

AVALIAÇÃO DO EFEITO EMBRIOTÓXICO DA LECTINA DE *Bothrops leucurus* (BIL) NO MODELO DE *Gallus gallus domesticus*

EVALUATION OF THE EMBRYOTOXIC EFFECT OF LECTIN FROM *Bothrops leucurus* (BIL) IN THE *Gallus gallus domesticus* MODEL

DOI: <https://doi.org/10.16891/2317-434X.v12.e1.a2024.pp4077-4087>

Recebido em: 15.11.2023 | Aceito em: 09.04.2024

Ana Jhoice de Santana Ferreira^{a*}, Thiago Felix da Silva^a, Beathryz Lethycya Almeida Guimarães^a, Eliane Alves Bandeira de Carvalho^a, Maria Isabel de Assis Lima Castro^a, André de Lima Aires^a, Mary Angela Aranda de Souza^a, Marta Gerusa Soares de Lucena^a, Eliete Cavalcanti da Silva^a

**Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife – PE, Brasil
*E-mail: jhoiceferreira15@gmail.com**

RESUMO

Uma lectina do tipo c isolada do veneno da serpente *Bothrops leucurus* apresentou efeitos importantes como atividade antibacteriana, antitumoral e atividade leishmanicida sobre *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Para analisar os possíveis efeitos embriotóxicos da Lectina de *Bothrops leucurus* (BIL), foi escolhido um modelo experimental com embriões de *Gallus gallus domesticus*. Nesta pesquisa foram utilizados 180 ovos fertilizados de *G. gallus domesticus*, devido às semelhanças dos estágios iniciais no desenvolvimento embrionário das aves e nos humanos, além das características e vantagens que beneficiam seu uso para o teste de toxicidade. As concentrações aplicadas nos embriões possuíam 2,5 e 5 µM BIL, utilizando as técnicas de Montagem total, Corte Transversal e HET- CAM. Após a realização dos procedimentos, os embriões foram analisados através de microscopia óptica. Concluindo que, independentemente das concentrações testadas durante o estudo, a BIL não acarretou irritabilidade na membrana cório-alantóide e não alterou a morfogênese do sistema nervoso central em embriões de *G. gallus domesticus*.

Palavras-chave: *Bothrops leucurus*; Embrião de galinha; Neurodesenvolvimento.

ABSTRACT

A type c lectin isolated from the venom of the *Bothrops leucurus* snake showed important effects such as antibacterial, antitumor and leishmanicidal activity against *L. braziliensis* and *L. amazonensis*. To analyze the possible embryotoxic effects of *Bothrops leucurus* Lectin (BIL), an experimental model was chosen with *Gallus gallus domesticus* embryos. In this research, 180 fertilized eggs of *G. gallus domesticus* were used, due to the similarities of the initial stages in the embryonic development of birds and humans, in addition to the characteristics and advantages that benefit their use for toxicity testing. The concentrations applied to the embryos were 2.5 and 5 µM BIL, using the Total Mounting, Transverse Section and HET-CAM techniques. After carrying out the procedures, the embryos were analyzed using optical microscopy. Concluding that, regardless of the concentrations tested during the study, BIL did not cause irritability in the chorio-allantoic membrane and did not alter the morphogenesis of the central nervous system in *G. gallus domesticus* embryos.

Keywords: *Bothrops leucurus*; Chick Embryo; Neurodevelopmental.

INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas com ampla distribuição na natureza, podendo ser encontradas em plantas, animais, fungos, vírus e bactérias (GOMES *et al.*, 2021). As lectinas do tipo C são um subgrupo de lectinas de animais, que possuem ligação a carboidratos, dependência de Ca^{2+} e desempenham papéis importantes na sinalização celular, diferenciação e adesão celular e imunidade inata (ARANDA-SOUZA *et al.*, 2019).

Essas lectinas podem ser isoladas do veneno da serpente *Bothrops leucurus*, conhecida como jararaca-de-cauda-branca, é encontrada principalmente no nordeste do Brasil (LIRA-DA-SILVA, 2009; SILVA *et al.*, 2022) e é considerada uma cobra de interesse médico. A lectina *Bothrops leucurus* (BIL) tem demonstrado importantes atividades biológicas por ser capaz de reconhecer com alta especificidade resíduos de carboidratos presentes em proteoglicanos, glicoproteínas e glicolipídeos, que desempenham importantes funções como: interação parasita-célula, comunicação célula-célula, fertilização, desenvolvimento, reconhecimento celular e comunicação, entre outros (SITOHY *et al.*, 2007; ARANDA-SOUZA *et al.*, 2019).

A BIL é um ligante galactosídeo dependente de cálcio capaz de reconhecer glicoproteínas complexas, classificada estruturalmente como uma proteína da classe β e descrita como uma lectina ácida que mantém sua termoestabilidade até 70°C (NUNES, 2011). Essas são as principais características que lhe conferem grande importância em termos de aplicabilidade (ARANDA-SOUZA *et al.*, 2018). BIL demonstrou atividade leishmanicida, pois foi capaz de reconhecer seu carboidrato de ligação, a galactose, na membrana plasmática dos parasitas e promove a interrupção da homeostase do Ca^{2+} , auxiliando na inibição do crescimento de suas formas evolutivas (ARANDA-SOUZA *et al.*, 2018). Além disso, é conhecida por sua capacidade citotóxica contra algumas linhagens tumorais (K-562, Hep-2 e NCI-H292) em detrimento da regulação de Ca^{2+} e espécies reativas de oxigênio, induzindo a morte celular (NUNES *et al.*, 2012).

