

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA LECTINA DE  
FOLHAS *Schinus terebinthifolius* Raddi E DO EFEITO SOBRE A  
FORMAÇÃO DE VASOS DO SACO VITELÍNICO E MORFOLOGIA DE  
EMBRIÕES DE *Coturnix japonica***

*Ardilles Juan Carlos Alves dos Santos*

Recife

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**Ardilles Juan Carlos Alves dos Santos**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA LECTINA DE  
FOLHAS *Schinus terebinthifolius* Raddi E DO EFEITO SOBRE A  
FORMAÇÃO DE VASOS DO SACO VITELÍNICO E MORFOLOGIA DE  
EMBRIÕES DE *Coturnix japonica***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

**Orientador:**

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual

**Co-Orientador:**

Prof. Dr. Romildo de Aluquerque Nogueira

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S237a Santos, Ardilles Juan Carlos Alves dos.  
Avaliação da atividade imunomoduladora da lectina de folhas  
*Schinus terebinthifolius* Raddi e do efeito sobre a formação de  
vasos do saco vitelínico e morfologia de embriões de *Coturnix*  
*japonica* / Ardilles Juan Carlos Alves dos Santos. – Recife, 2018.  
99 f.: il.

Orientador(a): Emmanuel Viana Pontual.  
Coorientador(a): Romildo de Albuquerque Nogueira.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal,  
Recife, BR-PE, 2018.  
Inclui referências.

1. Angiogênese 2. *Schinus terebinthifolia* 3. SteLL 4. Citocinas  
5. Imunomodulação 6. Vasculogênese I. Pontual, Emmanuel Viana,  
orient. II. Nogueira, Romildo de Albuquerque, coorient. III. Título

CDD 574

**ARDILLES JUAN CARLOS ALVES DOS SANTOS**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA LECTINA DE  
FOLHAS *Schinus terebinthifolius* Raddi E DO EFEITO SOBRE A FORMAÇÃO  
DE VASOS DO SACO VITELÍNICO E MORFOLOGIA DE EMBRIÕES DE  
*Coturnix japonica*

Tese defendida em 27 de dezembro de 2018.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual  
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal – UFRPE  
Presidente

---

Profa. Dra. Tatiana Souza Porto  
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal – UFRPE

---

Dr. Edbhergue Ventura Lola Costa

---

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia – UFPE

---

Profa. Dra. Lidiane Pereira de Albuquerque  
Departamento de Bioquímica e Farmacologia - UFPI

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por permitir a realização de todas as conquistas em nossas vidas, sempre nos guiando pelos melhores caminhos.

Agradeço imensamente aos meus pais Adjane e Carlos, pelo incentivo em todos os momentos desta etapa, sempre mostrando a importância dos estudos em nossas vidas, e por acreditarem em minhas escolhas. Ao meu irmão Panait por todo apoio dado nos momentos de trabalho e estresse. À minha esposa Eva por toda ajuda na realização das etapas deste trabalho. Ao meu filho Heitor maior inspiração para realização das etapas e tarefas diárias, por todo amor e sorrisos diários.

Agradecimento mais que especial ao meu orientador, Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual, pela pessoa simples, humilde, humana que é. Além de um grande profissional, um grande amigo, sendo fundamental para realização deste trabalho. Sempre se mostrando disponível nos momentos mais difíceis, com sugestões e conselhos, do qual tenho muito orgulho de citá-lo como um dos responsáveis pela minha formação profissional.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira, pelo qual tenho grande admiração. Por ter me acolhido em seu laboratório inicialmente como estágio voluntário, fornecendo a base necessária para dar continuidade no mestrado, seguindo até o doutorado. Sempre com conversas e conselhos. O senhor é um exemplo de simplicidade, compreensão e competência.

Ao colegas e amigos do LABTEC e CENAPESQ, em especial Felipe, Edbhergue e Rayssa pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, compartilhando momentos de aprendizagem e de trabalho. Aos colegas Hanna, Leandro, Radamés e Jeine pelos momentos únicos vividos no laboratório, de descontração, brincadeiras e as dores de cabeça.

Aos coordenadores da Pós-Graduação em Biociência Animal Prof. Rinaldo Mota e Prof<sup>a</sup>. Tatiana Porto, por todo apoio dado a frente da coordenação do programa. Aos professores e funcionários da Pós-Graduação

por todo conhecimento e sugestões sempre valiosas para nossa formação. A André e Renata, responsáveis pelos cuidados do Biotério do DMFA.

Ao Prof. Thiago Napoleão e a Prof<sup>a</sup>. Patrícia Paiva da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pelo auxílio na realização das etapas deste trabalho, fornecendo equipamentos, reagentes e o próprio laboratório para realização da etapa de purificação da lectina SteLL. À professora Cristiane Moutinho (UFPE) pela colaboração que possibilitou os resultados da investigação de atividade imunomoduladora de SteLL.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco para apoio financeiro.

Ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães, da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ Pernambuco). À Estação Experimental de Pequenos Animais de Carpina (EEPAC - UFRPE) pelo fornecimento dos ovos de codorna utilizados em nossos experimentos.

*“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços.”*

*-Albert Einstein.*

## RESUMO

Lectinas, proteínas que reconhecem carboidratos, têm sido relatadas como potenciais agentes imunomoduladores e antiangiogênicos. O câncer, importante problema de saúde pública, é um exemplo de doença cujo progresso está associado aos processos de inflamação e angiogênese. A alta toxicidade dos agentes quimioterápicos atualmente disponíveis tem estimulado a busca por novos compostos que sejam menos tóxicos e mais eficazes no tratamento de tumores. Folhas de *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae), a aroeira vermelha, contém uma lectina (SteLL) antimicrobiana. A presente Tese avaliou os efeitos de SteLL na viabilidade de esplenócitos de camundongos e sua capacidade de alterar a produção de citocinas e óxido nítrico por essas células. O efeito da lectina no processo de angiogênese utilizando como modelo embriões de *Coturnix japonica* foi também investigado. SteLL não foi tóxica para os esplenócitos até a concentração de 50 µg/mL, uma vez que não foi observada indução de apoptose ou necrose em relação ao controle. Não foi detectada alteração significativa nos níveis de espécies reativas de oxigênio citosólicas e mitocondriais e nos níveis de cálcio citosólico em presença de SteLL (12,5 µg/mL); dados que corroboram com a ausência de citotoxicidade. Por outro lado, uma pequena redução no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) foi registrada. O tratamento dos esplenócitos com SteLL (12,5 µg/mL) resultou em aumento na liberação das citocinas IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-2, indicando uma resposta predominantemente pró-inflamatória (Th1 e Th17). Foi detectada ainda uma pequena redução na produção de óxido nítrico. A análise pelos métodos da Contagem por Caixas e Dimensão de Informação revelou que SteLL (1,35 mg/ml) é um agente anti-angiogênico, uma vez que inibe a formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes. O tratamento com a lectina também provocou a redução do percentual de comprimento cefálico dos embriões de *C. japonica*, bem como de sua área total e de seu perímetro, indicando alterações morfológicas que corroboram o efeito antiangiogênico. Em conclusão, SteLL apresentou ação imunomoduladora e interferiu na neovascularização de embriões de *C. japonica*. Estes resultados estimulam futuras investigações desta lectina como um agente terapêutico para atuar em condições patológicas que envolvam os processos de inflamação e angiogênese, tais como o câncer.

**Palavras-chave:** Angiogênese, *Schinus terebinthifolia*, SteLL, citocinas, imunomodulação, vasculogênese.



## ABSTRACT

Lectins, proteins that recognize carbohydrates, have been reported as potential immunomodulatory and antiangiogenic agents. Cancer, an important public health problem, is an example of a disease whose progress is associated with the processes of inflammation and angiogenesis. The high toxicity of currently available chemotherapeutic agents has stimulated the search for new compounds that are less toxic and more effective in treating tumors. Leaves of *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae), the Brazilian peppertree, contains an antimicrobial lectin (SteLL). The present Thesis evaluated the effects of SteLL on the viability of mouse splenocytes and their ability to alter the production of cytokines and nitric oxide by these cells. The effect of the lectin on the angiogenesis process using as a model the *Coturnix japonica* embryos was also investigated. SteLL was not toxic to the splenocytes up to the concentration of 50 µg/mL, since no induction of apoptosis or necrosis was observed regarding the control. No significant changes were detected in the levels of cytosolic and mitochondrial oxygen reactive species and in the level of cytosolic calcium in the presence of SteLL (12.5 µg/mL); data that corroborate with the absence of cytotoxicity. On the other hand, a slight reduction in mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was recorded. Treatment of splenocytes with SteLL (12.5 µg/mL) resulted in increased release of IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-2 cytokines, indicating a predominantly proinflammatory response (Th1 and Th17). A small reduction in the nitric oxide production was also detected. Analysis by the Box Counting and Information Dimension methods revealed that SteLL (1.35 mg/mL) is an anti-angiogenic agent, since it inhibits the formation of new blood vessels from other pre-existing ones. The treatment with the lectin also reduced the percentage of cephalic length of *C. japonica* embryos, as well as their total area and perimeter, indicating morphological changes that corroborate the antiangiogenic effect. In conclusion, SteLL presented immunomodulatory action and interfered in the neovascularization of *C. japonica* embryos. These results stimulate future investigations of this lectin as a therapeutic agent to act in pathological conditions that involve the processes of inflammation and angiogenesis, such as cancer.

**Key words:** Angiogenesis, *Schinus terebinthifolia*, SteLL, cytokines, immunomodulation, vasculogenesis.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	18
2.1 Lectinas .....	18
2.2 O sistema imunológico .....	19
2.3 Vasculogênese e angiogênese .....	24
2.3.1 Codornas japonesas como modelo para avaliar angiogênese e vasculogênese .....	28
2.3.2 Geometria Fractal .....	32
2.4 O câncer: importante patologia favorecida pelos processos de inflamação e angiogênese .....	34
2.5 <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi .....	38
3. OBJETIVOS .....	41
3.1 OBJETIVO GERAL .....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
4. REFERÊNCIAS .....	42
4. CAPÍTULO I .....	56
<i>Schinus terebinthifolia</i> leaf lectin (SteLL) stimulates cytokine release by mice splenocytes .....	56
5. CAPÍTULO 2 .....	79
<i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi leaf lectin (SteLL) interferes with in the neovascularization and morphological development of the <i>Coturnix japonica</i> embryos .....	79
6. CONCLUSÃO .....	98
7. Anexo .....	99
7.1 Comprovante de submissão do artigo “ <i>Schinus terebinthifolia</i> leaf lectin (SteLL ) stimulates cytokine release by mice splenocytes” ao periódico <i>International Journal of Biological Macromolecules</i> . .....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS

- CDR – Domínio de reconhecimento de carboidratos (inglês)
- CECbCv – Comprimento do eixo da flexura da cabeça até a flexura cervical
- CECvCd – Comprimentodo eixo da flexura cervical até a flexura caudal
- CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono
- CPE – Células progenitoras endoteliais
- Dcc – Dimensão de contagem por caixas
- Dinf – Dimensão de informação
- FGF – fator de crescimento fibroblástico
- FGF-1 – Fator de crescimento fibroblástico tipo 1
- FGF-2 – Fator de crescimento fibroblástico tipo 2
- HER2/neu – Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (inglês)
- HGF – Fator de crescimento hepático
- Hif-1 – Fator indutor por hipóxia-1
- Hif-1 $\alpha$  – Fator indutor de hipóxia-1 $\alpha$
- IgE – Imunoglobulina E
- IgG – Imunoglobulina G
- IFN-  $\gamma$  – Interferon  $\gamma$
- IL – Interleucina
- MEC – Matriz extracelular
- MPPs – Metaloproteinases da matriz
- MSV – Membrana do saco vitelínico
- NK – Natural killer
- OMS – Organização mundial de saúde
- PCF – Percentual de comprimento cefálico
- PGDF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PHDs – Domínios de prolil-hidroxilase
- PBMC – Células mononucleares do sangue periférico humano

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SV – Saco vitelínico

TGF $\beta$  – Fator de crescimento transformador

TNF – Fator de necrose tumoral

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

- Figura 1. Ensaio de atividade hemaglutinante utilizando eritrócitos humanos ou de outros animais, empregado para detecção da presença de lectinas (A). Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante realizado em presença de carboidratos livres ou conjugados (B)..... 18
- Figura 2. Imagem sumarizada da vasculogênese (A) e angiogênese (B)..... 24
- Figura 3. (A) Exemplar adulto de codorna japonesa (*Coturnix japonica*, Fasianidae). (B) Comparação entre o ovo de codorna e o ovo de galinha..... 28
- Figura 4. (A) Localização do saco vitelínico, estruturas extraembrionárias e o embrião. (B) Membrana do saco vitelínico com sua área vascular, embrião de codorna (*Coturnix japonica*) com 72 hora de incubação..... 29
- Figura 5. *Schinus terebinthifolia* Raddi. Hábito da planta (A) e seu fruto (B)..... 38

### Capítulo II

- Figure 1. Investigation of the cytotoxic effect of *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) (3.12–50 µg/mL) on BALB/c mice splenocytes after incubation for 24 h. Cytotoxic effect was assessed by flow cytometry using annexin V (AnnV) and propidium iodide (PI). AnnV–/PI+ cells were considered necrotic and AnnV+/PI– cells were considered apoptotic. Bars represent the mean ± standard deviation of six experiments..... 73

Figure 2. Evaluation of the effects of 24-h treatment of BALB/c mice splenocytes with *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) at 12.5 µg/mL on cytosolic calcium concentration (A), cytosolic (B) and mitochondrial (C) reactive oxygen species (ROS) production, and membrane mitochondrial potential ( $\Delta\Psi_m$ ) (D) after incubation for 24 h. Bars represent the mean  $\pm$  standard deviation of six experiments..... 74

Figure 3. Evaluation of the effects of 24-h treatment of BALB/c mouse splenocytes with *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) at 12.5 µg/mL on the release of cytokines (A–G) and nitric oxide (H). Bars represent the mean  $\pm$  standard deviation of six experiments..... 75

### Capítulo III

Figure 1. Effect of the *Schinus terebinthifolia* lectin (SteLL) on the formation of vascular network from *Coturnix japonica* yolk sac membrane. Investigation through box counting method (A) and information dimension method (B). The statistical treatment used the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc multiple-comparison test. The significance level was 5%, being considered differences between the treatments when  $p < 0.05$ . The data were expressed as medians with the respective deviation interquartile. Different letters indicate significant differences between the treatments..... 94

Figure 2. Effect of the *Schinus terebinthifolia* lectin (SteLL) on the development of *Coturnix japonica*. Embryos area (A), perimeter (B) and percentage of cephalic length (C). The statistical treatment used the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc multiple-comparison test. The significance level was 5%, being considered differences between the treatments when  $p < 0.05$ . The data were expressed as medians with the respective deviation interquartile. Different letters indicate significant differences between the treatments..... 94

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1.....	34
Tabela 2.....	35

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm sido muito utilizados na medicina popular para tratamento de várias doenças em humanos ou outros animais desde os primórdios da humanidade (PANG *et al.*, 2014). A utilização popular desses produtos aumenta o interesse científico visando a comprovação da sua eficácia e segurança, bem como a substituição de fármacos de elevada toxicidade e custo utilizados atualmente. Essa comprovação resulta no desenvolvimento de tecnologias para disponibilização desses produtos como medicamentos. E assim os produtos naturais movimentam fatia considerável do mercado de fármacos, o que estimula a busca pela compreensão mais apurada de suas propriedades químicas e de suas funções com vista em aplicações farmacológicas (KHAN, 2018).

As plantas são importantes fontes de produtos naturais cuja utilização popular é amplamente difundida. Suas propriedades medicinais têm sido atribuídas a produtos do seu metabolismo primário ou secundário (KOROLKOVAS, 1996; RATES, 2001; GARCIA *et al.*, 2009). Dentre esses produtos biologicamente ativos, destacam-se as lectinas, proteínas amplamente encontradas na natureza e descritas em microrganismos, plantas e animais. Elas reconhecem carboidratos e sua ligação a glicoconjugados presentes em superfícies celulares resulta em uma gama de propriedades biológicas (DIAS *et al.*, 2015).

O câncer é uma grande preocupação em saúde pública no cenário mundial, sendo estimadas cerca de 9,6 milhões de mortes por câncer em 2018, o que o coloca como a segunda principal causa de morte no mundo (OMS, 2018). Os processos inflamatórios contribuem para a iniciação e aumento da proliferação celular desordenada que caracteriza a doença, podendo evoluir para formação e crescimento tumoral. Em outras palavras, os processos inflamatórios fornecem as condições ideais para o crescimento da massa tumoral, que também pode estar associado a infecções microbianas ou doenças autoimunes (MANTOVANI, 2018). A angiogênese é um evento necessário ao crescimento de tumores sólidos, que garante o suprimento de oxigênio, nutrientes essenciais e vários fatores de crescimento necessários



para a proliferação de células cancerígenas e para a formação de metástases (RONCA et al., 2017).

Os efeitos adversos e complicações associados aos agentes quimioterápicos atualmente disponíveis representam as limitações dos tratamentos anticâncer convencionais (SHIVAMADHU et al., 2017). Nesse sentido, novos agentes que apresentem capacidade de modular a atividade do sistema imune e/ou interferir no processo de angiogênese podem ser potenciais agentes antitumorais.

Há relatos na literatura que lectinas vegetais podem apresentar atividade antitumoral, inclusive *in vivo*, sendo indicadas como potenciais agentes terapêuticos contra o câncer (YAU et al., 2015; SINGH et al., 2016). Também tem sido amplamente reportado que as lectinas podem exercer efeito imunomodulador, o qual está relacionado com a interação com porções de glicano da superfície das células imunitárias (MACIEL et al., 2004; CORIOLANO et al., 2018). Essa interação pode desencadear a produção de mediadores inflamatórios (fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas) no microambiente tumoral e contribuir, dependendo do estágio da vigilância imunológica, para a referida inibição da tumorigênese (SOUZA et al., 2013). Relatos recentes de lectinas que apresentam efeito antiangiogênico também podem ser encontrados. Este efeito tem sido relacionado com a inibição de metaloproteinases e pode resultar em redução drástica na neovasculatura tumoral (SHIVAMADHU et al., 2017).

A ação imunomoduladora das lectinas vegetais pode resultar na sua capacidade de modificar positivamente a resposta imune sob certas condições patológicas além do câncer (BRITO et al., 2017), incluindo infecções por microrganismos e doenças do sistema imune como a diabetes tipo 1, artrite reumatoide, psoríase ou artrite psoriática, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico, doença inflamatória intestinal, doença de Addison, anemia perniciosa, doença celíaca, dentre outras.

*Schinus terebinthfolia* Raddi (Anacardiaceae), a pimenta rosa, é uma planta medicinal cujas folhas são muito utilizadas, em especial no Brasil, para o tratamento e reparo tecidual de feridas na pele. Também são bastante utilizadas infusões das folhas para tratamento de infecções respiratórias, do trato digestivo e urinário, bem como no reumatismo e candidíase oral (RIBAS et

al., 2006; LINDENMAIER, 2008). As folhas dessa planta contêm uma lectina (SteLL) ligadora de quitina termoestável, resistente à variação de pH na faixa de 5,0 a 8,0 e tóxica para microorganismos de importância médica (GOMES et al., 2013).

A presente Tese foi norteada pela hipótese que SteLL pode representar um novo bioproduto base para formulação de novos medicamentos ou atuar como adjuvante em estratégias terapêuticas para tratamento de condições patológicas que envolvam processos de inflamação e angiogênese. Este trabalho avaliou os efeitos de SteLL na viabilidade de esplenócitos de camundongos e sua capacidade de alterar a produção de citocinas e óxido nítrico (atividade imunomoduladora) por essas células. O efeito da lectina no processo de angiogênese utilizando como modelo embriões de *Coturnix japonica* foi também investigado.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

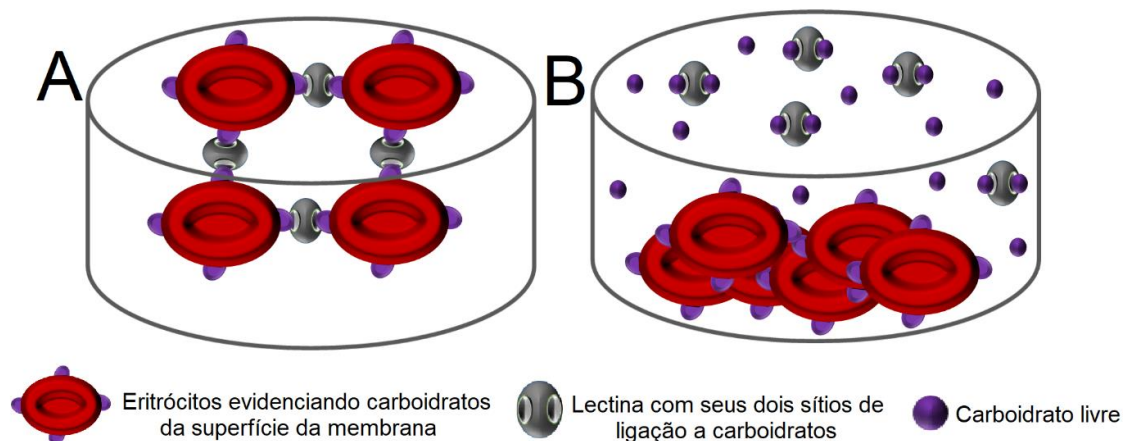
### 2.1 Lectinas

Lectinas são uma classe diversificada de proteínas ou glicoproteínas com afinidade por carboidratos livres ou conjugados, cuja expressão não está ligada a uma reação do sistema imune. Essas proteínas possuem pelo menos um domínio não catalítico de reconhecimento de carboidratos (CRD; do inglês *carbohydrate-recognizing domain*), o qual tem a propriedade de ligar açúcares de forma reversível e com alta especificidade, sem modificar a estrutura covalente do ligante (MACEDO et al., 2015; PROCÓPIO et al., 2017).

