



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DALILA DE BRITO MARQUES RAMOS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL E ANTINOCICEPTIVA DE
EXTRATO SALINO E LECTINA DE FOLHAS DE *Schinus terebinthifolia***

Recife
2019

DALILA DE BRITO MARQUES RAMOS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL E ANTINOCICEPTIVA DE
EXTRATO SALINO E LECTINA DE FOLHAS DE *Schinus terebinthifolia***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Fisiologia.

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rosemairy Luciane Mendes

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Ramos, Dalila de Brito Marques

Avaliação das atividades antitumoral e antinociceptiva de extrato salino e lectina de folhas de *Schinus terebinthifolia* / Dalila de Brito Marques Ramos- 2019.

102 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão

Coorientador: Rosemary Luciane Mendes

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2019.

Inclui referências, apêndice e anexo

1. Lectinas 2. Aroeira da praia 3. Genotoxicidade I. Napoleão, Thiago Henrique (orient.) II. Mendes, Rosemary Luciane (coorient.) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-145

DALILA DE BRITO MARQUES RAMOS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL E ANTINOCICEPTIVA DE
EXTRATO SALINO E LECTINA DE FOLHAS DE *Schinus terebinthifolia***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 22 / 02 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Examinador Interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Ana Patrícia Silva de Oliveira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Maiara Celine de Moura (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

À minha família, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde, paz e a proteção necessárias para concretização de mais um projeto na minha vida.

À minha família, meus pais Ana Martinha e Antônio, meus irmãos Amanda e Samuel, cunhados, tios, primos e sobrinhos, por todo amor e torcida para que tudo ocorresse bem.

Ao meu esposo, Yuri, pelo companheirismo e por sempre me fazer enxergar que por mais distante que esteja um sonho, é possível alcançá-lo com força e determinação.

Às minhas filhas Ana Beatriz e Ana Luísa, minhas maiores riquezas.

À Universidade Federal do Piauí, por ter concedido o afastamento para essa qualificação. Ao Prof. Daniel Fortier, o então coordenador, pelo incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Thiago Henrique, pela oportunidade, ensinamentos e ajuda imprescindíveis para conclusão desse doutorado.

À coorientadora, Prof^a. Rosemairry, pelo grande exemplo de pessoa ética a ser seguido e por ter viabilizado a execução desse projeto na Universidade Federal do Vale do São Francisco.

A todos que fazem parte do Laboratório de Bioquímica de Proteínas (Bioprot), em especial, Nataly, Thamara, Maiara, Leydianne, Bernardo, Caio, Lívia, Danilo, Alcides, Gustavo, Carlos, Yasmin e Robson, por todos os momentos compartilhados e receptividade de sempre.

A todos que fizeram e fazem parte do Laboratório de Oncologia Experimental (LOEX), da Universidade Federal do Vale do São Francisco em especial, Taís, Tarcísio, Mariana, Osmar, Yasmym e Ângela pela grande colaboração na realização dos experimentos.

À amiga Maria do Carmo, que mesmo distante, sempre torceu, incentivou e desejou muito sucesso na minha caminhada.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

Lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos, reconhecendo glicoconjugados nas superfícies celulares. *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira-da-praia) é uma planta medicinal cujas folhas contêm uma lectina (SteLL) que apresentou atividade antimicrobiana. A presente tese investigou a atividade antitumoral *in vivo* de extrato salino (ES) de folhas e da lectina SteLL em camundongos portadores de sarcoma 180. Sendo a dor um dos problemas que afetam diretamente a qualidade de vida dos pacientes com câncer, foi também avaliada a ação antinociceptiva de SteLL. A citotoxicidade para as células de sarcoma 180 foi testada *in vitro* e os ensaios *in vivo* foram realizados utilizando camundongos Swiss fêmeas. No ensaio de atividade antitumoral, os tratamentos (NaCl 0,15 M, controle negativo; metotrexato 1,5 mg/kg, controle positivo; ES 100 mg/kg; SteLL 1 e 5 mg/kg) por via intraperitoneal iniciaram no 8º dia após a inoculação dorsal do tumor e duraram 7 dias. Foram analisados o peso tumoral, número e calibre dos vasos tumorais, parâmetros hematológicos e bioquímicos, alterações histopatológicas e ocorrência de micronúcleos nas células da medula óssea. Nos ensaios de atividade antinociceptiva (testes de nocicepção espontânea, hiperalgesia mecânica e da placa quente), foi utilizado modelo ortotópico do sarcoma 180 na pata direita traseira. Os tratamentos foram NaCl 0,15 M (controle negativo), morfina 10 mg/kg (controle positivo) e SteLL (1 e 2 mg/kg), por via intraperitoneal durante 14 dias, a partir do 1º dia após a inoculação das células tumorais. No ensaio *in vitro* ES e SteLL apresentaram CI_{50} (concentração que reduz a viabilidade celular em 50%) de 301,65 e 8,30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. SteLL reduziu a viabilidade das células por induzir apoptose. Os tratamentos *in vivo* com extrato e lectina reduziram o peso do tumor em 57,6 a 73,6%, sem diferenças significativas em relação ao metotrexato. Os tumores de animais tratados com SteLL a 5 mg/kg mostraram um número reduzido de vasos secundários, enquanto que o calibre foi menor em todos os grupos tratados. Não foram detectadas alterações nos níveis sanguíneos de ureia, creatina e glicose, enquanto o nível de aspartato aminotransferase estava moderadamente aumentado no grupo tratado com ES. Análise histopatológica revelou vacuolização e esteatose no fígado de animais tratados com extrato e lectina, bem como redução do espaço de filtração e alterações na arquitetura tubular dos rins. Em relação aos parâmetros hematológicos, detectou-se apenas aumento no número de monócitos no grupo ES. O extrato e a lectina não induziram a formação de micronúcleos. Com relação à ação antinociceptiva, tratamento com SteLL aumentou o uso dos membros portadores do tumor, inibiu a hiperalgesia mecânica e aumentou o tempo de latência no teste da placa quente. As

patas portadoras do tumor apresentaram volume e peso reduzidos nos animais tratados com SteLL, em comparação ao controle negativo. Em conclusão, ES e SteLL foram agentes antitumorais contra sarcoma 180 sem promover alterações hematológicas relevantes e efeitos genotóxicos; entretanto, sinais de toxicidade hepática e renal foram observados, sugerindo a avaliação das estratégias de administração no futuro. A lectina também apresentou atividade antinociceptiva em modelo de dor causada por tumor.

Palavras-chave: Aroeira da praia. Anacardiaceae. Câncer. Dor. Genotoxicidade.

ABSTRACT

Lectins are proteins that bind to carbohydrates, recognizing glycoconjugates on cell surfaces. *Schinus terebinthifolia* Raddi is a medicinal plant whose leaves contain a lectin (SteLL) that showed antimicrobial activity. The present thesis investigated the *in vivo* antitumor activity of leaf saline extract (SE) and SteLL in 180-bearing mice. Since pain is one of the problems that directly affect the life quality of cancer patients, it was also evaluated the antinociceptive action of SteLL. Cytotoxicity for sarcoma 180 cells was tested *in vitro* and the *in vivo* assays were performed using female Swiss mice. In the test of antitumor activity, the treatments (0.15 M NaCl, negative control, methotrexate 1.5 mg/kg, positive control, SE 100 mg/kg, SteLL 1 and 5 mg/kg) by intraperitoneal via started on the 8th day after tumor inoculation and lasted 7 days. Tumor weight, number and size of tumor vessels, hematological and biochemical parameters, histopathological alterations and occurrence of micronuclei in bone marrow cells were analyzed. In the antinociceptive activity tests (spontaneous nociception, mechanical hyperalgesia and hot plate tests), the orthotopic model of sarcoma 180 was used in the right hind paw. The treatments were 0.15 M NaCl (negative control), 10 mg/kg morphine (positive control) and SteLL (1 and 2 mg/kg) intraperitoneally for 14 days from the 1st day after inoculation of tumor cells. SE and SteLL presented IC₅₀ (concentration that reduces cell viability by 50%) of 301.65 and 8.30 µg/mL, respectively. SteLL reduced cell viability by inducing apoptosis. The extract and lectin treatments reduced tumor weight by 57.6 to 73.6%, without significant differences in regard to methotrexate. Tumors of animals treated with SteLL at 5 mg/kg showed a reduced number of secondary vessels, whereas the caliber was lower in all treated groups. No changes were detected in blood levels of urea, creatine and glucose, while the level of aspartate aminotransferase was moderately increased in the SE group. Histopathological analysis revealed vacuolization and steatosis in the liver of animals treated with extract and lectin, as well as reduction of filtration space and alterations in the tubular architecture of the kidneys. Regarding the hematological parameters, only an increase in the number of monocytes in the SE group was detected. Extract and lectin did not induce the formation of micronuclei. Regarding antinociceptive action, treatment with SteLL increased the use of tumor-bearing limbs, inhibited mechanical hyperalgesia, and increased the latency time in the hot plate test. Tumor-bearing paws had reduced volume and weight in SteLL-treated animals compared to the negative control. In conclusion, SE and SteLL were antitumor agents against sarcoma 180 without promoting relevant hematological changes and genotoxic effects; however, signs of hepatic and renal

toxicity were observed, suggesting the evaluation of management strategies in the future. The lectin also showed antinociceptive activity in a model of pain caused by tumor.

Keywords: Brazilian pepper tree. Anacardiaceae. Cancer. Pain. Genotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fundamentação Teórica

Figura 1 -	Interação do receptor CD44 com o ácido hialurônico (ou hialuronano) e mecanismos ativados em consequência	18
Figura 2 -	Interações do heparan sulfato com seus receptores	19
Figura 3-	Imunoedição de tumor	22
Figura 4-	Nervos autonômicos como componentes ativos do microambiente tumoral	24
Figura 5 -	Aspectos de <i>Schinus terebinthifolia</i>	29

Artigo 2

Figure 1-	Evaluation of antinociceptive effect of <i>S. terebinthifolia</i> leaf lectin (SteLL) on sarcoma 180-bearing mice through the spontaneous nociception (A, B) and mechanical hyperalgesia tests (C)	76
Figure 2-	Evaluation of antinociceptive effect of <i>S. terebinthifolia</i> leaf lectin (SteLL) on sarcoma 180-bearing mice in the hot plate test. The latency time in the hot plate was evaluated 30 min (A) and 90 min (B) after the administration of the last dose of each treatment in the 14 th day	77
Figure 3-	Evaluation of the volume (A) and weight (B) of the hind right paw of healthy mice (Sham group) and sarcoma 180-bearing mice treated or not with <i>S. terebinthifolia</i> leaf lectin, SteLL (1 and 2 mg/kg) for 14 days.	77

LISTA DE TABELAS

Fundamentação Teórica

Tabela 1-	Lectinas com atividade antitumoral.....	34
------------------	---	----

Artigo 1

Tabela 1-	Espécies da família Anacardiaceae estudadas quanto ao seu potencial antinociceptivo.....	62
------------------	--	----

Artigo 2

Table 1-	Hematological parameters of healthy animals (Sham group) and sarcoma 180-bearing mice treated intraperitoneally during 14 days with 0.15 M NaCl (negative control), morphine 10 mg/kg and <i>S. terebinthifolia</i> leaf lectin (SteLL) at 1 and 2 mg/kg.....	78
-----------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAL	Lectina isolada do cogumelo comestível <i>Agrocybe aegerita</i>
Adrβ2	Receptores β 2-adrenérgicos
ArtinM	Lectina de sementes de <i>Artocarpus heterophyllus</i>
B16-BL6	Linhagem celular derivada de melanoma murino
BNDM	Macrófagos derivados da medula óssea
Cbol	Lectina de <i>Canavalia boliviana</i>
CCNS	Fármacos ciclo-celular não específicos
CCS	Fármacos ciclo-celular específicos
CD44	Receptores de superfície celular
CEA	Carcinoma de Ehrlich ascético
CGL	Lectina do molusco marinho <i>Crenomytilus grayanus</i>
cMoL	Lectina coagulante de sementes de <i>Moringa oleifera</i>
ConA	Concanavalina A
ConV	Lectina de sementes de <i>Canavalia virosa</i>
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidratos
DOX	Doxorrubicina
DR2	Receptor de dopamina tipo 2
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
FAK	Quinase de adesão focal
FCE	Fator de crescimento epidérmico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FmLC3	Lectina isolada de <i>Fenneropenaeus merguensis</i>
GA	Ácido gálico
Gb3	Globotriose
HeLa	Linhagem celular de adenocarcinoma cervical humano
HS	Heparan sulfato
IL	Interleucina
IM	Mediadores inflamatórios
JAK	Janus kinase

