

2.5.2. Delineamento Experimental

Os animais foram distribuídos randomicamente em três grupos com 10 animais em cada. Grupo: C, recebeu 50µL água destilada (controle); T1: 25µL do composto peptídico T19 (18,75 µg/mL) e T2: 50µL do composto peptídico T19 (37,5 µg/mL). As doses foram escolhidas com base em estudos da literatura e análises *in vitro*. A administração dos tratamentos foi realizada através de uso tópico por 9 dias. Após este período, os animais foram submetidos à eutanásia por excesso de anestésico.

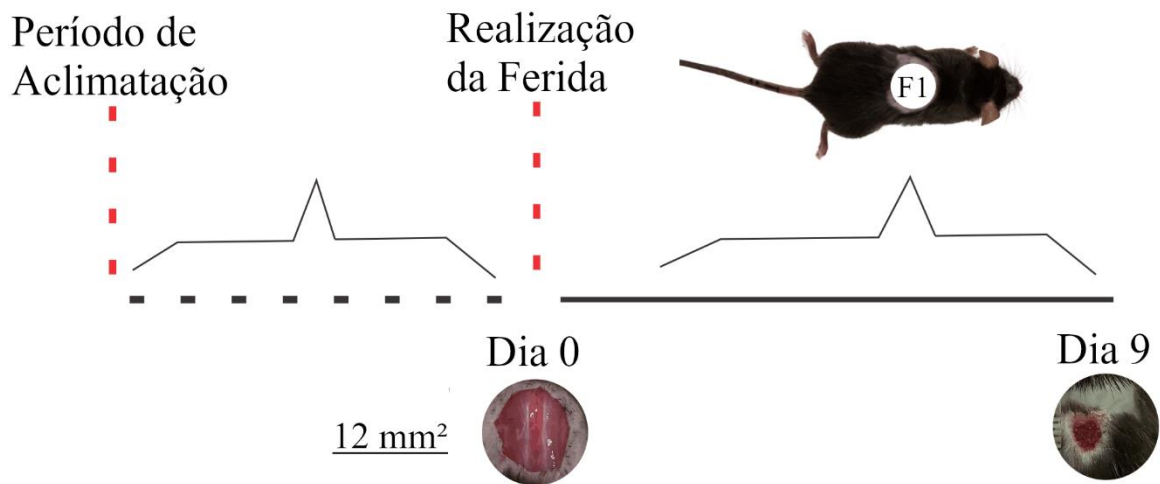


Figura 1. Representação do modelo experimental de cicatrização de feridas de segunda intenção e evolução da ferida em relação ao tempo de exposição ao composto peptídico T19. A imagem superior mostra a distribuição da ferida excisional no dorso do animal (F1). A aparência geral da ferida inicial (dia 0) e a evolução da cicatrização no (dia 9) após receber o T19 é representado por fotomicrografias. A área da ferida foi calculada no dia 0 e 9 (média \pm DP), com base em imagens digitalizadas.

2.5.3. Feridas Cirúrgicas

Os camundongos foram anestesiados com uma dose de injeção intraperitoneal do composto contendo cetamina e xilazina (10 mg/kg). Após a anestesia, foi realizada com o auxílio de uma máquina de corte a depilação dorsolateral dos animais, e a área foi limpa com álcool 70%. A área da ferida foi marcada com cristal violeta e medida com um paquímetro analógico (Mitutoyo Sul Americana Ltda®, São Paulo, Brasil) [44]. Uma ferida circular de segunda intenção de 12mm² de diâmetro foi feita na região dorso-lateral de cada camundongo, até a exposição da fáscia muscular dorsal utilizando tesouras cirúrgicas. Amostras de tecido foram obtidas a partir da ferida nos dias 0 e 9 após a realização da mesma. Estas amostras foram usadas para análises histológicas, bioquímicas e imunoistoquímicas.

2.5.4. Cálculo da área e da taxa de contração da ferida

A área e a taxa de contração da ferida foram avaliadas em 9 dias usando imagens digitalizadas com 4032 x 3024 pixels (dual câmera 12 Mp + 12 Mp) obtidas pelo smartphone Samsung Galaxy S9 Plus (Samsung, Manaus, Brasil). O índice de contração da ferida ICF (%) foi calculado pela proporção: área inicial da ferida (A₀) - área em um determinado dia (A_i) / área inicial da ferida (A₀) \times 100 [45].

2.5.5. Análise Histológica

As amostras coletadas das feridas, com tecido do centro da lesão e parte do tecido adjacente às bordas das lesões, foram fixadas em solução de Karnovsky, desidratadas em álcool etílico, diafanizadas em xilol e imersas em parafina. Cortes histológicos (4 μ m de espessura) foram obtidos em micrótomo rotativo (Leica Multicut® 2045, Reichert-Jung Products, Germany). Usamos 1 em cada 10 cortes para evitar a repetição da análise da mesma área histológica. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise de células e vasos sanguíneos [44]. A visualização das lâminas e a captação das imagens foram realizadas por meio do microscópio de luz Leica DM 750, acoplado a uma câmera fotográfica digital modelo Leica MC170 HD. Para cada corte corado com HE foram obtidas, de forma randomizada, dez imagens com resolução de 2048 x 1536 pixels, com objetiva de 20x. A partir das imagens digitalizadas, foi realizada a contagem de vasos sanguíneos, com o uso de uma grade de 216 intersecções associada ao software de análise de imagens Image Pro-plus 4.5 (Media Cybernetics®, Silver Spring, USA).

2.6. Análises dos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes

Fragmentos de tecido foram coletados de cada ferida e imediatamente congelados em nitrogênio líquido (-196 ° C), e armazenados em um freezer a -80 ° C. As amostras foram homogeneizadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS), amostra de 100 mg e 1 mL de PBS, e centrifugada por 5 minutos a 10000g (12.000 rpm) sob refrigeração a 5° C [46].

2.6.1. Produção de Peróxido de Hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi medida em sobrenadantes de homogenatos de tecidos. 50 μ L de sobrenadante foram incubados com 50 μ L de o-fenilenodiamina (OPD), e um volume igual de peroxidase tipo II 15 mmol / L. A conversão da absorbância em concentrações micromolares de H₂O₂ foi calculada a partir de uma curva padrão usando uma concentração conhecida de H₂O₂. Os resultados foram expressos como μ mol/L [47].

2.6.2. Análise de Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) foi quantificado indiretamente por meio da detecção de níveis de nitrito / nitrato (NO₂⁻ / NO₃⁻) pela reação de Griess padrão [48]. 50 μ L de sobrenadantes foram incubados com um volume igual de reagente de Griess, (1% sulfanilamida, 0,1% N- (1-Naftil) etilenodiamina e 2,5% H₃PO₄) e mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos. A conversão de absorbância nas concentrações micromolares de NO foram obtidas a partir de uma

curva padrão de nitrito de sódio (0-125 μ M) e expressas como concentrações de NO (μ mol x L⁻¹).

2.6.3. Determinação de Malondialdeído

A peroxidação lipídica (LPO) foi estimada de acordo com os níveis totais de malondialdeído (MDA) [34]. A concentração de MDA foi determinada usando a curva padrão de concentrações de 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (TMPO). Os resultados foram expressos como μ mol x L⁻¹ por mg de proteína.

2.6.4. Atividade de Superóxido Dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pelo método usando a redução do superóxido (O⁻²) e peróxido de hidrogênio, diminuindo assim a auto-oxidação de pirogalol [49]. A atividade de SOD foi calculada como unidades por miligrama de proteína, com uma unidade (U) de SOD definida como a quantidade que inibiu a taxa de autooxidação do pirogalol em 50%.

2.6. Análise de expressão de citocinas

Amostras de tecido cicatricial, coletadas nos dias 0 e 9, foram congeladas a -80 ° C, homogeneizadas em tampão PBS 7,4 contendo 0,05% de Tween e centrifugadas a 3500g, por 30 minutos. O sobrenadante foi analisado com a utilização de kits de imunoensaio, pela BD Cytometric Bead Array (CBA) / Mouse Th1 / Th2 do segmento de citometria BD notas (CBA) (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Os dados foram coletados usando FACSCalibur e analisados com o uso do sistema de software FCAP 3.0 (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). As dosagens das citocinas IL-2 (interleucina-2), IL-4 (interleucina-4) e IFN- γ (Interferon- γ) foram fornecidas para citometria de fluxo, de acordo com as recomendações do fabricante.

2.7. Análise de Imunohistoquímica

Para a análise imunohistoquímica, as amostras de tecido foram cortadas em pequenos fragmentos e colocados em solução tampão, PBS- T (1%), durante 1 hora e 30 minutos, trocando a solução a cada 30 minutos, para propiciar a abertura da membrana, permitindo, assim, a entrada do anticorpo. Após esta etapa, foi retirada toda a solução tampão e acrescentado 40 μ l de anticorpo diluído, sendo então, armazenado na geladeira por 48 horas. Foram utilizadas as soluções de anticorpos primários nas seguintes proporções (Anti-CD31 – 1/500, Anti-CD

163 – 1/500, Anti-MMP (PCNA) – 1/500, Anti-COX-2 – 1/1000, Anti-Ki 67 – 1/500). Logo depois, os frascos foram lavados com TBS, a fim de lavar os anticorpos primários e evitar a super marcação. Então, foi adicionado 40 µl de Isotiocianato de fluoresceína (FITC) como anticorpo secundário, acondicionado overnight. Em seguida, as amostras passaram pelo processo de desidratação e inclusão na resina. Todas as etapas foram realizadas no escuro. Depois de finalizado o protocolo imunohistoquímico, foram obtidas fotografias, através do microscópio EVOS™ M5000 Imaging System da Thermo Fisher Scientific. Posteriormente, as fotografias foram editadas no programa *GIMP* versão 2.10.24, para que permanecessem apenas as estruturas marcadas pela técnica de imunohistoquímica nas imagens. E então, as imagens já editadas foram analisadas no programa *Image J* versão 1.42q, para a contagem de estruturas marcadas.

2.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média ± DP) e uma análise de variância one-way ANOVA foi feita seguido pelo teste paramétrico de Student- Newman-Keuls. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Hidrólise Enzimática

Após a hidrólise enzimática realizada com a enzima tripsina, foram obtidos 5 diferentes compostos de acordo com o seu tempo de incubação, sendo T0, T2, T4, T6 e T19. A análise de Bradford determinou o nível de concentração peptídica contida nas dosagens de 25 e 50 microlitros do composto peptídico T19, que foi de 18,75 µg/mL e 37,5 µg/mL, respectivamente.

3.2. Análise de LC/MS-MS

3.2.1. Caracterização dos peptídeos

Após as análises do composto peptídico T19, foi gerado como resultado um relatório com as descrições das proteínas e sequências de aminoácidos dos peptídeos presentes na amostra. A relação proteína/peptídeo encontrada, contém: 16 proteínas (identificadas com 1 ou mais peptídeos, com pesos moleculares menores que 2 kDa (Tabela 1)); 2 proteínas não caracterizadas identificadas pelo BLASTp (Tabela 2); e 136 TAGs (sequências que não alinharam com as proteínas identificadas (Anexo 1)).