A especificidade da lectina é determinada pelo arranjo espacial decorrente da conformação dos aminoácidos que compõem o CRD e daqueles aminoácidos na sua microvizinhança (PROCÓPIO et al., 2017). Adicionalmente, íons metálicos podem ser requeridos para o correto posicionamento do carboidrato a ser ligado (PAIVA et al., 2010). A ligação entre os CRDs das lectinas e carboidratos simples (monossacarídeos e dissacarídeos) ou complexos (polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídios) ocorre através de ligações fracas, incluindo pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas (PROCÓPIO et al., 2017).

As lectinas, quando possuem em sua molécula pelo menos dois CRDs, podem ser detectadas através de um ensaio simples, utilizando eritrócitos humanos ou de outros animais, que tem como fundamento a capacidade dessas proteínas em reconhecer carboidratos da superfície de células e causar sua aglutinação. A ligação cruzada entre as moléculas de lectina e os carboidratos da superfície de diferentes eritrócitos forma uma malha ou rede de aglutinação (LIMA et al., 2018), como representado na Figura 1A. Contudo, outros compostos que eventualmente estão presentes em amostras vegetais, como os taninos, podem causar dispersão dos eritrócitos ou hemólise, acarretando em um resultado falso positivo para a hemaglutinação. Nesse sentido, para confirmar a atividade de lectina, realiza-se o ensaio de inibição da atividade hemaglutinante em presença de uma solução concentrada de carboidratos livres ou conjugados (figura 1B). Neste ensaio, os carboidratos ocupam os CRDs na molécula de lectina inibindo a aglutinação dos eritrócitos

(PAIVA et al., 2012). Adicionalmente, este ensaio de inibição da atividade hemaglutinante define a especificidade de ligação da lectina.



**Figura 1.** Ensaio de atividade hemaglutinante utilizando eritrócitos humanos ou de outros animais, empregado para detecção da presença de lectinas (A). Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante realizado em presença de carboidratos livres ou conjugados (B). Fonte: Lima et al. (2018).

Em vegetais, as lectinas podem ser extraídas de diferentes partes como folhas, flores, sementes, raízes, caule (cerne ou casca) e têm demonstrado possuir uma variedade de atividades biológicas incluindo atividade antitumoral, anti-inflamatória, anticoagulante, hipoglicêmica, entre outras (BRUSTEIN et al, 2012; ALBUQUERQUE et al, 2014).

## 2.2 O sistema imunológico

O sistema imune é responsável por combater microorganismos invasores, remover células mortas e renovar estruturas, bem como é ativo contra células alteradas que surgem como resultado de mitoses anormais e, se não forem destruídas, podem dar origem a tumores. O sistema de defesa humano constituído de três níveis: o primeiro é formado pelas barreiras anatômicas e fisiológicas; o segundo nível pela imunidade inata; o terceiro e último pela imunidade adaptativa (DEMPSEY et al., 2003; TURVEY & BROIDE, 2010; SCHENTEN & MEDZHITOV, 2011).

As barreiras anatômicas e fisiológicas do corpo humano constituem a primeira linha de defesa do organismo contra os patógenos, tendo como principais elementos a pele saudável, movimentos protetores como espirro, e o baixo pH estomacal (TURVEY & BROIDE, 2010). A imunidade inata vai aumentar a proteção do organismo, ocorrendo através da identificação de padrões moleculares associados a patógenos invariantes, atuando nos componentes microbianos conservados que são compartilhados por grandes grupos de patógenos. A sua velocidade de ação é uma das características marcantes da imunidade inata. Após alguns minutos de exposição ao patógeno, o sistema imune inato começa a gerar uma resposta inflamatória protetora (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002; FRANK, 2010; SCHENTEN & MEDZHITOV, 2011).

A imunidade inata é realizada por células hematopoiéticas e não hematopoiéticas. Entre as células hematopoiéticas tem-se os macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, células *Natural Killer* (NK), células da pele e células de revestimento das mucosas respiratórias, gástricas e do trato geniturinário. Os cílios epiteliais que participam no transporte de muco favorecendo sua renovação após ser contaminado por partículas estranhas também participam da imunidade inata (TURVEY & BROIDE, 2010). Além desses componentes, o as células do sistema imune inato também possuem um grupo de receptores de membrana que participam da transdução de sinal na comunicação entre as células e proteínas citoplasmáticas que se ligam a receptores específicos na superfície dos patógenos causando sua inativação (CHAPLIN, 2010).

A imunidade adaptativa é caracterizada pelo reconhecimento específico de patógenos, sendo os linfócitos B (que se originam da medula óssea) e T (que se originam do timo) os principais componentes do sistema imune adaptativo. O sistema imune adaptativo possui uma grande variedade de receptores, sendo responsáveis pelo reconhecimento específico de uma grande variedade de antígenos (PANCER & COOPER, 2006; BONILLA & OETTGEN, 2010).

A resposta inflamatória a estímulos nocivos tais como agentes infecciosos, fisiológicos ou químicos, libera vários mediadores inflamatórios

através de células imunes (neutrófilos, macrófagos e linfócitos), dentre os quais se destacam as citocinas.

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas hidrossolúveis extracelulares com massa molecular variando de 8 a 30 kDa. São liberadas no local da lesão pelas células imunitárias (monócitos, macrófagos, linfócitos), em resposta a proteínas quinases ativadas por mitógenos e fazem parte de um grupo de fatores extra-celulares, mediadores de comunicação no sistema imunológico que são fundamentais para a defesa contra patógenos. Podem também ser produzidas por células que não sejam linfoides, em resposta a uma infecção, como é o caso dos interferons, ou ainda, podem ser produzidas ou liberadas por células em resposta a danos, quando a integridade destas células está comprometida (O'SHEA et al., 2019).

As citocinas constituem sinais de comunicação entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes e controlam muitos aspectos do crescimento celular, desenvolvimento e sobrevivência e também podem reprogramar células no ambiente tecidual local para, desta forma, melhorar a resposta imune, atuando através de várias vias de sinalização que modulam o metabolismo celular e a programação transcricional (O'SHEA et al., 2019). Elas se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica e influenciam a atividade, diferenciação e proliferação das células imunes, bem como regulam a produção e atividade de outras citocinas que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou diminuir (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. Entre as citocinas pró-inflamatórias (resposta Th1) podemos citar as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e TNF (fator de necrose tumoral) (OLIVEIRA et al., 2011)). As citocinas anti-inflamatórias (resposta Th2) incluem IL-4, IL-10, IL-13 e TGF $\beta$  (fator de crescimento transformador). Nesta Tese será dada ênfase às citocinas pró-inflamatórias IL-2, IL-4, IL-17A, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

A administração de certas combinações de citocinas no microambiente tumoral, dependendo do estágio de progressão do tumor, induz uma forte resposta antitumoral sinérgica, incluindo o recrutamento de grande quantidade de células imunes e a geração de imunidade antitumoral sistêmica. Este pode ser um método versátil para a imunoterapia de neoplasmas malignos intratáveis (ZHANG et al., 2018).

De um modo geral, as interleucinas (ILs) são secretadas por leucócitos e macrófagos e estão envolvidas na comunicação entre leucócitos que regulam numerosos processos biológicos e respostas imunes. As interações de ILs e seus receptores em células endoteliais modulam a angiogênese, tanto em estado fisiológico quanto patológico, bem como atividade antitumoral por exemplo, configurando uma nova abordagem para o tratamento de diferentes tipos de tumor (RIBATTI, 2017).

A interleucina 2 (IL-2) é uma proteína de 15 kDa produzida principalmente por células T CD4 e, em menores quantidades por células T CD8+. Ela exerce suas ações por interação com os receptores IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$ , e IL-2R $\gamma$  através da via intracelular JAK/STAT (família Janus de tirosina cinases / fatores de transcrição) que estimula o crescimento e a proliferação de linfócitos T e B. Ela também induz a produção de outras citocinas como IFN $\gamma$  e TNF $\beta$ , resultando na ativação de monócitos, neutrófilos e células NK. A IL-2 tem sido amplamente utilizada em terapias oncológicas, por exemplo para tratamento de melanoma metastático, carcinoma de células renais e leucemia mielogênica (BRUNE et al., 2006; ROSENBERG, 2014; MITRA & LEONARD, 2018).

A interleucina 4 (IL-4) é uma glicoproteína de 15 kDa com propriedades anti-inflamatórias que é produzida por linfócitos T CD4, mastócitos, eosinófilos, e basófilos. Ela atua sobre linfócitos T e B, células NK, mastócitos, sinoviócitos e células endoteliais, também utilizando a via JAK/STAT. A IL-4 induz a diferenciação dos linfócitos B para produzir IgG e IgE, importantes imunoglobulinas em alergias e respostas contra helmintos. A IL-4 afeta os macrófagos ativados reduzindo os efeitos de IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, e IL-8 e inibindo a produção de EROS. Adicionalmente, ela aumenta a susceptibilidade dos macrófagos ao efeito de glicocorticóides. IL-4 tem potencial terapêutico em muitas situações clínicas incluindo psoríase, osteoartrite, linfoma e asma (ROSENBERG, 2014; MITRA & LEONARD, 2018).

A interleucina 17 (IL-17) é uma proteína homodimérica com 155 aminoácidos predominantemente produzida por linfócitos T CD4. A IL -17A tem atividade pró-inflamatória por estimular a produção de IL-6, IL-8 (quimiocina) e moléculas de adesão intercelular em fibroblastos humanos. A atividade antitumoral da citocina IL-17 depende da produção de IFN $\gamma$  por células T

CD8+, recrutadas pela quimiocina CCR6. As células T CD4 diferenciam-se preferencialmente no subconjunto de células T Th17 por sinais de IL-6 e TGF- $\beta$  mediados pela ativação de STAT-3. A IL-17 é ativada por IL-23, que é o fator chave para a expansão e manutenção da população inflamatória Th17. A IL-23 está intimamente associada à IL-12 e compartilha a subunidade IL-12 P40 com a IL-23, que está envolvida na produção de IFN $\gamma$  pela Th1 e atividade imunológica antitumoral (ROSENBERG, 2014; SHRIHARI, 2017; MITRA & LEONARD, 2018).

Outras citocinas de resposta Th1 também têm sido relatadas como inibidoras da tumorigênese. Por exemplo, o TNF- $\alpha$  juntamente com MIP-1 $\alpha$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e NO, que são citotóxicos para células tumorais, sinalizam junto com as quimiocinas CXCL8, CXCL1, CXCL2 para que sejam recrutados e ativados neutrófilos fenotípicos N1, os quais apresentam atividade antitumoral. Adicionalmente, a indução de apoptose por ligantes de TNF e a liberação de IFN $\gamma$  inibem a proliferação de células tumorais (SHRIHARI, 2017).

Diversas síndromes de imunodeficiência primária são originadas por mutações germinativas em genes que codificam citocinas, receptores de citocinas ou mediadores de transdução de sinal. Sendo assim, doenças auto-imunes e inflamatórias podem ser resultado da superexpressão ou da atividade aumentada de citocinas. Como principais mediadores, as citocinas, seus receptores e vias de transdução de sinal se tornam alvos terapêuticos (O'SHEA et al., 2019).

A capacidade das lectinas de modular (estimular ou inibir) a produção de citocinas em culturas de células ou *in vivo* tem sido amplamente reportada e, por isso, essas proteínas têm sido apontadas como agentes imunomoduladores promissores. Esse efeito está relacionado com a interação dessas proteínas com porções de glicano presentes na superfície das células imunitárias. Essa interação pode desencadear ou inibir a produção de citocinas e induzir uma resposta do sistema imune contra tumores ou agentes infecciosos (SOUSA et al., 2013).

Em estudo recente, foi demonstrado que a lectina purificada de *Aspergillus gorakhpurensis* impediu a reação de Arthus induzida por BSA e anafilaxia sistêmica em ratos. Em culturas de esplenócitos, a capacidade funcional aumentada de macrófagos foi evidente a partir do aumento da



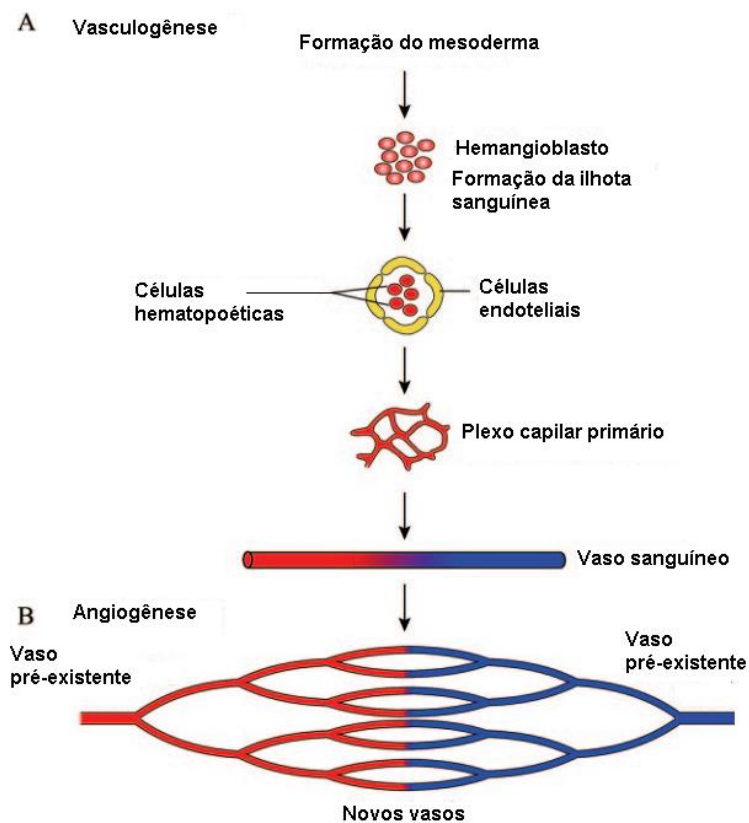
atividade de explosão respiratória e produção de óxido nítrico. Em adição, os níveis de interferon- $\gamma$  e interleucina-6 foram significativamente supra-regulados nos grupos tratados com a lectina. O efeito imunomodulatório máximo foi observado no tratamento com a lectina a 3,0 mg/kg de peso corporal (SINGH et al., 2017).

A lectina solúvel em água de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) induziu a liberação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-10, bem como de óxido nítrico por células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC). A incubação de PBMC com WSMoL também causou ativação de linfócitos T CD8+ (CORIOLANO et al., 2018).

### **2.3 Vasculogênese e angiogênese**

Durante o desenvolvimento embrionário dos vertebrados, o sistema cardiovascular é um dos primeiros sistemas funcionais a se desenvolver, sendo formado por uma complexa rede de artérias, veias, capilares e vasos linfáticos. Este sistema vai atuar no transporte de gases, nutrientes, e metabólitos por todo o corpo e desempenha um importante papel na regulação da homeostasia do embrião em desenvolvimento (DIAS *et al.*, 2002; CARMELIET, 2003; CZIROK & LITTLE, 2012).

Os constituintes básicos do sistema vascular sanguíneo desenvolvem-se a partir da membrana do saco vitelínico (MSV), incluindo as células endoteliais e as sanguíneas (glóbulo brancos e glóbulos vermelhos) que são diferenciadas respectivamente a partir das células angioblásticas e hematopoiéticas. Na MSV também se formam células tronco multipotentes e o próprio hemangioblasto, precursor comum para estas células, que se formam durante a vasculogênese. Os hemangioblastos migram em direção ao espaço entre o epiblasto e o hipoblasto, chegando ao mesoderma lateral do saco vitelínico (SV), onde irão se agrupar formando ilhotas sanguíneas (Figura 2 A). As ilhotas sanguíneas são formadas por células sanguíneas primitivas (hematopoiéticas) localizadas internamente, e células endoteliais localizadas mais na periferia formando as primeiras estruturas tubulares, constituindo uma pequena porção do sistema vascular da MSV (GARCIA-PORRERO et al., 1995; FLAMME et al., 1997; KENNEDY et al., 2007; WENG & SHENG, 2014; LI et al., 2014).



**Figura 2** - Imagem sumarizada da vasculogênese (A) e angiogênese (B). Fonte: Lamalice et al. (2007).

A MSV é o primeiro local onde os angioblastos dão origem aos vasos sanguíneos e alguns estudos mostram que os capilares presentes na MSV apresentam características estruturais e de crescimento semelhantes às encontradas em vascularizações tumorais. A vasculogênese ocorre primeiramente que a angiogênese na MSV. Nos embriões de aves a vasculogênese ocorre a partir da diferenciação e migração das células mesodérmicas para formar as ilhotas sanguíneas durante o período da gastrulação, e ocorre a formação dos plexos capilares primários nos locais das ilhotas sanguíneas a partir dos angioblastos (HARRIS & NELSON, 2010).

O plexo capilar primário é formado pela união de diferentes ilhotas sanguíneas localizadas próximas umas das outras (Figura 2) (FERGUSON *et al.*, 2005). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), é o principal responsável pela união das ilhotas sanguíneas e consequente formação do plexo capilar primário, promovendo migração da matriz extracelular (MEC) das

células endoteliais e angioblastos recentemente formados (BALDWIN, 1996; LAMALICE *et al.*, 2007; CZIROK & LITTLE, 2012).

A formação das ilhotas sanguíneas e posteriormente dos plexos vasculares primários, se dá a partir dos hemangioblastos, em um processo chamado de vasculogênese, que é a formação de novos vasos sanguíneos (BUSCHMANN & SCHAPPER, 1999; CZIROK & LITTLE, 2012; LIU *et al.*, 2014). As células progenitoras endoteliais (CPE) que podem ser derivadas da medula óssea (a partir de célula tronco hematopoiética) ou das células troncos de tecidos não hematopoiéticos, no indivíduo adulto são responsáveis pela neovascularização, exercendo um papel crítico na manutenção da homeostase dos tecidos e atuando no tratamento de lesões endoteliais (URBICH & DIMMELER, 2004; ASAHARA *et al.*, 2011).

Diferente da vasculogênese, a angiogênese está relacionada ao brotamento de novos vasos a partir dos vasos sanguíneos preexistentes (Figura 2 B) ocorrendo a remodelação e expansão do plexo vascular através do brotamento das células endoteliais para formar os vasos sanguíneos maduros (ARORA & PAPAIOANNOU, 2012; RIVAS *et al.*, 2013). A angiogênese aumenta o suprimento sanguíneo para os tecidos, resultando no surgimento de microvasos e até reparo de feridas, sendo de suma importância para o tratamento de feridas, doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, obesidade, entre outras patologias (OTROCK *et al.*, 2007).

Os fatores mecânicos, químicos e moleculares podem ser considerados principais mecanismos de indução da angiogênese. Dentre os fatores químicos, temos os mecanismos de hipóxia e gradiente de tensão de oxigênio. A hipóxia excita os macrófagos a liberarem fatores incluindo o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e FGF-1 e FGF-2 (fator de crescimento fibroblástico 1 e 2); a hipóxia também está envolvida na autorregulação do VEGF. Quanto a influência molecular as citocinas liberadas pelas células inflamatórias (macrófagos, monócitos e plaquetas) são capazes de estimular a expressão de FGF e de VEGF (TABIBIAZAR & ROCKSON, 2001; BERARDI *et al.*, 2013; MARUOTTI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013).

Um dos mecanismos de estimulação do VEGF ocorre em situação de hipóxia, em resposta o HIF-1 (fator induzido por hipóxia – 1) e aciona centenas

de genes das células submetidas à baixa concentração de oxigênio, sendo um desses genes o que expressa a proteína VEGF, sendo estes um dos principais mecanismos para proliferação celular, em especial em células cancerígenas, que se multiplicam desordenadamente e necessitam de um aumento da quantidade de nutrientes (QUTUB & POPEL, 2009; KROCK *et al.*, 2011; MADANECKI *et al.*, 2013).