KML-C	Lectina de <i>Korean mistletoe</i>
L5178Y-ML25	Linhagem celular derivada de linfoma murino
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano
MDA-MB-231	Linhagem celular de câncer de mama humano
PC-3	Linhagem celular de adenocarcinoma prostático humano
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PI	Iodeto de propídeo
PI3Ks	Fosfatidilinositol 3-quinases
PNA	Lectina de <i>Arachis hypogaea</i>
RTKs	Receptores tirosina quinases
ScLL	Lectina do látex de <i>Synadium carinatum</i>
SNI	Lesão poupadora de nervo
STAT	Transdutores de Sinal e Ativadores da Transcrição-1
SteLL	Lectina da folha de <i>Schinus terebinthifolia</i>
SVL	Lectina isolada dos tubérculos de <i>Sauromatum venosum</i>
TMRE	Trimetilrodamina etil éter
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TS	Timidilato sintase
VEGF	Fatores de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo Geral	16
1.1.2	Objetivos específicos	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	NEOPLASIAS	17
2.1.1	Incidência e fatores de risco	20
2.1.2	Inflamação e câncer	21
2.1.3	Dor relacionada ao câncer	23
2.1.4	Antitumorais disponíveis no mercado	25
2.1.5	Modelo experimental do sarcoma 180	27
2.2	FAMÍLIA ANACARDIACEAE E <i>Schinus terebinthifolia</i>	27
2.2.1	Constituintes químicos e atividades biológicas	28
2.3	LECTINAS	32
2.3.1	Lectinas com atividade anticâncer	33
2.3.2	Lectinas com atividade antinociceptiva	39
3	RESULTADOS	41
3.1	ARTIGO 1 - ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE PLANTAS DA FAMÍLIA ANACARDIACEAE: REVISÃO DE LITERATURA	41
3.2	ARTIGO 2- <i>Schinus terebinthifolia</i> LEAF LECTIN (SteLL) HAS ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY IN SARCOMA 180-BEARING MICE ...	64
4	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	80
	APÊNDICE A- ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY	91
	ANEXO A- CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	102

1 INTRODUÇÃO

O câncer afeta parcela expressiva da população mundial e, apesar do declínio do número de óbitos para alguns tipos da doença, a taxa de mortalidade global por câncer tem aumentado nas últimas décadas. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (2017), 8,8 milhões de pessoas em todo o mundo morrem anualmente de câncer. Dessa forma, grandes esforços são empenhados na procura por modos mais eficazes de se enfrentar a doença, bem como para aprimoramento do diagnóstico, através da patologia molecular, já que detecção precoce permite maior chance de cura e controle da doença (BRASILEIRO-FILHO, 2013; STEWART et al., 2018).

As terapias atuais de combate ao câncer visam destruir as células tumorais, no entanto, são muito agressivas, muitas vezes atingem células saudáveis (MOLINARO et al., 2015) e algumas vezes são pouco eficazes. Assim, a procura por novos fármacos com ação antitumoral e propriedades menos agressivas aos pacientes é de suma importância e se justifica também pela necessidade de drogas mais seletivas para a quimioterapia antineoplásica (DESHPANDE et al., 2013).

As lectinas constituem um grupo heterogêneo de proteínas contendo sítios de ligação a carboidratos, os quais podem ser mono, oligo ou polissacarídeos. Sua capacidade de interagir de forma específica com carboidratos, reconhecendo glicoconjugados na superfície celular, é responsável por suas importantes e diversas atividades biológicas (COELHO et al., 2017). Elas exercem efeitos citotóxicos, inibindo a proliferação e ativando vias de morte celular, sobre diferentes tipos de células cancerígenas (CUNHA et al., 2016; OSTERNE et al., 2017).

Schinus terebinthifolia Raddi, conhecida como aroeira-da-praia, aroeira-mansa, aroeira-brasileira, aroeira-vermelha, árvore-de-aroeira, fruto-de-sabiá, aguaraíba, aroeira-do-brejo, aroeira-pimenteira, corneíba, aroeira-do-Paraná e pimenta-rosa, dentre outros nomes populares, pertence à família Anacardiaceae, sendo uma espécie de origem no continente Sul-americano (OLIVEIRA et al., 2014). Atualmente, é uma das 71 plantas medicinais listadas pelo Ministério da Saúde como de interesse ao SUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - RENISUS), autorizada pelo Ministério da Saúde para ser receita e distribuída, sendo recomendado o uso contra ferimentos e úlceras. No entanto, é utilizada para diversos outros fins como, por exemplo, o emprego do decocto das folhas no tratamento de tumores (MORTON et al., 1978; MORS et al., 2000). As folhas de *S. terebinthifolia* contêm uma lectina (StELL, do inglês *S. terebinthifolia leaf lectin*) que é isolada por cromatografia em coluna de quitina e apresentou atividade antibacteriana e antifúngica (GOMES et al., 2013).

A presente tese teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral *in vivo* de extrato salino de folhas de *S. terebinthifolia* e da lectina SteLL isolada em modelo de sarcoma 180 em camundongos. Adicionalmente, possível atividade antinociceptiva da lectina nos animais portadores do tumor foi investigada.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar as atividades antitumoral e antinociceptiva de extrato salino e da lectina de folhas de *S. terebinthifolia* (SteLL) isolada em camundongos portadores de sarcoma 180.

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Purificar SteLL a partir do extrato salino de folhas de *S. terebinthifolia* seguindo protocolo previamente estabelecido.
- ✓ Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* do extrato e da lectina para células do sarcoma 180;
- ✓ Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do extrato e da lectina em camundongos portadores do sarcoma 180;
- ✓ Avaliar a toxicidade dos tratamentos com extrato e SteLL para os camundongos portadores do tumor, através da determinação de variação de peso corporal, consumo de água e ração, parâmetros bioquímicos e hematológicos e análise histopatológica de órgãos.
- ✓ Investigar a genotoxicidade *in vivo* dos tratamentos com extrato e SteLL em células da medula óssea dos camundongos portadores do sarcoma 180.
- ✓ Fazer um levantamento de estudos realizados que avaliaram, em modelos experimentais, plantas da família Anacardiaceae como fontes de agentes antinociceptivos.
- ✓ Avaliar a atividade antinociceptiva de SteLL em camundongos portadores de tumor, utilizando diferentes modelos de nocicepção.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 NEOPLASIAS

Denomina-se “neoplasia” ou “tumor” qualquer proliferação anormal de células, que pode ser benigna ou maligna. Enquanto o tumor benigno permanece confinado à sua localização original, o tumor maligno é capaz de invadir o tecido normal circundante e se espalhar por todo o corpo através dos sistemas circulatório ou linfático, caracterizando o fenômeno conhecido como metástase. Quando há uma perda gradual de um fenótipo diferenciado e a aquisição de características progenitoras semelhantes a células-tronco, o câncer progride (MALTA et al., 2018). Algumas características são importantes nas células neoplásicas malignas: (1) elas são autossuficientes nos sinais de crescimento, (2) são insensíveis a sinais de anticrescimento, (3) estimulam a angiogênese local, (4) são capazes de escapar da apoptose apresentando imortalidade replicativa, (5) ativam mecanismos de invasão e metástases, (6) apresentam instabilidade no genoma e (7) induzem a inflamação (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011; MURRAY et al., 2014).

Os tumores são classificados de acordo com a localização (órgão ou sistema) e características histológicas, com o auxílio de técnicas como a imunohistoquímica, hibridação *in situ* e o mapeamento molecular detalhado do tecido tumoral (BOSMAN, 2019). Essas tecnologias têm fornecido dados relevantes relacionados às variações somáticas de DNA, RNA, proteína ou características epigenômicas de diferentes tipos de câncer (SONG et al., 2015). Na nomenclatura dos tumores, além do tipo histológico, pode ser acrescentada a topografia como, por exemplo, adenocarcinoma de pulmão, adenocarcinoma de pâncreas, osteossarcoma de fêmur, ou utiliza-se o nome dos cientistas que os descreveram pela primeira vez, como linfoma de Burkitt e sarcoma de Kaposi (INCA, 2011).

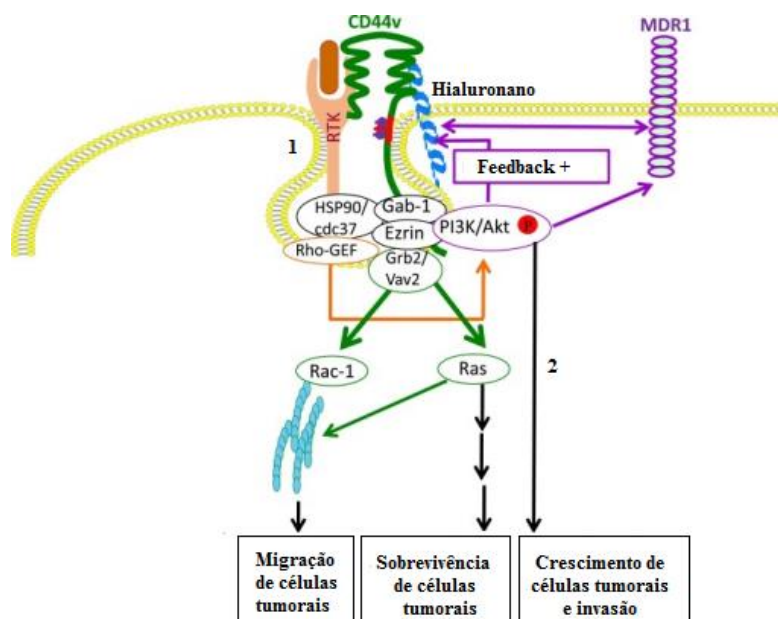
Outra classificação para os tumores malignos diz respeito a seu estágio, ou seja, avalia o seu grau de disseminação. Um dos sistemas de estadiamento mais utilizados é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. Ele baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M) (INCA, 2017).

As células neoplásicas desenvolvem mecanismos de evasão da apoptose, decorrentes de mutações que provocam perda da função de proteínas pró-apoptóticas ou aumento da

expressão de genes anti-apoptóticos. Essa evasão favorece o crescimento contínuo do tumor (MURRAY et al., 2014). Desta forma, esforços estão sendo realizados na busca de fármacos ou outros compostos que estimulem a apoptose nas células neoplásicas, levando-as à morte.

A alteração na glicosilação é outra característica universal das células tumorais, sendo certos glicanos marcadores bem conhecidos de progressão tumoral. Algumas das primeiras evidências de alteração na glicosilação como característica do câncer foram obtidas utilizando como ferramentas algumas lectinas (proteínas que reconhecem carboidratos) que apresentavam capacidade de aglutinar diferencialmente essas células (VARKI et al., 2017). Muitos tumores malignos expressam, por exemplo, altos níveis de ácido hialurônico (glicosaminoglicano de carga negativa) e, ainda, a interação dele com receptores de superfície celular CD44 é ativada, possivelmente devido a clivagem por hialuronidases. Como consequência tem-se a proliferação, transição epitélio-mesenquimal (EMT) e invasão. Essa interação na superfície da célula tumoral é necessária também para a ativação de alguns oncogenes, como receptores tirosina quinases (RTKs), exemplo ErbB2, que levam ao aumento dos níveis de fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K) que, por sua vez estimulam síntese de novas moléculas de ácido hialurônico, estabelecendo assim um ciclo de *feedback* positivo (Figura 1). Essa interação ainda estimula a resistência a fármacos, sendo um alvo terapêutico importante (VARKI et al., 2017).