Como potencial fármaco, a lectina BIL deve ter sua segurança testada. A identificação de riscos teratogênicos associados à exposição a produtos químicos é uma prioridade para proteger a saúde humana (JARQUE *et al.*, 2020). A utilização dos embriões de aves é considerada uma ferramenta valiosa para estudar os efeitos de substâncias químicas sobre o desenvolvimento embrionário, visto que, os estágios iniciais do

desenvolvimento embrionário das aves e dos humanos se assemelham (SILVA, 2020; SILVA *et al.*, 2021).

Então, este estudo tem como objetivo avaliar a atividade embriotóxica da lectina BIL no modelo de *Gallus gallus domesticus* para analisar sua possível toxicidade na morfogênese.

MATERIAIS E MÉTODOS

Lectina BIL da peçonha de bothrops leucurus

O veneno da *Bothrops leucurus* foi cedido pelo Laboratório de Animais Peçonhentos (UFPE). A lectina BIL foi isolada e purificada como estabelecida por Nunes *et al.* (2011).

Embriões de G. gallus domesticus da raça COBB

Os ovos embrionados da linhagem COBB, doados pela empresa G3 Agroavícola, localizado na Fazenda Santa Teresinha, Riacho das Almas, Pernambuco, Brasil (8°08'23.0"S 35°51'52.1"W), foram incubados por 48 horas, a 37.5°C. umidade relativa de 65% a 75%. Após esse período, os ovos embrionados foram dessensibilizados por 20 minutos a 20°C, sendo utilizados 180 ovos embrionados, separados em três grupos experimentais com 60 ovos. O ensaio foi realizado em duplicata.

O grupo controle negativo (G1) recebeu injeção de PBS (100 μl) e os grupos (G2) e (G3) soluções de 2,5 μM e 5 μM de BIL respectivamente. O protocolo deste estudo com embriões de *G. gallus domesticus* foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Biociências – Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 23076.010939/2018-31).

Histologia do embrião de G. gallus domesticus

O processamento da técnica histológica de montagem total dos embriões foi realizado segundo a metodologia (SILVA *et al.*, 2021). Os discos embrionários foram removidos com auxílio de tesoura e transferidos para uma placa de Petri, fixado em Bouin por duas horas, armazenado em etanol 70% em temperatura ambiente. Posteriormente, os embriões foram hidratados com água destilada e corados com Hematoxilina por 30 segundos, desidratados em uma série etanólica (70%, 80%, 90% e 100%) por 30 min e diafanizados com xilol. Em seguida, as amostras foram montadas em bálsamo do Canadá e estabelecido o estadiamento dos embriões de acordo com Hamburger & Hamilton (1951), sendo identificado um maior número de exemplares do estágio 14 em todos os

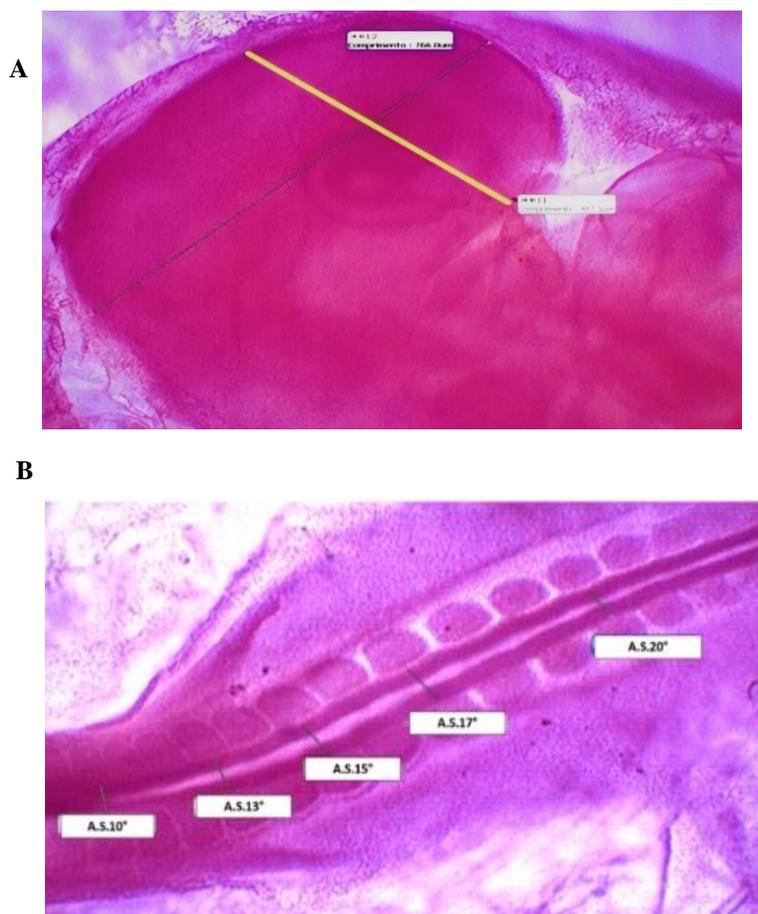
grupos, portanto, escolhido para análises anátomo-morfológicas. A técnica de corte transversal foi realizada de acordo com (SILVA *et al.*, 2021), em espessura de 4 μm , após coloração foram montados entre lâmina e lamínula com Entellan.

Análises morfométrica e morfológica de embriões de G. gallus

Fotomicrografias das preparações histológicas de embriões em montagem total e corte transversal foram capturadas utilizando um sistema de captura e registro de imagem, constituído por um microscópio acoplado a uma

câmera MOTICAM 1000 1.3M Pixel-USB 2.0, QUIMIS e conectado a um computador com uma ferramenta de Software MOTIC Image Plus 2.0. Na região cefálica foram traçadas linhas de distância da região cranial em direção ventral e uma outra da região dorsal em direção ventral inter cruzando-se acima da vesícula óptica (Figura 1A). Na região caudal do embrião, a largura do tubo neural foi aferida nas regiões do pares de somitos (10° , 13° , 15° , 17° e 20°) (Figura 1B). A análise morfológica qualitativa foi realizada com preparações histológicas tanto com a técnica de montagem total quanto transversal das seguintes estruturas: vesículas ópticas, coração, tubo neural e somitos.