A redução do fluxo sanguíneo no tecido isquêmico, leva ao acúmulo dos produtos do gene induzido por hipóxia, em especial o VEGF-A havendo um aumento da proliferação de células endoteliais. Ocorrendo o processo de angiogênese haverá maior aporte sanguíneo e assim o aumento da quantidade de oxigênio local que leva à ativação de PHDs (domínios de prolil-hidroxilase) que irá suprimir a atividade das células endoteliais (TAKEDA & FONG, 2007).

Apesar de ser um fator inerente a embriogênese, a angiogênese também pode ocorrer no indivíduo adulto, tanto em algumas condições fisiológicas como nas enfermidades. A neovascularização ocorre no adulto em algumas situações, como, crescimento do cabelo, no ciclo menstrual feminino, inflamação e cicatrização de feridas. Em algumas enfermidades graves a neovascularização vai desempenhar um papel essencial, como ocorre nas condições inflamatórias sistêmicas, doenças oculares, aterosclerose, isquemia miocárdica, crescimento e sobrevivência tumoral como a metástase (DIAS *et al.*, 2002; SCHWARTZ *et al.*, 2008; MELO-REIS *et al.*, 2010; CHUNG & FERRARA, 2011).

A literatura internacional tem demonstrado que as lectinas podem interferir nos processos de vasculogênese e angiogênese. Shivamadu *et al.* (2017), por exemplo, observaram que a lectina da *Praecitrullus fistulosus* (PfLP) inibiu a formação de novos vasos a partir dos vasos pré-existentes em membrana corioalantóide de embriões de aves. Em modelo *in vivo* utilizando tumores de roedores, a lectina apresentou uma marcante atividade antitumoral e reduziu significativamente a angiogênese, sem causar efeitos nos animais do grupo controle. Os autores demonstraram que PfLP também promoveu uma diminuição na produção de VEGF.

A lectina isolada da *Remusatia vivipara* (RVL) também foi agente antiangiogênico por inibir a formação de novos vasos assim como o número de ramificações ou bifurcações dos vasos secundários e terciários a partir de um

vaso pré-existente, sem afetar os vasos já formados em membrana corioalantóide de aves. Por ser a neoangiogênese um evento essencial para o desenvolvimento tumoral, inibindo a angiogênese conseqüentemente o desenvolvimento das células tumorais também foi comprometido (SINDHURA et al., 2017).

Silva et al., 2014 descreveram que a lectina isolada da semente da *Canavalia brasiliensis* (ConBr) apresentou um efeito anti-angiogênico *in vitro* e um efeito pró-angiogênico *in vivo*, sugerindo que esta lectina pode ser usada em células alvos envolvidas na estimulação ou inibição da angiogênese.

Os embriões de aves têm sido apontados como modelos interessantes para avaliar atividade antiangiogênica e antivasculogênica devido ao relativamente rápido desenvolvimento embrionário, à maior praticidade de manipulação e à facilidade de visualização dos resultados. Por outro lado, a interpretação destes resultados com acurácia não é tarefa fácil. Nesse sentido, a utilização de modelos matemáticos pode ser útil (COSTA et al., 2013). Neste trabalho de Tese, embriões de codorna japonesa foram utilizados como modelo para investigação de atividade antiangiogênica e antivasculogênica, sendo os resultados tratados por análise fractal. Por este motivo, estes temas serão brevemente tratados nos itens a seguir.

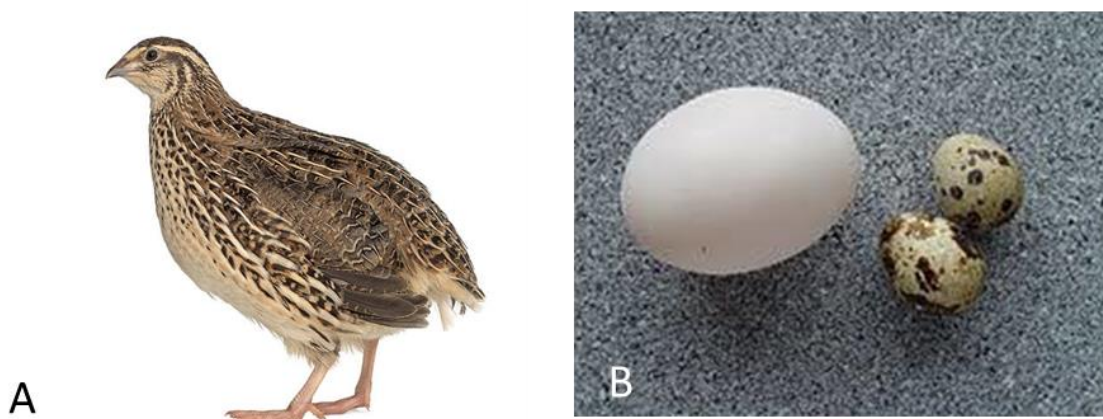
### **2.3.1 Codornas japonesas como modelo para avaliar angiogênese e vasculogênese**

*Coturnix japonica* (Figura 3A), popularmente conhecida como codorna japonesa, pertence à família Fasianidae. A espécie é organizada em dois grupos principais, as codornas comerciais e as experimentais (AINSWORTH et al., 2010; BAI et al., 2016). Nessa espécie de codornas, a maturidade sexual nas fêmeas se dá aos quarenta e dois dias e nos machos aos quarenta e oito dias. A codorna japonesa apresenta uma grande rusticidade, se adaptando a regiões com climas adversos, quente ou frio, tendo como condição ideal de conforto temperaturas entre 21 a 25° C (ALBINO & NEME, 1998).

Os ovos de codorna quando comparados aos ovos de galinha são pequenos (Figura 3B), medindo em torno de 30 mm de comprimento e pesando

em torno de 10 g, contudo podem sofrer variações. O período de incubação da codorna japonesa é de aproximadamente 16,5 dias (AINSWORTH et al., 2010).

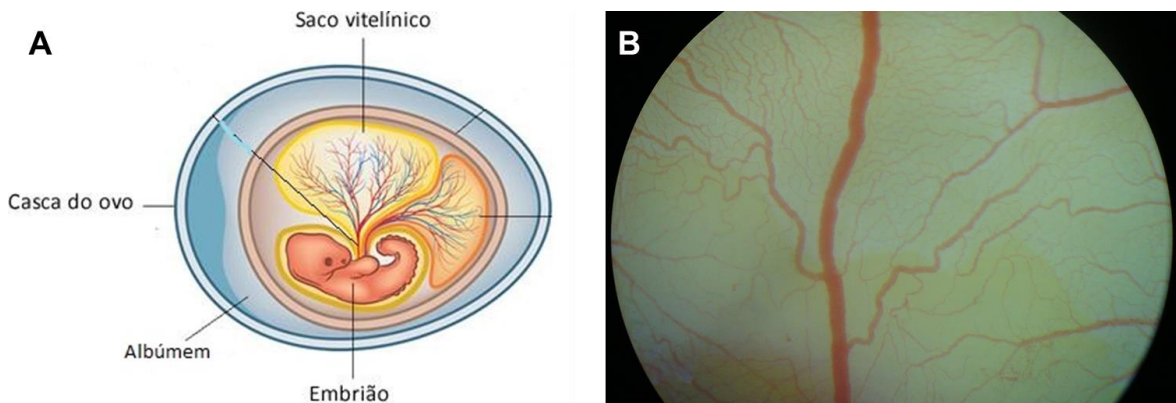
O desenvolvimento morfológico dos embriões de codorna se dá de forma bastante rápida. No primeiro dia de incubação, se inicia o crescimento dos primórdios da traquéia, no segundo dia os primórdios dos vasos sanguíneos começam a aparecer na superfície do ovo, e é possível visualizar sangue na região central ou em torno do blastoderma. Já no terceiro dia surge o globo ocular e é possível visualizar o embrião. No décimo sexto dia seu desenvolvimento está completo, e por volta do décimo sétimo dia se dá o nascimento (BAI et al., 2016). Baixo peso, tamanho reduzido e curto intervalo de tempo entre as gerações são algumas características que fazem das codornas japonesas valiosos modelos experimentais que se destacam nas áreas da Epidemiologia, Fisiologia, Histologia, Reprodução animal, Embriologia e Farmacologia (BAI et al., 2016).



**Figura 3.** (A) Exemplar adulto de codorna japonesa (*Coturnix japonica*, Fasianidae). (B) Comparação entre o ovo de codorna e o ovo de galinha. Fonte: <https://www.istockphoto.com>.

O ovo é uma estrutura bastante complexa tanto química quanto fisicamente, apresentando em seu interior substâncias essenciais para a proteção e o completo desenvolvimento do embrião. É formado basicamente por três componentes, a casca (cutícula, membrana externa da casca, câmara de ar e membrana interna da casca), a clara, também conhecida como albume (ligamentos do albume, calazas, camada cacazífera, clara fina interna, clara média de espessura, clara fina externa) e o óvulo que compreende a gema

(blastocisto “não fertilizado” ou blastoderma “fertilizado”, membrana vitelina e vitelo) (REIZIS et al., 2005; GILBERT 1988). As figuras abaixo mostram o saco vitelínico (SV) do embrião de *C. japonica* com 3 dias de incubação (Figura 4 A) e sua localização (Figura 3B).



**Figura 4.** (A) Localização do saco vitelínico, estruturas extraembrionárias e o embrião. (B) Membrana do saco vitelínico com sua área vascular, embrião de codorna (*Coturnix japonica*) com 72 hora de incubação. Fonte: (A) [https://medium.com/@lawisaktf\\_/embriologia-a6a1431be043](https://medium.com/@lawisaktf_/embriologia-a6a1431be043)

Na formação do ovo estão envolvidas uma série de atividades metabólicas, transportando grandes quantidades de nutrientes entre as membranas, além de formar proteínas e lípidios, essenciais para o desenvolvimento embrionário. Podendo este processo ser alterado por fatores externos e internos, entre os fatores externos de grande importância tem-se os ambientais e entre os internos, os fatores genéticos e fisiológicos são os principais (REIS, 1980).

O saco vitelínico (SV) é uma membrana extraembrionária encontrada em todos os vertebrados, sendo rapidamente substituída pela placenta. Apresentando funções imunológicas, hematopoiética, secretora, nutricional, e metabólica. Diferente dos mamíferos a membrana do saco vitelínico (MSV) de aves permanece durante toda sua embriológica (SPEAKE et al., 1998; HYTTEL, et al., 2010). Nas primeiras horas de desenvolvimento das aves a MSV se forma a partir do intestino do embrião, uma camada do ectoderma se projeta sobre a gema cobrindo-a completamente, em seguida ocorre uma rápida proliferação de células endodérmicas que se espalha entre a gema do

ovo e o ectoderma. Por fim as células de origem mesodérmica localizadas entre as camadas endodérmica e ectodérmica, começa a se diferenciar formando os primórdios dos sanguíneos, células sanguíneas e tecido conjuntivo (MORAN, 2007; BAUER et al., 2013).

A MSV de embriões de *C. japonica* é uma estrutura extraembrionária que se forma pela fusão de duas estruturas distintas, o epitélio ectodermal (cório) e o epitélio endodermal (alantoide). A MSA é responsável por realizar as trocas gasosas entre os poros da casca e sua rede de capilares subjacente. Tendo um importante papel na mobilização do cálcio presente na casca, regulação do transporte de água e eletrólitos e na manutenção do controle ácido-básico do embrião (BORGES et al., 2003; LENG et al., 2004; GABRIELLI & ACCILI, 2010).

Após serem reabsorvidos pela MSV os lipídios chegam ao embrião, através da circulação, ou através de um processo de fagocitose. Através do processo de pinocitose realizado pelas células endodérmicas as proteínas chegam ao embrião através da MSV. Além disso a MSV também fornece aminoácidos ao embrião (GERHARTZ *et al.*, 1997 e 1999). No momento da postura, o ovo passará pelo processo de clivagem, e formação do blastoderme. Dessa forma, a incubação é uma etapa necessária para que ocorra a gastrulação, ocorrendo o surgimento dos anexos embrionários, modelagem do embrião e formação da linha primitiva, processos de suma importância na formação do embrião (GARCIA & FERNÁNDEZ, 2009).

A Membrana do Saco Vitelínico (MSV) é constituída das três camadas germinativas nos estágios iniciais, o ectoderma, mesoderma e endoderma. Onde após a expansão do celoma extraembrionário apresenta apenas células mesodérmicas e endodérmicas (SHENG, 2010; BAUER *et al.*, 2013). Sendo a MSV dividida em duas áreas, a área vitelínica (região da membrana que ainda não contém células do mesoderma) e a área vascular (local onde ocorre a vasculogênese) (SHENG, 2010). Após o surgimento do mesênquima lateral ocorre a formação das ilhotas sanguíneas, que representam as células progenitoras endoteliais e hematopoéticas. O endotélio vai ser formado pelas células mais externa das ilhotas e as células sanguíneas que ficarão livres no lúmen são formadas pelas células mais centrais (ZAGO & COVAS, 2006).



A MSV é o primeiro local de formação de células sanguíneas, logo no início da embriogênese, demonstrando a presença de células tronco pluripotentes, que podem se diferenciar nos glóbulos vermelhos e brancos assim como nas células endoteliais (AUERBACH *et al.*, 1996; METCALF, 2007). A área vascular é onde ocorre o processo de vasculogênese. Gradualmente o mesoderma invade a área vitelínica que se torna a área vascular. Antes da área vascular se tornar vascularizada, o mesoderma está presente como uma dupla camada, onde as células somáticas estão abaixo do ectoderma e as células esplânicas acima do endoderma. Com a vascularização o mesoderma altera a forma se tornando tipicamente mesenquimal. A área vascular é medialmente contínua com as regiões vasculares na região pelúcida (BELLAIRS, 1963; SHENG, 2010).

A MSV o primeiro local onde ocorre a formação de células sanguíneas, evidenciando a presença de células tronco pluripotentes, sendo capazes de produzir células endoteliais, assim como, glóbulos brancos e vermelhos (AUERBACH *et al.*, 1996; METCALF, 2007). A MSV é o local de formação do plexo capilar primitivo e da aorta a partir do processo de vasculogênese. No polo posterior e anterior da MSV estão localizados respectivamente as células endoteliais que epressam os genes que irão originar as artérias e veias para o embrião (LE NOBLE *et al.*, 2004). Sendo

A MSV constitui-se como uma nova ferramenta para análise dos mecanismos da angiogênese normal e em diferentes situações patológicas, sendo um promissor modelo experimental em pesquisa de vascularização e implantação de tumores, sendo um modelo mais acessível à observação, além de não possuir influências hormonais e metabólicas externas (DERYUGINA & QUIGLEY, 2008). A MSV de codorna tem sido utilizada no estudo dos efeitos de campo magnético sobre a vasculogênese e angiogênese (COSTA *et al.*, 2013).

### **2.3.2 Geometria Fractal**

Por muito tempo a geometria euclidiana foi utilizada para representar as formas de muitos objetos. Os sistemas euclidianos, ou não-fractais apresenta uma dimensão topológica inteira, o que se torna sua principal limitação na

caracterização de estruturas complexas e irregulares que apresentam um comportamento não-linear (PIRES & COSTA, 1992). No entanto, é reconhecida a inadequação desta geometria para descrever as formas irregulares encontradas na natureza, como a rede vascular sanguínea (MANDELBROT, 1991).

A geometria da natureza não é absoluta, ou melhor, não há uma geometria intrínseca à natureza, o homem é que acaba escolhendo a geometria em função de sua comodidade e da maior adequação a descrição dos fenômenos em estudos (NUSSENZVEIG, 1999). Assim, Benoît Mandelbrot (1924-2010) sistematizou e aperfeiçoou vários estudos matemáticos visando uma melhor representação da geometria irregular encontrada na natureza. Ele introduziu esta palavra para designar estruturas que possuem uma forma extremamente irregular ou fragmentada e que repete geometricamente ou estaticamente a mesma estrutura em diferentes escalas (SILVA *et al.*, 2003; CUNHA JÚNIOR *et al.*, 2004).

Os objetos fractais são caracterizados por quatro propriedades: 1) autossimilaridade, a qual significa que partes de um objeto ou processo são semelhantes ao objeto ou processo todo; 2) dependência de escala (scaling), que significa dizer que a medida da grandeza depende da escala na qual foi medida; 3) dimensão fractal, a qual provê uma descrição quantitativa da autossimilaridade e dependência de escala e 4) as propriedades estatísticas anômalas das grandezas fractais, que se caracterizam pela inexistência de média e variância dos objetos e processos fractais (BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994; NUSSENZVEIG, 1999).

Os objetos fractais podem possuir irregularidades ou fragmentações ao extremo, significando que os recursos iterativos ou as formas semelhantes observadas em diferentes escalas podem tender ao infinito para uma estrutura fractal altamente complexa (NUSSENZVEIG, 1999; ASSIS *et al.*, 2008).

Muitos objetos ou processos naturais têm propriedades próximas aos fractais, em particular a simetria de escala, portanto podem ser descritos pela geometria fractal, pelo menos em determinados domínios (NUSSENZVEIG, 1999). Para estruturas biológicas, suas partes não são cópias reduzidas fiéis à estrutura inteira (DEVILHA *et al.*, 2013). Elas possuem certa semelhança podendo ser designada de autossimilaridade estatística, isto

é, as propriedades estatísticas das partes da estrutura são proporcionais às propriedades estatísticas da estrutura inteira. Podemos tomar como exemplo a taxa média de ramificação dos grandes vasos sanguíneos que pode ser semelhante à taxa de ramificação dos pequenos vasos (BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994).

### **2.3.2.1 Dimensão de contagem por caixas (dimensão de capacidade)**

Na dimensão de contagem por caixas  $D_{cc}$ , o objeto é coberto por uma grade formada por um número de caixas  $N(r)$ . As caixas de dimensão  $r \times r$  contadas deverão conter no mínimo um ponto do objeto fractal. O procedimento é repetido com várias grades contendo, a cada etapa, um número maior de caixas  $N(r)$  à medida que os lados de caixas  $r$  irão reduzindo seu tamanho. Posteriormente, é traçado um gráfico duplo logaritmo de  $N(r)$  em função dos lados das caixas  $r$  (COSTA *et al.*, 2013). A dimensão de contagem por caixas  $D_{cc}$  é a inclinação do gráfico duplo logaritmo de  $N(r) \times r$  com sinal invertido.

### **2.3.2.2 Dimensão de informação (entropia)**

Na dimensão de informação  $D_{inf}$ , a imagem também é coberta por várias caixas de diferentes tamanhos, no entanto a contagem é realizada com base na probabilidade de ocupação das caixas pelo objeto fractal. O procedimento é repetido 34 vezes com várias grades contendo, a cada etapa, um número maior de caixas  $N(r)$  à medida que os lados de caixas  $r$  vão reduzindo seu tamanho. Posteriormente, é traçado um gráfico duplo logaritmo da entropia de Kolmogorov em função dos lados das caixas  $r$ . A dimensão de informação é obtida pela inclinação do gráfico duplo logaritmo da entropia de Kolmogorov ( $S(r)$ ) versus  $r$ , com sinal invertido. (KUNICK *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2013).

## **2.4 O câncer: importante patologia favorecida pelos processos de inflamação e angiogênese**

São conhecidas hoje uma infinidade de doenças decorrentes de distúrbios do sistema imunológico, tais como diabetes tipo 1, artrite reumatoide, psoríase, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico e, inclusive o câncer. Este último será tratado com destaque nas próximas linhas devido à sua importância para a saúde pública no cenário mundial.

Câncer é um termo genérico que se refere a um grupo diversificado de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. São muitas vezes referidos também como tumores malignos ou neoplasias. Uma característica comum aos diversos tipos de câncer é o rápido surgimento de células anormais que se multiplicam desordenadamente e crescem para além dos seus limites normais, podendo invadir regiões adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos. Este é o processo conhecido como metástase, a principal causa de morte por câncer (Organização Mundial de Saúde, 2018). A tabela 1 apresenta os tipos de cânceres mais comuns no cenário mundial.

**Tabela 1.** Tipos mais comuns de câncer e o número de casos estimados em todo o mundo pela Organização Mundial de Saúde em 2018.

<b>Tipo de câncer</b>	<b>Número de casos</b>
Pulmão	2,09 milhões
Mama	2,09 milhões
Colorretal	1,80 milhões
Próstata	1,28 milhões
Câncer de pele (não melanoma)	1,04 milhões
Estômago	1,03 milhões

De acordo com dados da Organização Mundial de saúde (2018), o câncer é uma das grandes causas de morte no mundo, sendo estimadas cerca de 9,6 milhões de mortes em 2018. A tabela 2 apresenta os tipos de câncer que mais causam mortes no mundo e o número de mortes estimadas pela Organização Mundial de Saúde para este ano.

**Tabela 2.** Tipos de câncer com maior mortalidade associada no mundo e o número de mortes estimadas para o ano de 2018 pela Organização Mundial de Saúde.