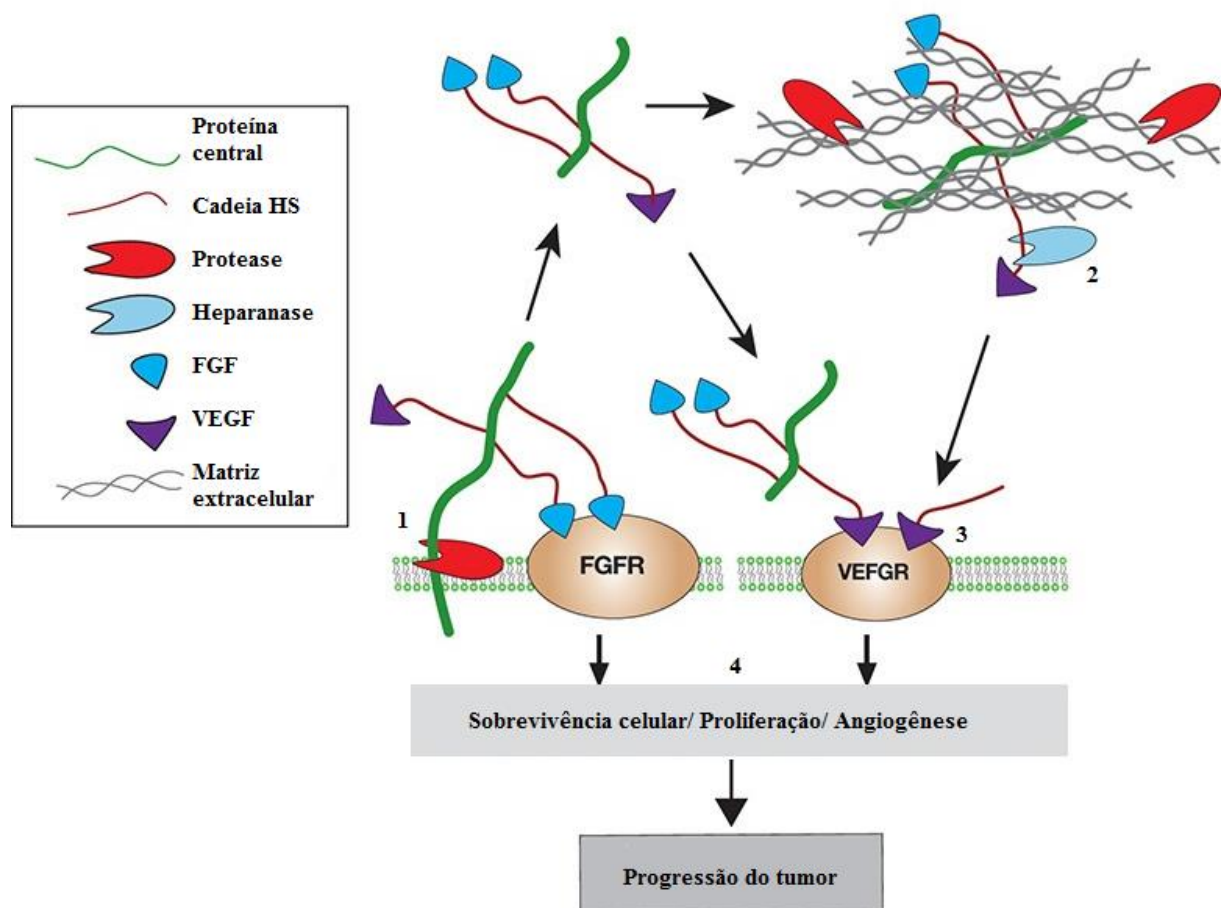
Figura 1- Interação do receptor CD44 com o ácido hialurônico (ou hialuronano) e mecanismos ativados em consequência.



1- Interação hialuronano e CD44v ativa as proteínas anti-apoptóticas de sobrevivência celular, através da associação com Receptores Tirosina Quinase (RTK). 2- Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) ativa Proteína quinase B (Akt) e eventos antiapoptóticos subsequentes. Fonte: Miisra et al. (2015), adaptado pela autora.

Proteoglicanos contendo heparan sulfato também desempenham papéis na progressão do tumor, permitindo que células tumorais possam proliferar, escapar da resposta imune, invadir os tecidos vizinhos, metastatizar e promover a angiogênese. Estão presentes na superfície da célula, ou sequestrados na matriz extracelular e membrana basal, podendo ainda ser liberados por proteases ou heparanases (Figura 2). Cânceres como de mama, pulmão, cérebro, pâncreas, pele e colorretal apresentam uma modulação aberrante de várias enzimas biossintéticas e catabólicas do sulfato de heparan, tais como a heparanase. A modulação dessas vias biossintéticas e catabólicas é um alvo na busca de novos fármacos que possam retardar a progressão tumoral (KNELSON et al., 2014; RAMAN; KUBERAN, 2010).

Figura 2 – Interações do heparan sulfato com seus receptores.



Heparan sulfato (HS) na superfície da célula ou sequestrados na matriz extracelular e membrana basal são clivados por proteases (1) ou heparanases no microambiente (2). As cadeias de HS interagem com fatores de crescimento, que interagem com seus receptores nas células (3), com consequente aumento da angiogênese ou aumento da proliferação e invasão por células tumorais (4). Fonte: Varki et al. (2017), adaptado pela autora.

Para que o tumor cresça, é fundamental que haja uma boa oferta vascular, o que é conseguido através da expressão de fatores de crescimento pró-angiogênicos, incluindo os fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF). A expressão da família de ligantes VEGF está aumentada em um grande número de cânceres, o que levantou-se a hipótese de inibir a

angiogênese através da inibição da via VEGF. Drogas como bevacizumabe, sunitinibe e aflibercepte exibem atividade anti-angiogênica por atuarem sobre diferentes seguimentos dessa via (VASUDEV; REYNOLDS, 2014). Outros biomarcadores de angiogênese, como fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (FCE), nucleolina, quinase de adesão focal (FAK) e endoglina, desempenham papéis críticos na angiogênese do câncer e podem ser usados como alvos na terapia anti-angiogênese (MASHREGHI et al. 2018).

2.1.1 Incidência e fatores de risco

O número de casos de câncer cresce de forma global, afetando principalmente os países de baixa e média renda, que muitas vezes não dispõem de um sistema de saúde capaz de oferecer um diagnóstico precoce e um tratamento de qualidade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). Nos Estados Unidos, apesar do câncer ser a segunda principal causa de morte, tem se observado nas últimas duas décadas uma contínua diminuição na taxa de mortalidade. Entre 1991 e 2011, o risco de morrer acometido por esta doença diminuiu em 22% nesse país (SIEGEL et al., 2015).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2017), no biênio 2018-2019 ocorrerão 600 mil novos casos de câncer no Brasil, para cada ano, sendo os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto os mais incidentes, com altas taxas também para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago.

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento do câncer são bem conhecidos e podem até ser evitados. São eles: tabagismo (CHARAFEDDINE et al., 2017), alimentação inadequada (JOHNSON et al., 2013; SONG; CHAN, 2019.), inatividade física (BRENNER et al., 2017), consumo de bebidas alcoólicas (RATNA; MANDREKAR, 2017), obesidade (DOBBINS et al., 2013; MACKINTOSH et al., 2019), diabetes (TSENG, 2015), hipertensão (HAN et al., 2017), agentes infecciosos (MARTEL et al., 2017) exposições ocupacionais (ZENG et al., 2017), poluição ambiental (GRAY et al., 2017) e uso de contraceptivos orais (REID et al., 2017).

Apesar do grande conhecimento em relação à biologia do câncer, grandes esforços são necessários na busca de terapias capazes de superar a resistência, recorrência e metástase. O grande desafio consiste na diversidade genética do câncer, além das interações entre células tumorais heterogêneas, estroma e as células imunes (DERBAL, 2017).

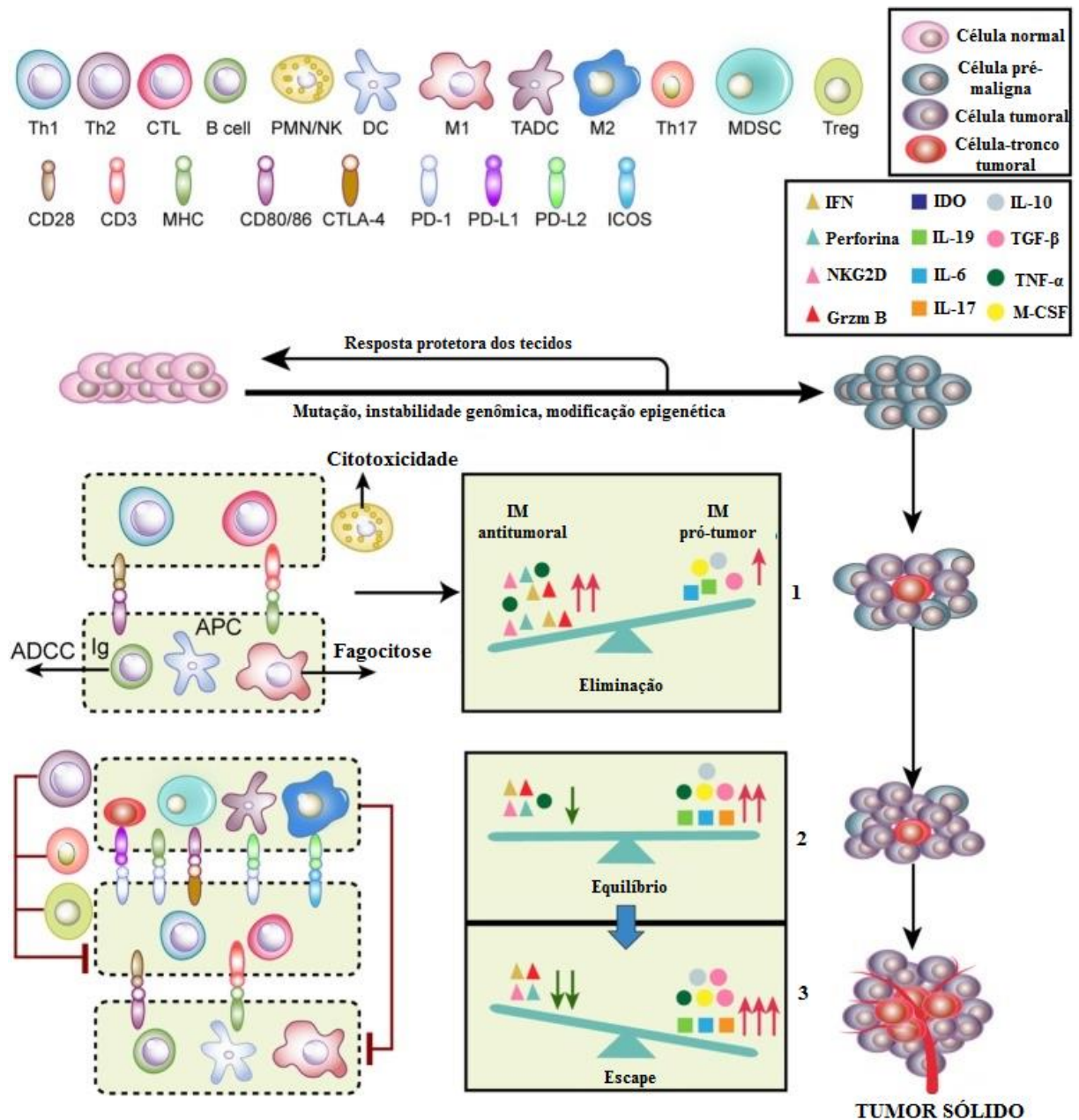
2.1.2 Inflamação e câncer

Em 1863, Rudolf Virchow observou leucócitos em tecidos neoplásicos e associou, pela primeira vez, a inflamação e o câncer. Ele sugeriu que o "infiltrado linforetico" refletia a origem do câncer em locais de inflamação crônica (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). A inflamação atua em todos os estágios da tumorigênese, contribuindo para a iniciação do tumor através de mutações, instabilidade genômica e modificações epigenéticas. Ativa respostas de reparo tecidual, induzindo a proliferação de células pré-malignas e aumentando sua sobrevivência, estimula a angiogênese, provoca imunossupressão localizada e promove a formação de um microambiente hospitaleiro em que as células pré-malignas podem sobreviver, expandir e acumular mutações adicionais e mudanças epigenéticas. Pode ainda promover a disseminação metastática (GRIVENNIKOV et al., 2010).

No processo de transformação das células normais em malignas, as imunidades inata e adaptativa regulam o microambiente tumoral, como observado na Figura 3. Porém, descobriu-se que o sistema imune não atua somente na eliminação de células tumorais, mas também pode agir selecionando ou “editando” os tumores emergentes, fenômeno chamado “edição imunológica” ou “imunoedição”, sendo composta de três fases (ONUICHIC; CHAMMAS, 2010). Na fase de eliminação, as células tumorais são detectadas, mas aquelas células tumorais raras que não são eliminadas podem entrar na fase de equilíbrio e, finalmente, aquelas variantes de células tumorais restantes com imunogenicidade fraca escapam da vigilância imunológica e formam uma neoplasia clinicamente aparente (ZHANG et al., 2017).

Microrganismos, comensais e patogênicos, são reguladores críticos do sistema imunológico do hospedeiro e, conseqüentemente de inflamação. Assim eles têm potencial para influenciar a progressão do tumor através de uma grande variedade de vias, incluindo a ativação da inflamação crônica, alterando o microambiente tumoral, além da indução de respostas genotóxicas e de metabolismo. Até 20% de todos os cânceres são precedidos por inflamação crônica relacionada a infecções, como o carcinoma hepatocelular, câncer de colon e câncer gástrico, que podem ser precedidos por hepatite, doença intestinal inflamatória e gastrite induzida por *H. pylori*, respectivamente (FRANCESONE et al., 2014).

Figura 3 - Imunoedição de tumor.



1- Células Natural Killer (NK) e macrófagos produzem interferon- γ (IFN) e interleucina-12 (IL-12) que eliminam células tumorais iniciando respostas citotóxicas: perforina, Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). 2- Variantes sobrevivem, mas perdem Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Citocinas antitumorais tornam-se pró-tumorígenicas. 3- Células imunes pró-tumorais induzem a imunossupressão por secreção de citocinas. Fonte: Zhang et al. (2017), adaptado pela autora.