3.2.2. Composição de aminoácidos de MCP's

Os peptídeos do colágeno tipo 1 (alfa 1, 2 e 3) da pele da tilápia-do-Nilo foram analisados em termos de composição, quantificação e a proporção (%) de aminoácidos e os resultados são mostrados na Tabela 3. Os MCP's (Peptídeos de Colágeno Marinho), da pele da tilápia-do-Nilo continha nove aminoácidos essenciais, dos quais cinco apresentaram resíduos (11,76%) e treze aminoácidos não-essenciais, dos quais nove apresentaram resíduos (88,24%). A quantidade de glicina, prolina e alanina como os principais aminoácidos em MCP's representou 33,6%, 16% e 16%, respectivamente. Esses eram consistentes com a sequência Gly-Pro-Ala. O conteúdo de aminoácidos (glicina, prolina e alanina) presente nos MCP's foram 78 resíduos por 119 aminoácidos totais. A partir da composição de aminoácidos, a maioria dos resíduos em MCP's eram hidrofílicos, como glicina, ácido glutâmico, arginina, ácido aspártico, lisina, serina, valina, leucina e isoleucina, que representaram mais de 56% do total de resíduos.

Tabela 1. Sequências de peptídeos que se alinharam as proteínas provenientes do hidrólizado da pele da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Database identification			
Accession	Description	Mass (Da)	Peptide Sequence
I3KV11 I3KV11_ORENI	Uncharacterized protein OS=Oreochromis niloticus OX=8128 GN=LOC100707505 PE=3 SV=2	1252,6564 1160,644 1165,5503 1005,5131	LFLQNFSASAR IGVDEFAALVK SGFIEDELK AFAVIDQDK
G9M6I5 G9M6I5_ORENI	Collagen type I alpha 1 OS=Oreochromis niloticus OX=8128 GN=COL1A1 PE=2 SV=1	868,4402 798,3871 1114,5002	GPSGAAGAPGK GDTGPAGPK EGTPGNEGAAGR
I3JLI3 I3JLI3_ORENI	Creatine kinase OS=Oreochromis niloticus OX=8128 GN=CKM PE=3 SV=2	1092,5452	TDLNFENLK
I3JS34 I3JS34_ORENI	Nucleoside diphosphate kinase B OS=Oreochromis niloticus OX=8128 PE=3 SV=2	1190,5389	FVQASEDHMK
I3KW15 I3KW15_ORENI	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Oreochromis niloticus OX=8128 GN=ald PE=3 SV=1	1317,6776	GILAADESTGSVAK
I3J1U5 I3J1U5_ORENI	EF-hand domain-containing protein OS=Oreochromis niloticus OX=8128 GN=LOC100692640 PE=3 SV=2	1238,5415	AFLSAGDSGDGK
A0A669BE09 A0A669BE09_ORENI	USP domain-containing protein OS=Oreochromis niloticus OX=8128 GN=pan2 PE=4 SV=1	655,4269	VINLVV
I3JTB6 I3JTB6_ORENI	Plasminogen activator urokinase a OS=Oreochromis niloticus OX=8128 PE=4 SV=2	905,4971	NKPGVYTK
A0A669E4X1 A0A669E4X1_ORENI	GLOBIN domain-containing protein OS=Oreochromis niloticus OX=8128 GN=LOC102080222 PE=3 SV=1	1058,5356	SAEIGGEALGR
G9M6I7 G9M6I7_ORENI	Collagen type I alpha 3 OS=Oreochromis niloticus OX=8128 GN=COL1A3 PE=2 SV=1	1095,4945 699,3551 1519,7378 1280,6472	GNNGDPGPSGPK GVDGAPGK GESGPSGPAGPAGPAGVR GEAGAVGVAGPSGPR

G9M6I6 G9M6I6_ORENI	Collagen type I alpha 2 OS=Oreochromis niloticus OX=8128 GN=COL1A2 PE=2 SV=1	1126,5002 768,3878 1172,6149	EGPAGPSGQDGR GASGPAGPR TGEIGATGLAGAR
B9A9D4 B9A9D4_ORENI	Myoglobin OS=Oreochromis niloticus OX=8128 GN=Mb PE=2 SV=1	1107,5812 1155,5996	VIADLEASYK AGLDAAGQQGLR
A0A669DS57 A0A669DS57_ORENI	Uncharacterized protein OS=Oreochromis niloticus OX=8128 GN=LOC100702068 PE=3 SV=1	1187,5417	GEVDDAVQEAR
A0A669FBF2 A0A669FBF2_ORENI	Serotransferrin OS=Oreochromis niloticus OX=8128 GN=LOC100691316 PE=3 SV=1	1197,5414	FGNTGTDPSFR
A0A669DTG7 A0A669DTG7_ORENI	HECT domain E3 ubiquitin protein ligase 4 OS=Oreochromis niloticus OX=8128 GN=HECTD4 PE=4 SV=1	692,3857	LLEYR
A0A669CD06 A0A669CD06_ORENI	L-lactate dehydrogenase OS=Oreochromis niloticus OX=8128 PE=3 SV=1	1190,6217	SVADLVESIMK

Tabela 2. Sequências de peptídeos que se alinharam as proteínas não caracterizadas oriundas da pele da tilápia-do-Nilo identificadas a partir do BLASTp.

BLASTp Identification							
Accession UNIPROT	Accession NCBI	Description	Organism	Total Score	Query Cover	e-Value	Per. Ident.
I3KV11 I3KV11_ORENI	XP_013129480	parvalbumin beta	<i>Oreochromis niloticus</i>	208	70%	9,00E-67	100.00%
A0A669DS57 A0A669DS57_ORENI	XP_019213375	myosin heavy chain, fast skeletal muscle	<i>Oreochromis niloticus</i>	3835	100%	0.0	97.83%

Tabela 3. Composição e quantificação de aminoácidos derivado dos peptídeos que se alinharam as proteínas de colágeno tipo I (alfa 1, 2 e 3) presentes na pele da tilápia-do-Nilo.

Amino acid composition		
Amino Acid	Residues Per 119 Total Amino Acid Residues	(%)
Ala (A)	19	16.0%
Arg (R)	6	5.0%
Asn (N)	3	2.5%
Asp (D)	4	3.4%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	1	0.8%
Glu (E)	6	5.0%
Gly (G)	40	33.6%
His (H) *	0	0.0%
Ile (I) *	1	0.8%
Leu (L) *	1	0.8%
Lys (K) *	4	3.4%
Met (M) *	0	0.0%
Phe (F) *	0	0.0%
Pro (P)	19	16.0%
Ser (S)	7	5.9%
Thr (T) *	4	3.4%
Trp (W) *	0	0.0%
Tyr (Y)	0	0.0%
Val (V) *	4	3.4%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
Total	119	100%

Nota: * aminoácidos essenciais

3.3. Análises in vitro

3.3.1. Ensaio de Citotoxicidade/Proliferação

Nenhuma citotoxicidade foi observada após a exposição das células de macrófagos ao homogenato liofilizado e ao T19. Além disso, a maior taxa de proliferação e migração celular foi observada no T19 após uma incubação de 24h e contendo 37,5 µg/mL. (Figura 2a e 2b).

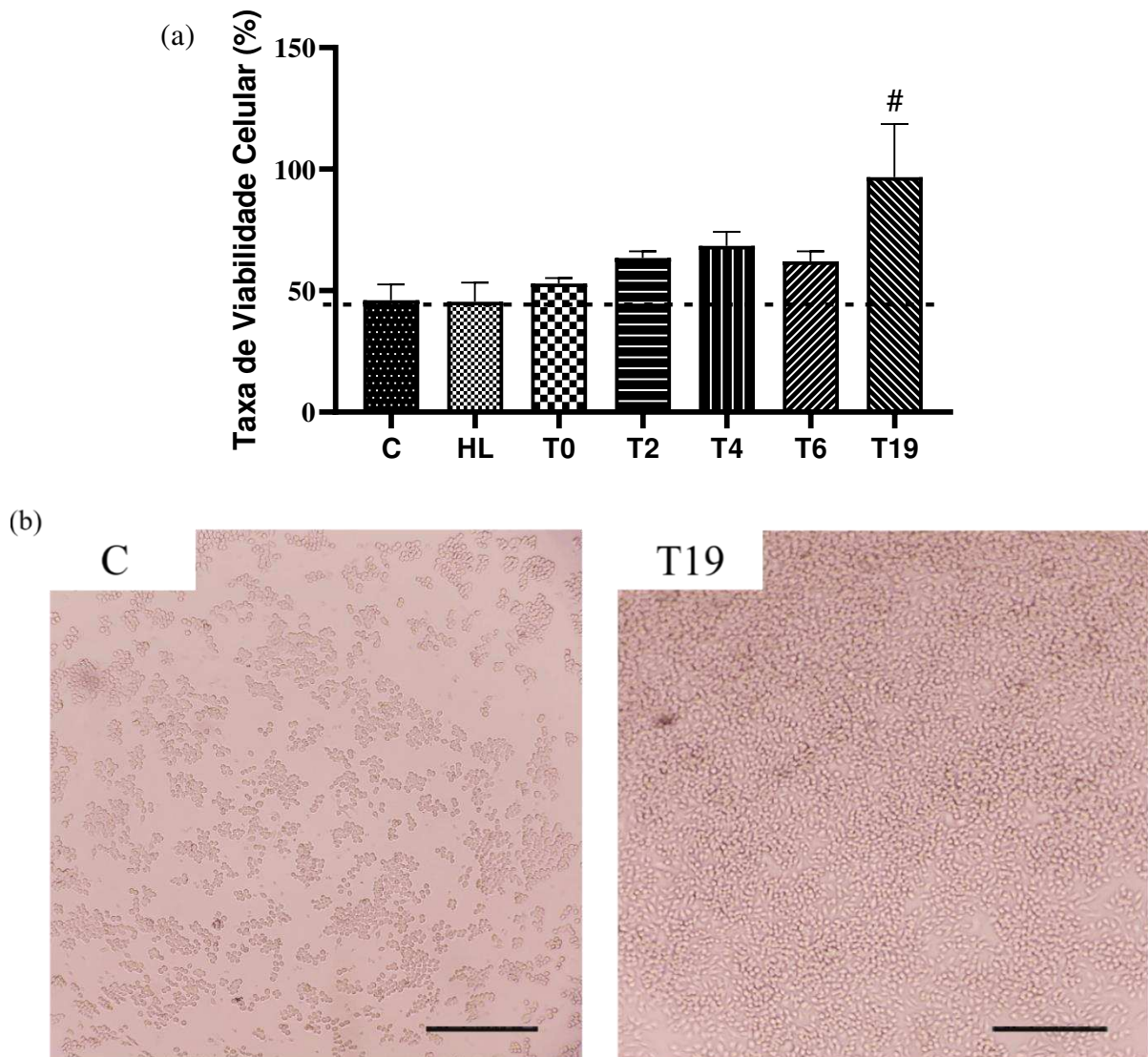


Figura 2. Efeitos dos hidrolisados em cultura de macrófagos RAW 264.7 no ensaio de citotoxicidade/proliferação. (a) Gráfico estatístico dos resultados da viabilidade celular. (b) fotomicrografias ilustrando a confluência de células macrófagos RAW 264.7 em C (grupo controle: células cultivadas em DMEM c/ SFB 10%) e grupo T19. Bar = 100 μ m. No gráfico, os dados são representados como média e desvio padrão. O símbolo # representa diferença estatística entre C (controle), HL (Homogenato liofilizado), T0, T2, T4 e T6. Teste paramétrico de Student- Newman-Keuls, $p < 0,05$.