<b>Tipo de câncer</b>	<b>Número de mortes associadas</b>
Pulmão	1,76 milhões
Colorretal	862.000
Estômago	783.000
Fígado	782.000
Mama	627.000

O câncer é uma doença multifatorial, que pode ter duas origens distintas: I. por meio de alterações genéticas, ocorrendo a transformação de células normais em células tumorais e II. pela ação de agentes externos (carcinogênicos físicos, químicos ou biológicos) que estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Essas anomalias genéticas surgem de diferentes combinações de genes, que podem sofrer mutação, superexpressando ou excluindo genes e, conseqüentemente, proteínas. O aumento desordenado na formação das EROS, pode causar instabilidade dos genes e alterações no crescimento celular, por causar danos nas macromoléculas como proteínas, lipídios e o próprio DNA (GODONE et al., 2018; HELFINGER & SCHRODER, 2018). As EROS possuem a capacidade de modular a atividade de várias proteínas ou vias de transdução proteica que regulam a diferenciação e proliferação celular (OSTMAN et al., 2011; GROITL & JAKOB, 2014). Durante o desenvolvimento das células cancerígenas as alterações nos genes acarretam uma desorganização no ciclo celular, em particular nos pontos de verificação deste ciclo, levando a um crescimento desordenado das células tumorais (NAIR et al., 2018).

Uma análise das células tumorais pode revelar anomalias de centenas até milhares de genes, ocorrendo em vários níveis, na replicação gênica, transcrição gênica, nível cromossômico e epigenético, este último podendo incluir metilação do DNA e acetilação de histonas (FRANCO et al., 2008; KORKOLA & GRAY, 2010). Estas anomalias geralmente ocorrem no início do desenvolvimento tumoral. O gene supressor de tumores, o p53, é

frequentemente o gene que mais sofre mutações (GAO et al., 2014; CHENG et al., 2016; WALKER & UNDERWOOD, 2018). A proteína p53 se liga ao DNA, e passa a estimular outro gene o CDKN1A, que por sua vez produz a proteína p21, que interage com a proteína estimuladora da divisão celular a CDK2 (NIKI & ISHIDA, 2014).

Um importante fator para o desenvolvimento tumoral é o chamado fator indutível de hipóxia-1 $\alpha$  (Hif-1 $\alpha$ ), que em condições normais, é rapidamente degradado pela via ubiquitina-proteossoma. Foi observado em células tumorais de próstata e ovário que altos níveis de EROS mantêm ativo o Hif-1 $\alpha$ , assim como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), levando a uma angiogênese mais acelerada e eficiente (XIA et al., 2007; HELFINGER et al., 2016). Segundo Méplan et al., (2000) as EROS são capazes de inativar a p53 através da oxidação de cisteínas no domínio de ligação do DNA.

O aumento da vascularização (angiogênese) é um fator preponderante para o desenvolvimento dos tumores, fornecendo oxigênio e nutrientes para o rápido desenvolvimento tumoral, além de remover dióxido de carbono e resíduos metabólicos. Além do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), uma classe de proteínas específicas, as metaloproteinases da matriz (MMPs), particularmente MMP-2 e MMP-9 estimulam diretamente o crescimento de vasos sanguíneos, e conseqüentemente a angiogênese (TARABOLETTI & MARGOSIO, 2001; ELLIS et al., 2001; WANG et al., 2007). Nos estágios iniciais, as células tumorais se encontram em um estágio de baixa atividade, recebendo nutrientes e oxigênio através de difusão. Com o aumento da vascularização as células tumorais começam a se proliferar mais rapidamente (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Níveis aumentados de citocinas, fatores de crescimento e seus receptores, receptores de estrogênio e amplificação de HER2/neu (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*; um oncogene localizado no cromossomo 17) são algumas das transformações moleculares comuns em muitos tipos de câncer. Entre as citocinas, a Interleucina-6 (IL-6), proteína de peso molecular de 26 kDa contendo 185 aminoácidos, desempenha um papel crítico no número de eventos biológicos e patobiológicos associados ao câncer (BAHRTI et al., 2016). As células cancerígenas superexpressam e secretam IL-6 no microambiente tumoral, a qual se liga ao receptor de IL-6 (IL-6R) que ativa a

glicoproteína gp130, que é uma forma mutante da proteína transmembrana também conhecida como CD130. O complexo IL-6/IL-6R/gp130 ativa vias distintas levando à oncogênese. Essas vias incluem JAK/STAT, MAPK e PI3K/Akt. IL-6 também é altamente relatada por estar envolvida em muitas condições inflamatórias (BAHRTI et al.,2016).

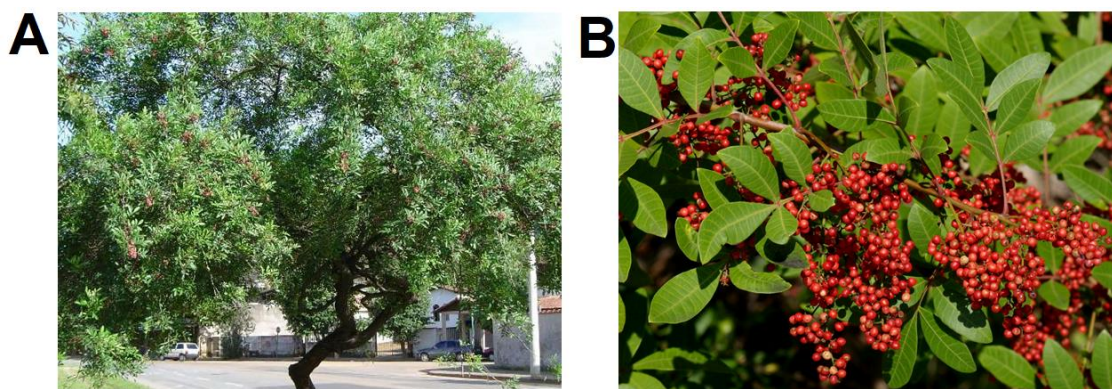
O tratamento dos vários tipos de câncer apresenta sérias limitações, incluindo o desenvolvimento de resistência medicamentosa pelo paciente e a alta citotoxicidade para células normais, acarretando em severos efeitos colaterais, podendo ocasionar a morte de importantes células de defesa como monócitos, neutrófilos e linfócitos (MICHELLE et al., 2012; HOLOHAN, et al., 2013; LIU et al., 2013). Muitos genes associados ao câncer e suas funções têm sido descritos, fornecendo uma plataforma inovadora e de grande utilidade na compreensão da biologia do tumor e na proposta da próxima geração de terapias contra o câncer.

As lectinas podem atuar como agente antitumoral por possuírem a capacidade de ligação a carboidratos de forma específica e através de domínio próprio, o CDR. A especificidade dessa interação é favorecida pela reconhecida expressão alterada de carboidratos da superfície das células tumorais em relação àquela observada em células não transformadas. Nesse sentido, o perfil das lectinas tem sido estudado no que tange novas abordagens terapêuticas de tumores, com ênfase no seu potencial citotóxico indutor do apoptose, na sua capacidade de transporte de outras moléculas, direcionado à célula tumoral, no seu papel enquanto detectora de biomarcadores tumorais e na sua capacidade inibitória de certos mecanismos que compõem o processo tumoral, tais como a invasão e metastização (COELHO et al., 2017).

## **2.5 *Schinus terebintifolia* Raddi**

Conhecida popularmente no Brasil por aroeira, aroeira-da-praia, aroeira-vermelha, entre outros, a *Schinus terebintifolia* Raddi é uma planta de porte variado, podendo ser encontrada nos portes arbóreo ou arbustivo, que pertence à família Anacardiaceae (Figura 5A). Seu fruto é uma drupa vermelha (Figura 5B) que possui aroma semelhante ao da pimenta, por isso também é

conhecida por pimenta vermelha, pimenta rosa ou aroeira-pimenteira (MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA, 2014).



**Figura 5.** *Schinus terebinthifolia* Raddi. Hábito da planta (A) e seu fruto (B).

*S. terebinthifolia* é amplamente utilizada na medicina popular e possui princípios ativos potentes para produção de diversos fármacos. Possui efeitos benéficos por via oral e tópica e, a isto se deve a necessidade de identificação e caracterização de seus reais efeitos terapêuticos e toxicológicos em vias de administração invasivas (MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA, 2014; FALCÃO et al., 2015).

Suas folhas são popularmente utilizadas para cicatrização de feridas, para combater candidíase em crianças, e para produzir infusões que se acredita terem propriedades anti-reumáticas (BALBACHAS, 1959; LINDENMAIER, 2008). Alguns dos compostos das folhas de *S. terebinthifolia* com atividades biológicas comprovadas são terpenos, os quais induzem apoptose em melanoma e protegem contra metástase (MATSUO et al., 2011), óleos essenciais que inibem mitose em células de alface e cebola (PAWLOWSKI et al., 2012), compostos aromáticos com efeito anti-alérgico (CAVALHER-MACHADO et al., 2008). Atividade larvicida contra *Aedes aegypti* foi detectada em um extrato de folhas de *S. terebinthifolius* em diclorometano e em óleo essencial extraído de seus frutos (COELHO et al., 2009; SILVA et al., 2010).

Recentemente foi relatado que o extrato de folhas de *S. terebinthifolia* contendo proantocianidinas poliméricas, taninos hidrolisáveis, favenóides heterosídeos e agliconas, derivados do ácido cinâmico, traços de esteróides e



lectina causou mortalidade de larvas de *A. aegypti* no quarto instar com CL<sub>50</sub> de 0,62% (para larvas não alimentadas) e 1,03% (para larvas alimentadas) (PROCÓPIO et al., 2015). O extrato de folhas atrasou o desenvolvimento das larvas e promoveu intensa desorganização do epitélio intestinal, incluindo deformação e hipertrofia das células, desorganização das microvilosidades e vacuolização do citoplasma, afetando as células digestivas, enteroendócrinas regenerativas e proliferativas. Adicionalmente, o extrato induziu a fragmentação do DNA em algumas células intestinais. Os autores mostraram ainda que os derivados do ácido cinâmico e flavonoides estão envolvidos no efeito larvicida do extrato, sendo os primeiros mais eficientes em causar danos às larvas.

As folhas de *S. terebinthifolia* expressam uma lectina (SteLL) que corresponde a um polipeptídeo glicosilado de 14 kDa termoestável, íon-independente e com afinidade por quitina. SteLL foi ativa contra os seguintes microrganismos de importância médica: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (GOMES et al., 2013).

Esta Tese de Doutorado foi motivada pelo reconhecido uso de *S. terebinthifolia* na medicina popular e pelo já relatado potencial antimicrobiano da lectina SteLL. Esses relatos nos levaram a questionar se além da toxicidade direta de SteLL sobre microrganismos, ela poderia causar alguma ativação das células do sistema imune. A seguir serão apresentados dois capítulos que descrevem a investigação da hipótese de que SteLL pode ser um agente imunomodulador e antiangiogênico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos de SteLL na viabilidade de esplenócitos de camundongos, bem como a capacidade de alterar a produção de citocinas e óxido nítrico por essas células e investigar o efeito da lectina no processo de angiogênese utilizando como modelo embriões de *Coturnix japonica*.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar a citotoxicidade de SteLL sobre esplenócitos de camundongos Balb/c.
- Analisar *in vitro* a capacidade de SteLL interferir na liberação de cálcio citosólico, na produção de EROS e no potencial de membrana mitocondrial nos esplenócitos de camundongos Balb/c.
- Determinar se SteLL apresenta capacidade de influenciar na produção de citocinas e óxido nítrico pelos esplenócitos de camundongos Balb/c.
- Avaliar se SteLL é capaz de interferir no processo de angiogênese por modelo *in vivo* utilizando embriões de *C. japonica*.
- Realizar análise morfométrica (área, perímetro e percentual de comprimento cefálico) dos embriões de *C. japonica* tratados com SteLL.

#### 4. REFERÊNCIAS

AINSWORTH, S. J.; STANLEY, R. L.; EVANS, D. J. R. Developmental stages of the Japanese quail. **Journal of Anatomy**. v. 216, p. 3-15, 2010.

ALBINO, L. F. T.; NEME, R. Codornas: **Manual prático de criação**. Viçosa: Aprenda Fácil, 1998, 56 p.

ALBUQUERQUE, L. P. ; PONTUAL, E. V. ; SANTANA, G. M. S. ; SILVA, L. R. S. ; AGUIAR, J. S. ; COELHO, L. C. B. B. ; REGO, M. J. B. M. ; PITTA, M. G. R. ; SILVA, T. G. ; MELO, A. M. M. A. ; NAPOLEÃO, T. H. ; PAIVA, P. M. G. . Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**, v. 138, p. 23-27, 2014.

ARORA, R.; PAPAIOANNOU, V. E. The murine allantois: a model system for the study of blood vessel formation. **Blood**. v. 120, p. 2562-2572, 2012.

ASAHARA, T.; KAWAMOTO, A.; MASUDA, H. Concise review: circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. **Stem Cells**. v.29, p.1650-1655, 2011.

ASSIS, T.A.; MIRANDA, J.G.V.; MOTA, F.B.; ANDRADE, R.F.S.; CASTILHO, C.M.C.. Geometria fractal: propriedades e características de fractais ideais. **Revista Brasileira de Ensino de Física**. v. 30, n. 2, p. 2304, 2008.

AUERBACH, R.; HUANG, H.; LU, L. Hematopoietic stem cells in the mouse embryonic yolk sac. **Stem Cells**. v. 14, p. 269-280, 1996.

BAI, J. Y.; PANG, Y. Z.; ZHANG, X. H.; LI, Y. X. Study on the Morphological development of quail embryos. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v. 02, p. 91-94, 2016.

BALBACHAS, A. **As plantas curam**. São Paulo, Missionária, 1959. 431 p.

BALDWIN, HS. Early embryonic vascular development. **Cardiovascular Research**. v.31, p. E34-E4.5, 1996.

BASSINGTHWAIGHTE, J.B.; LIEBOVITCH, L.S.; WEST, B.J. **Fractal physiology**. New York: Oxford University Press, 1994. 364 p.

BAUER, R.; PLIESCHING, J. A.; FINKES, T.; RIEGLER, B.; HERMANN, M. SCHEIDER, W. J. The developing chicken yolk sac nutrient transport

competence by an orchestrated differentiation process of its endodermal epithelial cells. **J Biol Chem.** v. 288, p. 1088-1098, 2013.

BELLAIRS, R. Differentiation of the yolk sac of the chick studied by electron microscopy. **Journal of Embryology and Experimental Morphology.** v.11 parte 1, p.201-225, mar. 1963.

BERARDI, S.; RIA, R.; REALE, A.; LUISI, A.; CATACCHIO, I.; MOSCHETTA, M.; VACCA, A. Multiple myeloma macrophages: pivotal players in the tumor microenvironment. **Journal of Oncology.** v. 2013, p.1-6, 2013.

BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive Immunity. **Journal Allergy Clin Immunol.** v. 125, p. 33-40, 2010.

BORGES, J.; TEGTMEIER, F. T.; PADRON, N. T.; MUELLER, M. C.; LANG, E. M.; STARK, G. B. Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model. **Tissue Engineering,** v. 9, n.3, p. 441-450, 2003.

BRITO, J. S.; FERREIRA, G. R. S.; KLIMCZAK, E.; GRYSHUK, L.; SANTOS, N. D. L.; PATRIOTA, L. L. S.; MOREIRA, A. K. A.; SOARES, B. R.; BARBOZA, B. R.; PAIVA, P. M. G.; NAVARRO, D. M. A. F.; LORENA, C. M. L.; MELO, C. M. L.; CORIOLANO, M. C.; NAPOLEÃO, T. H. Lectin from inflorescence of ornamental crop *alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation. **Biomed. Pharmacother.** v. 94, p. 865-872, 2017.

BRUNE, M.; CASTAIGNE, S.; CATALANO, J.; GEHLSSEN, K.; HO, A. D.; HOFMANM W. K.; HOGGE, D. E.; NILSSOM, B.; OR, R.; ROMERO, A. I.; SIMONSSON, B.; SPEARING, R.; STADTMAUER, E. A.; SZER, J.; WALLHULT, E.; HELLSTRAND, K. Improved leukemia-free survival after postconsolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in acute myeloid leukemia: results of a randomized phase 3 trial. **Blood.** v. 108, p. 88-96, 2006.

BRUSTEIN, V. P.; SOUZA-ARAÚJO, F. V.; VAZ, A. F.; ARAÚJO, R. V.; PAIVA, P. M.; COELHO, L. C.; CARNEIRO-LEÃO, A. M.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CORREIA, M. T.. A novel antimicrobial lectin from *Eugenia*

malaccensis that stimulates cutaneous healing in mice model.

**Inflammopharmacology**, v. 20, p. 315–322, 2012.

BUSCHMANN, I.; SCHAPER, W. Arteriogenesis versus angiogenesis: two mechanisms of vessels growth. **New Physiology Science**. v.14, n.3, p. 121-125, jun. 1999.

CAVALHER-MACHADO, S. C.; ROSAS, E. C.; BRITO, F. A.; HERINGE, A. P.; DE OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M. A.; FIGUEIREDO, M. R.; HENRIQUES, M. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 1552-1560, 2008.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**. v.9, n.6, p.653-660, 2003.

CASTANHEIRA, L. E.; LOPES, D. S.; GIMENES, S. N. C.; DECONTE, S. R.; FERREIRA, B. A.; ALVES, P. T.; FILHO, L. R. G.; TOMIOSSO, T. C.; RODRIGUES, R. S.; YONEYAMA, K. A. G.; ARAÚJO, F. A.; RODRIGUES, V. M. Angiogenic effects of BpLec, a C-type lectin isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.102, p. 153-161, 2017.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal Allergy Clin Immunol**. v. 125, p. 3-23, 2010.

CHENG, C.; ZHOU, Y.; LI, H.; XIONG, T.; LI, S.; BI, Y.; YOUNG, P.; WANG, F.; CUI, H.; LI, Y.; FANG, X.; YAN, T.; LI, Y.; WANG, J.; YANG, B.; ZHANG, L.; JIA, Z.; SONG, B.; HU, X.; IANG, J.; QIU, H.; ZHANG, G.; LIU, J.; XU, E.; SHI, R.; ZHANG, Y.; LIU, H.; HE, C.; ZHAO, Z.; QIAN, Y.; RONG, R.; HAN, Z.; ZHANG, Y.; LUO, W.; WANG, J.; PENG, S.; YANG, X.; LI, X.; LI, L.; FANG, H.; LIU, X.; MA, L.; CHEN, Y.; GUO, S.; CHEN, X.; XI, Y.; LI, G.; LIANG, J.; YANF, X.; GUO, J.; JIA, J.; LI, Q.; CHENG, X.; ZHAN, Q.; CUI, Y. Whole-genome sequencing reveals diverse models of structural variations in esophageal squamous cell carcinoma. **Am J Hum Genet**. v. 98, p. 256-274, 2016.

CHUNG, A.S.; FERRARA, N. Developmental and pathological angiogenesis. **The Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v.27, p.563–84, 2011.

CLEN, A. S. Fundamentals of vaccine immunology. **J. Global Infect. Dis.** v. 51, p. 43-54, 2011.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, P. M. D. S.; LIMA, V. L. D. M.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. D. S. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, doi: 10.1155/2017/1594074, 2017.

CORIOLOANO, M. C.; BRITO, J. S.; PATRIOTA, L. L. S.; SOARES, A. K. A.; LORENA, V. M. B.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; MELO, C. M. L. Immunomodulatory effects of the Water-soluble lectin from *Moringa Oleifera* Seeds (WSMoL) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). **Protein and Peptide Letters**. v. 25, p 295-301, 2018.

CUNHA JR., H.; COSTA, E.O.; LOBO, M.H.; MENEZES, M. Caos e fractal: uma introdução pedagógica pela cultura para os cursos de engenharia elétrica. In: WCETE - World Congress on Engineering and Technology Education, 2004, Santos. **WCETE**. São Paulo. 2004, p.1549-1552.

CZIROK, A.; LITTLE, C.D. Pattern formation during vasculogenesis. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**. v.96, n.2, p.153–162, jun. 2012.

DEMPSEY, P. W.; VAIDYA, S. A.; CHENG, G. The art of war: innate and adaptive immune responses. **Cell. Mol. Life Science**. v. 60, p. 2604-2621, 2003.

DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. **Histochem Cell Biol**. v. 130, p. 1119-110, 2008.

DEVILHA, V.S.; RENGARAJAN, P.; HUSSAIN, R.J. Modeling blood flow in the blood vessels of the cardiovascular system using fractals. **Applied Mathematical Sciences**. v. 7, n.11, p.527 - 537, 2013.

DIAS, P.F.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; MARASCHIM,R.P.; MARASCHIM,M. Novos moduladores da formação de vasos sanguíneos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 25, p.28-34, mar/abr. 2002.