Porém, a inflamação nem sempre é "ruim" no contexto de doenças malignas e citocinas relacionadas ao câncer também podem contribuir para a resposta terapêutica. Algumas abordagens para o tratamento do câncer tentam mudar a natureza do microambiente imunossupressor que promove tumores para um que mate células tumorais, seja anti-angiogênico e promova respostas imunes adaptativas. Citocinas inflamatórias bastantes relacionadas com a atividade promotora de tumores, tais como fator de necrose tumoral

(TNF)- α , interleucina (IL)-6 e IL-1 β , podem ser considerados alvos terapêuticos (BALKWILL; MANTOVANI, 2010).

2.1.3 Dor relacionada ao câncer

O microambiente tumoral é composto de fibroblastos, vasos sanguíneos, fibras nervosas, macrófagos e outras células imunes que interagem ativamente com células tumorais para regular a progressão do câncer (Figura 4). Em situações de estresse, as fibras nervosas, presentes dentro e ao redor do tumor, liberam catecolaminas no estroma tumoral. Tanto as células tumorais como as células estromais expressam receptores β 2-adrenérgicos (Ad β 2), respondendo à norepinefrina que promove crescimento tumoral. Pericitos, dentro do microambiente do tumor, expressam o receptor de dopamina tipo 2 (DR2) e respondem à dopamina que regula a angiogênese. Além disso, células tumorais invadem os nervos autonômicos (invasão perineural) em vários tipos de câncer, o que pode causar dor e facilitar a disseminação sistêmica (HANOUN et al., 2015).

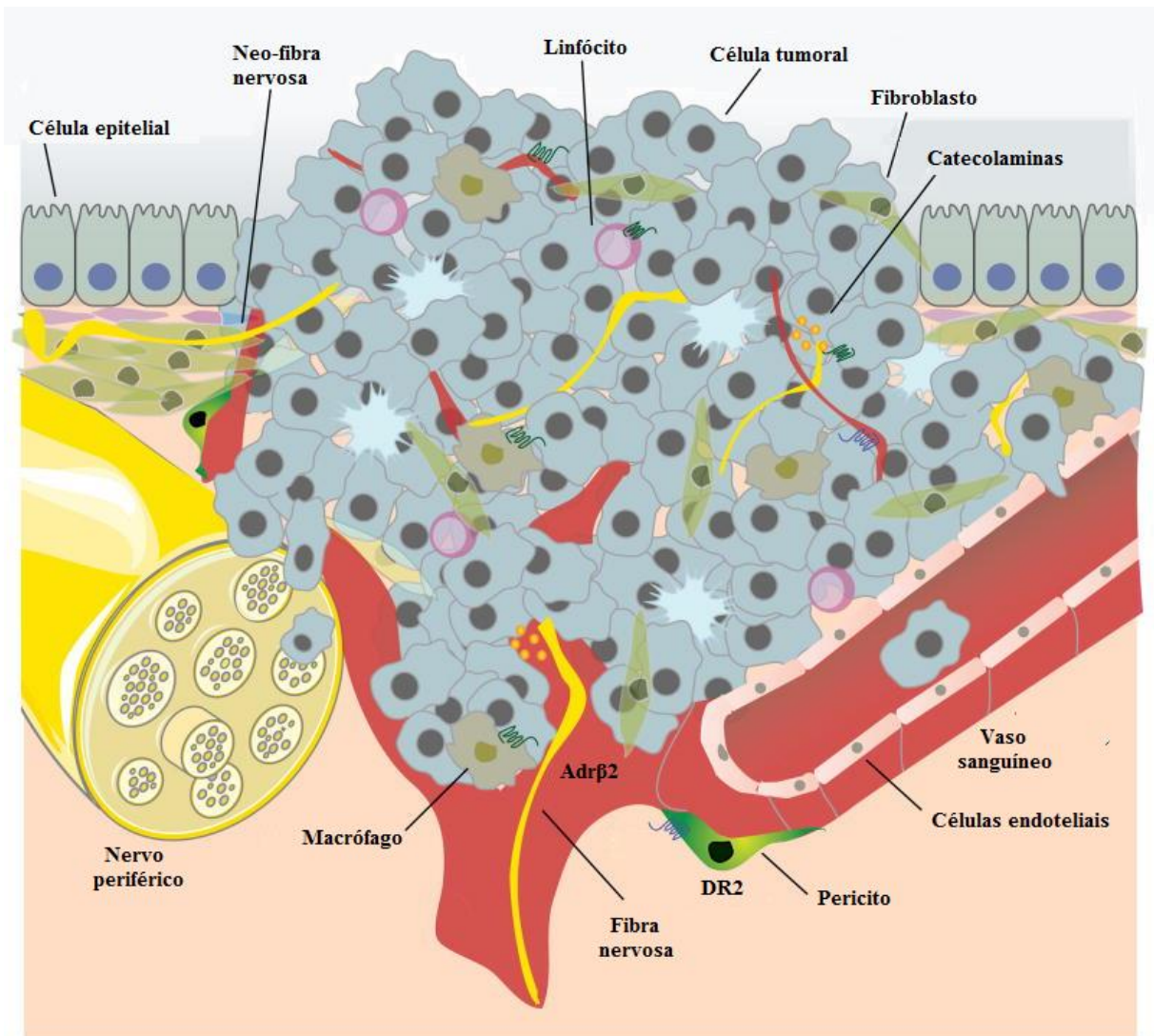
Uma revisão sistemática da literatura publicada entre setembro de 2005 e janeiro de 2014 revelou que as taxas de prevalência de dor relacionada ao câncer eram 39,3% após o tratamento, 55,0% durante o tratamento e 66,4% em doença avançada, metastática ou terminal. Um percentual de 38,0% de dor moderada a grave foi relatada entre os pacientes (VAN DEN BEUKEN-VAN EVERDINGEN, 2016).

Segundo Schmidt (2015) a dor do câncer é devida a geração e secreção de mediadores que subsequentemente sensibilizam e ativam nociceptores aferentes no microambiente tumoral. Apesar de já ter sido proposto que a dor era resultado da destruição tecidual e compressão do nervo, esta hipótese não é consistente com achados clínicos ou com dados pré-clínicos. Além disso, a dor de câncer também foi descrita como dor inflamatória, porém, os antiinflamatórios não esteróides são clinicamente ineficazes nos estágios mais avançados da doença. Ademais, estudos pré-clínicos evidenciam que a dor de câncer é distinguível da dor inflamatória e geralmente é uma forma única de dor patológica.

O câncer de pulmão, um dos quatro tipos de câncer mais prevalentes em todo o mundo, apresenta como um dos sintomas a dor. A dor surge da invasão local de estruturas do tórax ou doença metastática que invade os ossos, nervos ou outras estruturas anatômicas potencialmente dolorosas. Pode também ser consequência de abordagens terapêuticas como cirurgia, quimioterapia ou radioterapia. Intervenção médica convencional para essa dor inclui

prescrição de opióides e coadjuvantes em doses suficientes para controlá-la sem causar efeitos colaterais (HOCHBERG et al., 2017).

Figura 4- Nervos autonômicos como componentes ativos do microambiente tumoral.



Fibras nervosas liberam catecolaminas no estroma do tumor. Células tumorais e estromais expressam receptores β_2 -adrenérgicos ($Adrb_2$), respondendo à norepinefrina e promovendo crescimento tumoral. Pericitos, expressam receptor de dopamina tipo 2 (DR2) e respondem à dopamina, regulando angiogênese. Células tumorais invadem os nervos autonômicos (invasão perineural) em vários tipos de câncer, causando dor. Fonte: Hanoun et al. (2015), adaptado pela autora.

Os opióides são os principais analgésicos capazes de controlar a dor de câncer moderada e grave. A resposta farmacodinâmica a um determinado opioide depende da natureza do receptor ao qual o opioide se liga e sua afinidade pelo receptor. A morfina, por exemplo, ativa os receptores μ -opioides, porém, causa não só analgesia e sedação, mas também euforia, depressão respiratória, constipação e prurido. A existência de vários subtipos

de receptores opioides, cada um com seu próprio repertório de respostas, leva à busca por um que produza seletivamente analgesia e sedação adequadas, sem ao mesmo tempo, causar efeitos adversos indesejados, ou por métodos neuroestimuladores ou neuroinibitivos adequados envolvendo o sistema nervoso central que podem amplificar a ação analgésica dos opioides (PLANTE; VANITALLIE, 2010).

2.1.4 Antitumorais disponíveis no mercado

Nos últimos 20 anos, pacientes diagnosticados com cânceres sólidos e hematológicos têm contado com um número crescente de opções terapêuticas. Muitos deles estão experimentando uma melhor sobrevivência global e remissão de longo prazo com a introdução de classes de agentes oncológicos, tais como novos agentes citotóxicos, terapias direcionadas e agentes imuno-oncológicos. Porém, estes novos agentes e suas combinações vieram com toxicidades adicionais e, tendo em vista que o fígado é responsável pelo metabolismo da maioria deles, pode ocorrer hepatotoxicidade durante os tratamentos (DHANASEKARAN; KWO, 2017).

Os quimioterápicos utilizados no tratamento de câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, sendo denominados fármacos ciclo-celular específicos (CCS). Outros, porém, denominados fármacos ciclo-celular não específicos (CCNS), são capazes de agir independentemente de as células estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso. Dentre os CCS, destacam-se os agentes antimetabólicos, tais como os análogos do ácido fólico (metotrexato); os antagonistas das pirimidinas (fluoracil, floxuridina e citabina); além dos análogos das purinas (mercaptopurina, tioguanina, pentostatina, fosfato de fludarabina, cladribina). Com relação aos CCNS destacam-se aqueles que atuam como eletrófilos sobre macromoléculas nucleofílicas (DNA), como os agentes alquilantes (ALMEIDA et al., 2005).

Inicialmente desenvolvido como um análogo do ácido fólico, o metotrexato (MTX) foi um dos primeiros agentes quimioterápicos utilizados clinicamente. Atua inibindo a di-hidrofolato redutase e, com isso, reduz os níveis intracelulares de intermediários da via do folato necessários para a síntese de nucleotídeos. Com isso, a replicação e reparo do DNA ficam prejudicados, retardando a proliferação celular e levando à morte celular. É usado para o tratamento de leucemias agudas, linfomas e também no tratamento de doenças inflamatórias (em uma dose 100 vezes menor), incluindo artrite reumatoide, Doença de Crohn e psoríase.

Nessas baixas doses, o metotrexato atua como anti-inflamatório e imunossupressor, possivelmente através da inibição da via Janus Kinase/Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição (JAK/STAT), o que pode também ser benéfico para o tratamento de pacientes com neoplasias hematológicas associadas a essa via (THOMAS et al., 2015). Um dos principais efeitos colaterais do MTX, e que restringe seu uso clínico, é a hepatotoxicidade (MEHRZADI et al., 2018).

O 5-fluoracil (5-FU) é um análogo de pirimidina que inibe a enzima timidilato sintase (TS), sendo usado no tratamento de câncer de mama, colorretal e do trato aerodigestivo. A TS catalisa a conversão de desoxiuridina monofosfato (dUMP) em desoxitimidina monofosfato (dTMP), tendo o 5,10-metilenotetrahidrofolato (CH_2THF) como o doador de metil. O fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), metabólito ativo de 5-FU, liga-se ao sítio de ligação de nucleotídeos da TS e forma um complexo estável com a enzima, bloqueando o acesso de dUMP e inibindo a síntese de dTMP, com consequente dano ao DNA. Esse dano ao DNA é dependente dos níveis de desoxiuridina pirofosfatase e uracila-DNA-glicosilase. Além disso, dTMP pode ser recuperado da timidina através da ação de timidina quinase (LONGLEY et al., 2003). Apresenta como efeitos colaterais a cardiotoxicidade (POLK et al., 2014), além de induzir mucosite intestinal, caracterizada por ulcerações epiteliais na mucosa e manifestada clinicamente com dor e sintomas dispépticos (SOARES et al., 2013).

A doxorubicina (DOX) pertence à família das antraciclinas, exercendo sua ação antitumoral intercalando-se no DNA e rompendo o mecanismo de reparo mediado pela topoisomerase II, bem como através da liberação de radicais livres. Isso acontece quando a DOX é oxidada a semiquinona, um metabólito instável que, quando retorna para DOX, libera espécies reativas de oxigênio levando à peroxidação lipídica, danos à membrana, danos ao DNA, estresse oxidativo e morte celular por apoptose. Um dos grandes efeitos colaterais relacionados ao uso da DOX é sua cardiotoxicidade (FARAJI et al., 2016).