3.3.2. Efeito do T19 no ensaio de Arranhadura (*Scratch assay*)

Os efeitos de diferentes tempos de hidrólises (T0, T2, T4, T6 e T19) no processo de cicatrização foi investigado usando o ensaio de arranhadura *in vitro* com células macrófagos RAW 264.7. A taxa de fechamento do risco foi calculada após 24h e o resultado foi apresentado na Figura 3. A amostra não hidrolisada (T0) não demonstrou ter resultado significativo se comparado ao grupo controle. As amostras hidrolisadas em T2, T4, T6 e T19 potencializaram

a proliferação e a migração celular, sendo que foi na hidrólise T19 que o composto apresentou maior potencial migratório quando comparado aos demais grupos.

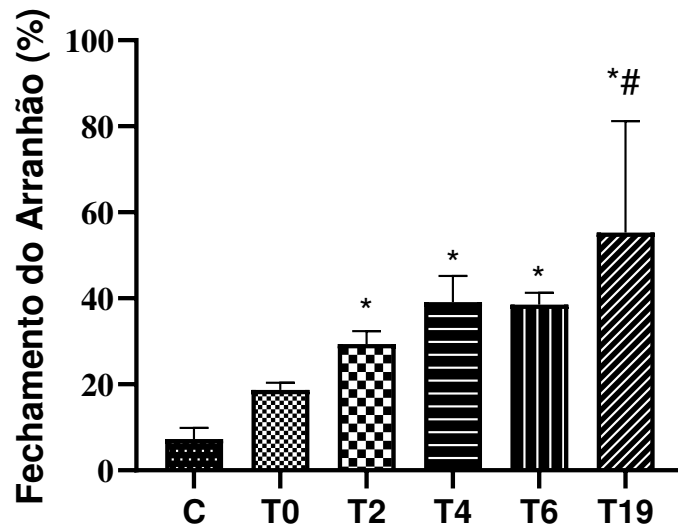


Figura 3. Efeitos de diferentes tempos de hidrólises no ensaio de arranhadura *in vitro* com Macrófagos RAW 264.7. C: grupo controle (células cultivadas em DMEM c/SFB 10%) T0, T2, T4, T6 e T19 (grupos teste tratados com homogenato liofilizado da pele da tilápia-do-Nilo em diferentes tempos de hidrólises 0h, 2h, 4h, 6h e 19h). A avaliação da contração ocorreu após 24h. No gráfico, os dados são representados como média e desvio padrão. O símbolo * representa diferença estatística entre C (controle); e # representa diferença estatística entre T0. Teste paramétrico de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$.

3.4. Análises *in vivo*

3.4.1. Área da ferida e índice de contração

A área da ferida foi menor no grupo T2, tratado com 50 μL do composto peptídico T19 (37,5 $\mu\text{g/mL}$), e T1, tratado com 25 μL do composto peptídico T19 (18,75 $\mu\text{g/mL}$), quando comparado ao grupo controle tratado com 50 μL de água destilada (Figura 4a). O índice de contração da ferida foi maior no grupo T2 e T1 respectivamente, quando comparados ao controle no 9º dia (Figura 4b e 4c).

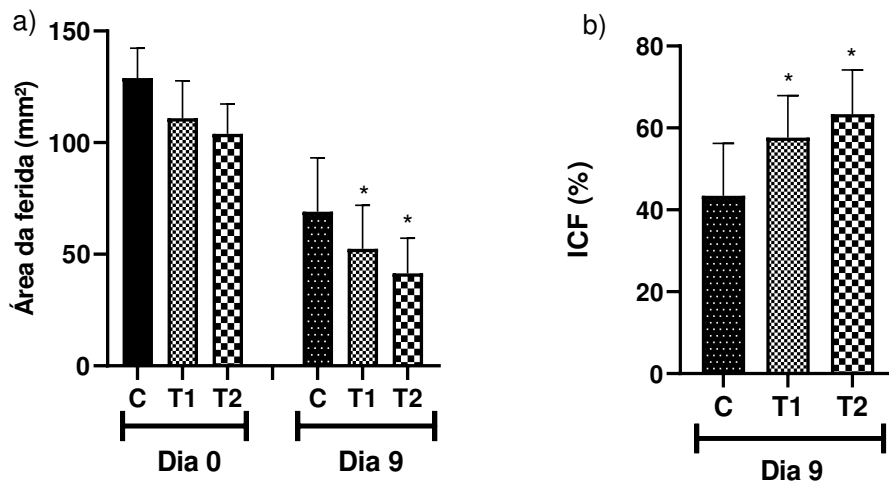
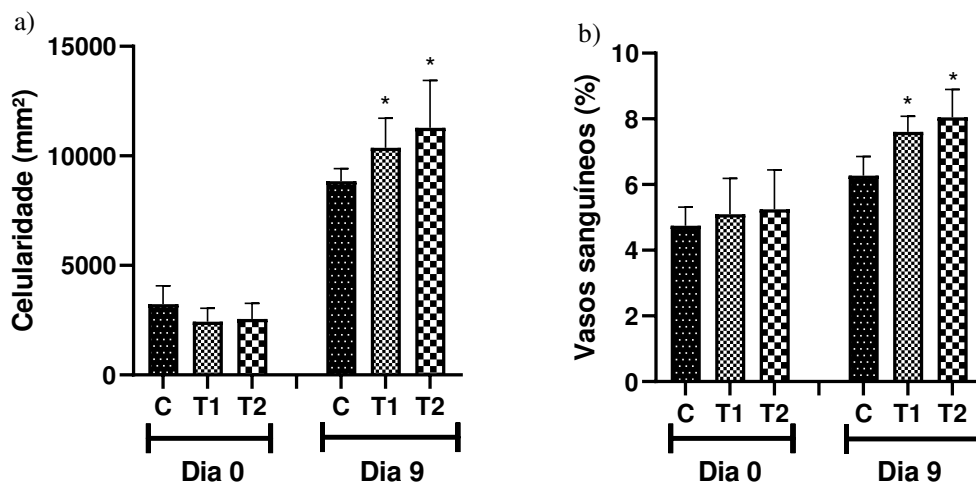


Figura 4. Representação da área da ferida (mm²) (a). ICF (%) = índice da contração da ferida em porcentagem (b). Grupo: C, recebeu 50 µL de água destilada (controle); T1: recebeu 25 µL do composto peptídico T19 (18,75 µg/mL) e T2 recebeu 50 µL do composto peptídico T19 (37,5 µg/mL). Administração da dose por via tópica. Nos gráficos, os dados são representados como média e desvio padrão. O símbolo * representa diferença estatística entre o C (controle). Teste paramétrico de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$.

3.4.2. Resultados Histopatológicos

No dia 9, a proporção de células e vasos sanguíneos do grupo T1 e T2 foram maiores quando comparado ao grupo controle. Porém, o resultado mais expressivo, é observado no grupo T2 (Figura 5a e 5b). A distribuição representativa de células e vasos sanguíneos na cicatriz do tecido dos diferentes grupos é mostrado na Figura 5c.



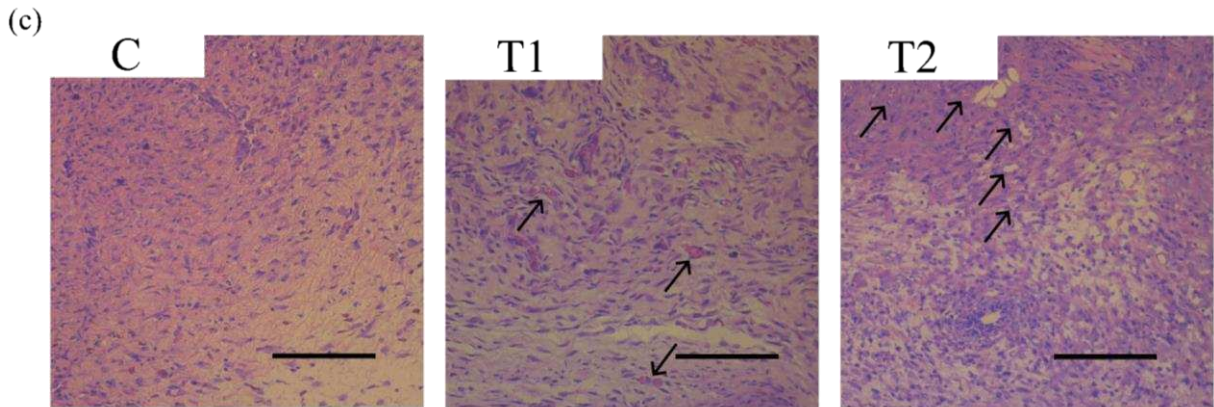


Figura 5. (a) celularidade, (b) vasos sanguíneos e (c) fotomicrografias mostrando células e vasos sanguíneos no tecido cicatricial de camundongos (C57) knockout IL-10 tratados com hidrolisado da pele da tilápia-do-Nilo no nono dia, bar = 100 μ m. Grupo: C, recebeu 50 μ L de água destilada (controle); T1: recebeu 25 μ L do composto peptídico T19 (18,75 μ g/mL) e T2 recebeu 50 μ L do composto peptídico T19 (37,5 μ g/mL). Nos gráficos, os dados são representados como média e desvio padrão. O símbolo * representa diferença estatística entre C (controle). Teste paramétrico de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$.

3.5. Resultados dos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes

3.5.1. Enzima Antioxidante

Os valores para a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) não foi diferente entre os grupos após a exposição aos compostos (Figura 6a).

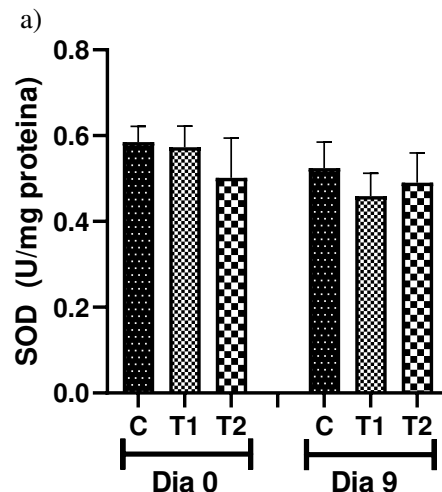


Figura 6. Níveis de (a) superóxido dismutase (SOD), no tecido cicatricial de camundongos (C57) knockout IL-10 tratados com hidrolisado da pele da tilápia-do-Nilo. Grupo: C, recebeu 50 μ L de água destilada (controle); T1: recebeu 25 μ L do composto peptídico T19 (18,75 μ g/mL) e T2 recebeu 50 μ L do composto peptídico T19 (37,5 μ g/mL). No gráfico, os dados são representados como média e desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os grupos. Teste paramétrico de Student-Newman-Keuls, $p > 0,05$.