- DIAS, R.O.; MACHADO, L. S.; MIGLIOLO, L.; FRANCO, O. L. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, p. 519-541, 2015.
- ELLIS, L. M.; LIU, W.; AHMAD, S. A.; FAN, F.; JUNG, Y. D.; SHAHEEN, R. M.; REINMUTH, N. Overview of angiogenesis: biological implications for antiangiogenic therapy. **Semin. Oncol.** v. 28, p. 94-104, 2001.
- FALCÃO, M. P. M. M.; OLIVEIRA, T. K. B.; DO Ó, N. P. R.; SARMENTO, D. A.; GADELHA, N. C. *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) e suas propriedades na Medicina Popular. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, p. 23-27, 2015.
- FERGUSON, J. E.; KELLEY, R. W.; PATTERSON, C. Mechanisms of endothelial differentiation in embryonic vasculogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.25, p. 2246-2254, 2005.
- FLAMME, I.; FRÖLICH, T.; RISAU, W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. **Journal of Cellular Physiology**. v. 173, p.206-210, 1997.
- FRANCO, R.; SCHONEVELD, O.; GEORGAKILAS, A. G.; PANAYIOTIDIS, M. I. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. **Canc. Lett.** v. 266, p. 6-11, 2008.
- FRANK, M.M. Complement disorders and hereditary angioedema. **J. Allergy Clin Immunol.** v. 125, p. 262-271, 2010.
- GABRIELLI, M. G.; ACCILI, D. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and function adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-12, 2010.
- Gao, F.; Wang, W. MicroRNA-96 promotes the proliferation of colorectal cancer cells and targets tumor protein p53 inducible nuclear protein 1, forkhead box protein O1 (FOXO1) and FOXO3a. **Molecular medicine reports**, v. 11, p. 1200-1206, 2015.

GARCIA-PORRERO, J. A.; GODIN, I. E.; DIETERLEN-LIEVRE, F. Potential intra-embryonic hemogenic sites at pre-liver stages in the mouse. **Anat Embryol.** v. 192, p. 425-435, 1995.

GARCIA, S. M. L.; FERNÁNDEZ, C. G. **Embriologia.** Editora: Artmed. 3ª edição, 2009, 416p.

GERHARTZ, B.; AUERSWALD, E.A.; MENTELE, R.; FRITZ, H.; MACHLEIDT, W.; KOLB, H.J.; WITTMANN, J. Proteolytic enzymes in yolk-sac membrane of quail egg. Purification and enzymatic characterisation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.** v.118, n.1, p.159–166, 1997.

GERHARTZ, B.; KOLB, H.J.; WITTMANN, J. Proteolytic activity in the yolk sac membrane of quail eggs. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology.** v. 123, n.1, p.1-8, 1999.

GILBERT, A. B. Aves Domésticas. In: Hafez, E. S. E. **Reprodução animal.** 4º ed. São Paulo: Manole. Cap 21, p. 488-514, 1988.

GODONE, R. L. N.; LEITÃO, G. M.; ARAÚJO, N. B.; CASTELLETTI, C. H. M.; LIMA-FILHO, J. L.; MARTINS, D. B. G. Clinical and molecular aspects of breast cancer: Targets and therapies. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** v. 106, p. 14-34, 2018.

GOMES, F. S.; PROCÓPIO, T. F.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C.; PAIVA, P. M. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology.** v. 114, p. 672-679, 2013.

GROITL, B.; JAKOB, U. Thiol-based redox switches. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1844, p. 1335-1343, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell.** V. 144, p. 646-674, 2011.

HARRIS, E. S.; NELSON, W. J. VE-Cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function. **Cell Biol.** v. 22, p. 651-658, 2010.



HE, L.; WANG, H.; GU, C.; HE, X.; ZHAO, L.; TONG, X. Administration of traditional chinese blood circulation activating drugs for microvascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Diabetes Research.** v. 2016, p. 1-9, 2016.

HELFINGER, V.; SCHRODER, K. Redox control in cancer development and progression. **Molecular Aspects of Medicina.** v. 63, p. 88-98, 2018.

HELFINGER, V.; HENKE, N.; HARENKAMP, S.; WALTER, M.; EPAH, J.; PENSKI, C.; MITTELBRONN, M.; SCHEODER, K. The NADPH oxidative Nox4 mediates tumour angiogenesis. **Acta Physiol.** v. 216, p. 435-446, 2016.

HOLOHAN, C.; VAN SCHAEYBROECK, S.; LONGLEY, D. .; JOHNSTON, P. G. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer.** V. 13, p. 714-726, 2013.

HYTTEL, P. Development of the blood cells, heart and vascular system. In: HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. Essential of domestic animal embryology. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto: Elsevier, 2010. 455p

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol.** v. 20, p. 197-216, 2002.

KENNEDY, M.; D'SOUZA, S.L.; LYNCH-KATTMAN, M.; SCHWANTZ, S.; KELLER, G. Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. **BLOOD.** v.109, n.7, p. 2679-2687, apr. 2007.

KHAN, R. A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. **Saudi Pharmaceutical Journal.** v. 26, p. 739-753, 2018.

KORKOLA, J.; GRAY, J. W. Breast cancer genomes-form and function. **Curr. Opin. Genet Dev.** v. 20, p. 4-14, 2010.

KOROLKOVAS, A. A riqueza potencial de nossa flora. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** São Paulo, v.1, p.1-7, 1996.

KROCK, B.L.; SKULI, N.; SIMON, M.C. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. **Genes & Cancer**. v.2, n.12, p.1117–1133, 2011.

LAMALICE, L.; BOEUF, F.; HUOT, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. **Circulation Research**. v.100, p.782-794, 2007.

LE NOBLE, F.; MOYON, D.; PARDANAUD, L.; YUAN, L.; DJONOV, V.; MATTHIJSSEN, R.; BRÉANT, C.; FLEURY, V.; EICHMANN, A. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. **Development**. v.131, p.361-375, 2004.

LENG, .; MILLER, J. M.; BILBAO, K. V.; PALANKER, D. V.; HUIE, P.; BLUMENKRANZ, M. S. The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. **The Journal of Retinal and Vitreous Diseases**, v. 24, n. 3, p. 427-434, 2004.

LI, L.; CHEN, D.; LI, J.; WANG, X.; WANG, N.; XU, C.; WANG, Q.K. *Aggf1* acts at the top of the genetic regulatory hierarchy in specification of hemangioblasts in zebrafish. **Blood**. v.123, p.501-508, 2014.

LIMA, J. L. S.; VILA-NOVA, I. C.; ALMEIDA, W. A.; SILVA, J. E. S.; PONTUAL, E. V.; EVENCIO NETO, J. LECTINAS VEGETAIS COMO FERRAMENTAS TERAPÊUTICAS: UMA REVISÃO In: Fabrício Loreni da Silva Cerutti, Cristiane Rickli Barbosa, Lais Daiene Cosmoski. (ORG). **Biomedicina e Farmácia: Aproximações**.1 ed.Ponta Grossa (PR) : Atena, v.1, p. 63-78, 2018.

LINDENMAIER, D. S. Etnobotânica em comunidades indígenas Guaranis no Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Santa Cruz do sul, 2008.

LIU, Z.; LUO, Y.; ZHOU, T. T.; ZHANG, W. Z. Could plant lectins become promising antitumor drugs for causing autophagic cells death? **Cell Prolif**. v. 46, p. 509-515, 2013.

LIU, Z.; LEBRIN, F.; MARING, J.A.; DRIESCHE, S.; BRINK, S.; DINTHER, M.; THORIKAY, M.; MARTIN, S.; KOBAYASHI, K.; HAWINKELS, L.J. A. C.; MEETEREN, L.A.; PARDALI, E.; KORVING, J.; LETARTE, M.; ARTHUR, H.M.; THEUER, C.; GOUMANS, M.J.; MUMMERY, C.; DIJKE, P. Endoglin is dispensable for vasculogenesis, but required for vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. **Plos One**. v.9, n.1, p.1-12, jan. 2014.

MACIEL, E. M. V.; ARAÚJO, V. S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y. M.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M.T.S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**. v. 32, p. 57-60, 2004.

MADANECKI, P.; KAPOOR, N.; BEBOK, Z.; OCHOCKA, R.; COLLAWN, J.F.; BARTOSZEWSKI, R. Regulation of angiogenesis by hypoxia: the role of microRNA. **Cellular & Molecular Biology Letters**. v.18, p. 47-57, 2013.

MANTOVANI, A. The inflammation-cancer connection. **FEBS Journal**. v. 4, p. 638-640, 2018.

MARUOTTI, N.; ANNESE, T.; CANTATORE, F.P.; RIBATTI, D. Macrophages and angiogenesis in rheumatic diseases. **Vascular Cell**. v.5, n.11, p.1-8, 2013.

MELO-REIS, P.R.; ANDRADE, L.S.; SILVA, C.B.; ARAÚJO, L.M.M.; PEREIRA, M.S.; MRUE, F.; CHEN-CHEN, L. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax látex **Brazilian Journal of Biology**. v. 70, n. 1, p. 189-194, 2010.

MÉPLAN, C.; RICHARD, M. J.; HAINAUT, P. Redox signaling and transition metals in the control of p53 pathway. **Biochem. Pharmacol**. v. 59, p. 25-33, 2000.

METCALF, D. Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. **Stem Cells**. v. 25, p. 2390-2395, 2007.

MICHELLE, X.; LIU; DAVID, W.; CHAN, H.; NGAN, Y. S. Mechanisms of chemoresistance in human ovarian cancer al a glance. **Gynecol. Obstet**. v. 2, p. 1. 2012.

MITRA, S.; LEONARD, W. J. Biology of IL-2 and its therapeutic modulation: Mechanisms and strategies. **Journal of leukocyte biology**. v. 103, p. 643-655, 2018.

MORAN, E. T. Nutrition of developing embryo and hatchling. **Poult Sci**. v. 86, p. 104-1049, 2007.

NAIR, M.; SANDHU, S. S.; SHARMA, A. K. Cancer molecular markers: A guide to cancer detection and management. **Seminars in Cancer Biology**. v. 52, p. 39-55, 2018.

NIKI, T. H.; ISHIDA, N. Role of p53 in the entrainment of mammalian circadian behavior rhythms. **Genes Cells**. v. 9, p. 441-448, 2014.

NUSSENZVEIG, M. H. **Complexidade & Caos**. Rio de Janeiro: COPEA, 1999. 280 p.

OLIVEIRA, C. M. B. D.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Cytokines and pain. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 61, p. 260-265, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Ficha informativa sobre o câncer**. Atualizado: setembro, 2018.

O'SHEA, J. J.; Gadina, M.; Siegel, R. M. Cytokines and cytokine receptors. In **Clinical Immunology (Fifth Edition)**. p. 127-155, 2019.

OSTMAN, A.; FRIJHOFF, J.; SNADIN, A.; BOHMER, F. D. Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. **J. Biochem**. v. 150, p. 345-356, 2011.

OTROCK, Z. K.; MAHFOUZ, R. A. R.; MAKAREM, J. A.; SHAMSEDDINE, A. L. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. v. 39, p. 212-220, 2007.

PAIVA, P. M. G. ; GOMES, F. S. ; NAPOLEÃO, T. H. ; SÁ, R. A. ; CORREIA, M. T. S. ; COELHO, L. C. B. B. . Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In: Antonio Mendez Vilas. (Org.). **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. Badajoz: Formatex Research Center , v. 1, p. 396-406, 2010.

PAIVA, P. M. G. ; PONTUAL, E. V. ; NAPOLEÃO, T. H. ; COELHO, L. C. B. B. Effects of Plant Lectins and Trypsin Inhibitors on Development, Morphology and Biochemistry of Insect Larvae. In: Kia Pourali; Vafa Niroomand Raad. **Larvae: Morphology, Biology and Life Cycle**. v. 5, p. 37-55, 2012.

PANCER, Z.; COOPER, M. D. The evolution of adaptive immunity. **Annu Rev. Immunology**. v. 24, p. 497-518, 2006.

PANG, B.; ZHOU, Q.; LI, J. L.; ZHAO, L. H.; TONG, X. L. Treatment of refractory diabetic gastroparesis: western medicine and traditional Chinese medicine therapies. **World J. Gastroenterol.** v. 20, p. 6504-6514, 2014.

PAWLOWSKI, Â.; KALTCHUK-SANTOS, E.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B.; SOARES, G. L. G. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. **South African Journal of Botany**, v. 80, p.96-103, 2012.

PIRES, A. S. T.; COSTA, B. V. A. A desordem inaceitável. **Ciência Hoje.** v. 14, p. 5-39, 1992.

PROCÓPIO, T. F.; MOURA, M. C.; ALBUQUERQUE, L. P.; GOMES, F. S.; SANTOS, N. D. L.; COELHO, L. C. B. B.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H. **Antibacterial lectins: action mechanism, defensive roles and biotechnological potential.** In: Collins, E. (Org) Antibacterials: synthesis, properties and biological activities, Nova Science Publishers Inc., New York, p. 68-89, 2017.

QUTUB, A.A.; POPEL, A.S. Elongation, proliferation & migration differentiate endothelial cell phenotypes and determine capillary sprouting. **BMC Systems Biology.** v.3, n.13, p.1-24, 2009.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2001.

REIS, L. F. S. D. **Codornizes, criação e exploração.** Lisboa: Agros, 10, 1980, 222p.

REIZIS, A.; HAMMEL, I.; AR, A. Regional and developmental variations of blood vessel morphometry in the chick embryo chorioallantoic membrane. **The Journal of Experimental Biology.** v. 208, p. 2483-2488, 2005.

RIBAS, M. O.; SOU, H. M.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T. A.; NORONHA, L.; ACRA, L. A. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de raparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Rev Odonto Ciência.** v. 21, p. 245-252, 2006.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. **Reproductive Toxicology.** V. 70, p. 97-101, 2017.

RIVAS, V.; CARMONA, R.; MUÑOS-CHÁPULI, R.; MENDIOLA, M.; NOGUÉS, L.; REGLERO, C.; MIGUEL-MARTÍN, M.; GARCÍA-ESCUADERO, R.; DORN ii, G. W.; HARDISSON, D.; MAYOR JR, F.; PENELA, P. Developmental and tumoral vascularization is regulated by G protein-coupled receptor kinase 2. **J. Clin. Invest.** v. 123, p. 4714-4730, 2013.

RONCA, R.; BENKHEIL, M.; MITOLA, S.; STUYF, S. LIEKENS, S. Tumor angiogenesis revisited: Regulators and clinical implications. **Medicinal Research Reviews.** v. 37, p. 1231-1274, 2017.

ROSENBERG, S. A. IL-2: The first effective immunotherapy for humancancer. **J.Immunol.** v. 192, p. 5451-5458, 2014.

SCHENTEN, D.; MEDZHITOV, R. The control of adaptive immune responses by the innate immune system. **Adv. Immunology.** v. 109, p. 87-124, 2011.

SCHWARTZ,S.; GEORGE,J.; BEN-SHOSHAN, J .; LUBOSHITS, G.; AVNI, I.; LEVKOVITCH-VERBIN, H.; ZIV, H .; ROSNER, M.; BARAK, A. Drug modification of angiogenesis in a rat cornea model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science.** v. 48, p.250–254, 2008.

SHENG, G. Primitive and definitive erythropoiesis in the yolk sac: a bird's eye view. **The International Journal of Developmental Biology.** v.54, p.1033-1043, 2010.

SHIVAMADHU, M. C.; SRINIVAS, B. K.; JAYARAMA, S.; SHARADA, A. C. Anti-cancer and anti-angiogenic effects of partially purified lectin from *Praecitrullus fistulosus* fruit on *in vitro* and *in vivo* model. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** V. 96, p. 1299-1309, 2017.

SHRIHARI, T. G. Dual role of inflammatory mediators in cancer. **Ecancermedicalscience.** v. 11, p. 1-9, 2017.

SILVA, F. O.; SANTOS, P. N.; FIGUEIRÔA, E. O.; MELO, C. M. L.; NEVES, J. K. A. L.; ARRUDA, F. V. S.; CAJAZEIRAS, J. B.; NASCIMENTO, K. S.; TEIEIRA, E. H.; CAVADA, B. S.; PORTO, A. L. F.; PEREIRA, V. R. Antiproliferative effect off *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F 10 cells. **Research in Veterinary Science.** v. 96, p. 276-282, 2014.

SINDHURA, B. R.; HEDGE, P.; CHACHADI, V. B.; INAMDAR, S. R.; SWAMY, B. M. High mannose N-glycan binding lectin from *Remusatia vivipara* (RVL) limits cell growth, motility and invasiveness of human breast cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** v. 93, p. 654-665, 2017.

SINGH, R.; NAWALE, L.; SARKAR, D.; SURESH, C. G.. Two chitotriose-specific lectins show anti-angiogenesis, induces caspase-9-mediated apoptosis and early arrest of pancreatic tumor cell cycle. **PLoS ONE**, v. 11, p. 1-18, 2016.

SINGH, R. S.; KAUR, H. P.; KENNEDY, J. F. Modulation of immunocyte functions by a mucin-specific lectin from *Aspergillus gorakhpurensis*. **International journal of biological macromolecules**, v. 101, p. 172-178, 2017.

SOUZA, M. A.; CARVALHO, F. C.; RUAS, L. P.; RICCI-AZEVEDO, R.; ROQUE-BARREIRA, M. C. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconjugate journal**. v. 30, 641-657, 2013.

SPEAKE, B. K.; MURRAY, A. M.; NOBLE, R. C. Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. **Prog. Lipid. Res.** v. 37, p. 1-32, 1998.

TABIBIAZAR, R.; ROCKSON, S.G. Angiogenesis and the ischemic. **European Heart Journal**. v.22, p.903-918, 2001.

TAKEDA, K.; FONG, G.-H. Prolyl hydroxylase domain 2 protein suppresseshypoxia-induced endothelial cell proliferation. **Hypertension**. v.49, p.178-184, 2007.

TARABOLETTI, G.; MARGOSIO, B. Antiangiogenic and antivasular therapy for cancer. **Curr. Opin. Pharmacol.** v. 1, p. 378-384, 2001.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **Journal Allergy Clin Immunology**. v. 125, p. 24-32, 2010.

URBICH, C.; DIMMELER, S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. **Circulation Research**. v.95, p. 343-353, 2004.

WALKER, R. C.; UNDERWOOD, T. J. Molecular pathways in the development and treatment of oesophageal cancer. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. V. 36-37, p. 9-15, 2018.

WANG, Z.; ZHENG, L.; YANG, S.; NIU, R.; CHU, E.; LIN, X. N-acetylchitooligosaccharide is a potent angiogenic inhibitor both in vivo and in vitro. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** V.357, p. 26-31, 2007.

WENG, W.; SHENG, G. Five transcription factors and fgf pathway inhibition efficiently induce erythroid differentiation in the epiblast. **Stem Cell Reports.** v. 2, p.262–270, mar. 2014.

XIA, C.; MENG, Q.; LIU, L. Z.; ROJANASAKUL, Y.; WANG, X. R.; JIANG, B. H. Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. **Canc. Res.** v. 67, p. 10823-10830, 2007.

YAU, T.; DAN, X.; NG, C. C.; NG, T. B. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. **Molecules**, v. 20, p. 3791-3810, 2015.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células Tronco: a nova fronteira da medicina.** Rio de Janeiro: Atheneu, 264 p, 2006.

ZHANG, P.; YU, H.; ZHOU, N.; ZHANG, J.; WU, Y.; ZHANG, Y.; BAI, Y.; JIA, J.; ZHANG, Q.; TIAN, S.; WU, J.; HU, Y. Early exercise improves cerebral blood flow through increased angiogenesis in experimental stroke rat model. **Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation.** v.10, p.43:1-10, 2013.

ZHANG, Z.; JI, S.; ZHANG, B.; LIU, J.; QIN, Y.; XU, J.; YU, X. Role of angiogenesis in pancreatic cancer biology and therapy. **Biomedicina & Pharmacotherapy.** v. 108, p. 1135-1140, 2018.