Fármacos como o bevacizumabe ligam-se ao fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) inibindo a ligação do VEGF aos seus receptores na superfície das células endoteliais e consequentemente a angiogênese (GOMES et al., 2012). Foi aprovado pela FDA em 2004 para o tratamento sistêmico do câncer colorretal (ABRAHAO et al., 2017). Uso de agentes anti-VEGF, tais como o bevacizumabe, pode resultar em complicações renais e vasculares como hipertensão, eventos trombóticos arteriais (ATE), proteinúria e perfurações gastrointestinais (ARORA et al., 2017).

2.1.5 Modelo experimental do sarcoma 180

O sarcoma 180, ou tumor de Crocker, cresce rapidamente na maioria dos animais nos quais é inoculado (>90%), podendo regredir espontaneamente em 8-10%, ou ainda mais quando tratado com produtos químicos ou biológicos (SATO et al., 2005). Porém, o índice de regressão sofre influência do genótipo do hospedeiro. Camundongos portadores do alelo H-2D, por exemplo, tanto homozigotos quanto heterozigotos, ao contrário dos camundongos Swiss, não apresentam nenhuma regressão espontânea do sarcoma 180 na forma sólida e nem melhores taxas de regressão do tumor induzida por substâncias químicas (polissacarídeos de basidiomicetos, ácido polinosínico-policitidílico e zimosana) (TARNOWSKI et al., 1973).

Trata-se de um tumor indiferenciado que foi encontrado em ratos albinos machos em 1914. Sendo uma linhagem celular transplantada por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal, e por ser de fácil obtenção, vários centros de pesquisa têm utilizado esse modelo tumoral para compreensão da biologia tumoral e estudo dos efeitos de diversos agentes sobre a patogénia do câncer (CUNHA, 2014).

Mais de 13.000 compostos e quase um número igual de materiais de origem natural já tinham sido testados em 1955 quanto à capacidade de inibir o sarcoma 180 e apenas treze deles apresentaram considerável inibição, quando o diâmetro correspondia a 1/4 ou menos do que nos tumores do grupo controle. No rastreio dessas substâncias com capacidade de inibir o crescimento do sarcoma 180 em camundongos, foram empregados os seguintes critérios: peso dos camundongos, sendo fêmeas Swiss, 18-22 g; transplante de tumor via subcutânea; injeções intraperitoneais de compostos em doses máximas toleradas vinte e quatro horas depois da inoculação do tumor, sendo as injeções duas vezes ao dia por sete dias ou em alguns casos doses únicas (STOCK et al., 1960).

2.2 FAMÍLIA ANACARDIACEAE E *Schinus terebinthifolia*

A família Anacardiaceae, formada principalmente por árvores e arbustos, inclui aproximadamente 860 espécies em 83 gêneros, tendo membros cultivados em todo o mundo devido às suas frutas e sementes comestíveis, propriedades medicinais, madeira valiosa e também como recurso paisagístico. Alguns frutos de espécies de Anacardiaceae, tais como manga (*Mangifera indica*), pistache (*Pistacia vera*) e caju (*Anacardium occidentale*), são apreciados em todo o mundo, enquanto outros frutos como umbu (*Spondias tuberosa*), a

marula da África (*Sclerocarya birrea*) e os frutos do *Antrocaryon* são restritos ao cultivo e consumo localizados (PELL, 2009).

Schinus terebinthifolia Raddi é uma espécie nativa do continente Sul-americano, sendo encontrada na Argentina, Paraguai, Uruguai e nos estados brasileiros de Sergipe, Paraíba, Alagoas, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Santa Catarina e São Paulo (EMBRAPA, 2016). Trata-se de uma planta medicinal conhecida no Brasil como aroeira da praia e utilizada na medicina popular como antitérmica, analgésica, depurativa e no tratamento de doenças do sistema urogenital, infecções, úlceras de pele, além de distúrbios gastrintestinais (CARVALHO et al., 2013; SILVA et al., 2018; ULIANA et al., 2016).

Em estudos etnobotânicos, como o realizado na comunidade quilombola Salamina/Putumujú em Maragogipe, Bahia, ela aparece na lista de plantas citadas, onde foi relatada que as partes utilizadas para fins medicinais são entrecasca e folhas, sendo preparadas na forma de chá ou pó e usados em banhos de asseio, feridas e problemas intestinais (LISBOA et al., 2017). Pesquisas sobre a importância medicinal desta planta também relataram o uso de decocto das folhas e suco de raízes maceradas para tratamento de tumores (MORS et al., 2000; MORTON et al., 1978).

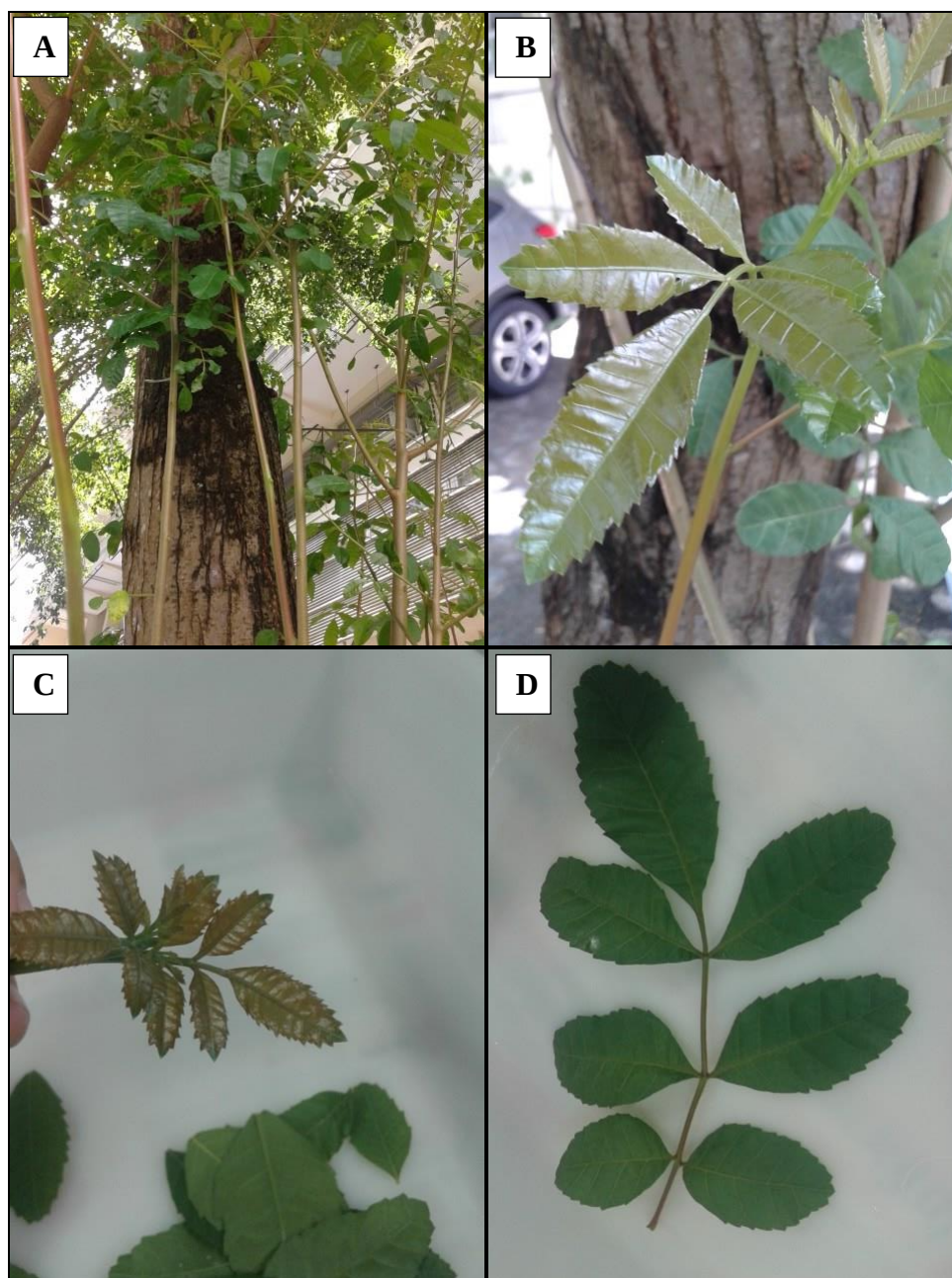
A árvore possui até 12 m de altura, com tronco de até 60 cm de diâmetro, casca externa de coloração acinzentada (com fissuras longitudinais estreitas) e casca interna de coloração rosada e textura fibrosa. Suas folhas apresentam estrutura imparipinada, com número ímpar de folíolos e apenas um folíolo na extremidade. São folhas compostas, alternas, com raque e pecíolo alado, possuindo de 7 a 11 folíolos. A ráquis, com ala estreita entre os pares de folíolos, é a principal característica para sua identificação. Os folíolos são sésseis, oblongo-elípticos a obovalados, com ápice agudo, base assimétrica, consistência membranácea, nervura central proeminente na face abaxial, margem inteira a serreada, medindo de 1 a 3 cm de largura por 2,5 a 6 cm de comprimento, sendo os brotos jovens avermelhados (FONSECA et al., 2017). Algumas dessas características podem ser observadas na Figura 5.

2.2.1 Constituintes químicos e atividades biológicas

As propriedades de *S. terebinthifolia* foram descritas já na primeira edição da Farmacopeia brasileira, publicada em 1926 (CARVALHO et al., 2013). Além do seu uso na

medicina popular, devido às diversas atividades biológicas apresentadas, já existem no mercado alguns medicamentos fabricados à base de *S. terebinthifolia*, como por exemplo, gel vaginal fabricado a partir da casca, sendo indicado no tratamento das cervicites, vaginites e cérvico-vaginites. Existem também os comprimidos, indicados para gastrite (SANTOS et al., 2010).

Figura 5 – Aspectos de *Schinus terebinthifolia*.



(A) Árvore localizada em frente ao Departamento de Patologia, na Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE. (B) Folhas e caule da planta, mostrando as fissuras longitudinais. (C) Folhas jovens, de coloração avermelhada. (D) Folha imparipinada. Fotos: A autora.

Um estudo clínico realizado por Santos et al. (2010) comparou a eficácia e segurança de comprimidos de *S. terebinthifolia* (dose de 233,6 mg, 2 vezes/dia) com os comprimidos de omeprazol (20 mg, 2 vezes/dia), administrados durante quatro semanas em pacientes com sintomas dispépticos associados à gastrite. A verificação da eficácia foi feita através do desaparecimento ou melhora dos sintomas, tais como dor epigástrica, azia, náusea e saciedade precoce e pela melhora dos achados endoscópicos e histopatológicos. Chegou-se à conclusão que a terapia oral com aroeira apresentou ligeira vantagem sobre o tratamento com omeprazol, na melhora dos sintomas relacionados à gastrite, além da vantagem de ser um fitomedicamento, que pode ser usado por um período mais prolongado, sem apresentar complicações conhecidas.

Para testar a eficácia e a tolerância do gel vaginal de *S. terebinthifolia* no tratamento da vaginose bacteriana, Amorim e Santos (2003) realizaram um ensaio clínico randomizado e duplo-cego, com um grupo que fez uso do gel vaginal de aroeira e outro que usou placebo. Foi encontrada uma taxa de cura para vaginose bacteriana de 84% no grupo que usou o gel de aroeira e 47,8% no grupo placebo, além de uma frequência significativamente maior de lactobacilos na colpocitologia entre as pacientes tratadas com aroeira (43,5%) em relação ao placebo (4,3%), indicando a segurança e eficácia do gel no tratamento da vaginose bacteriana, além dos efeitos benéficos na microbiota vaginal.

Outro estudo clínico, piloto, duplo cego e randomizado, realizado por Silva et al. (2016), avaliou o uso de uma pomada de aroeira em orabase a 30%, preparada a partir do extrato hidroetanólico das folhas, no tratamento da mucosite oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, submetidos à radioterapia e/ou radioterapia associada à quimioterapia. As pomadas dos dois grupos foram produzidas com aparência e forma semelhantes, sendo o placebo sem o princípio ativo. Doze pacientes foram divididos em dois grupos e foram orientados a aplicar a pomada três vezes por dia. Percebeu-se que o uso da aroeira, apesar de não demonstrar eficácia no tratamento da mucosite, apresentou uma porcentagem significativa (50%) de redução da dor.