3.5.2. Avaliação de marcadores de estresse oxidativo

No dia 9, os níveis de H_2O_2 foram maiores nos grupos tratados com T1 e T2, em relação ao grupo controle (Figura 7a). As concentrações de óxido nítrico (NO), foram maiores nos grupos tratados com T1 e T2, quando comparado ao grupo controle no dia 9. Porém, o resultado mais expressivo, é observado no grupo T2. (Figura 7b). Os níveis de malondialdeído (MDA) não foram significativamente diferentes durante o período de teste (Figura 7c).

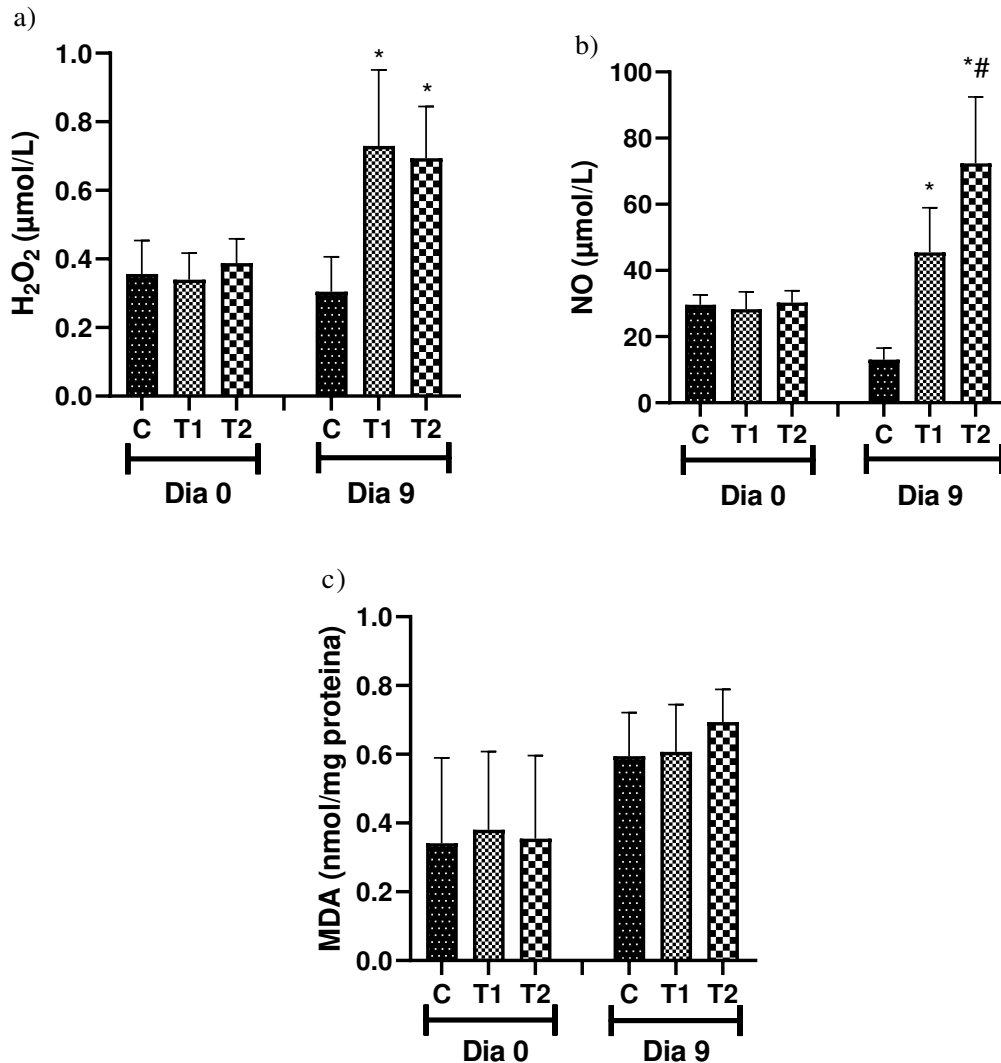


Figura 7. Níveis de (a) peróxido de hidrogênio (H_2O_2), (b) óxido nítrico (NO) e (c) malondialdeído (MDA), no tecido cicatricial de camundongos (C57) knockout IL-10 tratados com hidrolisado da pele da tilápia-do-Nilo. Grupo: C, recebeu 50 μL de água destilada (controle); T1: recebeu 25 μL do composto peptídico T19 (18,75 $\mu\text{g/mL}$) e T2 recebeu 50 μL do composto peptídico T19 (37,5 $\mu\text{g/mL}$). No gráfico, os dados são representados como média e desvio padrão. O símbolo * representa diferença estatística entre o C (controle); e # representa diferença estatística entre T1. Teste paramétrico de Student-Newman-Keuls. $P < 0,05$.

3.6. Análise de citocinas pró e antiinflamatórias em tecido cicatricial

Em relação ao perfil inflamatório, observou-se que as citocinas pró-inflamatórias (IL-2 e INF- γ) foram elevadas nos grupos T2 no dia 9, quando em comparação com os outros grupos (Figura 8a e 8b). Ao analisar o marcador anti-inflamatório (IL-4) no dia 9, observa-se que os animais que receberam o T2 apresentaram níveis mais elevados, quando comparado ao T1 e ao grupo controle no mesmo dia.

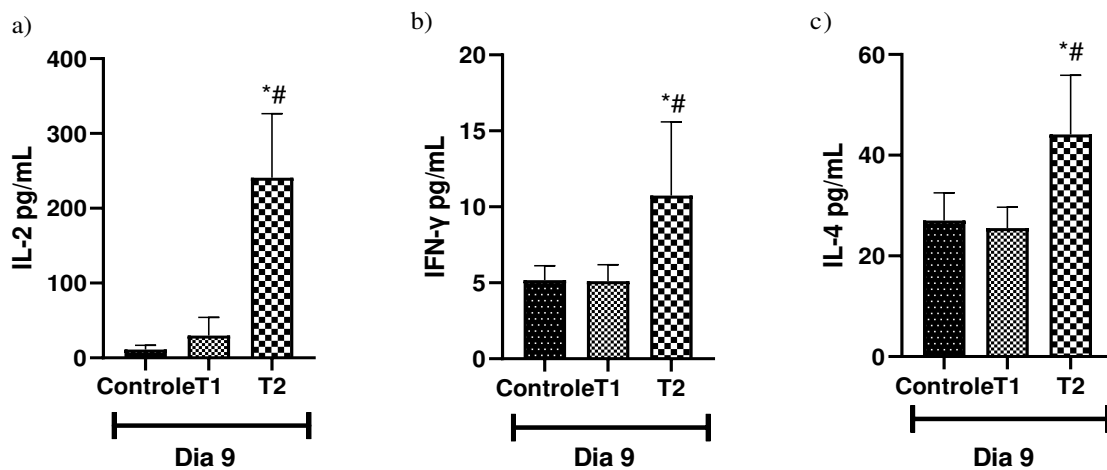


Figura 8. Níveis de citocinas pró-inflamatórias: a-Interleucina-2 (IL-2), b-Interferon gama (INF-gama) e citocinas anti-inflamatórias: c-Interleucina-4 (IL-4) no tecido cicatricial de camundongos (C57) knockout de IL-10 no dia 9. Grupo: C, recebeu 50 μ L de água destilada (controle); T1: recebeu 25 μ L do composto peptídico T19 (18,75 μ g/mL) e T2 recebeu 50 μ L do composto peptídico T19 (37,5 μ g/mL). No gráfico, os dados são representados como média e desvio padrão. O símbolo * representa diferença estatística entre o C (controle); e # representa diferença estatística entre T1. Teste paramétrico de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$.

3.7. Imunohistoquímica

No dia 9, os níveis dos marcadores de CD31 e PCNA foram maiores nos grupos tratados com T1 e T2, em relação ao grupo controle (Figura 9a e 9e). Os níveis dos marcadores CD163 e COX-2 foram menores no grupo T1 e T2 quando comparado ao controle, no dia 9, sendo a diferença mais expressiva observada no T2 (Figura 9b e 9c). O nível do marcador para Ki67 foi maior no grupo tratado com T2, quando comparado ao T1 e ao controle respectivamente (Figura 9d).