## 4.CAPÍTULO I

***Schinus terebinthifolia* leaf lectin (StELL) stimulates cytokine release by mice splenocytes**

**ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO  
“International Journal of Biological Macromolecules”**



**Fator de Impacto: 3.909**  
**Qualis A1 na área de Medicina Veterinária**

***Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) stimulates cytokine release by mice splenocytes**

Ardilles Juan Carlos Alves dos Santos<sup>a</sup>, Bárbara Rafaela da Silva Barros<sup>b</sup>, Lethícia Maria de Souza Aguiar<sup>b</sup>, Leydianne Leite de Siqueira Patriota<sup>c</sup>, Patrícia Maria Guedes Paiva<sup>c</sup>, Virgínia Maria Barros de Lorena<sup>d</sup>, Thiago Henrique Napoleão<sup>c</sup>, Cristiane Moutinho Lagos de Melo<sup>b</sup>, Emmanuel Viana Pontual<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-300, Recife, Brazil.*

<sup>b</sup>*Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Brazil.*

<sup>c</sup>*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Brazil.*

<sup>d</sup>*Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*

\*Corresponding author. E-mail address: emmanuelpontual@yahoo.com.br

## Abstract

Lectins (carbohydrate-binding proteins) can exert immunomodulatory effects. *Schinus terebinthifolia* leaves contain a lectin (SteLL) that have been reported as an antimicrobial agent. Here, we investigate the ability of SteLL to affect the viability of mice splenocytes and modulate the production of cytokines and nitric oxide (NO) by these cells. SteLL (3.12–50 µg/mL) was not toxic to splenocytes, since no induction of apoptosis or necrosis was observed. Corroborating with this data, no significant changes were detected in levels of cytosolic and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and in cytosolic calcium concentrations in cells treated with SteLL at 12.5 µg/mL. A slight reduction in the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) was observed. SteLL (12.5 µg/mL) stimulated the cells to release the cytokines IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-2, indicating a pro-inflammatory response (Th1 and Th17). The cells were also stimulated to release IL-4, an anti-inflammatory cytokine that can regulate the immunomodulatory effect preventing exacerbated inflammation. A slight decrease in the NO release after treatment with SteLL was recorded. In conclusion, SteLL is an immunomodulatory agent able to induce the production of cytokines of Th1 and Th17 profiles. The results stimulate the investigation of SteLL as a chemotherapeutic agent against cancer cells, for example.

**Keywords:** Brazilian peppertree, lectin, immunomodulatory action, Th1 response.

## 1. Introduction

Lectins constitute a diversified group of proteins that specifically recognize free carbohydrates or glycoconjugates [1]. The binding of lectin domains to carbohydrates occurs through reversible interactions (hydrogen bonds, van der Waals forces and hydrophobic interactions). Different cellular processes can be triggered when a lectin interacts with glycan moieties present at cell membrane, resulting in several biological properties [2].

Lectins can exert immunomodulatory effects through binding to glycans present on the surface of immune cells. This interaction can stimulate or suppress the production of growth factors, chemokines, cytokines, and nitric oxide as well as can lead to activation of lymphocytes. This property of lectins can be explored to modulate immune responses at a tumor microenvironment or sites containing foreign antigens aiming to inhibit carcinogenesis, cease infectious process or even reduce autoimmune response, for example [3–5].

*Schinus terebinthfolia* Raddi (Anacardiaceae), the Brazilian pepper tree, is a medicinal plant whose leaves are widely used for treatment of skin wounds. Infusions of the leaves are also used for treatment of respiratory, digestive and urinary tract infections, oral candidiasis, as well as rheumatism [6, 7]. The leaves contain a thermostable and chitin-binding lectin called SteLL, which resistant to pH variation (5.0–8.0) and toxic to microorganisms (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*) of medical importance [8]. Faced with the complex task of finding new agents for infection control, the search for molecules that have both antimicrobial activity

and ability for immunomodulation is considered a promising new route for expanding the therapeutic possibilities [9].

In this work, it was evaluated whether SteLL would be able to alter the production of cytokines and nitric oxide (immunomodulatory activity) by BALB/c mice splenocytes. Before this, it was evaluated the ability of SteLL to affect the viability and cause cellular stress.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Lectin isolation*

SteLL was isolated as previously described by Gomes et al. [8]. Leaves of *S. terebinthifolia* were collected in Recife (Pernambuco, Brazil) and placed to dry at 28 °C for 15 days. The access was recorded (A04F306) in the *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado* (SisGen). The dried leaves were powdered using a blender and homogenized (10 g) in 0.15 M NaCl (100 mL) for 16 h at 28 °C under magnetic stirring. The leaf extract was obtained after filtration through gauze and centrifugation (12,000 g, 15 min, 4 °C) and loaded onto a chitin (Sigma-Aldrich, USA) column (7.5 × 1.5 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl. Isolated SteLL was recovered by elution with 1.0 M acetic acid. The lectin was dialyzed against distilled water for eluent elimination and evaluated for protein concentration according to Lowry et al. [10].

### *2.2. Hemagglutinating activity (HA)*

HA was evaluated as described by Procópio et al. [5] using a suspension (2.5%, v/v) in 0.15 M NaCl of rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde [11]. The erythrocytes were collected as approved by the Ethics Committee on Animal Use of the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE) (process 23076.033782/2015-70). The HA was quantified as the reciprocal of the highest dilution of sample that promoted full agglutination of erythrocytes. The specific HA was calculated as the ratio between HA and the protein concentration (mg/mL).

### 2.3. Mice splenocytes

Female BALB/c mice (6–8-week-old) were obtained from the vivarium of the *Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami* (UFPE) and kept at  $21\pm 1$  °C and 12:12 light/dark cycle, with free access to food (Labina/Purina, Campinas, Brazil) and water. The Ethics Committee on Animal Use of UFPE approved all the experiments (process number 0048/2016). The mice were anesthetized with 2% xylazine (10 mg/kg) and 10% ketamine hydrochloride (115 mg/kg). After cervical dislocation, the spleens were removed and placed in a centrifuge tube containing RPMI 1640 medium (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) containing fetal calf serum. The cells were obtained through dounce equipment and the homogenate was transferred to centrifuge tubes incomplete RPMI medium (10 mL) and covered with Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) with density adjusted to 1.077 g/mL. After centrifugation (2,500 g, 25 °C, 25 min), the cell layer containing immune cells was recovered, washed

twice with PBS, and collected after a new centrifugation (500 g, 25 °C, 10 min). Cells were counted in a Neubauer chamber and viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were only used when viability was higher than 98%.

#### *2.4. Treatments*

In 24-well plates, splenocytes ( $10^6$  cells) were treated with SteLL in supplemented RPMI 1640 medium for 24 h in a humidified CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>). Untreated cells (control) were grown under the same conditions. To evaluate the induction of apoptosis or necrosis, the cells were treated with SteLL at the concentration range of 3.12–50.0 µg/mL. In all the other assays, cells treated with the lectin at 12.5 µg/mL were used.

#### *2.5. Evaluation of the effect on cell viability*

Cell death was analyzed using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Treated and control cells were collected by centrifugation (450 g, 10 min, 25 °C) and the pellet was resuspended with 1 mL of PBS and the suspension was centrifuged again. The supernatant was discarded, the pellet resuspended in a binding buffer, and annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate (AnnV-FITC) (1:500) and propidium iodide (PI, 20 µg/mL) were added. Flow cytometry was performed in a FACSCalibur platform using the Cell Quest Pro software (BD Biosciences). Results were analyzed in FL1 vs. FL3 dot plots. AnnV-FITC negative/PI positive

cells were considered necrotic cells, and AnnV-FITC positive/PI negative cells were at the early stage of apoptosis. Double negatives were considered viable cells. Six experiments were performed.

## 2.6. Measurement of cytosolic $Ca^{2+}$ concentration ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ )

The occurrence of changes in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  were evaluated using the Fluo-3AM probe (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Treated and control cells were washed with PBS and centrifuged at 300 g and 26°C for 5 min. The pellets were plated onto new 24-well plates and incubated (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) for 40 min with 5 μM Fluo-3AM containing 1 μM pluronic acid F-127 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 30 μg/mL bovine serum albumin (Sigma-Aldrich). Next, the cells were washed with PBS, collected by centrifugation (300 g, 25 °C, 5 min) and then transferred to cytometer tubes. Fluorescence intensity was analyzed with excitation at 395 nm and emission at 525 nm. Maximum fluorescence was measured using cells incubated with 1 μM ionomycin for 2 min, and minimal fluorescence was measured using cells incubated with 8 mM EDTA for 2 min. A minimum of 10,000 events were collected. Next,  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  was calculated with the following equation:  $[Ca^{2+}]_{cyt} = Kd(F_{sample} - F_{min}) / F_{max} - F_{sample}$ , where F represents the fluorescence value and Kd is 390 nM [12–14]. Six experiments were performed.

## 2.7. Measurement of cytosolic and mitochondrial levels of reactive oxygen species (ROS)



Cytosolic and mitochondrial ROS levels were measured by flow cytometry using dihydroethidium (DHE) (Sigma-Aldrich) and MitoSox Red (Thermo Fisher Scientific) probes, respectively [14]. Treated and control splenocytes were washed with PBS, centrifuged (300 g, 25 °C, 5 min) and the pellets were plated onto 24-well plates and incubated (5% CO<sub>2</sub>) with 5 μM DHE for 40 min or 5 μM MitoSox Red for 10 min. The cells were washed with PBS, collected by centrifugation (300 g, 25 °C, 5 min) and transferred to cytometer tubes. Fluorescence intensity was analyzed with excitation at 488 nm and emission at 620 nm. A minimum of 10,000 events were collected. Six experiments were performed.

### *2.8. Determination of the mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ )*

Alterations in  $\Delta\Psi_m$  were measured using MitoStatus probe (BD Biosciences). Treated and control cells were washed with PBS and centrifuged (300 g, 25 °C, 5 min). The pellet was plated onto 24-well plates and incubated with 100 nM MitoStatus at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 30 min. Next, the cells were washed with PBS, centrifuged (300 g, 25 °C, 5 min) and transferred to cytometer tubes. Fluorescence intensity was analyzed with an excitation of 488 nm and emission of 620 nm. A minimum of 10,000 events were collected. Six experiments were performed.

### *2.9. Cytokine production measurement*

Supernatants of treated and untreated cultures were collected for quantification of cytokines using the Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (Becton Dickinson Biosciences, USA) for detection of interleukins (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IL-17A), tumor necrosis factor (TNF), and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ). The assays were performed according to the manufacturer's instructions. Individual cytokine standard curves (0–5000 pg/mL) were generated and the range of detection was between 2 and 5000 pg/mL. Six experiments were performed.

#### *2.10. Nitrite analysis*

The supernatants from untreated and treated cultures were also used for quantification of nitrite by the Griess method [15]. NO concentration was estimated using a standard curve (3.12–100.0  $\mu\text{mol/mL}$ ) and a microplate spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) at 595 nm. Six experiments were performed for statistical analysis.

#### *2.11. Statistical analysis*

The statistical differences between two groups of data were analyzed by the Student's t-test using the GraphPad Prism 5.01 software. All the results were analyzed with a significance level of 95% ( $p < 0.05$ ).

### **3. Results and discussion**

This work was designed to test the hypothesis that SteLL may be an immunomodulatory agent. This hypothesis was raised due to: the recognized potential of *S. terebinthifolia* leaves to treat infectious process in folk medicine; the need for new therapeutic strategies with greater selectivity for altered endogenous cells or foreign antigens; the previous report on the antimicrobial activity of SteLL. In addition, some evidences on the anticancer potential of SteLL were already obtained by our research group (unpublished data).

A potential immunomodulatory drug is expected to be capable of stimulating protective immunity against infectious agents or tumors without causing damage to the host [16]. In this sense, we started our study investigating the cytotoxicity of SteLL to the splenocytes of mice. Interestingly, SteLL did not cause apoptosis or necrosis even at the highest concentration tested here (50 µg/mL) (Figure 1). We also evaluated whether SteLL was able to cause damages in the splenocytes that, although not enough to led to cell death, could impair their functionality. In addition, the analysis performed allow to detect if some type of activation of these cells was occurring. Therefore, we assessed the effects of SteLL at 12.5 µg/mL on cytosolic and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) levels, cytosolic calcium concentration, and mitochondrial membrane potential. This concentration (12.5 µg/mL) was selected since other lectins exerted immunomodulatory effects at this same concentration [4, 5, 17, 18].

The ROS are not only by-products of cellular metabolism that mediate cell death and mitotic failure. They can interfere with signal transduction pathways, changing the metabolism through the reversible oxidation of cellular proteins that are linked to immune cell activation [19]. In turn, the increase in

cytoplasmic free calcium influx may constitute an early element of signaling cascades that trigger defense against pathogens; however, it can result from oxidative stress, causing influx into mitochondria (disrupting the normal cell metabolism and leading to death) and nuclei (modulating gene transcription and nucleases that control cell apoptosis) [20, 21]. Thus, it can be inferred that if a small increase in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  and the amount of ROS in the cytoplasm and mitochondria can be signs that an immune cell was being activated. On the other hand, a strong increase would point to the occurrence of cellular damage [22].

SteLL did not alter  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  (Figure 2A) nor affected the levels of cytosolic and mitochondrial ROS (Figures 2B and 2C, respectively) in the splenocytes. This result agrees with the absence of cells in apoptosis or necrosis and shows that the presence of SteLL did not stress the splenocytes nor activate them. When alteration of the  $\Delta\Psi_m$  of splenocytes was evaluated, a slight reduction was observed in the cells incubated in the presence of SteLL regarding to the control (Figure 2D). In spite of this, the absence of alterations in the concentrations of ROS and calcium and the non-occurrence of apoptosis ensure that the functioning of these cells has not been compromised.

Since SteLL was not cytotoxic to the splenocytes, we assessed whether the ability of these cells to produce cytokines would have been affected. As expected, in view the results showed above, all the cytokines investigated were secreted by the splenocytes, ensuring that the cells were functional. When compared with control cells, SteLL stimulated the release of IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-2 (Figure 3). Despite the release of IL-4 has been stimulated, the data indicate a predominant pro-inflammatory (Th1 and Th17) response.

SteLL did not interfere with IL-10 release, which could have counterbalanced this profile through its regulatory properties.

The IL-2 is a 15-kDa protein that interacts with the IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$ , and IL-2R $\gamma$  receptors and stimulates the growth and proliferation of T and B lymphocytes through the JAK/STAT pathway. It also induces the production of other cytokines including IFN- $\gamma$  and TNF- $\beta$ , which result in the activation of monocytes, neutrophils and NK cells. IL-2 has been widely used in cancer therapies, for treatment of metastatic melanoma, renal cell carcinoma, and myelogenous leukemia [23–25]. IL-17 is a pro-inflammatory cytokine whose antitumor activity depends on IFN- $\gamma$  production. IL-17 is activated by IL-23, which is the key factor for the expansion and maintenance of the Th17 population. IL-23 is closely associated with IL-12, which is involved in the production of IFN- $\gamma$  by Th1 cells and antitumor immunological activity [24–26].

TNF- $\alpha$  is a cytokine associated with Th1 response that together with MIP-1 $\alpha$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and NO represent cytotoxic factors against microorganisms and tumor cells. Together with the chemokines CXCL8, CXCL1, and CXCL2, TNF- $\alpha$  recruits and activates N1 phenotypic neutrophils, which have antitumor activity. In addition, the induction of apoptosis by TNF ligands and the release of IFN- $\gamma$  inhibit the tumor cell proliferation [26].

The IL-4 is a glycoprotein with anti-inflammatory properties that induces the differentiation of B lymphocytes to produce IgG and IgE, which are important in allergic process and responses to helminthic infestations. IL-4 inhibits ROS production, which may be a reason for the maintenance of ROS levels in splenocytes treated with SteLL, even with the reduction in

mitochondrial membrane potential and the stimulus of a pro-inflammatory status [24, 25].

Other plant lectins have been described as immunomodulatory agents. The lectin from the inflorescences of *Alpinia purpurata* stimulated the release of Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6) and Th17 (IL-17A) cytokines and nitric oxide by human lymphocytes. In contrast, this lectin also increased the expression of IL-10, an anti-inflammatory mediator (Brito et al., 2017). In the same way, the lectin from *Microgramma vacciniifolia* frond increased TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, and nitric oxide production by human lymphocytes, inducing a predominant Th1 response [17]. The water-soluble *Moringa oleifera* seed lectin (WSMoL) induced the release of TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 and IL-10 as well as nitric oxide by human lymphocytes [4]. In this sense, these lectins induced a pro-inflammatory response but also stimulates the production of a cytokine of Th2 response, similarly to SteLL.

The lectin isolated from the leaf pinnulae of *Calliandra surinamensis* did not induce apoptosis or necrosis of mice splenocytes and promoted increase of IL-2 and TNF- $\alpha$  production [5]. The authors stated that these results stimulate the evaluation of antitumor activity of this lectin.

Due to the predominantly proinflammatory response of SteLL treatment, one could expect that, in presence of the lectin, the splenocytes would have increased the NO release, which did not occur (Figure 3). Hiroi et al. [27] reported that IL-4 inhibits the NO production induced by IFN- $\gamma$ . On this way, the increased expression of IL-4 by splenocytes treated with SteLL can be a reason for the slight decrease in the levels of NO, corresponding to other indication of the regulatory role of IL-4 in the status induced by SteLL.

#### **4. Conclusion**

The findings presented here demonstrate that SteLL is able to affect the release of specific cytokines by mice splenocytes without causing cellular stress and generating a predominant pro-inflammatory (Th1 and Th17) response but regulated by IL-4. Thus, we can point out SteLL as an interesting immunomodulatory agent to be investigated as a possible chemotherapeutic agent against cancer cells, for example.

#### **Acknowledgements**

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; 408789/2016-6) for research grants and fellowships (PMGP and THN) as well as to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15) for financial support. The authors thank the *Núcleo de Plataformas Tecnológicas* of the *Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz* (FIOCRUZ Pernambuco).

#### **References**

- [1] L.C.B.B. Coelho, P.M.S. Silva, V.L.M. Lima, E.V. Pontual, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, M.T.S. Correia, Lectins, interconnecting proteins with

- biotechnological/pharmacological and therapeutic applications, Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2017 (2017) 1594074.
- [2] T.F. Procópio, M.C. Moura, L.P. Albuquerque, F.S. Gomes, N.D.L. Santos, L.C.B.B. Coelho, E.V. Pontual, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, Antibacterial lectins: action mechanism, defensive roles and biotechnological potential. In: E. Collins. (Org.), Antibacterials: synthesis, properties and biological activities, Nova Science Publishers Inc., New York, 2017, pp. 69-89.
- [3] M.A. Souza, F.C. Carvalho, L.P. Ruas, R. Ricci-Azevedo, M.C. Roque-Barreira, The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties, Glycoconj. J. 30 (2013) 641-657.
- [4] M.C. Coriolano, J.S. Brito, L.L.S. Patriota, A.K.A. Soares, P.M.G. Paiva, V.M.B. Lorena, T.H. Napoleão, L.C.B.B. Coelho, C.M.L. Melo, Immunomodulatory effects of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), Prot. Pept. Lett. 25 (2018) 295-301.
- [5] T.F. Procópio, L.L.S. Patriota, B.R.S. Barros, L.M.S. Aguiar, V.M.B. Lorena, P.M.G. Paiva, C.M.L. Melo, T.H. Napoleão, *Calliandra surinamensis* lectin (CasuL) does not impair the functionality of mice splenocytes, promoting cell signaling and cytokine production, Biomed. Pharmacother. 107 (2018) 650-655.
- [6] M.O. Ribas, H.M. Sou, J. Sartoretto, T.A. Lanzoni, L. Noronha, L.A. Acra, Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato, Rev. Odonto Ciênc. 21 (2006) 245-252.



- [7] D.S. Lindenmaier, J. Putzke, Estudo etnobotânico em três comunidades Mbya/Guarani na região central do Rio Grande do Sul, Brasil, Cad. Pesq. 23 (2011) 6-18.
- [8] F.S. Gomes, T.F. Procópio, T.H. Napoleão, L.C.B.B. Coelho, P.M.G. Paiva, Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf, J. Appl. Microbiol. 114 (2013) 672-679.
- [9] E.F. Haney, R.E.W. Hancock, Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications, Biopolymers 100 (2013) 572-583.
- [10] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin-Phenol Reagent, J. Biol. Chem. 193 (1951) 265–275.
- [11] D.H. Bing, J.G.M. Weyand, A.B. Stavitsky, Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124 (1967) 1166–1170.
- [12] R.Y. Tsien, Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium, Trends Neurosci. 11 (1988) 419–424.
- [13] G.R. Degasperi, K.G. Zecchin, J. Borecky, M.A. Cruz-Höfling, R.F. Castilho, L.A. Velloso, F. Guimarães, A.E. Vercesi, Verapamil-sensitive  $Ca^{2+}$  channel regulation of Th1-type proliferation of splenic lymphocytes induced by Walker 256 tumor development in rats, Eur. J. Pharmacol. 54 (2006) 179–184.
- [14] C.M.L. Melo, B.A. Paim, K.G. Zecchin, J. Morari, M.R. Chiaratti, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, P.M.G. Paiva, Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats, Mol. Cell. Biochem. 342 (2010) 163–169.