Rosas et al. (2015) investigaram o efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico da folha de *S. terebinthifolia* em camundongos Swiss machos, avaliando a influência do mesmo na migração neutrofílica, em modelo de artrite induzida por zimosana. Foi constatada uma inibição do influxo de neutrófilos, além da redução de mediadores inflamatórios. A grande vantagem observada foi que a administração oral do extrato não induziu dano gástrico e letalidade, em contraste com os ratos que receberam diclofenaco de potássio. Tendo em

vista que a análise fitoquímica revelou o ácido gálico como um dos principais componentes fenólicos do extrato, foi avaliado o efeito desse composto na quimiotaxia de neutrófilos humanos. O ácido gálico não foi citotóxico nas concentrações testadas, ao tempo que foi capaz de reduzir significativamente a quimiotaxia, levando a acreditar que ele seja um dos componentes bioativos do extrato.

Cole et al. (2014) analisaram a composição do óleo essencial dos frutos maduros de *S. terebinthifolia*, encontrando uma grande porcentagem de monoterpenos, seguidos de sesquiterpenos. Esse óleo essencial foi ativo contra cepas bacterianas de origem hospitalar (*Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella oxytoca*, *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* sp., *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus* sp., *Nocardia* sp. e *Streptococcus* grupo D), sendo as gram-positivas mais susceptíveis.

Uma mesma planta pode apresentar diferentes quantidades de metabólitos secundários, dependendo da sazonalidade, período circadiano, idade, desenvolvimento, nutrientes e água no solo. Com o objetivo de avaliar a variedade de compostos voláteis das folhas de *S. terebinthifolia*, Carneiro et al. (2017) coletaram amostras em diferentes cidades (Salvador -BA, Maceió -AL, Teresina-PI, João Pessoa-PB, São Luís-MA, Recife-PE, Fortaleza-CE, Natal-RN e Aracaju-SE) e analisaram por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Com os *fingerprints* cromatográficos, foram identificados os principais componentes nas diferentes amostras e as variações na composição química. Com base nos resultados, as amostras foram distribuídas em três grupos: Grupo A, amostras dos estados de RN, PB, SE, PE e AL, que apresentaram careno como composto principal; Grupo B, amostras do estado de CE, apresentando felandreno, e Grupo C contendo amostras dos estados de PI, MA e BA apresentando limoneno.

Piccinelli et al. (2015) verificaram as ações anti-hiperalgésicas e antidepressivas do óleo essencial e dos monoterpenos, (R)-(+)-limoneno e α -felandreno isolados de frutos de *S. terebinthifolia*, administrados via oral, na dor neuropática induzida em ratos. Tanto o óleo quanto os compostos puros reduziram a hipernocicepção mecânica e comportamento depressivo (imobilidade). Destaca-se o fato de 15 dias de tratamento com o óleo essencial (100 mg/kg) e com os compostos isolados (10 mg/kg) não ter alterado a atividade locomotora dos ratos, quando comparada com animais tratados apenas com veículo.

Santos Júnior et al. (2010) avaliaram o potencial antitumoral do extrato metanólico das folhas de *S. terebinthifolia*, na concentração de 125 μ g/mL, em linhagens celulares de tumor de pele murino (B16), leucemia humana (HL-60), adenocarcinoma mamário humano

(MCF-7) e tumor de cólon humano (HCT-8). Para essas linhagens, foi constada uma inibição de 71,7%, 99,9%, 97,7% e 100%, respectivamente.

Os efeitos antiproliferativos de polifenóis purificados das folhas dessa planta também foram investigados, frente a linhagem celular de carcinoma prostático humano (DU145). A fração F3 purificada a partir do extrato causou uma inibição na 30 vezes maior em comparação com o extrato bruto. Análise realizada através de citometria de fluxo mostrou que essa fração contendo polifenóis induziu parada de ciclo celular G0/G1 e apoptose via estimulação de caspase 3 (QUEIRES et al., 2006).

Avaliação fitoquímica revelou que extrato salino das folhas de *S. terebinthifolia* possui proantocianidinas poliméricas, flavonoides heterosídeos e agliconas, taninos hidrolisáveis e principalmente derivados de ácido cinâmico. Esse extrato foi capaz de causar danos ao intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*, mosquito transmissor da dengue, chikungunya e vírus Zika. Células do intestino médio (digestivas, regenerativas e enteroendócrinas) tiveram seu número significativamente reduzido em larvas incubadas com o extrato salino. Os metabólitos secundários do extrato foram semi-purificados em três frações, F1 (ácido cinâmico e derivados), F2 (flavonoides) e F3 (taninos hidrolisáveis), por extração em fase sólida e ficou constatado que F1 e F2 continham compostos responsáveis pelo efeito larvicida do extrato (PROCÓPIO et al., 2015).

S. terebinthifolia e outras plantas da família Anacardiaceae têm sido descritas como fontes de agentes com atividade antinociceptiva. Esse é o tema de uma revisão sistemática apresentada na seção 4.2 da presente tese.

2.3 LECTINAS

As lectinas constituem um grupo de proteínas que tem sido muito investigado por apresentar diferentes atividades biológicas, podendo ser isoladas a partir de plantas (THAKUR et al., 2017), animais (CASTANHEIRA et al., 2017) e microrganismos (SINGH et al., 2017) (WANG et al., 2000). Começaram a ser estudadas no final do século XIX, quando notou-se a presença de proteínas que aglutinavam eritrócitos, sendo referidas como hemaglutininas ou fitoaglutininas. A primeira lectina foi descrita por Stillmark em 1888, isolada a partir sementes da árvore de rícino (*Ricinus communis*) e sendo chamada de ricina (SHARON; LIS, 2004).

As lectinas possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de se ligar de forma reversível e específica a mono, oligo ou polissacarídeos. É devido a essa capacidade de

ligação com as porções de carboidratos na superfície das células, que essas proteínas são reconhecidas por sua atividade aglutinante (LAM; NG, 2011). Assim, um dos testes realizados para detectar a presença de lectina em uma amostra é o ensaio de hemaglutinação, no qual essas proteínas interagem, por meio de seus sítios de ligação, com os carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos, formando uma rede. Para tal, utiliza-se eritrócitos tratados enzimaticamente (tripsina, papaína) ou quimicamente (glutaraldeído ou formaldeído) e que podem ser provenientes de sangue humano (BOSE et al., 2016) ou de outras espécies, como por exemplo, de coelho (BROSSON et al., 2017).

Devido à capacidade de interagirem com carboidratos, as lectinas podem ser exploradas em diferentes áreas da biologia e medicina (SILVA et al., 2010), como por exemplo: investigação da estrutura de glicoproteínas e carboidratos em células (ITAKURA et al., 2017); empregadas na purificação e caracterização de polissacarídeos e glicoconjugados (NAPOLEÃO et al., 2013); estimulação da mitogênese de linfócitos (VALADEZ-VEJA et al., 2011); caracterização de grupos sanguíneos (MAHAJAN et al., 2017); combate a patógenos de animais e plantas (SILVA et al., 2016; PROCÓPIO et al., 2017); controle de insetos vetores de doenças e pragas agrícolas (OLIVEIRA et al., 2016; LIMA et al., 2017); como biomarcadores de células anormais e no desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos (COELHO et al., 2017; HASHIM et al., 2017; POIROUX et al., 2017).

Dentre as atividades biológicas descritas para as lectinas, destacam-se a antimicrobiana (RAMOS et al., 2014; MOURA et al., 2015, 2017; SILVA et al., 2016; PROCÓPIO et al., 2017; PALHARINI, 2017), anti-helmíntica (GAOFU et al., 2008), inseticida (COELHO et al., 2009), nematicida (MEDEIROS et al., 2017), imunomoduladora (BRITO et al., 2017; PATRIOTA et al., 2017), anti-inflamatória e analgésica (ARAÚJO et al., 2011; BEZERRA et al., 2014), antiviral (FANG et al., 2010; HOPPER et al., 2017; MU et al., 2017), vasorelaxante (BARROSO-NETO et al., 2016) e antitumoral (FIGUEIRÔA et al., 2017; GONDIM et al., 2017; PALHARINI et al., 2017).

2.3.1 Lectinas com atividade anticâncer

Estudos têm demonstrado a atividade citotóxica de lectinas sobre uma grande variedade de células malignas. Várias lectinas que possuem atividade anticâncer ligam-se a membranas celulares de células malignas ou a seus receptores, causando apoptose e inibição do crescimento tumoral (CUNHA, 2014). A Tabela 1 mostra algumas dessas lectinas que foram estudadas quanto ao seu potencial citotóxico para células cancerosas.

Tabela 1- Lectinas com atividade citotóxica sobre células tumorais

Lectina	Origem	Dose	Linhagem tumoral	Inibição	Referência
In vitro					
cMoL	Sementes de <i>Moringa oleifera</i>	9,72 µM	B16-F10	50%	Luz et al. (2017)
pCramoll e rCramoLL	Sementes de <i>Cratylia mollis</i>	100 µg/mL e 300 µg/mL	PC-3	>90%	Figueirôa et al. (2017)
PLUN	Sementes de <i>Phaseolus lunatus</i> L	25 µg/mL	A375	7%	Lacerda et al.(2017)
		50 µg/mL		41%	
		100 µg/mL		73%	
Eutirucalina	Látex de <i>Euphorbia tirucalli</i>	100 µg/mL	PC-3	27,5%	Palharini et al. (2017)
			MDA-MB-231	25,5%	
			MCF-7	32,5%	
ConV	Sementes de <i>Canavalia virosa</i>	100 µg/mL	Glioma C6	50%	Osterne et al. (2017)
CGL	Molusco marinho <i>Crenomytilus grayanus</i>	200 µg/mL	MCF-7	33%	Liao et al. (2016)
PTL	Bulbos da erva <i>Pinellia ternata</i>	40 µg/mL	Sarcoma 180	85,2%	Zuo et al. (2012)
			HeLa	74,6%	
			K562	59,4%	
Lectina de <i>G. capense</i>	Corpos frutíferos do cogumelo <i>Ganoderma capense</i>	8 µM	L1210	50%	Ngai e Ng (2004)
		16,5 µM	HepG2		
		12,5 µM	M1		
In vivo					
rCramol recombinate livre	Sementes de <i>Cratylia mollis</i>	7 mg/kg por 7 dias	Sarcoma 180	59%	Cunha et al. (2016)
rCramol recombinate encapsulada	Sementes de <i>Cratylia mollis</i>			75%	
PTL	Bulbos da erva <i>Pinellia ternata</i>	0,85 mg/kg por 10 dias	Sarcoma 180	15,6%,	Zuo et al. (2012)
		2,30 mg/kg por 10 dias		32,1%	
		3,25 mg/kg por 10 dias		36,2%	
POL	Corpos frutíferos do cogumelo <i>Pleutotus ostreatus</i>	1,5 mg/kg por 20 dias	Sarcoma 180	88,46%	Wang et al. (2000)
			Hepatoma 22	75,42%	

Fonte: A autora. A375-melanoma humano; B16-F10- melanoma murino; HeLa- adenocarcinoma cervical humano; HepG2- hepatoma humano; K562- leucemia humana; L1210- leucemia murino; M1-leucemia murino; MDA-MB-231-carcinoma mamário humano; MCF-7-adenocarcinoma mamário humano; PC-3- adenocarcinoma prostático humano.

As células tumorais exibem uma grande quantidade de O-glicanos ligados à superfície de suas membranas e determinadas glicoproteínas (antígenos T e Tn) e glicolipídeos (antígenos Lewis a, Lewis x e Forssman) servem como marcadores úteis no diagnóstico (detecção histoquímica em biópsias) e prognóstico do câncer. Lectinas de plantas podem ser usadas no reconhecimento desses antígenos. Por exemplo, a lectina jacalina, purificada de sementes de *Artocarpus integrifolia*, reconhece os antígenos T/Tn. Além de serem usadas para o diagnóstico, lectinas ligadoras de antígenos T/Tn podem induzir apoptose dependente de caspases em células tumorais, inibindo a proliferação (POIROUX et al., 2017).

A apoptose pode ser executada por uma família de cisteíno-proteases conhecidas como caspases, sendo a caspase-3 uma protease fundamental nesse processo, associada à fragmentação do DNA. A ativação da caspase-3 pode ser mediada por via intrínseca (mitocôndria), extrínseca (receptor de morte), ou mediada pelo estresse do retículo endoplasmático (RE). É possível verificar qual dessas vias foi ativada, levando à ativação da caspase-3, através da avaliação da atividade de caspases-9, -8 e -4, respectivamente (HUANG et al., 2011). Assim, a determinação da atividade dessas caspases pode ajudar a elucidar o mecanismo de ação das lectinas com atividade antitumoral.