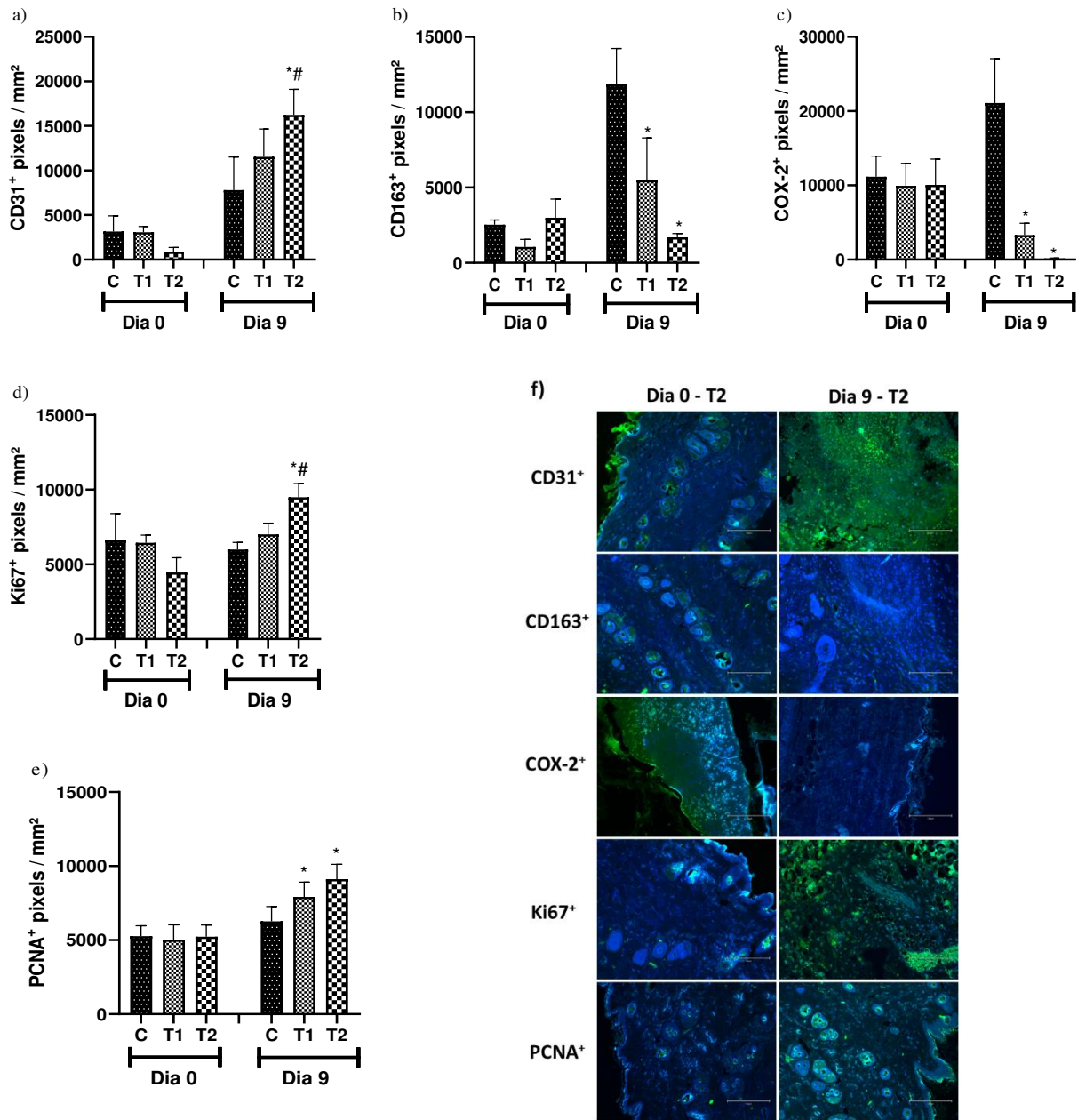


Figura 9. Níveis de marcações positivas: a) CD31⁺; b) CD163⁺; c) COX-2⁺; d) Ki67⁺; e) PCNA⁺ e f) fotomicrografia ilustrando os marcadores no tecido de camundongos (C57) knockout de IL-10 nos dias 0 e 9. Grupo: C, recebeu 50 μ L de água destilada (controle); T1: recebeu 25 μ L do composto peptídico T19 (18,75 μ g/mL) e T2 recebeu 50 μ L do composto peptídico T19 (37,5 μ g/mL). Os resultados são apresentados como quantidade de pixels por mm² por campo analisado. No gráfico, os dados são representados como média e desvio padrão. O símbolo * representa diferença estatística entre o C (controle); e # representa diferença estatística entre T1. Teste paramétrico de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

Atualmente, a identificação de peptídeos animais com propriedades curativas tem aberto uma nova perspectiva para o tratamento de feridas cutâneas [29,50,51]. Em nosso estudo, observamos que o composto hidrolisado da pele da tilápia-do-Nilo T19 apresentou resultados eficaz no processo de reparo cutâneo. Segundo Alves et. al. (2020), resultados positivos em relação a diminuição da área da ferida foi encontrado no tecido de feridas cutâneas infectadas após a exposição a peptídeos obtidos a partir da pele da tilápia-do-Nilo [52]. Este efeito possivelmente ocorre porque algumas AMPs (Peptídeos Antimicrobianos), presentes na pele da tilápia-do-Nilo, possuem potente efeito microbicida, além de atuar na modulação indireta do sistema de defesa do hospedeiro através do aumento do sistema imunológico e da resposta celular [53]. Essa característica vem sendo associadas a presença dos peptídeos piscidina 3 (TP3) e piscidina 4 (TP4), ambos originários da espécie *O. niloticus* [52]. Além disto, estudos recentes têm sugerido que peptídeos obtidos a partir da hidrolise da pele da tilápia-do-Nilo também apresenta atividades anti-inflamatória, proliferativa, antioxidante, antibacteriana e anti-hipertensiva que podem alterar positivamente o processo de reparo cutâneo [34].

Atráves da hidrolise enzimática do colágeno presente na pele da tilápia-do-Nilo, variados grupos peptídicos podem ser obtidos em diferentes tempos de digestão [54]. Das 16 proteínas identificadas em T19, foram identificados peptídeos do colágeno tipo 1 (alfa 1, 2 e 3) conhecidos como MCP's (Peptídeos de Colágeno Marinho). Diferentes enzimas estão envolvidas na produção de peptídeos a partir do colágeno, sendo elas: bromelaína, ficina, papaína, pepsina, tripsina e quimiotripsina [55]. Um recente estudo publicado, analisou os peptídeos extraídos da pele da tilápia-do-Nilo e foram localizados componentes com menos de 1, 3 e 5 kDa o que representou 73,92%, 95,84% e 99,14%, respectivamente, o que mostrou que os peptídeos do colágeno da pele da tilápia eram compostos principalmente por uma série de polipeptídeos com pequenos pesos moleculares [34, 56]. Os hidrolisados de colágeno geralmente contêm uma alta concentração de tripeptídeos de colágeno com uma sequência Gly-X-Y, em que Gly é o aminoácido glicina; X, quase sempre é prolina e Y, alanina. Em geral, o colágeno contém cerca de 30% de glicina, 12% de prolina e 11% de alanina [57–60]. No presente trabalho a quantidade de glicina, prolina e alanina como os principais aminoácidos em MCP's representou 33,6%, 16% e 16%, respectivamente. Esses eram consistentes com a sequência Gly-Pro-Ala frequentemente observado nas sequências de colágeno (3,4 - 5,5%) [59,61]. A propriedade hidrofílica de MCP's podem ser usadas para melhorar a

histocompatibilidade e absorção [34,57]. No procedimento de preparação e identificação dos MCP's, até o presente momento, não foi encontrado estudos utilizando somente a enzima tripsina, apenas, um complexo de proteases contendo 7% de tripsina, 65% de papaína e 28% de protease alcalina, em busca de extrair peptídeos da pele de Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) [26]. Em outro estudo, já mencionado anteriormente, utilizou-se das enzimas protease neutra e papaína afim de extrair MCP's da pele da tilápia-do Nilo (*O. niloticus*) [34].

A Tripsina é uma serino-protease que age clivando na extremidade C-terminal dos aminoácidos lisina e arginina [62]. Tendo em vista a ampla utilização da tripsina para a caracterização de proteínas usando a espectrometria de massas (bottom up proteomics) [63,64]. No presente estudo somente a enzima tripsina foi utilizada para analisar o seu potencial na geração de MCP's.

O ensaio *in vitro* para avaliar citotoxicidade/proliferação e potencial migratório das células tem se mostrado ferramentas importantes para entender a ação de um composto no processo de cicatrização de feridas e tem sido usadas como um norteador em relação a dose e o tempo de exposição dos compostos, servindo como um guia para a realização de estudos *in vivo* [27,65]. Foi observado que, além do T19 mostrar maior capacidade proliferativa e de migração nestas células quando comparado aos demais hidrolisados, este composto não mostrou efeito citotóxico. Além disto, também foi observado uma maior capacidade proliferativa e de migração após a exposição de 50 µl (37,5 µg/mL). Baseado nisto o composto T19, que apresentou os melhores resultados nos referidos testes *in vitro*, foi escolhido para ser testado no ensaio *in vivo*. Corroborando com os resultados *in vitro*, as análises *in vivo* demonstraram que a dose de 50 µl (37,5 µg/mL) administrada no grupo T2, proporcionou um fechamento mais eficaz da ferida com aumento no índice da taxa de contração da ferida. Este resultado está possivelmente associado a modulação inflamatória promovida pelo composoto [28–30,66].

O processo de cicatrização de feridas é composto por três fases diferentes sobrepostas entre si, e na fase inicial observamos aumento no número de células que são importantes para a produção de mediadores que promovem a evolução do processo cicatricial [9]. Nesta fase as células apresentam elevada atividade metabólica e precisam receber nutrientes e oxigênio para que as funções celulares sejam mantidas, para isto o tecido também apresenta um elevado número de vasos sanguíneos que mantém a homeostase celular [67,68]. No presente estudo, foi observado que no dia nove houve aumento da celularidade e da vascularização tecidual após a exposição de 50 µl de T19 na dosagem de (37,5 µg/mL), quando comparado aos demais grupos.

Estes resultados demonstram o efeito promissor do T19, especialmente nas fases inflamatórias e de proliferação do processo cicatricial, onde o recrutamento de células e a boa vascularização tecidual são imprescindíveis para o correto fechamento da ferida, bem como para a síntese do tecido de granulação, importante arcabouço para a síntese de outros componentes de matriz extracelular [69,70].

Nossos achados de celularidade no dia 9 foram corroborados pelos dados de imunohistoquímica, já que os marcadores CD31, Ki67 e PCNA estavam aumentados nos grupos T1 e T2. CD31 é uma molécula de adesão endotelial plaquetária (PECAM-1), geralmente considerado um sensível marcador endotelial específico [71]. Os aumentos destes marcadores mostram que T19 é eficaz para estimular a neangiogenese e conseqüentemente fornecer um ambiente adequado para o metabolismo celular nas fases iniciais do processo de cicatrização das feridas. Além da nutrição e oxigenação adequadas, a expressão aumentada da CD31 está intimamente relacionada a síntese de componentes da matriz, em especial o tecido de granulação, que confere a ferida uma matriz favorável para a síntese e deposição de outros componentes importantes para formação de um tecido forte e resistente [72,73]. O aumento morfológico observado na celularidade foi corroborado pelo aumento no marcador Ki67, importante marcador de proliferação celular [74] e que se mostrou aumentado também após a exposição ao T19. O aumento deste marcador está intimamente associado ao aumento de CD31, já que para que a célula se divida e repovoe determinado tecido ela precisa de nutriente e oxigênio. Associado a isto, nosso composto também promoveu um aumento na expressão de PCNA, proteína nuclear não histônica que é ativamente expressa no ciclo celular, especialmente na fase S do processo. Esta proteína funciona como uma proteína auxiliar para a DNA polimerase, auxiliando na regulação das passagens pelas diferentes fases do ciclo celular. Se aumento está relacionado a maior capacidade da célula em ciclar e conseqüentemente em dividir [75,76]. O importante papel destas proteínas na evolução do ciclo celular já é conhecido, mas o aumento na sua expressão após a exposição de compostos obtidos a partir da pele da tilápia nunca havia sido relatado antes, o que mostra o potencial inovador do nosso estudo. Esses resultados quando interpretados conjuntamente mostram que o T19 tem ação benéfica para o tratamento de lesões cutâneas, especialmente nas fases iniciais do processo de cura das feridas.

Interessantemente, após a exposição aos compostos T1 e T2 observou-se diminuição nos marcadores CD163 e COX-2. CD163 é um marcador exclusivo de células da linhagem monócito/ macrófago, frequentemente expresso em macrófagos ativados [77]. Sabe-se que

macrófagos positivos para CD163 são encontrados durante a inflamação aguda e na inflamação crônica [78]. Segundo Akila et. al. (2012), macrófagos positivos para CD163 desempenham um papel importante na resolução da inflamação, uma vez que são encontrados em altas taxas nos tecidos inflamados. A expressão do mRNA e da proteína de CD163 é regulada de forma positiva durante o período fagocítico mais comumente na fase de resolução da inflamação [79]. Em nossos achados, observamos que a expressão de CD163 foi significativamente reduzida no grupo T2 no dia 9, em comparação com o controle. Esta redução, pode indicar que T19 promoveu a resolução do processo inflamatório de forma rápida e eficaz, uma vez que o grupo controle apresentou aumento considerável de CD163 em 9 dias. Corroborando com este achado, observamos também diminuição na expressão de COX-2, que é expressa predominantemente em células inflamatórias e regulada positivamente em inflamações crônicas e agudas [80]. A expressão da COX-2 é estimulada por diferentes fatores de crescimento, citocinas e prostaglandinas, que está associada à resposta inflamatória [81]. Quando analisamos conjuntamente os resultados encontrados para CD163 e COX-2 observamos um controle significativo do processo inflamatório, mostrando que nosso composto foi eficaz para evitar o desenvolvimento de uma inflamação crônica e conseqüentemente promoveu um controle de citocinas e outros compostos que são importantes para as fases iniciais do processo inflamatório, mas que se persistirem podem causar lesões teciduais e assim comprometer o processo de cura dos tecidos.