- [15] A.H. Ding, C.F. Nathan, D.J. Stuehr, Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production, *J. Immunol.* 141 (1988) 2407-2412.
- [16] T.A.R. Santos, A.C. Silva, E.B. Silva, P.A.T.M. Gomes, J.W.P. Espíndola, M.V.O. Cardoso, V.R. Pereira, Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-thiazoles in Jurkat and HT-29 cells, *Biomed. Pharmacother.* 82 (2016) 555-560.
- [17] L.L.S. Patriota, T.F. Procópio, J.S. Brito, V. Sebag, A.P.S. Oliveira, A.K.A. Soares, L.R. Moreira, T.A. Lima, T. Soares, T.D. Silva, P.M.G. Paiva, V.M.B. Lorena, C.M.L. Melo, L.P. Albuquerque, T.H. Napoleão, *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells, *Int. J. Biol. Macromol.* 103 (2017) 36-46.
- [18] J.S. Brito, G.R.S. Ferreira, E. Klimczak, L. Gryshuk, N.D.L. Santos, L.L.S. Patriota, L.R. Moreira, A.K.A. Soares, B.R. Barboza, P.M.G. Paiva, D.M.A.F. Navarro, V.M.B. Lorena, C.M.L. Melo, M.C. Coriolano, T.H. Napoleão, Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation, *Biomed. Pharmacother.* 94 (2017) 865-872.
- [19] M.P. Murphy, R.M. Siegel, Mitochondrial ROS fire up T cell activation, *Immunity* 38 (2013) 201-202.

- [20] B. Blume, T. Nürnberger, N. Nass, D. Scheel, Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley, *Plant Cell* 12 (2000) 1425-1440.
- [21] G. Ermak, K.J. Davies, Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death, *Mol. Immunol.* 38 (2002) 713-721.
- [22] 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.
- [23] M. Brune, S. Castaigne, J. Catalano, K. Gehlsen, A.D. Ho, W.K. Hofmann, D.E. Hogge, B. Nilsson, R. Or, A.I. Romero, B. Simonsson, R. Spearing, E.A. Stadtmauer, J. Szer, E. Wallhult, K. Hellstrand, Improved leukemia-free survival after postconsolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in acute myeloid leukemia: results of a randomized phase 3 trial, *Blood* 108 (2006) 88-96.
- [24] S.A. Rosenberg, IL-2: The first effective immunotherapy for human cancer, *J. Immunol.* 192 (2014) 5451-5458.
- [25] S. Mitra, W.J. Leonard, Biology of IL-2 and its therapeutic modulation: Mechanisms and strategies, *J. Leukocyte Biol.* 103 (2018) 643-655.
- [26] T.G. Shrihari, Dual role of inflammatory mediators in cancer, *ecancermedicalscience* 11 (2017) 721.
- [27] M. Hiroi, Y. Sakaeda, H. Yamaguchi, Y. Ohmori, Anti-inflammatory cytokine interleukin-4 inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression in the mouse macrophage cell line RAW264.7 through the repression of octamer-dependent transcription, *Mediators Inflamm.* 2013 (2013) 369693.

## Figure captions

**Figure 1.** Investigation of the cytotoxic effect of *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) (3.12–50 µg/mL) on BALB/c mice splenocytes after incubation for 24 h. Cytotoxic effect was assessed by flow cytometry using annexin V (AnnV) and propidium iodide (PI). AnnV–/PI+ cells were considered necrotic and AnnV+/PI– cells were considered apoptotic. Bars represent the mean ± standard deviation of six experiments.

**Figure 2.** Evaluation of the effects of 24-h treatment of BALB/c mice splenocytes with *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) at 12.5 µg/mL on cytosolic calcium concentration (A), cytosolic (B) and mitochondrial (C) reactive oxygen species (ROS) production, and membrane mitochondrial potential ( $\Delta\Psi_m$ ) (D) after incubation for 24 h. Bars represent the mean ± standard deviation of six experiments.

**Figure 3.** Evaluation of the effects of 24-h treatment of BALB/c mouse splenocytes with *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) at 12.5 µg/mL on the release of cytokines (A–G) and nitric oxide (H). Bars represent the mean ± standard deviation of six experiments.

Figure 1.

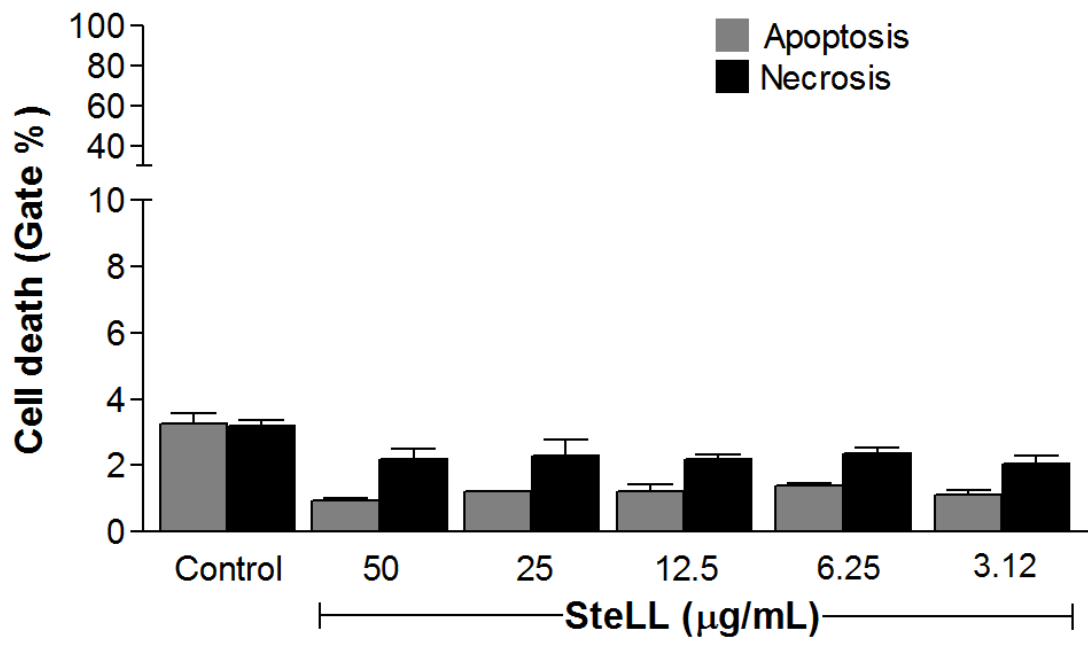


Figure 2

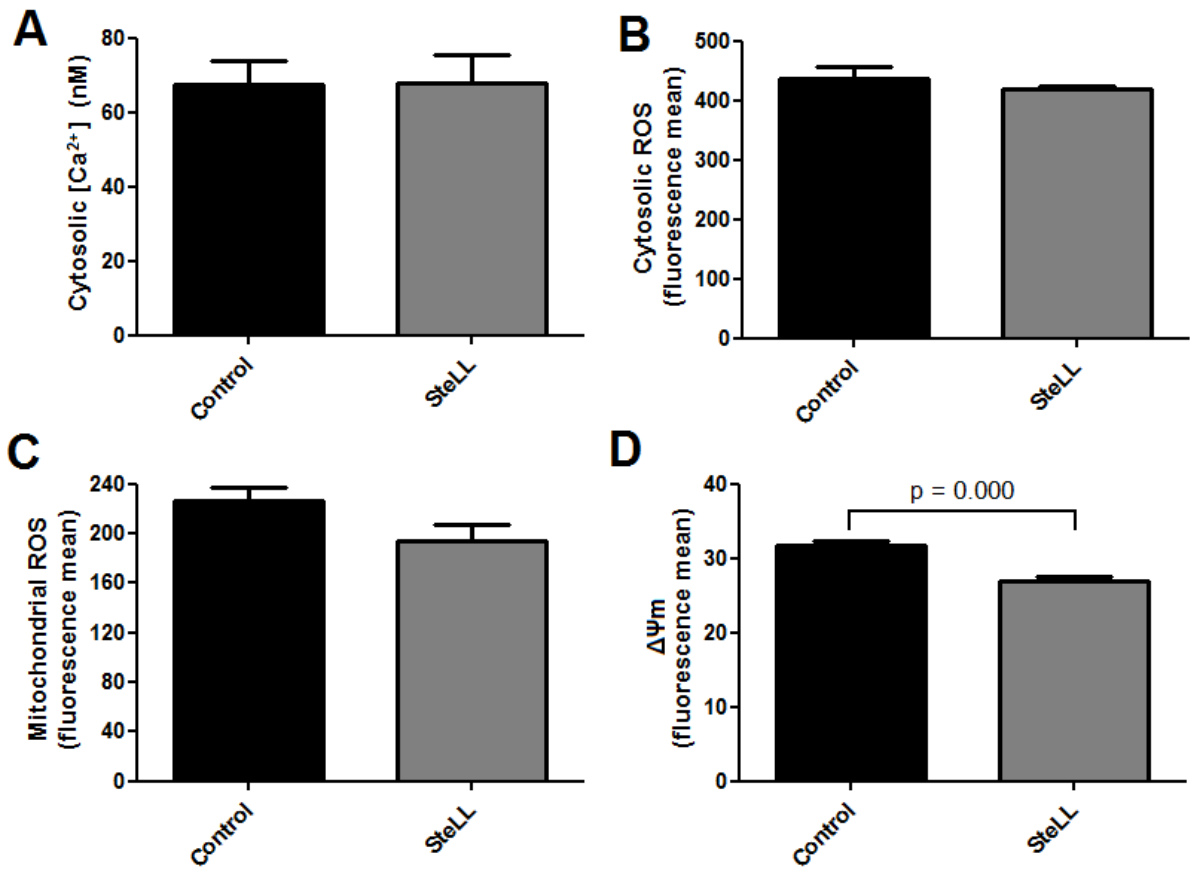
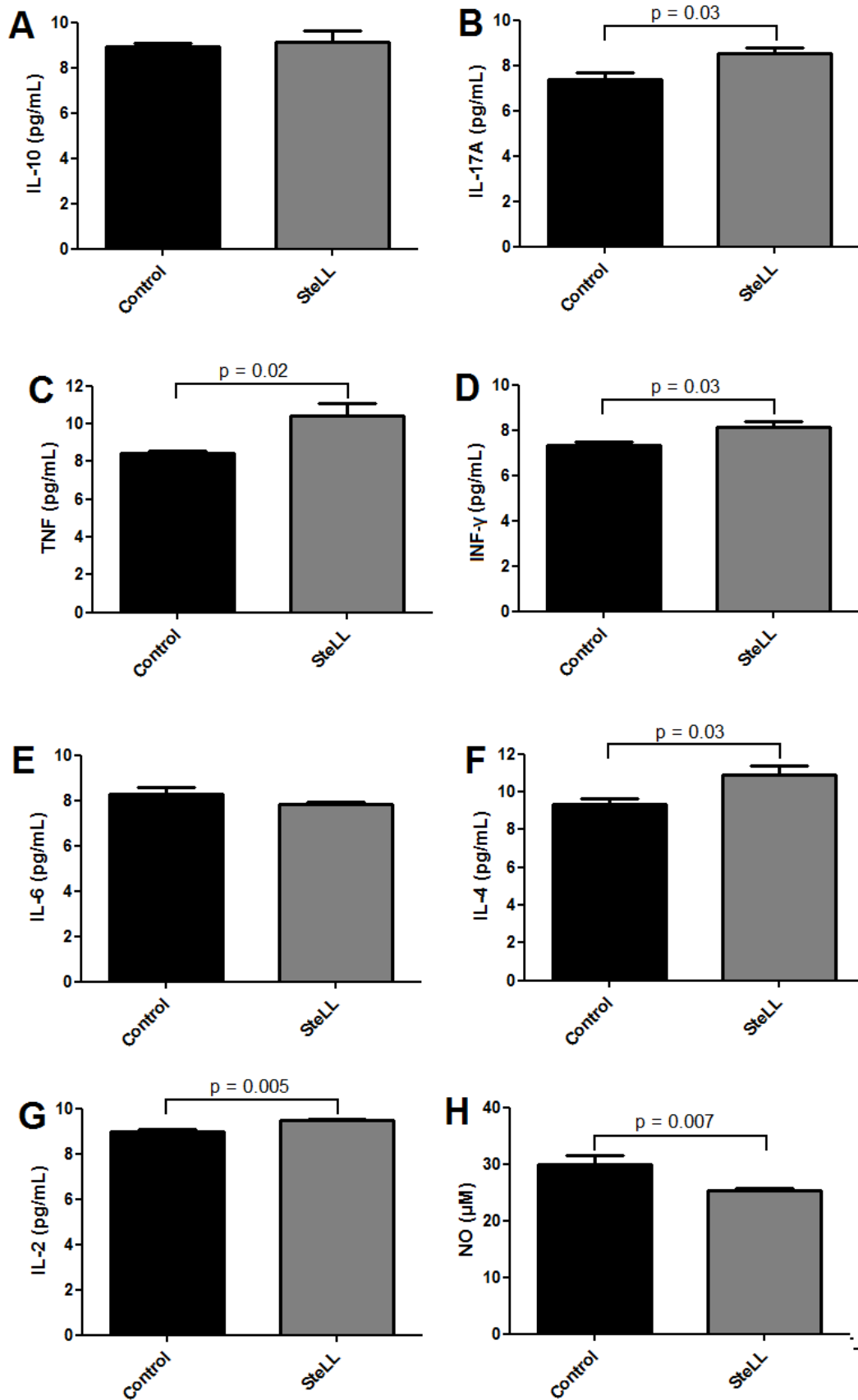


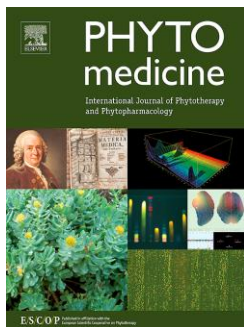
Figure 3



## 5.CAPÍTULO 2

***Schinus terebinthifolia* Raddi leaf lectin (SteLL) interferes with in the neovascularization and morphological development of the *Coturnox japonica* embryos**

**ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO  
“Phytomedicine”**



**Fator de Impacto: 3.10  
Qualis A2 na área de Medicina Veterinária**



***Schinus terebinthifolia* Raddi leaf lectin (SteLL) interferes with the neovascularization and morphological development of *Coturnix japonica* embryos**

Ardilles Juan Carlos Alves dos Santos<sup>a</sup>, Victor Felipe da Silva Araújo<sup>a</sup>, Rayssa Perla Martins França<sup>a</sup>, Eva Luana Almeida da Silva<sup>a</sup>, Patrícia Maria Guedes Paiva<sup>b</sup>, Thiago Henrique Napoleão<sup>b</sup>, Edbhergue Ventura Lola Costa<sup>a</sup>, Romildo de Albuquerque Nogueira<sup>a</sup>, Emmanuel Viana Pontual<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-300, Recife, Brazil.*

<sup>b</sup>*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Brazil.*

\*Corresponding author. E-mail address: emmanuelpontual@yahoo.com.br

## **Abstract**

Angiogenesis corresponds to the budding of new blood vessels starting from other preexisting ones. This process is of great importance for development of tumor cells. *Schinus terebinthifolia* (Brazilian Peppertree) leaves express a thermostable and antimicrobial lectin (SteLL). This work reports the effect of SteLL on the angiogenesis process using the *in vivo* model of yolk sac membrane of *Coturnix japonica* (Japanese quail) embryos. The fractal analysis by box counting and information dimension indicated that SteLL at 1.35 mg/mL reduced the angiogenesis of *C. japonica* yolk sac membrane. The inhibition of the vascular network formation in the yolk sac membrane resulted in decreased blood supply to the embryos, and consequently area, perimeter and percentage of cephalic length of embryos were significantly reduced in the group treated with SteLL, corroborating with the antiangiogenic activity. In conclusion, SteLL is an antiangiogenic agent and this result stimulate future investigations about its antitumor activity.

**Keywords:** Angiogenesis, Brazilian pepper tree, cancer, lectin, fractal dimension.

## 1. Introduction

Malignant tumors, also referred as neoplasms or, more generically, cancers result from a rapid multiplication of abnormal cells that can then invade adjoining tissues and spread to other organs, causing the metastases. The malignant tumors represents a serious public health concern, since is estimated that 9.6 million of people died due to the cancer complications in 2018 (WHO, 2018). The cancers with higher incidence are lung and breast tumors, from which were recorded 2.09 million cases around the world, followed by the colorectal cancer with 1.80 million cases. On the other hand, the most common causes of cancer death worldwide are lung and colorectal tumors, responding by 1.76 million and 862 000 deaths in 2018, respectively (WHO, 2018).

Angiogenesis, characterized by the budding of new blood vessels starting from other preexisting ones, is one of the most important factors required for the development of tumor cells, providing the supply of oxygen and nutrients, besides removing carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and other metabolic residues (FERRARA, 2004; ZHANG, et al., 2018).

Since the tumors cannot grow or spread without a blood supply, the molecules involved in the angiogenesis represent promising targets for cancer therapy. In this sense, the antiangiogenic agents prevent or slow the growth of cancer by starving it of its needed blood supply (NCI, 2018). In addition, the adverse effects and complications associated with currently available chemotherapeutic agents represent the limitations of conventional anticancer treatments and this has stimulated the search for new anticancer drugs (Shivamadhu et al., 2017).

Lectins are proteins that have at least one non-catalytic domain for carbohydrate recognition that binds sugars in a reversible manner and with high specificity without modifying their covalent structure (Procópio et al., 2017). The lectin potential for use in new therapeutic approaches against tumors has been investigated, with emphasis on its cytotoxic potential by inducing apoptosis/necrosis, its ability to transport other molecules to the tumor cells, its role as biomarkers for tumor detection and its inhibitory capacity of tumor invasion and metastization. It has also been reported that lectins can inhibit the angiogenesis, including by reducing the production of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in the tumor microenvironment (Shivamadu et al., 2017).

Leaves of *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae), popularly known as Brazilian pepper tree, contain compounds that induce apoptosis in melanoma and block the development of metastasis (Matsuo et al., 2011). The leaves also express a chitin-binding lectin (SteLL), a 14-kDa glycosylated and ion-independent polypeptide active against the medically relevant microorganisms *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* (Gomes et al., 2013). In this work we hypothesize that SteLL, like other lectins already described, can interfere in the formation of a vascular network from preexisting vessels.

Embryos of *Coturnix japonica* (Fascianidae), a species popularly known as Japanese quail, represent interesting models to evaluate antiangiogenic and antivascuogenic activities, due to the rapid embryonic development, greater practicality of manipulation and ease of visualization of the results. In addition, the use of mathematical models such as fractal analysis may be useful to

increase the accuracy of results (Costa et al., 2013). Here, the effect of SteLL on the angiogenesis process using the *in vivo* model of yolk sac membrane of *C. japonica* embryos is described.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and lectin isolation

The access to the plant material was recorded (A04F306) in the *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado* (SisGen). The lectin SteLL was isolated using the procedure previously reported by Gomes et al. (2013). The *S. terebinthifolia* leaves were collected in the Recife city (Pernambuco, Brazil) and air-dried at 28 °C for 15 days. The dried leaves were crushed in a blender and the flour (10 g) was mixed with 0.15 M NaCl (100 mL) during 16 h at 28 °C under magnetic stirring. After filtration through gauze and centrifugation (12,000 ×g, 15 min, 4°C) the clear supernatant was collected and corresponded to the leaf extract. Next, the leaf extract was loaded onto a chitin (Sigma-Aldrich, USA) column (7.5 × 1.5 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl. The elution of SteLL was performed with 1.0 M acetic acid. The pool of eluted fractions (SteLL) was dialyzed against distilled water for removing of the acetic acid and its concentration was determined according to Lowry et al. (1951).

The hemagglutinating activity (HA) of SteLL was determined aiming to verify if its domain of carbohydrate recognition was preserved. The erythrocytes collection as approved by the Ethics Committee on Animal Use of the

*Universidade Federal de Pernambuco, UFPE* (process 23076.033782/2015-70). The HA assay was performed in microtiter plates according to Procópio et al. (2017), using a suspension (2.5%, v/v) of glutaraldehyde-treated (Bing et al., 1967) rabbit erythrocytes in 0.15 M NaCl. The HA corresponded to the reciprocal of the highest dilution of SteLL able to promote the full agglutination of erythrocytes. The specific HA was defined as the ratio between HA and the protein concentration (mg/mL).

## 2.2. Effect of SteLL on the angiogenesis from *C. japonica* yolk sac membrane

The *in vivo* assays were performed according to Costa et al. (2013), using an incubator (Chocmaster, Paraná, Brazil) assembled at the *Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional* (LABTEC) of the *Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)*. The apparatus was used to allow the development of the *C. japonica* embryos under controlled temperature and humidity (37.5 °C and 60%, respectively) at conditions considered proper to the development of the embryos (Mazzonelli & Led, 1960; Marques, 1994). The temperature was controlled through a resistance monitored by a thermostat and measured through a thermometer coupled to the incubator.

The experimentation with the embryos was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the *Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE* (process 23082.008841/2016; license 067/2016). It was used a total of 150 fertilized *C. japonica* eggs, with approximately two days, obtained from the

*Estação Experimental de Pequenos Animais* of UFRPE (Carpina, Pernambuco).