SVL, uma lectina isolada dos tubérculos de *Sauromatum venosum* (popularmente conhecida como lírio vudu), foi capaz de inibir significativamente linhagens celulares de tumores murinos e humanos. Nesse estudo foram testadas as seguintes linhagens: WEHI-279 (linfoma de células B), J774 e P388D1 (linhagens cancerígenas de macrófagos) e A-20 (linfoma de células T), com inibição de 84,6%, 81%, 74% e 47%, respectivamente. Com relação às linhagens humanas, T47D (carcinoma mamário), SiHa (carcinoma cervical), SK-N-MC (Neuropitelioma), SK-N-SH (neuroblastoma), SW-620 (carcinoma de cólon), HT-29 (carcinoma de cólon), HEP-2 (fígado), OVCAR-5 (ovário), PC-3 (adenocarcinoma prostático), foi verificado um efeito citotóxico da lectina em concentrações de 20 a 120 µg/mL e que, com exceção das linhagens do sistema nervoso, os índices de inibição foram quase iguais ou maiores que os promovidos pela combinação adriamicina/doxorubicina (5×10^{-5} M), usada como controle (SINGH BAINS et al., 2005).

Yoon et al. (2003) testaram o efeito inibitório da lectina de visco-coreano (*Viscum album coloratum*) (KML-C) em metástases de tumores murinos, melanoma (B16-BL6), carcinoma de cólon (26-M3) e linfoma (L5178Y-ML25). A administração da lectina, dois dias antes da inoculação dos tumores B16-BL6 e 26-M3, reduziu a metástase pulmonar, mesmo usando baixas concentrações (20 µg e 50 µg por camundongos). Além disso, foi observado efeito terapêutico da KML-C na metástase de fígado e do baço produzida pelas

células L5178Y-ML25. Observou-se também que quando os camundongos foram tratados com KML-C, aumentou de forma significativa a citotoxicidade das células Natural Killer (NK) contra o tumor, 2 dias após o tratamento, e também aumentou a atividade tumoricida dos macrófagos peritoneais, indicando uma atividade imunomoduladora da lectina.

Em estudos anteriores, realizados por Yoon et al. (1999), já havia sido demonstrado que a KML-C causava morte de células Jurkat, uma linhagem celular derivada a partir da leucemia de células T humanas, sendo observadas alterações morfológicas típicas de apoptose, nas células incubadas durante 24 h na presença de KML-C (20 ng/mL). Além disso, o DNA das células tratadas com a lectina foi extraído e analisado por meio de eletroforese em gel de agarose, sendo observado um padrão de fragmentação do DNA dose-dependente.

Concanavalina A (ConA), lectina com sítio de ligação específico para manose/glicose, exerceu efeito citotóxico sobre o crescimento de células de melanoma humano (A375), sendo capaz de inibir 50% das células após 24 h de tratamento com uma concentração de 25 µg/mL. As atividades antiproliferativa foram inibidas quando a ConA foi previamente incubada com manose, sugerindo o envolvimento do sítio de ligação a carboidrato nessa atividade. Usando microscopia eletrônica, foi observado que essa lectina induziu alterações características de apoptose nas células tumorais testadas, tais como condensação nuclear e encolhimento na membrana. Além disso, foi demonstrada a morte celular por via mitocondrial caspase-dependente (LIU et al, 2009).

Outros mecanismos de morte das células tumorais induzida por ConA já foram estabelecidos como, por exemplo, a indução da morte celular programada dependente de mitocôndria, apoptose pela sinalização p73-Foxo1a-Bim e autofagia mediada pela proteína BNIP3. ConA inibe ainda a sobrevivência das células tumorais através da anti-angiogênese, por meio das cascatas de sinalização IKK-NF-κB-COX-2, SHP-2-MEK-1-ERK e SHP-2-Ras-ERK. Em hepatomas murinos, após morte mediada por ConA e a ativação de linfócitos, os antígenos tumorais foram processados e apresentados às células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas do antígeno tumoral, por mecanismos restritos ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC), estabelecendo posteriormente a imunidade específica do tumor e inibindo a formação de novos tumores; ainda, foi prolongado o período de sobrevivência dos ratos portadores de tumor, gerando uma memória imune e levando a uma resistência ao mesmo genótipo tumoral (LI et al., 2011).

A lectina AAL, isolada do cogumelo comestível *Agrocybe aegerita*, é outra proteína que exerce sua função de supressão de tumor através da indução de apoptose em células cancerígenas. Com o objetivo de identificar os elementos estruturais essenciais nas

propriedades antitumorais da AAL, uma série de proteínas mutantes foram projetadas, purificadas e investigadas quanto à oligomerização. Verificou-se que, para que essa ação antitumoral ocorra, é necessária a formação de dímeros, uma vez que a lectina mutante I25G, cuja mutação leva à dissociação do dímero em solução, apresentou redução na capacidade de induzir a apoptose. Essa bioatividade depende também da ligação com os carboidratos galactose e glicose. Independentemente desses fatores, foi observada na estrutura dessa lectina, uma bolsa hidrófoba essencial para essa atividade (YANG et al., 2009).

Através de análise por citometria de fluxo, foi verificado que a lectina de *Pinellia ternata* é capaz de causar inibição do crescimento celular do sarcoma 180, decorrente da parada no ciclo celular durante replicação do DNA, através do bloqueio da transição G1/S e aumento de G1/G0 (ZUO et al., 2012).

Gondim (2014), ao investigar a possível ação anticancerígena das lectinas isoladas das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Canavalia marítima* (ConM), *Dioclea lasiocarpa* (DLasil) e *Dioclea sclerocarpa* (DSclerL), constatou que as mesmas foram efetivas em inibir o crescimento celular das linhagens de células tumorais testadas: células de carcinoma de ovário humano (A2780), carcinoma caucasiano de pulmão humano (A549), MCF7 e PC-3, em concentrações nanomolar.

A lectina do molusco marinho *Crenomytilus grayanus*, CGL, teve sua estrutura elucidada, sendo demonstrada folha- β que se dimeriza em uma estrutura quaternária em forma de haltere. Ao testar a citotoxicidade dessa lectina frente às células do câncer de mama da linhagem MCF-7, verificou-se que a CGL reconhece Gb3 presente na superfície das células tumorais. Estrutura cristalográfica da proteína revelou que a mesma possui um sítio de ligação a carboidratos envolvendo a formação de ponte de hidrogênio mediada por histidina e água e que cada CGL pode se unir a 3 ligantes, galactose, galactosamina e globotriose Gb3. A lectina foi previamente marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e através da microscopia de fluorescência foi verificada que a mesma estava ligada à superfície das células (LIAO et al., 2016).

Cunha et al. (2016), estudando uma lectina recombinante de sementes de *Cratylia mollis* (rCramoll) e a lectina purificada diretamente da planta (pCramoll), verificaram um potencial de inibição do sarcoma 180 *in vivo* que foi intensificado após a encapsulação em lipossomas furtivos, revelando os benefícios do uso dos nanossistemas no transporte da lectina. Figueirôa et al. (2017) verificaram o mecanismo de ação das lectinas pCramoll e rCramoll sobre células PC-3 e constataram que ambas aumentaram a geração de superóxido

mitocondrial e a concentração de cálcio citosólico, com consequente diminuição da fosforilação oxidativa e prejuízo à formação de ATP, levando a um colapso mitocondrial.

ConV é uma lectina de sementes de *Canavalia virosa* que foi estudada quanto à citotoxicidade para células de glioma C6. Verificou-se uma diminuição na viabilidade dessas células tumorais com diminuição o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Utilizando o marcador acidotrópico laranja de acridina, para verificar organelas vesiculares ácidas, e o iodeto de propídio (PI), para análise de possível morte celular por necrose, foi demonstrado que a ConV induziu autofagia das células do glioma C6 (OSTERNE et al., 2017).

A eutirucalina, lectina isolada do látex de *Euphorbia tirucalli*, também conhecido como avelós, apresentou atividade antiproliferativa para células tumorais HeLa (linhagem celular derivada de adenocarcinoma cervical humano), PC-3, MDA-MB-231 (linhagem celular de carcinoma mamário humano) e MCF-7, não sendo citotóxica para células normais como macrófagos e fibroblastos (PALHARINI et al., 2017). A eutirucalina inibiu também o Carcinoma de Ehrlich Ascítico (CEA), aumentando os níveis de IL-12 e TNF- α . Essa resposta imune adaptativa é importante na inibição do crescimento tumoral e outros trabalhos já evidenciaram a relação entre o aumento de IL-12 e a inibição de CEA (PALHARINI et al., 2017).

Enquanto diversas lectinas foram relatadas por apresentarem atividade antitumoral, a lectina de *Arachis hypogaea* (PNA), ao se ligar a uma glicoproteína transmembrana (isoforma CD44v6) em células de câncer de cólon HT29 e T84 causou efeito proliferativo. Esse efeito se deve ao fato da ligação de PNA com o antígeno Thomsen–Friedenreich, presente em CD44v6, causar um aumento de 6 vezes na fosforilação do c-Met, que codifica uma proteína conhecida como receptor do fator de crescimento de hepatócito, com subsequente ativação da proteína quinase ativadas por mitógeno p4/p42 (MAPK). Ativação de MAPK não foi observada em células de câncer de cólon Caco2, que carecem de CD44v6 (SINGH et al., 2006).

Luz et al. (2017), ao estudarem o efeito citotóxico da lectina coagulante de sementes de *Moringa oleifera* (cMoL) sobre linhagem celular derivada de melanoma murino (B16-F10), verificaram que a lectina foi capaz induzir necrose dessas células tumorais. Foi constatado ainda que cMoL aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio mitocondriais e promoveu ativação de caspases 3, 8 e 9 em células B16-F10, sugerindo que esta lectina induz também morte celular por apoptose de maneira caspase-dependente.

Uma lectina do tipo C, ligadora de galactose, purificada a partir de veneno da cobra *Bothrops leucurus* (BLL), também exibiu atividade antitumoral em células B16-F10.

Tratamento com BLL causou morte celular por necrose através da desregulação da homeostase celular do Ca^{2+} e abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca^{2+} . Foi constatado também que BLL não diminuiu a viabilidade de células não tumorais HaCaT, queratinócitos humanos (ARANDA-SOUZA et al., 2014).

2.3.2 Lectinas com atividade antinociceptiva

As lectinas também têm apresentado atividade antinociceptiva. Uma lectina isolada de sementes de *Canavalia grandiflora* apresentou potencial para novas terapias analgésicas e anti-inflamatórias, por ter sido capaz de inibir a migração neutrofílica e a hipernocicepção inflamatória (NUNES et al., 2009). Lectina purificada de sementes de *Lonchocarpus campestris* (LCaL) também apresentou efeito inibitório na nocicepção inflamatória. Quando administrada em camundongos Swiss machos, na dose 10 mg/kg, causou uma diminuição de 37% e 73% no tempo de lambida da pata na primeira e segunda fase do teste da formalina, respectivamente, além de reduzir a resposta hiperalgésica provocada pela carragenina. Nas doses 0,1 mg/kg, 1 mg/kg e 10 mg/kg reduziu o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (PIRES et al., 2019).

Campos et al. (2016) estudaram o efeito antinociceptivo da lectina de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) em camundongos Swiss machos. Foi constatado que, nas doses 15, 30 e 60 mg/kg, a lectina administrada por via intraperitoneal reduziu significativamente o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em 43,1, 50,1 e 71,3%, respectivamente. BmoLL, nas doses 30 e 60 mg/kg, aumentou também o tempo de latência dos camundongos sobre a placa quente, 90 minutos após a administração. O efeito analgésico da lectina foi atribuído a um mecanismo periférico, através da inibição de mediadores inflamatórios, e central, através da interação lectina-carboidrato e receptores celulares.

Uma lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (CcL), administrada nas doses 0,1, 1 e 10 mg/kg, inibiu a nocicepção inflamatória na articulação temporomandibular de ratos Wistar machos, através da inibição de $\text{TNF-}\alpha$, interleucina 1β (IL- 1β), ciclooxygenase-2 (COX-2) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e independentemente do sistema canabinoide e opioide e da via óxido nítrico sintase (NOS)/ guanilato ciclase solúvel (sGC)/ proteína quinase G (PKG)/ canal de potássio sensível ao ATP (RIVANOR et al., 2018).

A lectina AEL, isolada de sementes de quiabo (*Abelmoschus esculentus*), nas doses 0,001, 0,01 e 0,1 mg/kg via intravenosa (i.v.), reduziu a hipernocicepção da articulação temporomandibular (induzida por injeção intra-articular de formalina) em ratos Wistar machos, de forma dependente da ativação central dos receptores opióides δ e κ (ALVES et al., 2018). AEL também foi capaz de reduzir a hipernocicepção inflamatória da articulação temporomandibular induzida por zimosana, em ratos Wistar machos, em todas as doses testadas (0,01, 0,1 ou 1 mg/kg i.v.). Esse efeito antinociceptivo envolve a inibição do TNF- α e da IL-1 β e depende da integridade da via heme oxigenase-1 (HO-1) (FREITAS et al., 2016).