Durante a fagocitose, as células inflamatórias, especialmente macrófagos e neutrófilo produzem uma série de mediadores, citocinas, radicais livres e ERO's que são importante para aumentar a capacidade microbicida dos fagócitos [82,83]. No entanto, se este processo persiste alguns compostos lesivos podem extravasar e lesar os tecidos adjacentes [84]. Entre as ERO's que são liberadas no tecido está o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que podem provocar processos degenerativos e de morte celular nos tecidos comprometendo sua função [85,86]. Supreendentemente, observamos que em nosso estudo houve um aumento de H_2O_2 e NO após a exposição ao T19, no entanto quando analisamos a ação de peroxidação lipídica no tecido através da quantificação de MDA observamos que não houve diferença significativa entre os grupos. Provavelmente isto ocorreu porque o H_2O_2 e o NO produzidos ficaram retidos dentro dos fagócitos para aumentar seu potencial microbicida e não foram extravasados para os tecidos, não produzindo danos nas membranas das células dos tecidos analisados. No entanto, para confirmar esta hipótese seria interessante analisarmos a expressão gênica destes compostos

juntamente com outros marcadores de lesão tecidual, bem como de compostos antioxidantes para estabelecermos uma possível via mecanicista que justifique estes achados.

Outro importante mediador e consequentemente importante marcador no processo de reparo cutâneo são as citocinas. As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo a cicatrização apropriada da ferida [87]. A IL-2 é uma proteína de 15 kDa, produzida principalmente por células-T-CD4 e em menor quantidade por células-T-CD8+. Age através de receptores IL-2R α , IL-2R β e IL-2R γ , usando a via intracelular JAK/STAT (Família Janus de tirosinoquinas/fatores de transcrição) para estimular o crescimento e a proliferação de linfócitos-T e células-B. Também induz a produção de outras citocinas, como, por exemplo, IFN γ (Interferon-gama) e TNF β (fator de necrose tumoral-beta), o que resulta na ativação de monócitos, neutrófilos e células NK [87]. Desse modo, fica evidente que a IL-2 contribui para a geração e a propagação de respostas imunológicas específicas do antígeno e para promoção do processo inflamatório [88,89]. Nossos resultados mostraram um aumento na produção de IL-2 e consequentemente de IFN- γ após 9 dias de exposição ao T19. Interessantemente, os animais usados em nossa pesquisa eram knockout para IL-10, citocina que é produzida principalmente por células CD8⁺ ativadas. A principal função da IL-10 é inibir a produção de IL-2, IL-12 e IFN. Nossos resultados mostraram que mesmo sendo os animais knockout houve aumento na produção de IL-2 e IFN- γ , o que demonstra o potencial de T19 de promover inflamação tecidual especialmente nas fases iniciais do processo. O desenvolvimento da inflamação é a base para que o processo de reparo cutâneo ocorra de forma harmoniosa e segura, por isto é desejável que o processo inflamatório ocorra de forma coordenada e controlada [90,91]. Então a liberação de IL-2 e IFN é desejável nas fases iniciais do processo, agindo na modulação da resposta imunológica de Th1 para Th2. As células Th1 são responsáveis pela síntese de IL-2, IFN-g, IL-12, IL-16, IL-18, todas aumentando a resposta inflamatória, enquanto Th2 tem como característica a produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, e IL-13, as quais podem atuar na defesa contra parasitas. Além disto, IFN- γ pode induzir a produção de IL-2 agindo no perfil da resposta imunológica Th2 para Th1 [88]. Toda esta interação demonstra o papel importante que a modulação na produção destas citocinas pode promover no controle da inflamação e consequentemente no processo de reparo tecidual. Assim, o desenvolvimento de novos compostos como o T19 que promovem modulação no processo inflamatório é muito desejável, pois promovem indiretamente uma modulação na proliferação e migração celular, bem como na síntese de matriz e melhora na resposta imune

inata na área da ferida [92–94].

Assim, nossos resultados indicaram que o composto hidrolisado da pele da tilápia-do-Nilo, T19 é eficaz para o reparo tecidual, através de seu potencial proliferativo acelerando a cicatrização das feridas em camundongos (C57) knockout IL-10. O composto hidrolisado T19 foi eficaz na modulação da fase inflamatória reduzindo COX-2 e aumentando IL-4, acelerando assim a fase de remodelação. Além disso, T19 aumentou expressão de marcadores de proliferação celular e angiogênese, fundamentais na cicatrização de feridas cutâneas. Para melhor compreensão dos mecanismos adicionais dos processos celulares envolvidos, mais análises moleculares devem ser realizadas.

5. REFERÊNCIAS

- [1] G. Swann, Editorial, *J. Vis. Commun. Med.* 33 (2010) 148–149. <https://doi.org/10.3109/17453054.2010.525439>.
- [2] C. Eklouh-Molinier, V. Gaydou, E. Froigneux, P. Barlier, V. Couturaud, M. Manfait, O. Piot, In vivo confocal Raman microspectroscopy of the human skin: highlighting of spectral markers associated to aging via a research of correlation between Raman and biometric mechanical measurements, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 8363–8372. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8964-z>.
- [3] C. Karimkhani, R.P. Dellavalle, L.E. Coffeng, C. Flohr, R.J. Hay, S.M. Langan, E.O. Nsoesie, A.J. Ferrari, H.E. Erskine, J.I. Silverberg, T. Vos, M. Naghavi, Global Skin Disease Morbidity and Mortality, *JAMA Dermatology.* 153 (2017) 406. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2016.5538>.
- [4] J. Reichenberg, M. Davis, Venous Ulcers, *Semin. Cutan. Med. Surg.* 24 (2005) 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.sder.2005.10.002>.
- [5] N.R.V. Cavassan, C.C. Camargo, L.G. de Pontes, B. Barraviera, R.S. Ferreira, H.A. Miot, L.P.F. Abbade, L.D. dos Santos, Correlation between chronic venous ulcer exudate proteins and clinical profile: A cross-sectional study, *J. Proteomics.* 192 (2019) 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.009>.
- [6] K.J. Buster, E.I. Stevens, C.A. Elmets, Dermatologic Health Disparities, *Dermatol. Clin.* 30 (2012) 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.det.2011.08.002>.
- [7] PLISA, PLISA PLATAFORMA DE INFORMACIÓN EN SALUD PARA LAS AMÉRICAS - Indicador de estado de salud, (2019). http://www.paho.org/data/index.php/es/?option=com_content&view=article&id=515:indicadoresviz&Itemid=347.
- [8] J.M. Reinke, H. Sorg, Wound Repair and Regeneration, *Eur. Surg. Res.* 49 (2012) 35–43. <https://doi.org/10.1159/000339613>.
- [9] A. Nourian Dehkordi, F. Mirahmadi Babaheydari, M. Chehelgerdi, S. Raeisi Dehkordi, Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies, *Stem Cell Res. Ther.* 10 (2019) 111. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1212-2>.
- [10] C. Tziotzios, C. Profyris, J. Sterling, Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics, *J. Am. Acad. Dermatol.* 66 (2012) 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2011.08.035>.

- [11] M.H. Periyah, A.S. Halim, A.Z. Mat Saad, Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis., *Int. J. Hematol. Stem Cell Res.* 11 (2017) 319–327. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29340130>.
- [12] Y. Qin, Functional wound dressings, in: *Med. Text. Mater.*, Elsevier, 2016: pp. 89–107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100618-4.00007-8>.
- [13] James Daves, *Smart Bandage Technologies*, Elsevier, 2016. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00321-5>.
- [14] M.B. Serra, W.A. Barroso, N.N. da Silva, S. do N. Silva, A.C.R. Borges, I.C. Abreu, M.O. da R. Borges, From Inflammation to Current and Alternative Therapies Involved in Wound Healing, *Int. J. Inflam.* 2017 (2017) 1–17. <https://doi.org/10.1155/2017/3406215>.
- [15] L. Cañedo-Dorantes, M. Cañedo-Ayala, Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review, *Int. J. Inflam.* 2019 (2019) 1–15. <https://doi.org/10.1155/2019/3706315>.
- [16] N.S. Greaves, K.J. Ashcroft, M. Baguneid, A. Bayat, Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing, *J. Dermatol. Sci.* 72 (2013) 206–217. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.07.008>.
- [17] N.X. Landén, D. Li, M. Ståhle, Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing, *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (2016) 3861–3885. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2268-0>.
- [18] A. Blakaj, R. Bucala, Fibrocytes in health and disease, *Fibrogenesis Tissue Repair.* 5 (2012) S6. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-5-S1-S6>.
- [19] M. Xue, C.J. Jackson, Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring., *Adv. Wound Care.* 4 (2015) 119–136. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0485>.
- [20] A.C. de O. Gonzalez, T.F. Costa, Z. de A. Andrade, A.R.A.P. Medrado, Wound healing - A literature review, *An. Bras. Dermatol.* 91 (2016) 614–620. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>.
- [21] E.H. Black, F.A. Nesi, C.J. Calvano, G.J. Gladstone, M.R. Levine, eds., *Smith and Nesi's Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, Springer New York, New York, NY, 2012. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0971-7>.
- [22] A. Desmouliere, I.A. Darby, B. Laverdet, F. Bonté, Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing, *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* (2014) 301.