The eggs were randomly distributed in 03 groups, containing 30 eggs each one (G1- control group; G2- group treated with SteLL at 0.65 mg/mL; G3- group treated with SteLL at 1.35 mg/mL), and kept in the incubator for 72 h to yolk sac membrane formation. After the first 48 h, a disposable syringe was used to remove 2.5 ml of albumen from the egg and cuts were performed on the eggshells in order to allow the access to yolk sac membrane (Kirchner et al., 1996). These cuts were made with the aid of a sterile scissors and the eggshells, previously cleaned with a 2.0% chlorhexidine solution, was sectioned forming a curved window (2.0 cm long x 1.5 cm wide). The treatments were administered using discs of methylcellulose arranged in contact with the yolk sac membrane through the windows made in the eggshells. The discs were prepared according to Dias et al. (2008a) with an aliquot of 10  $\mu$ L of a methylcellulose solution (10 mg/ml). For the groups treated with SteLL, the discs were soaked with a lectin solution (6.5  $\mu$ L) at 0.65 or 1.35 mg/mL, while the control group received discs soaked with 0.15 M NaCl. After treatment, the windows in eggshells were covered with Parafilm®, sealing the egg from possible contaminations and avoiding the embryos dehydration. After completing the 72 h-incubation, images of the vascular network from the yolk sac membranes were captured through a digital camera (Sony DSC-W130 8.1 megapixels) and transferred to a computer for further analysis of fractal dimensions.

The images of the yolk sac membranes were segmented for analysis of the fractal geometry of their vascular network. The image segmentation was

resized in the Microsoft Paint program, where the vascular network was covered using the brush icon. Skeletonization of the images was performed, a type of segmentation that confers a single dimension to the entire vascular network, disregarding the different vessel sizes. Then, the segmented and binarized images were converted to black (background image) and white (segmented vessels). The fractal dimension of the segmented and binarized images was calculated with the Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System.

### *2.2.1. Mathematical methods for analyses of the images of the vascular network in *C. japonica* yolk sac membrane*

#### *2.2.1.1. Box Counting dimension method*

The box counting dimension analysis was performed according to Costa et al. (2013). The object was covered by a grid formed by a number of boxes  $N(r)$ . The boxes (dimensions of  $r \times r$ ) contained at least one dot of the fractal object. The procedure was repeated with several grids containing, at each step, a larger number of boxes  $N(r)$  while the size of the sides of boxes  $r$  were reducing. Afterwards, a double logarithm graphic of  $N(r)$  was plotted as a function of the sides of the boxes  $r$ . The counting dimension by boxes corresponded to the slope of the double logarithm plot of  $N(r) \times r$  with inverted signal.

#### *2.2.1.2. Information dimension (entropy) method*

In the information dimension, the image was covered by several boxes with different sizes; however, the counting was performed based on the



probability of occupancy of the boxes by the fractal object. The procedure was repeated 34 times with several grids containing, at each step, a larger number of boxes ( $N(r)$ ) as the sides of the boxes  $r$  were reduced in size. Subsequently, a double logarithm graph of the Kolmogorov entropy was plotted in function of the sides of the boxes  $r$ . The information dimension was obtained by sloping the double logarithm plot of the Kolmogorov entropy ( $S(r)$ ) versus  $r$ , with inverted signal (Kunick et al., 2008; Costa et al., 2013).

### *2.3. Effect of SteLL on C. japonica embryos*

#### *2.3.1. Effect of SteLL on the area, perimeter and percentage of cephalic length of C. japonica embryos*

After 72 h of the experiment beginning, corresponding to 24 h after treating the embryos with SteLL, the embryos were dissected and photographed with a digital camera (Sony DSC-W230) coupled to a microscope (Stereomicroscope Optom TIM-2B). The images were imported into the program Image J version 1.51p, where the area, perimeter and percentage of cephalic length of the embryos were calculated. The percentage of cephalic length was defined as a relative measure of cephalic length regarding to the body of the embryo. The embryos area corresponded to the sum of all pixels that made up the shape of the embryos and the perimeter represented the sum of all the pixels that composed embryos contour (Duarte Neto, 2005).

After dissecting, the embryos of *C. japonica* were immediately weighed and the percentage of cephalic length was determined using a microscope (Stereomicroscope Optom TIM-2B) with a standard slide for calibration. The

percentage of cephalic length (PCL) of each embryo served as a parameter of embryonic morphogenesis, being determined by the total body length based on the segments defined as head flexure, cervical flexure, and caudal axis (DIAS et al., 2008). This parameter was calculated through the length of the axis of the flexure of the head up to the cervical flexure (CECbCv) divided by the same length (CECbCv) along with the length of the axis of the cervical flexure until the caudal flexure (CECvCd) multiplied by 100.

#### *2.4. Statistical analysis*

The statistical analysis was performed using the Shapiro-Wilk normality test. However, since the data did not follow a normal distribution, the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test was performed, with a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ), represented by the median and deviation interquartile.

### **3. Results and discussion**

The anticancer potential of the leaf lectin of *S. terebinthifolia* (SteLL) was already observed by our research group (unpublished data). Because of the well-known importance of angiogenesis/vasculogenesis processes for the cancer progress, we wondered whether the SteLL antitumor activity could be due to inhibition of vascular network formation in the tumor region. In this sense, this research is an initial effort to point out SteLL as a new bioproduct that may serve as starting material for formulating new antiangiogenic drugs or as an adjuvant in new therapeutic strategies.

SteLL was efficiently isolated according the previously established protocol, and was able to agglutinate erythrocytes with high specific

hemagglutinating activity (18,616) and a purification factor of 46.6. These data corroborate with that reported by Gomes et al. (2013) and Procópio et al. (2017). Since the lectin domain of SteLL was active, we investigated its antiangiogenic activity.

In this work, the ability of SteLL of interfering with the formation of vascular network in *C. japonica* yolk sac membrane was investigated using the fractal analysis by box counting and information dimension in an attempt to provide a greater reliability to the analysis. Both the analyzes indicated that SteLL at 1.35 mg/mL was able to significantly ( $p= 0.004$ ) reduce the formation of the vascular network from the *C. japonica* yolk sac membrane (Figure 1A and 1B, respectively).

The C-type lectin isolated from *Bothrops pauloensis* inhibited the vessel formation in Matrigel assay (Castanheira et al., 2017) and the authors demonstrated that this effect was due to stimulation by the basic fibroblast growth factor (bFGF). The lectin from *Praecitrullus fistulosus* (Cucurbitaceae) fruits also showed an *in vivo* antiangiogenic activity when administrated to Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice (Shivamadhu et al., 2017). This activity was attributed to the inhibition of the vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF is an essential factor to the formation of new blood vessels, which is essential for the growth of solid tumors, ensuring the supply of oxygen, essential nutrients and other growth factors for the tumor, which are required for the proliferation of cancer cells and metastasis formation (Ronca et al., 2017).

The lectin from *P. fistulosus* fruit also showed a promising cytotoxic effect against multiple cancer cell lines, reduced the activity of metalloproteinases (MMP-2 & MMP-9) and inhibited *in vivo* the tumor growth in EAC bearing mice

(Shivamadhu et al., 2017). The mannose binding lectin from *Remusatia vivipara* tuber, similarly to described here for SteLL, inhibited the development of vascularization of chorioallantoid membrane from chicken eggs, as well as reduced the density of neoformed vessels (Sindhura et al., 2017).

The inhibition of the vascular network formation in the yolk sac membrane results in decreased blood supply to the embryo, impairing its development. In this sense, and since the mathematical models used here indicated that SteLL acted inhibiting the formation of new blood vessels in the earliest stages of the embryo, we investigated which morphological damages could be occurring as consequence of the angiogenesis inhibition. The parameters chosen to evaluate these damages were the area, the perimeter and the cephalic length of the embryos.

The area, perimeter and percentage of cephalic length of embryos were significantly (p values of 0.0002, 0.0027 and 0.0065, respectively) affected only in the group treated with SteLL at 1.35 mg/mL (Figure 2). The alteration of these morphometric parameters reflects a reduction in blood supply, ensuring the antiangiogenic activity of SteLL, since the vascular network of the yolk sac is essential for nutrient supply (Zhang et al., 2018).

#### **4. Conclusion**

The results reported here point out SteLL as an antiangiogenic agent and stimulate future investigations about its antitumor activity. Additionally, this work contributes for the enlargement of the panel of biological activities of this lectin.

#### **Acknowledgements**

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; 408789/2016-6) for financial support. A.J.C.A. Santos and E.L.A. Silva would like to thank CNPq and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for graduate scholarships. E.V.L. Costa would like to thank CAPES and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for post-doctoral scholarship.

## References

- A. C. Kunicki, L. S. Araújo, F. B. Sá, B. Stosic, C. T. F. Barbosa, R. A. Nogueira, A fractal analysis of retinal vessel patterns in ophthalmically normal dogs, *Veterinary Ophthalmology*. 11 (2008) 2-6.
- A. L. Matsuo, C. R. Figueiredo, D. C. Arruda, F. V. Pereira, J. A.B. Scutti, M. H. Massaoka, L. R. Travassos, P. Sartorelli, J. H. Lago,  $\alpha$ -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411 (2011) 449-454.
- B. R. Sindhura, P. Hedge, V. B. Chachadi, S. R. Inamdar, B. M. Swamy, High mannose N-glycan binding lectin from *Remusatia vivipara* (RVL) limits cell growth, motility and invasiveness of human breast cancer cells, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93 (2017) 654-665.

- D. Marques, Fundamentos básicos de incubação industrial. 2° ed. São Paulo: *Casp S/A Indústria e Comércio*, (1994) 143.
- D.H. Bing, J.G.M. Weyand, A. B. Stavitsky, Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124 (1967) 1166–1170.
- E. G. Mejia, V. I. Prisecaru, Lectins bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 45 (2005) 425-445.
- E. V. L. Costa, G. C. Jimenez, C. T. F. Barbosa, R. A. Nogueira, Fractal analysis of extra-embryonic vascularization in japanese quail embryos exposed to extremely low frequency magnetic fields, *Bioelectromagnetics*. 34 (2013) 114-121.
- F.S. Gomes, T.F. Procópio, T.H. Napoleão, L.C.B.B. Coelho, P.M.G. Paiva, Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf, *Journal of Applied Microbiology*, 114 (2013) 672-679.
- J. M. Mazzoneli, J. E. Led. Técnica y construcción de incubadoras. Buenos Aires: *Editora Hobby*, C. E I., (1960) 139p.
- L. E. Castanheira, D. S. Lopes, S. N. C. Gimenes, S. R. Deconte, B. A. Ferreira, P. T. Alves, L. R. G. Filho, T. C. Tomiosso, R. S. Rodrigues, K. A. G. Yoneyama, F. A. Araújo, V. M. Rodrigues, Angiogenic effects of BpLec, a C-type lectin isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102 (2017) 153-161.

- L. M. Kirchner, S. P. Schmidt, B. S. Gruber, Quantitation of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane model using fractal analysis. *Microvascular Research*, 54 (1996) 2-14.
- M. C. Shivamadhu, B. K. Srinivas, S. Jayarama, A. C. Sharada, Anti-cancer and anti-angiogenic effects of partially purified lectin from *Praecitrullus fistulosus* fruit on *in vitro* and *in vivo* model, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96 (2017) 1299-1309.
- N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress, *Endocrine Reviews*, 25 (2004) 581-611.
- National Cancer Institute. Cancer Fact sheet. Updated April 2, 2018. (2018).
- O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin-Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- P. F. Dias, J. M. Siqueira Junior, M. Maraschin, A. G. Ferreira, A. R. Gagliardi, R. M. Rieiro-do-valle, A polysaccharide isolated from the brown seaweed *sargassumstenophyllum* exerts antivasculogenic effects evidenced by modified morphogenesis, *Microvascular Research*, 75 (2008) 34-44.
- P. J. Duarte Neto, Análise Multivariada da Forma do Otólito Sagita para Discriminação de Estoques de Dourado, *coryphaenahippurus* (pisces: coryphaenidae), no nordeste do Brasil. 2005. 42p. Tese (Mestrado em Biometria) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- R. Ronca, M. Benkheil, S. Mitola, S. Stuyf, S. Liekens, Tumor angiogenesis revisited: Regulators and clinical implications. *Medicinal Research Reviews*, 37 (2017) 1231-1274.

T.F. Procópio, L.L.S. Patriota, M.C. Moura, P.M. Silva, A.P.S. Oliveira, L.V.N. Carvalho, T.A. Lima, T. Soares, T.D. Silva, L.C.B.B. Coelho, M.G.R. Pitta, M.J.B.R. Rêgo, R.C.B.Q. Figueiredo, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect, *Int. J. Biol. Macromol*, 98 (2017) 419-429.

World Health Organization. Cancer Fact sheet. Updated September 2018. (2018).

Z. Zhang, S. Ji, B. Zhang, J. Liu, Y. Qin, J. Xu, X. Yu, Role of angiogenesis in pancreatic cancer biology and therapy, *Biomedicina & Pharmacotherapy*, 108 (2018) 1135-1140.



## Figure captions

**Figure 1.** Effect of the *Schinus terebinthifolia* lectin (SteLL) on the formation of vascular network from *Coturnix japonica* yolk sac membrane. Investigation through box counting method (A) and information dimension method (B). The statistical treatment used the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc multiple-comparison test. The significance level was 5%, being considered differences between the treatments when  $p < 0.05$ . The data were expressed as medians with the respective deviation interquartile. Different letters indicate significant differences between the treatments.

**Figure 2.** Effect of the *Schinus terebinthifolia* lectin (SteLL) on the development of *Coturnix japonica*. Embryos area (A), perimeter (B) and percentage of cephalic length (C). The statistical treatment used the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc multiple-comparison test. The significance level was 5%, being considered differences between the treatments when  $p < 0.05$ . The data were expressed as medians with the respective deviation interquartile. Different letters indicate significant differences between the treatments.

Figure 1.

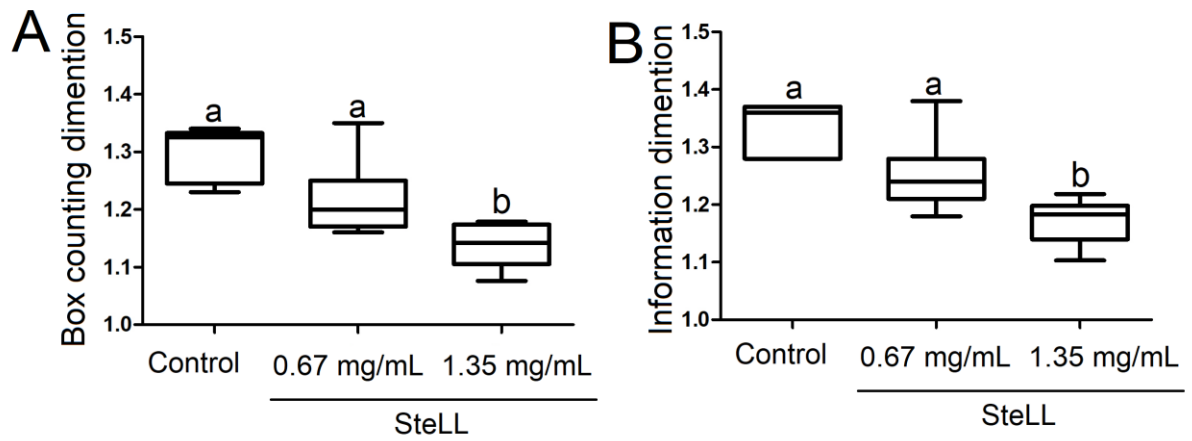
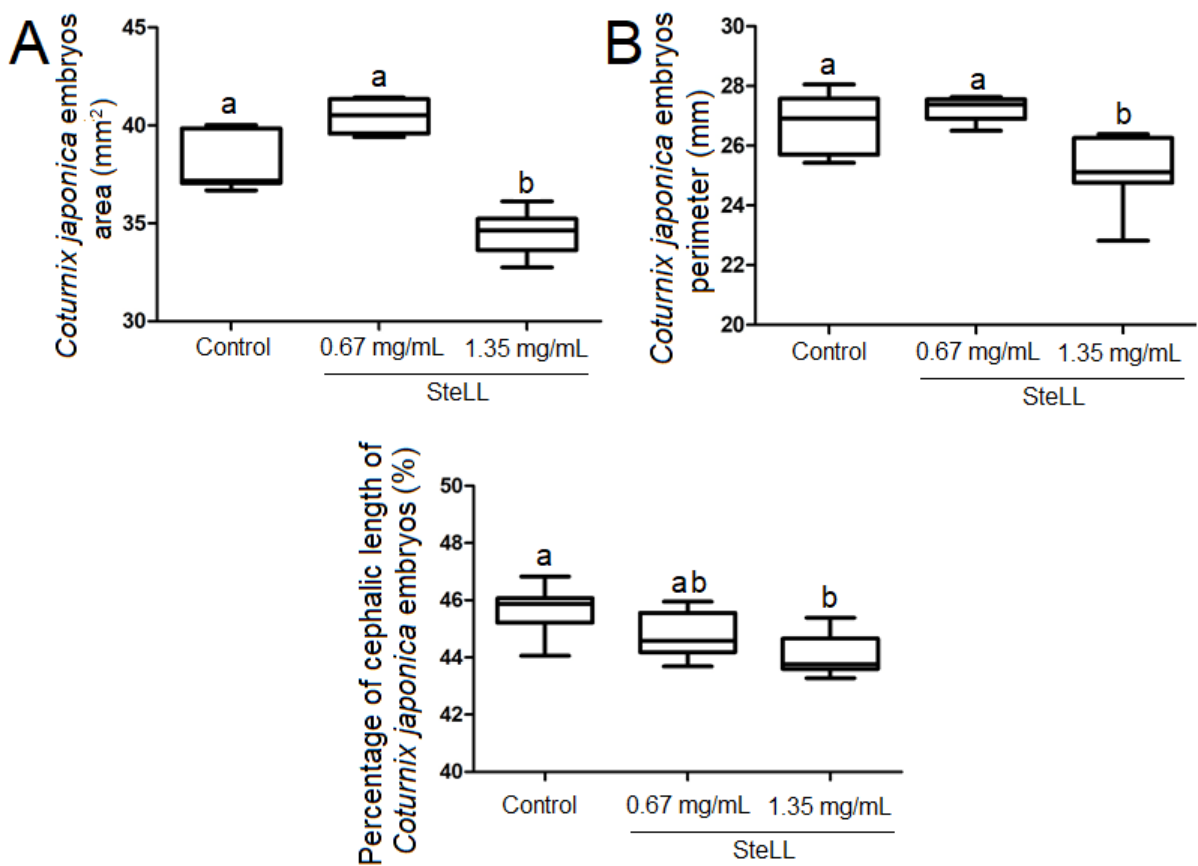


Figure 2.



## 6. CONCLUSÃO

- SteLL não foi citotóxica para esplenócitos de camundongos uma vez que células em apoptose ou necrose não foram detectadas.
- SteLL não causou danos celulares que pudessem comprometer a funcionalidade das células, uma vez que a liberação de cálcio citosólico e a produção de EROS pelos esplenócitos não foi alterada.
- SteLL mostrou atividade imunomoduladora uma vez que estimulou a liberação das citocinas IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-2, nesse sentido podemos concluir que a lectina estimula uma resposta predominantemente pró-inflamatória (Th1 e Th17), porém regulada por IL-4
- SteLL apresentou efeito angiogênico pelo modelo *in vivo* utilizando embriões de *C. japonica*.
- A ação antiangiogênica foi corroborada pelo fato de que a lectina alterou os parâmetros morfométricos (área, perímetro e percentual de comprimento cefálico) dos embriões, assegurando que houve redução no suprimento de sangue, devido à diminuição na formação da rede vascular do saco vitelínico dos ovos de *C. japonica*.
- As atividades imunomoduladora e antiangiogênica de SteLL estimulam futuras investigações desta lectina como um agente terapêutico para atuar em condições patológicas que envolvam os processos de inflamação e angiogênese, tais como o câncer.

## 7. Anexo

### 7.1 Comprovante de submissão do artigo “*Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL ) stimulates cytokine release by mice splenocytes” ao periódico *International Journal of Biological Macromolecules*.

Successfully received: submission Schinus terebinthifolia leaf lectin (SteLL) stimulates cytokine release by mice splenocytes for International Journal of Biological Macromolecules

---

De: International Journal of Biological Macromolecules (Evisesupport@elsevier.com)

Para: emmanuelpontual@yahoo.com.br

Data: segunda-feira, 7 de janeiro de 2019 18:12 BRST

---

*This message was sent automatically.*

Ref: IJBIOMAC\_2019\_169

Title: Schinus terebinthifolia leaf lectin (SteLL) stimulates cytokine release by mice splenocytes

Journal: International Journal of Biological Macromolecules

Dear Dr. Pontual,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in International Journal of Biological Macromolecules. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at:

[http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=IJBIOMAC](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=IJBIOMAC) and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

International Journal of Biological Macromolecules

#### Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

---

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.