Figura 1. Fotomicrografia de embriões de *G. gallus domesticus*, processada pela técnica de montagem total, incubados 48h. Pode ser observado as medidas usadas para análise morfométrica.



Legenda. 1A. Região cefálica, uma linha de distância (amarela-R1) da região cranial em direção ventral e uma outra da região dorsal em direção ventral (preta-R2) inter cruzando-se acima da vesícula óptica, ampliação 10x. 1B. na região caudal do embrião foram usadas as alturas dos pares de somitos = AS (10° , 13° , 15° , 17° 20°) para análise de possíveis alterações no desenvolvimento do tubo neural, ampliação 40x, coloração Hematoxilina. Fonte: Os autores (2023).

Egg Test Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)

Antes do teste do HET-CAM, os ovos embrionados (60) foram incubados por 72 horas. Posteriormente, separados em 4 grupos: Grupo G1 (PBS, grupo negativo); Grupo G2 e G3 (2,5 μ M e 5 μ M de BIL respectivamente) e Grupo G4 (NaOH 0,1M grupo positivo) após cinco minutos de aplicação das substâncias na membrana corioalantoidea foi avaliado através de monitoramento da presença de hemorragia, com os parâmetros não irritantes sem visualização de hemorragia, irritantes com verificação de hemorragia, adaptado de Budai *et al.* (2021).

Análise Estatística

Para a análise estatística da morfometria foi utilizado o teste One Way, comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os modelos de animais desempenham um papel fundamental na compreensão dos efeitos da BIL no organismo, oferecendo diversas perspectivas sobre suas ações dentro de cada organismo (NUNES *et al.*, 2011; ARANDA-SOUZA *et al.*, 2019). A BIL tem sido estudada por suas potenciais implicações clínicas, especialmente no que diz respeito ao seu efeito sobre o sistema imunológico e seu potencial terapêutico (ARANDA-SOUZA *et al.*, 2018).

Estudos demonstraram que a BIL possui atividade antibacteriana contra cepas gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis* (NUNES *et al.*, 2011). Além disso, no estudo de Nunes *et al.* (2012) através de uma avaliação *in vitro* da BIL em alguma linhagens celulares tumorais humanas demonstrou atividade induzindo a apoptose dessas células (K562, NCI-292 e Hep-2). A BIL inibiu o crescimento e a viabilidade de promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*, bem como reduzindo a sobrevivência de parasitas intracelulares, sem causar danos aparentes às células hospedeiras (ARANDA-SOUZA *et al.*, 2018; SOUZA, 2012).

Essas descobertas sugerem que BIL pode interferir em vias metabólicas do parasita, apontando para um potencial promissor no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose (ARANDA-SOUZA *et al.*, 2018; ARANDA-SOUZA *et al.*, 2019; CRUZ *et al.*, 2020).

O modelo embriotóxico de *G. gallus domesticus* é bastante

utilizado devido sua similaridade com alguns estágios dos embriões de mamíferos, tornando-o atrativo para diversos estudos científicos (LIMA, 2017). Suas vantagens incluem baixo custo, rápido período de desenvolvimento de cerca de 21 dias e facilidade de aquisição e manipulação de ovos, tornando essa abordagem uma escolha prática e acessível para os pesquisadores.

Os embriões de *Gallus gallus domesticus*, por exemplo, são frequentemente utilizados em estudos que investigam os possíveis efeitos teratogênicos de substâncias, oferecendo insights importantes para a compreensão do desenvolvimento embrionário e potenciais riscos ambientais (WOLPERT *et al.*, 2000; GILBERT, 2003; RIVERO *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2016; GOODFELLOW *et al.*, 2016).

O presente estudo analisou embriões de 48 horas de incubação no estágio 14, um ponto crucial em que os embriões de *G. gallus* podem ser equiparados aos estágios iniciais de desenvolvimento humano (SILVA *et al.*, 2021). Neste estágio, em ambas espécies embrionárias começam a estabelecer as bases para os sistemas corporais, incluindo o desenvolvimento das estruturas neurais, membros e órgãos que são fundamentais para o organismo (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016).

A análise morfológica dos embriões no estágio 14 de todos os grupos experimentais, mostram um neurodesenvolvimento normal, cuja presença das vesículas ópticas indicam a ocorrência de neurulação. O desenvolvimento do diencéfalo a partir do prosencéfalo, vesícula encefálica secundária originada da vesícula primária, fonte de origem das vesículas ópticas, é um indicativo da não interferência da lectina BIL no neurodesenvolvimento (Figura 2 A, B e C). Essa análise é corroborada como descrito por Gabriel *et al.* 2021 em que menciona a capacidade das vesículas encefálicas de desenvolver estruturas sensoriais, como a vesícula óptica em ensaios *in vitro* através de organoides cerebrais.

Alterações morfológicas na região do encéfalo do embrião podem acarretar em atrasos de desenvolvimento, por exemplo, microcefalia que pode causar um retardo no desenvolvimento cognitivo, motor e na fala, além de acarretar em problemas de visão e audição (SILVA *et al.*, 2021). Visto que, os embriões de *G. gallus domesticus* nos estágios precoces de desenvolvimento embrionário, são muito suscetíveis à exposição de agentes tóxicos que são capazes de alterar o desenvolvimento deste embrião, ou seja, interferindo no mecanismo de formação acarretando diversos efeitos adversos.