- <https://doi.org/10.2147/CCID.S50046>.
- [23] P. Chen, W.C. Parks, Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration, *J. Cell. Biochem.* 108 (2009) 1233–1243. <https://doi.org/10.1002/jcb.22363>.
- [24] N. Shanmugasundaram, T.S. Uma, T.S. Ramyaa Lakshmi, M. Babu, Efficiency of controlled topical delivery of silver sulfadiazine in infected burn wounds, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 89A (2009) 472–482. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31997>.
- [25] R.M. Johnson, R. Richard, Partial-Thickness Burns: Identification and Management, *Adv. Skin Wound Care.* 16 (2003) 178–187. <https://doi.org/10.1097/00129334-200307000-00010>.
- [26] X. Pei, R. Yang, Z. Zhang, L. Gao, J. Wang, Y. Xu, M. Zhao, X. Han, Z. Liu, Y. Li, Marine collagen peptide isolated from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) skin facilitates learning and memory in aged C57BL/6J mice, *Food Chem.* 118 (2010) 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.120>.
- [27] F. Felice, Y. Zambito, E. Belardinelli, A. Fabiano, T. Santoni, R. Di Stefano, Effect of different chitosan derivatives on in vitro scratch wound assay: A comparative study, *Int. J. Biol. Macromol.* 76 (2015) 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.041>.
- [28] H.-N. Huang, Y.-L. Chan, C.-F. Hui, J.-L. Wu, C.-J. Wu, J.-Y. Chen, Use of tilapia piscidin 3 (TP3) to protect against MRSA infection in mice with skin injuries, *Oncotarget.* 6 (2015). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4102>.
- [29] H.-N. Huang, C.-Y. Pan, H.-Y. Wu, J.-Y. Chen, Antimicrobial peptide Epinecidin-1 promotes complete skin regeneration of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected burn wounds in a swine model, *Oncotarget.* 8 (2017) 21067–21080. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15042>.
- [30] N. Ennaas, R. Hammami, A. Gomaa, F. Bédard, É. Biron, M. Subirade, L. Beaulieu, I. Fliss, Collagencin, an antibacterial peptide from fish collagen: Activity, structure and interaction dynamics with membrane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473 (2016) 642–647. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.121>.
- [31] S.-K. Kim, D.-H. Ngo, T.-S. Vo, Marine Fish-Derived Bioactive Peptides as Potential Antihypertensive Agents, in: 2012: pp. 249–260. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416003-3.00016-0>.
- [32] L. Xu, W. Dong, J. Zhao, Y. Xu, Effect of Marine Collagen Peptides on Physiological and Neurobehavioral Development of Male Rats with Perinatal Asphyxia, *Mar. Drugs.*

- 13 (2015) 3653–3671. <https://doi.org/10.3390/md13063653>.
- [33] C.F. Costa, G.C. de Sousa, A.C.E. Rodrigues, F. de S. Vieira, D. dos S.F. Viana, E. dos S. Costa, D.É.P. Oliveira, S.S. dos Santos, A. dos R.S. Santos, A.C.M. da Costa, Perfil de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: uma revisão integrativa, *Rev. Eletrônica Acervo Saúde. Esp* (2017) S624–S632. https://doi.org/10.25248/REAS57_2017.
- [34] Z. Hu, P. Yang, C. Zhou, S. Li, P. Hong, Marine Collagen Peptides from the Skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Characterization and Wound Healing Evaluation, *Mar. Drugs*. 15 (2017) 102. <https://doi.org/10.3390/md15040102>.
- [35] L. Mostaço-Guidolin, N. Rosin, T.-L. Hackett, Imaging Collagen in Scar Tissue: Developments in Second Harmonic Generation Microscopy for Biomedical Applications, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1772. <https://doi.org/10.3390/ijms18081772>.
- [36] J. Tang, T. Saito, Biocompatibility of Novel Type I Collagen Purified from Tilapia Fish Scale: An In Vitro Comparative Study, *Biomed Res. Int.* 2015 (2015) 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/139476>.
- [37] J. Masso-Silva, G. Diamond, Antimicrobial Peptides from Fish, *Pharmaceuticals*. 7 (2014) 265–310. <https://doi.org/10.3390/ph7030265>.
- [38] U. Anest, Óleo de Cravo: Um Anestésico Alternativo para o Manejo de Peixes, (2007).
- [39] W. Hoar, C. Hickman, A laboratory companion for General and comparative physiology, in: *A Lab. Companion Gen. Comp. Physiol.*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1967: p. 296.
- [40] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- [41] B. Ma, K. Zhang, C. Hendrie, C. Liang, M. Li, A. Doherty-Kirby, G. Lajoie, PEAKS: Powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 2337–2342. <https://doi.org/10.1002/rcm.1196>.
- [42] C. Pan, B.H. Park, W.H. McDonald, P.A. Carey, J.F. Banfield, N.C. VerBerkmoes, R.L. Hettich, N.F. Samatova, A high-throughput de novo sequencing approach for shotgun proteomics using high-resolution tandem mass spectrometry, *BMC Bioinformatics*. 11 (2010). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-118>.
- [43] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to

- proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [44] R. V. Gonçalves, R.D. Novaes, S.L.P. Matta, G.P. Benevides, F.R. Faria, M.V.M. Pinto, Comparative Study of the Effects of Gallium-Aluminum-Arsenide Laser Photobiomodulation and Healing Oil on Skin Wounds in Wistar Rats: A Histomorphometric Study, *Photomed. Laser Surg.* 28 (2010) 597–602. <https://doi.org/10.1089/pho.2009.2669>.
- [45] M.S. Ågren, P.M. Mertz, L. Franzén, A comparative study of three occlusive dressings in the treatment of full-thickness wounds in pigs, *J. Am. Acad. Dermatol.* 36 (1997) 53–58. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(97\)70325-6](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(97)70325-6).
- [46] M.M. Sarandy, L.L. Miranda, L.S. Altoé, R.D. Novaes, V.V. Zanuncio, J.P.V. Leite, R.V. Gonçalves, *Strychnos pseudoquina* modulates the morphological reorganization of the scar tissue of second intention cutaneous wounds in rats, *PLoS One.* 13 (2018) e0195786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195786>.
- [47] J.M. Oliveira, N.F. Losano, S.S. Condessa, R.M.P. de Freitas, S.A. Cardoso, M.B. Freitas, L.L. de Oliveira, Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148 (2018) 684–692. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.024>.
- [48] D. Tsikas, Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 851 (2007) 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>.
- [49] S. Dieterich, U. Bielig, K. Beulich, G. Hasenfuss, J. Prestle, Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart, *Circulation.* 101 (2000) 33–39. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.1.33>.
- [50] W. Bian, B. Meng, X. Li, S. Wang, X. Cao, N. Liu, M. Yang, J. Tang, Y. Wang, X. Yang, OA-GL21, a novel bioactive peptide from *Odorana andersonii*, accelerated the healing of skin wounds, *Biosci. Rep.* 38 (2018). <https://doi.org/10.1042/BSR20180215>.
- [51] H. Ebaid, B. Abdel-salam, I. Hassan, J. Al-Tamimi, A. Metwalli, I. Alhazza, Camel milk peptide improves wound healing in diabetic rats by orchestrating the redox status and immune response, *Lipids Health Dis.* 14 (2015) 132. <https://doi.org/10.1186/s12944->

- 015-0136-9.
- [52] R.S. Alves, L.B. Alves, L.S. Altoé, M.M. Sarandy, M.B. Freitas, N.J.F. Silveira, R.D. Novaes, R.V. Gonçalves, Peptides from Animal Origin: A Systematic Review on Biological Sources and Effects on Skin Wounds, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1155/2020/4352761>.
- [53] J.L. Fox, Antimicrobial peptides stage a comeback, *Nat. Biotechnol.* 31 (2013) 379–382. <https://doi.org/10.1038/nbt.2572>.
- [54] M. Vijaykrishnaraj, P. Prabhasankar, Marine protein hydrolysates: their present and future perspectives in food chemistry – a review, *RSC Adv.* 5 (2015) 34864–34877. <https://doi.org/10.1039/C4RA17205A>.
- [55] Y. Fu, M. Therkildsen, R.E. Aluko, R. Lametsch, Exploration of collagen recovered from animal by-products as a precursor of bioactive peptides: Successes and challenges, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59 (2019) 2011–2027. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1436038>.
- [56] G.A. Gbogouri, M. Linder, J. Fanni, M. Parmentier, Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon Byproducts Hydrolysates, *J. Food Sci.* 69 (2004) C615–C622. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09909.x>.
- [57] S. Yamamoto, K. Deguchi, M. Onuma, N. Numata, Y. Sakai, Absorption and Urinary Excretion of Peptides after Collagen Tripeptide Ingestion in Humans, *Biol. Pharm. Bull.* 39 (2016) 428–434. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00624>.
- [58] X. Sun, Y. Chai, Q. Wang, H. Liu, S. Wang, J. Xiao, A Natural Interruption Displays Higher Global Stability and Local Conformational Flexibility than a Similar Gly Mutation Sequence in Collagen Mimic Peptides, *Biochemistry.* 54 (2015) 6106–6113. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00747>.
- [59] J.A. Ramshaw, N.K. Shah, B. Brodsky, Gly-X-Y Tripeptide Frequencies in Collagen: A Context for Host–Guest Triple-Helical Peptides, *J. Struct. Biol.* 122 (1998) 86–91. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.3977>.
- [60] R. Dölz, E. Heidemann, Influence of different tripeptides on the stability of the collagen triple helix. I. Analysis of the collagen sequence and identification of typical tripeptides, *Biopolymers.* 25 (1986) 1069–1080. <https://doi.org/10.1002/bip.360250607>.
- [61] V. GLATTAUER, J.A. WERKMEISTER, A. KIRKPATRICK, J.A.M. RAMSHAW, Identification of the epitope for a monoclonal antibody that blocks platelet aggregation

- induced by type III collagen, *Biochem. J.* 323 (1997) 45–49. <https://doi.org/10.1042/bj3230045>.
- [62] I. Furlani, B. Amaral, R. Oliveira, Q. Cass, IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: CONCEITO E EFEITOS NA PROTEÓLISE, *Quim. Nova.* (2020). <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170525>.
- [63] H. Yuan, S. Zhang, B. Zhao, Y. Weng, X. Zhu, S. Li, L. Zhang, Y. Zhang, Enzymatic Reactor with Trypsin Immobilized on Graphene Oxide Modified Polymer Microspheres To Achieve Automated Proteome Quantification, *Anal. Chem.* 89 (2017) 6324–6329. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00682>.
- [64] R.A. Zubarev, Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry, *Curr. Opin. Biotechnol.* 15 (2004) 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.12.002>.
- [65] S. Il Jang, J.Y. Mok, I.H. Jeon, K.-H. Park, T.T.T. Nguyen, J.S. Park, H.M. Hwang, M.-S. Song, D. Lee, K.Y. Chai, Effect of Electrospun Non-Woven Mats of Dibutylryl Chitin/Poly(Lactic Acid) Blends on Wound Healing in Hairless Mice, *Molecules.* 17 (2012) 2992–3007. <https://doi.org/10.3390/molecules17032992>.
- [66] A. Aydin, R. Reis, H. Sipahi, G. Zeybekođlu, N. Çelik, H. Kırmızıbekmez, N. Kaklıkkaya, Hydroxytyrosol: The Phytochemical Responsible for Bioactivity of Traditionally used Olive Pits, *Euroasian J. Hepato-Gastroenterology.* 8 (2018) 126–132. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10018-1278>.
- [67] M.E. Okur, Ş. Ayla, D. Çiçek Polat, M.Y. Günal, A. Yoltaş, Ö. Biçerođlu, Novel insight into wound healing properties of methanol extract of *Capparis ovata* Desf. var. *palaestina* Zohary fruits, *J. Pharm. Pharmacol.* 70 (2018) 1401–1413. <https://doi.org/10.1111/jphp.12977>.
- [68] N. de C.C. Pinto, P. Cassini-Vieira, E.M. de Souza-Fagundes, L.S. Barcelos, M.C.M.N. Castañon, E. Scio, *Pereskia aculeata* Miller leaves accelerate excisional wound healing in mice, *J. Ethnopharmacol.* 194 (2016) 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.09.005>.
- [69] J. Larouche, S. Sheoran, K. Maruyama, M.M. Martino, Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets, *Adv. Wound Care.* 7 (2018) 209–231. <https://doi.org/10.1089/wound.2017.0761>.
- [70] R.J. Bodnar, Chemokine Regulation of Angiogenesis During Wound Healing, *Adv. Wound Care.* 4 (2015) 641–650. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0594>.