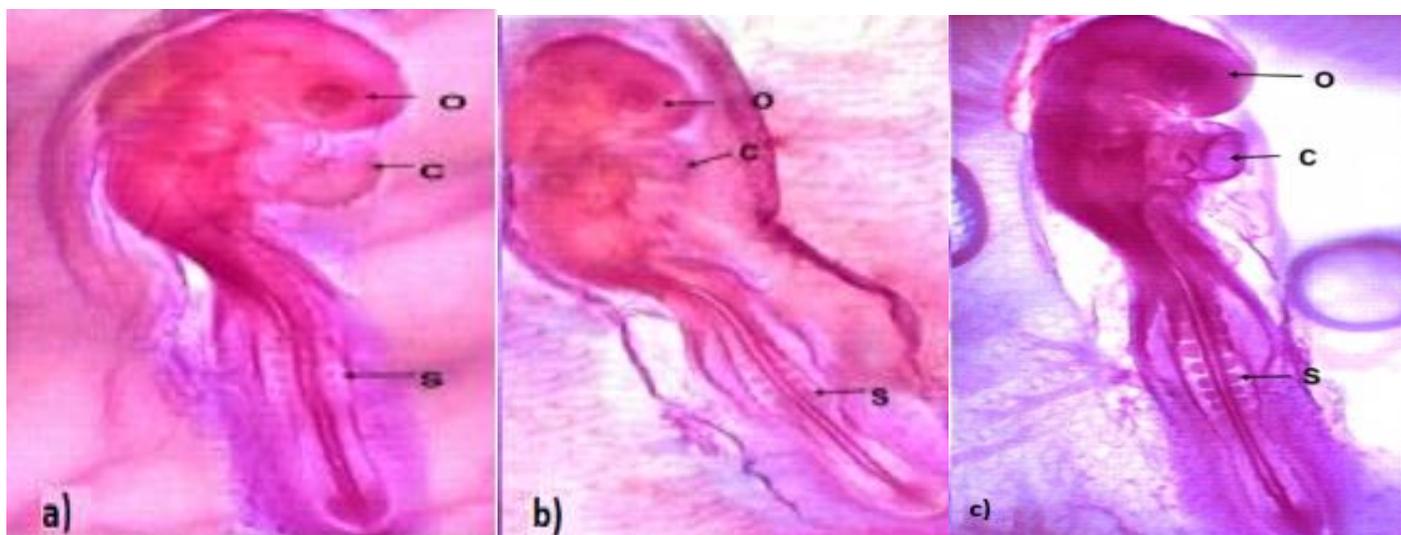
O desenvolvimento do coração dos embriões de *G. gallus* submetidos a estresse com BIL foi semelhante ao controle

negativo, portanto, sem interferência na sua formação (Figura 2 A, B e C). Essa análise é importante tendo em vista que o desenvolvimento cardíaco e suas funções no período embrionário de *G. gallus* é semelhante ao humano, como por exemplo; ambos têm o coração com quatro cavidades como descrito por Saxena *et al.* 2018.

No que concerne a somitogênese (Figura 2 A, B e C), foi observado que os somitos cefálicos são mais

desenvolvidos do que os caudais, sugerindo um processo de segmentação do embrião ao longo do seu eixo cefálico-caudal de forma normal como descrito por Maroto *et al.* 2012, assim sinalizando a formação do sistema locomotor, portanto, sem nenhuma interferência da BIL no seu desenvolvimento.

Figura 2. Fotomicrografias de embriões *G.gallus domesticus* com 48 horas de incubação, em técnica de montagem total, corados com hematoxilina, magnitude de 10x.

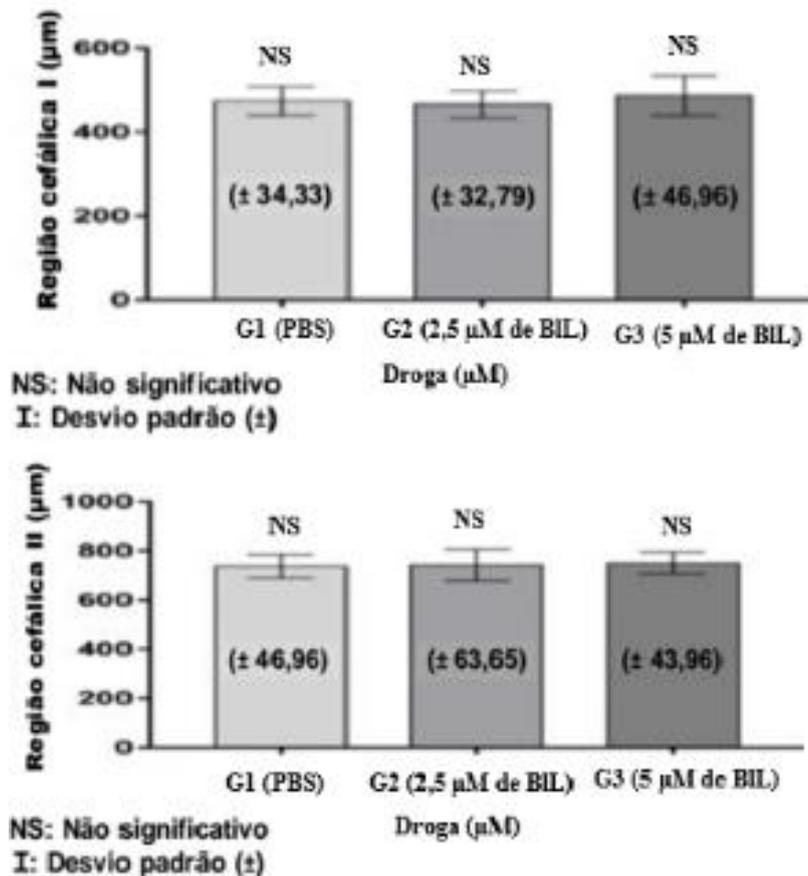


Legenda. C- coração, O- vesículas ópticas, S- somitos. 2A. G1= PBS, 2B. G2 = 2,5μM BIL, 2C.G3= 5 μM BIL. Fonte: Os autores (2023).

O estudo morfométrico da região das vesículas encefálicas não apresentou diferenças estatísticas a nível de ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey, com médias nos grupos: G1= 474,1μm; G2= 466,2μm; G3=486,0μm (R1) e: G1= 737,4μm; G2= 742,1μm; G3=750,7 μm (R2) (Gráfico 1). Considerando as mensurações das regiões cefálicas, foi constatado que a substância BIL não causou danos anátomo-morfológicos e nem morfométricos segundo o

gráfico 1. Na mesma perspectiva os autores Panunto *et al.* (2006) e Kwasniewski *et al.* (2022) analisaram a toxicidade da lectina de tipo C da *Bothrops Jararacussu*, no estudo *in vivo* foi observado um aumento da permeabilidade vascular acarretado pela lectina, todavia, não ocasionou danos ao organismo, evidenciando a lectina como potencial ferramenta imunofarmacológica e biotecnológica.

Gráfico 1. Comparação das médias dos grupos experimentais para morfometria.



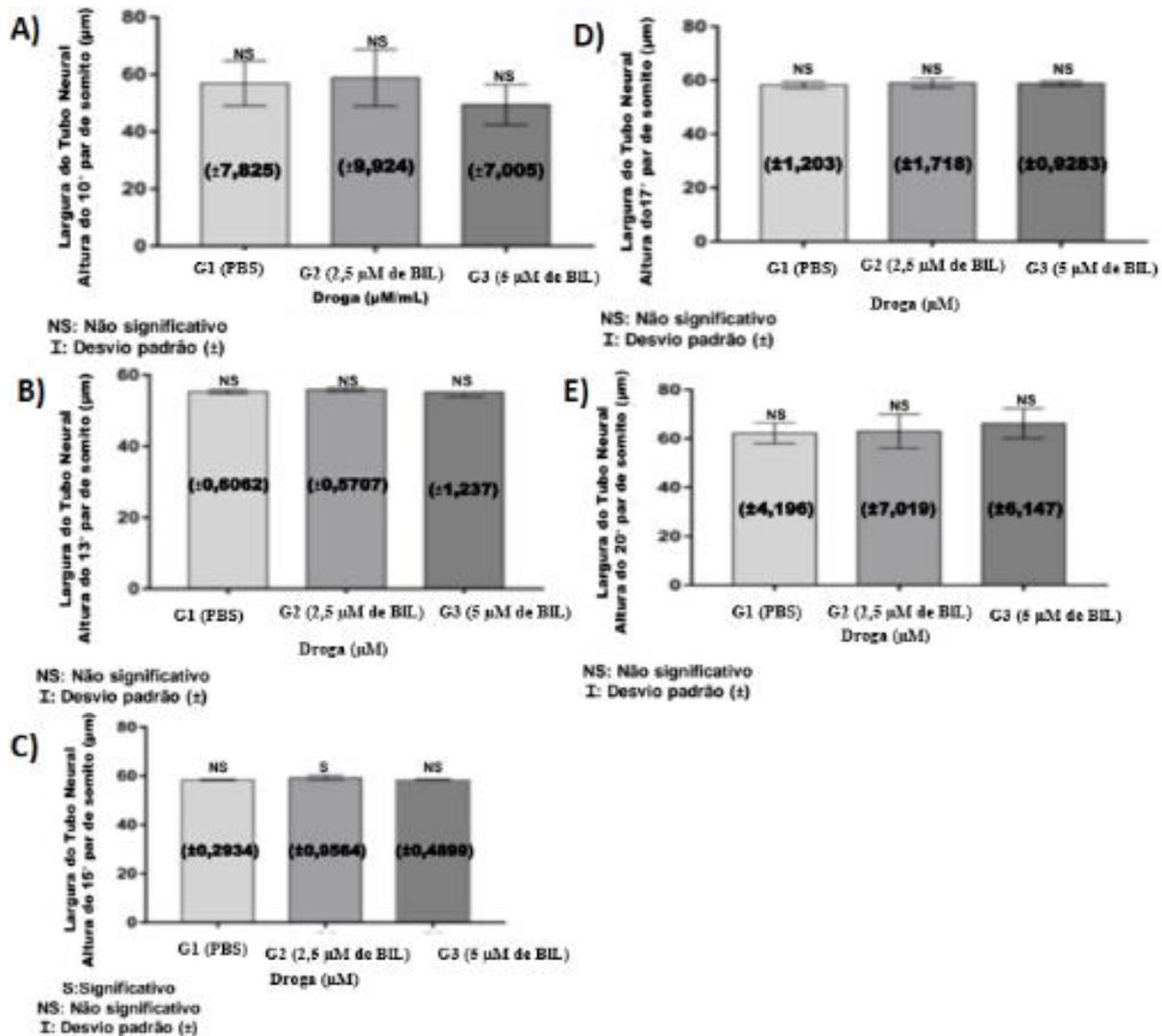
Legenda. Região I (R1): G1. 474,1µm, G2. 466,2µm, G3. 486,0µm e Região II (R2): G1. 737,4µm, G2. 742,1µm, G3. 750,7 µm, para ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Fonte: Os autores (2023).