- [71] K. Ley, C. Laudanna, M.I. Cybulsky, S. Nourshargh, Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 678–689. <https://doi.org/10.1038/nri2156>.
- [72] C. Aliste, J.M. Suarez Peñaranda, Atypical fibroxanthoma showing diffuse staining for CD31, *J. Cutan. Pathol.* 38 (2011) 679–680. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2011.01711.x>.
- [73] L. Requena, L. El-Shabrawi-Caelen, S.N. Walsh, S. Segura, M. Ziemer, M.A. Hurt, O.P. Sangüeza, H. Kutzner, Intralymphatic Histiocytosis. A Clinicopathologic Study of 16 Cases, *Am. J. Dermatopathol.* 31 (2009) 140–151. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e3181986cc2>.
- [74] E.C.G. Jardim, G.R. Manrique, J.C.G. de Mendonça, Â. Hanssessian, R.M.G. de Barros, Uso de técnicas de análise histológica e imunohistoquímica em Odontologia, *Arch. Heal. Investig.* 2 (2013) 40–49. <https://archhealthinvestigation.com.br/ArcHI/article/view/86>.
- [75] R. Crompton, H. Williams, D. Ansell, L. Campbell, K. Holden, S. Cruickshank, M.J. Hardman, Oestrogen promotes healing in a bacterial LPS model of delayed cutaneous wound repair, *Lab. Investig.* 96 (2016) 439–449. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.160>.
- [76] A. Gupta, T. Dai, M.R. Hamblin, Effect of red and near-infrared wavelengths on low-level laser (light) therapy-induced healing of partial-thickness dermal abrasion in mice, *Lasers Med. Sci.* 29 (2014) 257–265. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1319-0>.
- [77] S.K. Lau, P.G. Chu, L.M. Weiss, CD163: A Specific Marker of Macrophages in Paraffin-Embedded Tissue Samples, *Am. J. Clin. Pathol.* 122 (2004) 794–801. <https://doi.org/10.1309/QHD6-YFN8-1KQX-UUH6>.
- [78] C.D. DIJKSTRA, E.A. DOPP, I.M.C. VOGELS, C.J.F. NOORDEN, Macrophages and Dendritic Cells in Antigen-Induced Arthritis., *Scand. J. Immunol.* 26 (1987) 513–523. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1987.tb02285.x>.
- [79] P. Akila, V. Prashant, M.N. Suma, S.N. Prashant, T.R. Chaitra, RETRACTED: CD163 and its expanding functional repertoire, *Clin. Chim. Acta.* 413 (2012) 669–674. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.01.028>.
- [80] M.D. Ferrer, C. Busquets-Cortés, X. Capó, S. Tejada, J.A. Tur, A. Pons, A. Sureda, Cyclooxygenase-2 Inhibitors as a Therapeutic Target in Inflammatory Diseases, *Curr. Med. Chem.* 26 (2019) 3225–3241.

- <https://doi.org/10.2174/0929867325666180514112124>.
- [81] M.K. O'Banion, V.D. Winn, D.A. Young, cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 (1992) 4888–4892. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.11.4888>.
- [82] J. Ito, Y. Nagayasu, M. Hoshikawa, K.H. Kato, Y. Miura, K. Asai, H. Hayashi, S. Yokoyama, M. Michikawa, Enhancement of FGF-1 release along with cytosolic proteins from rat astrocytes by hydrogen peroxide, *Brain Res.* 1522 (2013) 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.05.035>.
- [83] A.E.K. Loo, Y.T. Wong, R. Ho, M. Wasser, T. Du, W.T. Ng, B. Halliwell, Effects of Hydrogen Peroxide on Wound Healing in Mice in Relation to Oxidative Damage, *PLoS One.* 7 (2012) e49215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049215>.
- [84] M. Mittal, M.R. Siddiqui, K. Tran, S.P. Reddy, A.B. Malik, Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>.
- [85] F.C. Fang, Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies., *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 820–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1004>.
- [86] M.N. Möller, Q. Li, J.R. Lancaster, A. Denicola, Acceleration of nitric oxide autoxidation and nitrosation by membranes., *IUBMB Life.* 59 (n.d.) 243–8. <https://doi.org/10.1080/15216540701311147>.
- [87] C.M.B. de Oliveira, R.K. Sakata, A.M. Issy, L.R. Gerola, R. Salomão, Citocinas e dor, *Rev. Bras. Anesthesiol.* 61 (2011) 260–265. <https://doi.org/10.1590/S0034-70942011000200014>.
- [88] J.H. Curfs, J.F. Meis, J.A. Hoogkamp-Korstanje, A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers, *Clin. Microbiol. Rev.* 10 (1997) 742–780. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.4.742>.
- [89] C.D. Raeburn, F. Sheppard, K.A. Barsness, J. Arya, A.H. Harken, Cytokines for surgeons., *Am. J. Surg.* 183 (2002) 268–73. [https://doi.org/10.1016/s0002-9610\(02\)00781-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9610(02)00781-x).
- [90] A. Grunau, U. Escher, S. Bereswill, M.M. Heimesaat, Toll-like receptor-4 dependent inflammatory responses following intestinal colonization of secondary abiotic IL10-deficient mice with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Eur. J. Microbiol.*

- Immunol. 7 (2017) 210–219. <https://doi.org/10.1556/1886.2017.00023>.
- [91] E.M. Lennon, L.B. Borst, L.L. Edwards, A.J. Moeser, Mast Cells Exert Anti-Inflammatory Effects in an IL10 $-/-$ Model of Spontaneous Colitis, *Mediators Inflamm.* 2018 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1155/2018/7817360>.
- [92] F.G. Bueno, G.P. Panizzon, E.V.S. de L. Mello, M. Lechtenberg, F. Petereit, J.C.P. de Mello, A. Hensel, Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts, *Fitoterapia.* 99 (2014) 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.10.007>.
- [93] G.D.P. Coelho, V.S. Martins, L.V. do Amaral, R.D. Novaes, M.M. Sarandy, R.V. Gonçalves, Applicability of Isolates and Fractions of Plant Extracts in Murine Models in Type II Diabetes: A Systematic Review, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2016 (2016) 1–25. <https://doi.org/10.1155/2016/3537163>.
- [94] R.V. Gonçalves, R.D. Novaes, M.M. Sarandy, J.P.V. Leite, E.F. Vilela, M. do C. Cupertino, S.L.P. da Matta, *Schizocalyx cuspidatus* (A. St.-Hil.) Kainul. & B. Bremer extract improves antioxidant defenses and accelerates the regression of hepatic fibrosis after exposure to carbon tetrachloride in rats, *Nat. Prod. Res.* 30 (2016) 2738–2742. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1143825>.

6. APÊNDICE 1

Sequências que não se alinham para nenhuma proteína (TAG's)					
Peptídeos	Massa (Da)	Peptídeos	Massa (Da)	Peptídeos	Massa (Da)
KLPKDADLLWKTVD R	1797,0149	MHKRKK	826,4959	WRQR	644,3506
WWYVLDGPLGRRVWK	1930,0366	DYELLK	779,4065	CHLK	556,2791
WFLGSFLYEYSR	1566,7507	KLVDLK	714,4639	VMNR	518,2635
KPLGATGFLKRK	1314,8135	TYLLGR	721,4122	WFMK	626,2886
AGPLGAKGDLKK	1153,6819	WERTYK	881,4395	WHDR	612,2769
KPLGADGKLLK	1153,7183	RLVLLK	740,5272	WRER	645,3347
TLPLPLALLK	1174,7688	CELG YK	768,3476	WYER	652,2969
WGPAGYTLSTR	1207,5986	WGTPAK	658,3438	WYQK	623,3067
RRCVADAHRK	1381,7109	YKPPPR	756,4282	CEYK	598,2421
WVDDAVKEAR	1187,5935	YMSRPK	780,3952	WDHR	612,2769
KPLGADKKKR	1139,7139	EEFSAR	737,3344	WHFR	644,3183
VLADLLEAHK	1107,6287	GHAVLK	623,3755	EVL R	515,3068
ELANALANYR	1133,5828	QQDDLK	745,3606	WYTR	624,302
LSSPATVKSR	1044,5928	RKSYRK	836,498	WLRR	629,3762
GAAGLVSPR	826,4661	TEELLK	731,4065	WMVR	606,2948
ETLTVTNPK	1001,5393	TLTPPR	683,3966	WRLR	629,3762
MLLFTASLK	1038,5784	LKDSVR	716,418	WCYK	655,2788
NLLALPLTR	1009,6284	QALGNK	629,3497	WLQR	601,3336
KAGPAGPR	752,4293	EEVPR	628,318	WRHK	625,3448
VATVSLPR	841,5021	EEQAR	631,2925	WRKR	644,387
CCDMMRDK	1130,3977	RDLPR	655,3765	WSVR	546,2914
QLLGSTLK	858,5175	VYLYR	712,3908	WYHK	632,3071
WNEAEARK	1002,4883	YSAHK	604,2969	KLLK	500,3686
KASSAYTK	854,4498	LGP AR	512,3071	MHAK	501,2369
GLVGLGLK	755,4905	GREER	645,3194	WEFR	636,3019
MMNSSGER	942,3535	CYEEK	727,2847	YFDR	599,2703
QNPRYTK	905,4719	CYSKR	712,3326	CMMK	600,207
LLKH YVK	899,5593	MSLYK	656,3204	RAVK	472,3121

YTMDPRR	937,444	RPSLK	599,3755	RLGR	500,3183
ELVPPK	809,501	LMKKR	674,4261	WHYK	632,3071
QAGLPWR	826,4449	NHGPR	579,2877	WRYK	651,3492
NKKMELK	905,5004	QQLR	656,3969	VEVR	501,2911
DLDKLAR	829,4658	YLCKR	738,3846	CSER	550,2169
KVGLPKK	768,5221	MALLR	618,3523	CYNR	611,2486
RQRGALK	827,5089	WNVLK	658,3802	WYHR	660,3132
EMGYDER	898,3491	MAHAK	556,2791	RGLR	500,3183
QMTDFHK	905,4066	WQPAK	628,3333	WRYR	679,3554
YQLGAMR	837,4167	YSEVR	652,318	LRLR	556,3809
NRAASAK	716,3929	CYAAK	611,2737	RLRR	599,3979
QALQLPK	796,4807	EVREK	659,3602	VQVR	500,3071
NEYLLK	778,4225	RVNGR	600,3456	LMER	547,2788
SAAPRK	628,3656	VLLLR	612,4323	MENK	520,2316
CMRNEK	836,3633	LKVR	514,3591	WLRK	601,37
FTSPDR	721,3395	CYDR	612,2326	WYEK	624,2907
QLLVLR	740,4908	WFHR	644,3183		
QQKSSR	732,3878	RRLR	599,3979		