A análise de morfometria do tubo neural nas alturas 10° ; 13° ; 17° e 20° não demonstrou diferença estatística (NS) entre nenhum dos grupos. Houve diferença estatística na altura do 15° par de somitos, entre os grupos G1 e G2 ($p = 0,0392$) e entre G2 e G3 ($p = 0,0111$), o desvio padrão do grupo G2 foi de $\pm 0,9564$ (Gráfico 2).

Apesar do G3 possuir maior dosagem da BIL com $5 \mu\text{M}$, foi constatado que a diferença estatística visualizada no G2 que possui $2,5 \mu\text{M}$ de BIL foi acarretada por

questões morfológicas do processo de neurulação normal, ou seja, os organismos possuem uma variabilidade individual intraespecífica (BUTLER, 2018), sendo constatado que a substância não alterou o padrão morfológico. Esta análise é de suma importância, uma vez que os defeitos do tubo neural podem ocorrer quando não há um fechamento ou quando existe uma imperfeição que pode acarretar na oclusão incompleta da região do tubo neural (SILVA *et al.*, 2021).

Gráfico 2. Comparação dos grupos experimentais, referentes às medidas selecionadas do tubo neural 10° ; 13° ; 15° ; 17° e 20° .

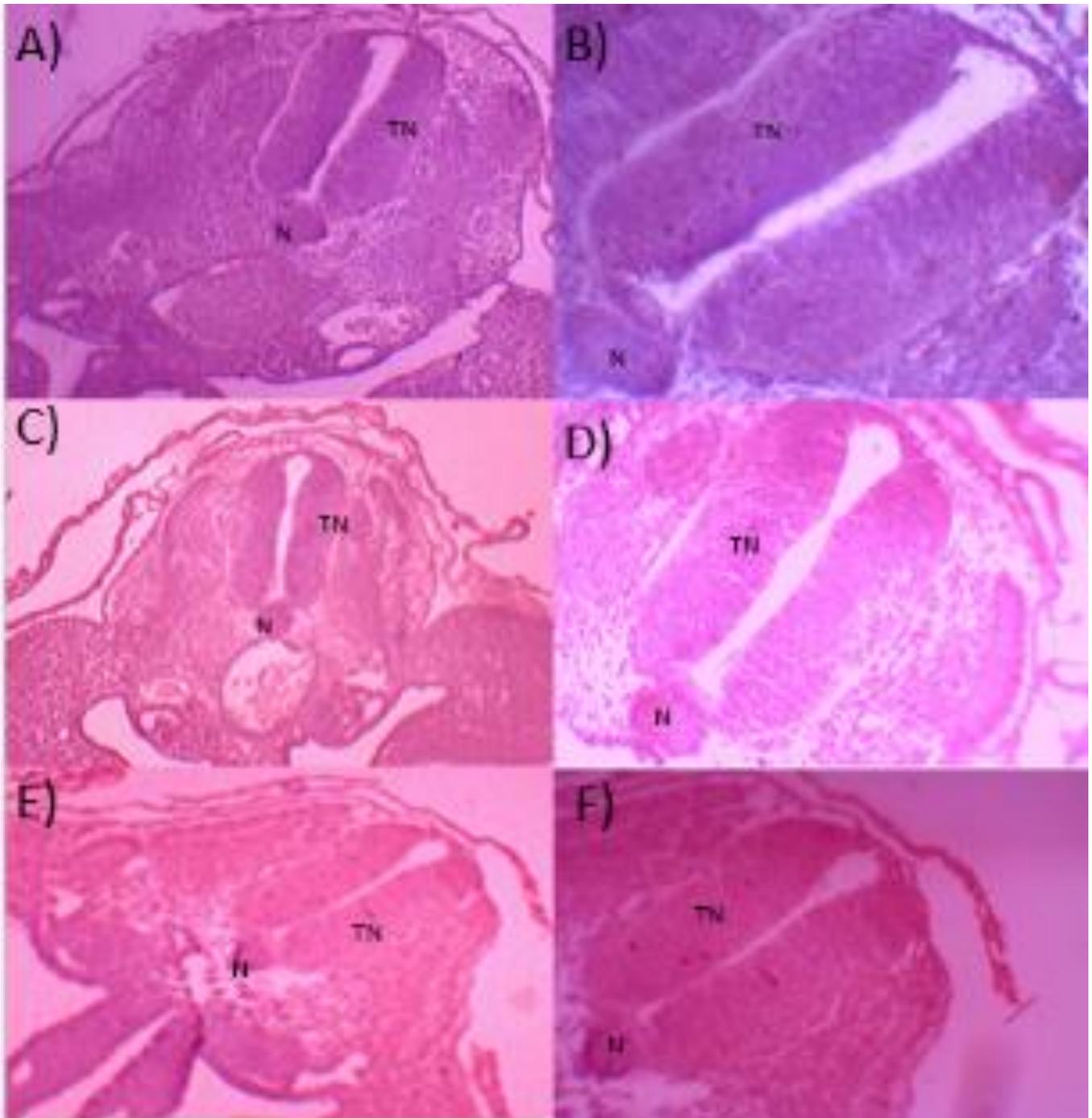


Fonte: Os autores (2023).

Cortes transversais dos embriões, figura 3, revelaram que as estruturas de tubo neural e notocorda em todos os grupos tinham aspectos compatíveis com um

desenvolvimento normal, independente da concentração de BIL.

Figura 3. Fotomicrografias de embriões de *G. gallus domesticus*.



Legenda. O tubo neural apresenta o teto e o assoalho delgado e suas laterais espessas (TN), a notocorda com o aspecto arredondado e compacta (N), ambas com morfologia normal, magnitude 10x (A, C e E) e magnitude 40x (B, D e F). G1. (A, B), G2. (C, D) e G3. (E, F). Coloração Hematoxilina. Fonte: Os autores (2023).

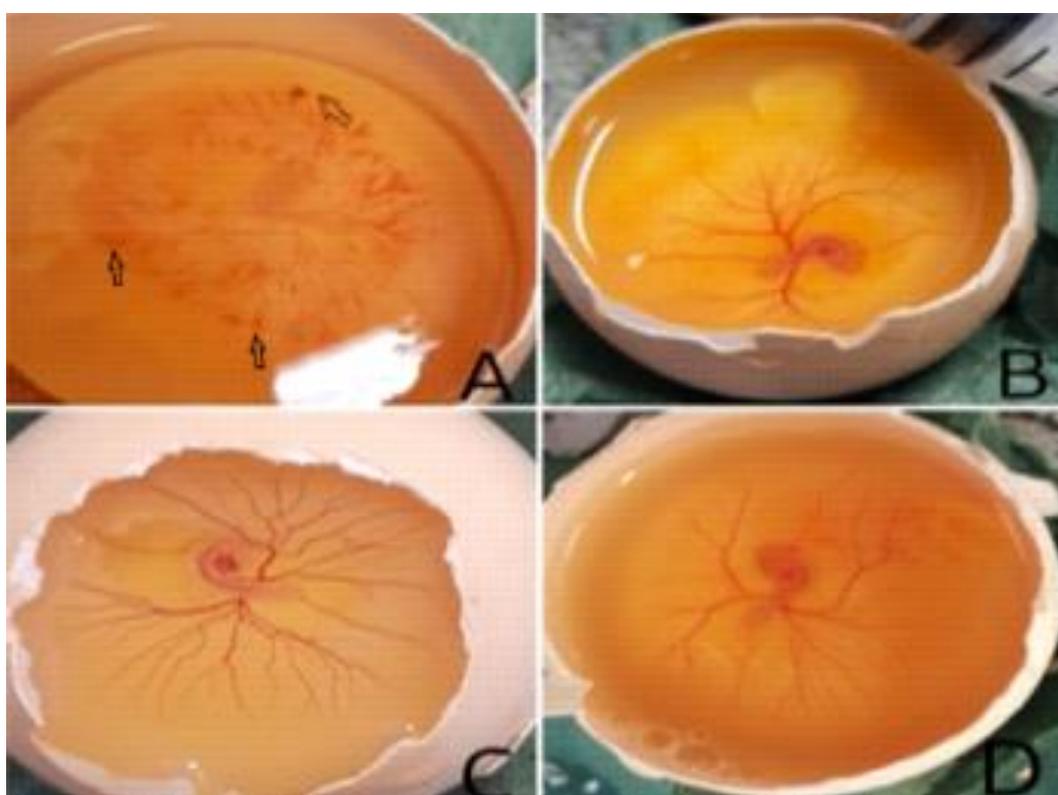
As lectinas de veneno de cobras são denominadas hemostáticas por causar danos nas fibras musculares de vasos, sendo atribuídas as mesmas alterações nas células endoteliais e plaquetas (EBLE, 2019).

No teste HET-CAM realizado com a BIL em embriões de *Gallus gallus*, não foi detectado processo hemorrágico (Figura 4).

O grupo G1 (controle negativo) foi identificado como “não irritante” para a membrana cório-alantoide e o grupo G4 sendo o controle positivo identificado como “severamente irritante” para a membrana cório-alantoide corroborando com o estudo de BUDAI *et al.* (2021). Os grupos G2 e G3, não apresentaram macroscopicamente

hemorragia ou qualquer irritação visível a olho nu, na membrana cório-alantoide. Os autores Yurisbeth Zanotty *et al.*, 2019, isolaram e caracterizaram a proteína Mutacytin-1 de veneno da serpente *Lachesis muta muta*, proteína semelhante a lectina de ligação a galactosídeo dependente de Ca^{2+} da *Bothrops jararaca*, ao testar essa proteína em larvas de peixe de zebra foi constatado a ocorrência de alterações na circulação, presença de trombose e apoptose em tecidos pericárdicos.

Figura 4. Membrana corioalantoide durante o teste HET-CAM.



Legenda. 4A- G4 com 0,1M NaOH, presença de pontos hemorragia (setas), 4B- G1 com PBS, 4C- G2 com soluções de 2,5 μ M de BIL, 4D- G3 com 5 μ M de BIL, sem presença de pontos hemorrágicos. Fonte: Os autores (2023).

CONCLUSÃO

A lectina de *Bothrops leucurus* (BIL), não promoveu nenhuma alteração no desenvolvimento do sistema nervoso, dentro dos parâmetros que foram utilizados. Não sendo prejudicial ao desenvolvimento morfológico do organismo. Os resultados têm implicações clínicas importantes para a compreensão dos mecanismos de embriotoxicidade, que auxiliam na contribuição para o desenvolvimento de fármacos e estratégias terapêuticas mais eficazes.

Quanto às limitações do estudo, o tempo de

incubação é um fator crucial, uma vez que é essencial manter os embriões dentro de uma faixa de desenvolvimento que se assemelhe à dos embriões humanos. Apesar do resultado promissor, planejamos conduzir análises adicionais das atividades biológicas da BIL em diferentes estágios do embrião de *G. gallus domesticus*, incluindo a utilização de marcadores para rastrear a migração celular, como células das cristas neurais. Esta abordagem proporcionará uma investigação mais aprofundada dos efeitos da BIL sobre o neurodesenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- ARANDA-SOUZA, M. Â.; LORENA, V. M. B.; SANTOS CORREIA, M. T.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. *In vitro* effect of *Bothrops leucurus* lectin (BLL) against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* infection. **International journal of biological macromolecules**, v. 120, p. 431-439, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.064.
- BRAGA, J. R. M. *et al.* Sexual and ontogenetic variation of *Bothrops leucurus* venom. **Toxicon**, v. 184, p. 127-135, set. 2020. DOI:10.1016/j.toxicon.2020.05.028.
- BUDAI, P. *et al.* Comparative evaluation of HET-CAM and ICE methods for objective assessment of ocular irritation caused by selected pesticide products. **Toxicology In Vitro**, v. 74, p. 105150. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105150>.
- BUTLER, H. An atlas for staging mammalian and chick embryos. **Crc Press**, 2018.
- CAVALCANTE, J. S. *et al.* A fingerprint of plasma proteome alteration after local tissue damage induced by *Bothrops leucurus* snake venom in mice. **Journal Of Proteomics**, v. 253, p. 104464, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104464>.
- CHIPPAUX, J. P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease!. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 23, n. 1, p. 1-2, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0127-6>.
- COSTA, H.C.; BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: Mudanças taxonômicas. Versão 2014.2. **Disponível em Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Disponível em: <https://sbherpetologia.org.br/lista-repteis-sbh-copy-copy>. Acesso em: 10 de novembro de 2023.
- CRUZ, J. I. O. D. *et al.* Potential pharmacological applications of lectins. **Tópicos Multidisciplinares em Ciências Biológicas** 3, p. 31-42, 2020. DOI: 10.22533/at.ed.2652024075.
- DOURADO, D. M. *et al.* Efeitos da terapia de extrato de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Chá verde) e fotobiomodulação em camundongos *Swiss* injetados com veneno de *Bothrops alternatus*. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 1, p. 1071-1088, 2020. DOI: <https://doi.org/10.34119/bjhrv5n1-092>.
- EBLE, J. A. Structurally robust and functionally highly versatile—C-type lectin (-related) proteins in snake venoms. **Toxins**, v. 11, n. 3, p. 136, 2019. DOI: 10.3390/toxins11030136.
- GABRIEL, E. *et al.* Human brain organoids assemble functionally integrated bilateral optic vesicles. **Cell Stem Cell**, v. 28, n. 10, p. 1740-1757. e8, 2021. DOI: 10.1016/j.stem.2021.07.010.
- GÜÇLÜ, E. *et al.* A tomentosina induz apoptose em células cancerosas pancreáticas através do aumento das espécies reativas de oxigênio e diminuição do potencial de membrana mitocondrial, 2022.
- HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Developmental Dynamics**, v. 195, n. 4, p. 231-272, 1992. DOI: 10.1002/aja.1001950404.
- KWASNIEWSKI, F. H. *et al.* *Bothrops jararacussu* snake venom lectin induces mast cell activation and vascular permeability enhance in an animal model. **Toxicon**, v. 205, p. 20-23, 2022. DOI: 10.1016/j.toxicon.2021.11.006.
- KMECICK, M.; COSTA, M. C. V.; RIBEIRO, C. A. O.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Morphological evidence of neurotoxic effects in chicken embryos after exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) and inorganic cadmium. **Toxicology**, v. 427, p. 152286, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2019.152286>.
- LUCKMANN, M. R. *et al.* Pyriproxyfen exposure induces DNA damage, cell proliferation impairments and apoptosis in the brain vesicles layers of chicken embryos. **Toxicology**, v. 464, p. 152998, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2021.152998>.
- MAROTO, M.; BONE, R. A.; DALE, J. K. Somitogenesis. **Development**, v. 139, n. 14, p. 2453-2456, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.069310>.
- MORAIS, I. C. O. *et al.* A L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops leucurus* induz nefrotoxicidade via apoptose e necrose. **PLoS One**, v. 10, n. 7, pág. e0132569, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132569>.

NUNES, E. S. *et al.* (2012). Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**, v. 59, n. 7-8, p. 667-671, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.002>.

PAULA, R. A.. Estudo da dinâmica molecular das lectinas de veneno de *Bothrops jararaca* (BJL), *Bothrops jararacussu* (BJcuL) e *Bothrops leucurus* (BIL). 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/30716>. Acesso em: 10 de novembro de 2023.

POPP, N.; DEBIASI, M.; MAURER, F. Análise morfológica do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus* submetidos ao cloreto de manganês. **Jornada Integrada em Biologia**, 21-28, 2016. Disponível em: <https://periodicos.unoesc.edu.br/jornadaintegradaembologia/article/view/10237>. Acesso em: 10 de novembro de 2023.

SAXENA, S.; GUPTA, A.; SHUKLA, V.; RANI, V.. Functional annotation of differentially expressed fetal cardiac microRNA targets: implication for microRNA-based cardiovascular therapeutics. **3 Biotech**, v. 8, n. 12, p. 1-11, 21 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-018-1520-8>.

SILVA, T. F. *et al.* Embryotoxicity of Yangambin Isolated from *Ocotea duckei* Vattimo-Gil in *Gallus gallus domesticus* Embryos. **Pharmacognosy Research**, v. 13, n. 3, p. 135-139. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.5530/pres.13.3.5>.

TAKASE, Y.; TAKAHASHI, Y. Blood flow-mediated gene transfer and siRNA-knockdown in the developing vasculature in a spatio-temporally controlled manner in chicken embryos. **Developmental biology**, v. 456, n. 1, p. 8-16, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.08.001>.

ZANOTTY, Y. *et al.* Mutacytin-1, a new C-Type lectin-like protein from the Venezuelan Cuaima (*Lachesis muta muta* Linnaeus, 1766)(Serpentes: Viperidae) snake venom inducing cardiotoxicity in developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Zebrafish**, v. 16, n. 4, p. 379-387, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/zeb.2019.1731>.