Tendo em vista que a dor relacionada ao câncer é um grande problema de saúde pública em todo o mundo, devido ao forte impacto na qualidade de vida de pacientes e os efeitos colaterais das opções terapêuticas existentes, várias substâncias têm sido estudadas quanto a suas propriedades terapêuticas, especialmente sua importância no controle de condições dolorosas, em modelos de nocicepção induzida por células tumorais em roedores (GUIMARÃES et al., 2015). Porém, não foram encontrados estudos da avaliação antinociceptiva de lectinas relacionados ao sarcoma 180.

3 RESULTADOS

Os resultados dessa pesquisa são apresentados na forma de artigos.

3.1 ARTIGO 1 - ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE PLANTAS DA FAMÍLIA ANACARDIACEAE: REVISÃO DE LITERATURA

Artigo submetido ao periódico “Revista Brasileira de Farmácia” (*Brazilian Journal of Pharmacy*)



Atividade antinociceptiva de plantas da família Anacardiaceae: revisão de literatura

Dalila de Brito Marques Ramos^{1,2} & Thiago Henrique Napoleão^{2*}

^{1,2}*Campus Amílcar Ferreira Sobral, Universidade Federal do Piauí, Floriano, Piauí, Brasil.*

²*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.*

*Autor para correspondência. E-mail: thiagohn86@yahoo.com.br

Resumo

A dor é um dos problemas que mais interferem na qualidade de vida de muitas pessoas e seu tratamento é um dos maiores desafios já que, em muitas condições, os medicamentos atualmente disponíveis são ineficazes, causam dependência e/ou possuem fortes efeitos colaterais. Nesse cenário, tem-se investigado uma variedade de produtos naturais quando à atividade antinociceptiva. O objetivo desta revisão foi fazer um levantamento de estudos realizados que avaliaram a atividade antinociceptiva de plantas da família Anacardiaceae, uma das mais promissoras como fontes de compostos bioativos. Foram encontradas diversas espécies que foram estudadas quanto ao seu potencial antinociceptivo, distribuídas nos gêneros *Anacardium*, *Antrocaryon*, *Lannea*, *Lithraea*, *Mangifera*, *Myracrodruon*, *Pistacia*, *Rhus*, *Schinopsis*, *Schinus*, *Semecarpus* e *Toxicodendron*. Dentre os compostos avaliados ou possivelmente relacionados com os efeitos antinociceptivos estão ácidos anacárdico, chiquímico, vanílico, gálico e pistagrêmico, mangiferina, R-(+)-limoneno e α -felandreno, bem como outros compostos pertencentes às classes dos ácidos fenólicos, flavonoides, alcaloides, glicosídeos, taninos, chalconas, catequinas, triterpenoides e esteroides. Em conclusão, as plantas de Anacardiaceae constituem potenciais fontes de opções terapêuticas para o tratamento da dor.

Palavras-chave: Nocicepção, Produtos naturais, Dor.

Abstract

Pain is one of the problems that most affect the life quality of many people and its treatment is one of the biggest challenges in Medicine since, under many conditions, the drugs currently available are ineffective, cause dependence and/or have strong side effects. In this scenario, a

variety of natural products have been investigated for antinociceptive activity. The objective of this review was to make a survey of studies that evaluated the antinociceptive activity of plants from the family Anacardiaceae, one of the most promising as sources of bioactive compounds. Several species have been studied for their antinociceptive potential, distributed in the genera *Anacardium*, *Antrocaryon*, *Lannea*, *Lithraea*, *Mangifera*, *Myracrodruon*, *Pistacia*, *Rhus*, *Schinopsis*, *Schinus*, *Semecarpus* and *Toxicodendron*. Among the compounds evaluated or possibly related to the antinociceptive effects are anacardic, shikimic, vanillic, gallic and pistachioic acids, mangiferin, R-(+)-limonene and α -phellandrene, as well as other compounds belonging to the classes of phenolic acids, flavonoids, alkaloids, glycosides, tannins, chalcones, catechins, triterpenoids and steroids. In conclusion, the plants of Anacardiaceae are potential sources of therapeutic options for the treatment of pain.

Keywords: Nociception, Natural products, Pain.

1. Introdução

A família Anacardiaceae compreende 83 gêneros, subdivididos em cinco tribos (Anacardieae, Dobineae, Rhoeae, Semecarpeae e Spondiadeae), que compreendem 860 espécies (Christenhusz & Byng, 2016; Correia, David & David, 2006). Inclui gêneros economicamente importantes como *Mangifera*, *Anacardium* e outros com importância medicinal, como *Myracrodruon* e *Schinus* (Ariyaratne *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2017; Taiwo *et al.*, 2017; Torres, Lima & Ueda, 2016). Extratos e compostos isolados de espécies dessa família apresentam diversas atividades, tais como hipoglicêmica (Diatte *et al.*, 2017), neuroprotetora (Shrestha *et al.*, 2013), leishmanicida (Carvalho *et al.*, 2017), hepatoprotetora, nefroprotetora (Tlili *et al.*, 2016), anti-inflamatória e analgésica (Santos *et al.*, 2018a).

Apesar dos grandes progressos na medicina, a dor ainda é um dos problemas que mais interferem na qualidade de vida de muitas pessoas (Luo *et al.*, 2017). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain*) define dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada com dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano” (Vallath, Salins & Kumar, 2013). Mecanismos periféricos e centrais estão envolvidos na transmissão dolorosa. Fibras nervosas A δ e C possuem nociceptores em suas terminações, que são capazes de traduzir estímulos dos tipos térmico, químico ou mecânico em estímulos elétricos, sendo transmitidos até o sistema nervoso central e interpretados no córtex cerebral como dor. A estimulação persistente de

nociceptores causa dor espontânea e redução do limiar de sensibilidade, resultando em um quadro de hiperalgesia (Rocha *et al.*, 2007). O tratamento da dor é um dos maiores desafios já que, em muitas condições, os medicamentos atualmente disponíveis são ineficazes, causam dependência e/ou possuem fortes efeitos colaterais (Manglik *et al.*, 2016).

Nesse contexto, os cientistas têm explorado uma variedade de produtos naturais como tratamentos alternativos, os quais se mostram farmacologicamente promissores devido à complexidade química de seus componentes (Santos *et al.*, 2018b). Os produtos naturais com potencial efeito analgésico podem ser usados isoladamente ou em combinação para reduzir alguns dos efeitos colaterais relacionados aos analgésicos tradicionais, reduzindo as dosagens sem afetar a eficácia (Hishe *et al.*, 2018).

O objetivo desta revisão sistemática foi fazer um levantamento de estudos realizados que avaliaram plantas da família Anacardiaceae, em modelos experimentais, como fontes de compostos que apresentam atividade antinociceptiva. Adicionalmente, são descritos brevemente os princípios dos métodos de avaliação de atividade antinociceptiva utilizados nos estudos encontrados.

2. Metodologia

A pesquisa foi realizada entre setembro e novembro de 2018 nas bases de dados *PubMed*, *Scopus*, *Science Direct* e *Web of Science*, usando os termos de pesquisa “Anacardiaceae” e “antinociceptive activity” sem restrição quanto ao ano de publicação. Somente foram avaliados artigos com texto completo disponível on-line. Foram excluídas revisões bibliográficas e estudos etnobotânicos.

3. Resultados

Foram encontradas diversas espécies da família Anacardiaceae que haviam sido estudadas quanto ao seu potencial antinociceptivo (Tabela 1), distribuídas nos gêneros *Anacardium*, *Antrocaryon*, *Lannea*, *Lithraea*, *Mangifera*, *Myracrodruon*, *Pistacia*, *Rhus*, *Schinopsis*, *Schinus*, *Semecarpus* e *Toxicodendron*. Os modelos animais utilizados nesses estudos foram: teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste de contorções abdominais induzidas pela *p*-benzoquinona, teste da formalina, teste da placa quente, teste de hiperalgesia mecânica, teste de nocicepção induzida por capsaicina, teste de nocicepção induzida por cinamaldeído, teste de imersão da cauda, teste de nocicepção

induzida por glutamato e lesão por constrição crônica. Inicialmente, apresentaremos algumas informações sobre esses modelos experimentais e, em seguida, os dados obtidos na revisão sistemática, separados por gênero botânico.

3.1. Modelos experimentais

O modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético é bastante utilizado por ser considerado de fácil e rápida execução, não necessitando do uso de equipamentos especiais. Nele, uma injeção por via intraperitoneal (i.p.) de ácido acético leva à liberação de citocinas como TNF- α (fator de necrose tumoral α) e IL-1 β (interleucina 1 β) e de quimiocinas que atuam em sinergia ativando os nociceptores e induzindo as contorções, cujo número é registrado durante 20 minutos (Aragão *et al.*, 2017; Pavao-de-Souza *et al.*, 2012). O teste é comumente utilizado para avaliar agentes de atuação periférica que atuam através da inibição desses mediadores inflamatórios (Al-Sayed & Abdel-Daim, 2018; Masroor *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2017). No teste de contorções abdominais induzidas pela ρ -benzoquinona, os animais são tratados e, após 1 hora, recebem uma injeção via i.p. da solução de ρ -benzoquinona. Após 5 minutos, o número de contorções abdominais é contado por 15 a 20 minutos (Akkol *et al.*, 2018; Zucoloto *et al.*, 2017).

O teste da formalina é realizado através da injeção subplantar de uma solução de formalina e compreende duas fases, nas quais são quantificados os comportamentos nociceptivos, como o número de elevações da pata. A primeira fase (aguda ou neurogênica) inicia imediatamente após a injeção da formalina e dura até 10 minutos, relacionando-se com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e das fibras do tipo A δ , ocorrendo a liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P. Na segunda fase (tardia ou inflamatória), entre 15 e 60 minutos, ocorre a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas e serotonina (Ivanova *et al.*, 2018; Izquierdo *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013). Assim, é possível avaliar se a inibição da dor ocorre por mecanismos centrais (fase inicial), periféricos (fase tardia) ou ambos (Sawada *et al.*, 2014).

O teste da placa quente mostra uma resposta do animal a um estímulo térmico que é associado à neurotransmissão central (Batista *et al.*, 2016). Os animais são colocados em placa aquecida em torno de 55 °C e é registrado, em segundos, o tempo decorrido até que eles reajam através de lambida da pata ou saltos (Bridi *et al.*, 2016). Nesse, e em outros testes, pode-se avaliar um possível envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo,

administrando-se naloxona por via i.p., antes da administração da substância a ser testada (Siddiqui *et al.*, 2016).

No teste de hiperalgesia mecânica, o limiar de sensibilidade a dor é medido após injeção de substâncias que induzirão um quadro de alodinia, como carragenina ou prostaglandinas, na pata traseira dos animais, seguida da aplicação de uma pressão crescente usando um dispositivo transdutor de força (analgesímetro), até que seja observada uma reação nociceptiva, como a retirada da pata. Esse valor é então registrado em gramas (Silva *et al.*, 2018; Guimarães *et al.*, 2015).

No teste da nocicepção induzida por capsaicina, os animais são tratados com a amostra a ser avaliada e, entre 30 minutos e 1 hora após o tratamento, recebem uma injeção intraplantar de capsaicina, que é agonista do receptor de potencial transitório vaniloide do tipo 1 (TRPV1). Após 5 minutos, os animais são observados e é quantificado o tempo de lambadura da pata injetada, como indicação de nocicepção. Para analisar o possível envolvimento da inibição do receptor TRPV1 na antinocicepção, utiliza-se um antagonista desse receptor, o rutênio vermelho. Esse teste avalia o efeito das substâncias contra a nocicepção neuropática, na qual há alteração do funcionamento do sistema nervoso (Xue *et al.*, 2019; Fongang *et al.*, 2017). O teste de nocicepção induzida por cinamaldeído avalia o envolvimento do receptor de potencial transitório com domínios anquirina 1 (TRPA1). Os animais são tratados e após 15 min recebem uma injeção intraplantar de cinamaldeído, agonista desses receptores. Em seguida, o tempo que os animais passam lambendo a pata injetada é monitorado por 5 min (Dallazen *et al.*, 2018).

No modelo de nocicepção induzida por glutamato, os animais são tratados com as substâncias a serem testadas e o glutamato é então injetado na pata do animal; nos 15 minutos seguintes, o número de lambidas ou o tempo gasto lambendo a pata é quantificado (Carvalho *et al.*, 2018; Imam & Moniruzzaman, 2014). O glutamato causa nocicepção por ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e receptores não-NMDA, com o envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico, sendo uma resposta de ação periférica local, medular e supraespinal (Beirith, Santos & Calixto, 2002).

O teste de imersão da cauda avalia atividade analgésica de mecanismo central. Os animais são tratados e depois os últimos dois a três centímetros de área da cauda são imersos em banho de água a 57 ± 2 °C, sendo o tempo de retirada da cauda da água (tempo de reação ou a latência da cauda) registrado em segundos (Hasan *et al.*, 2018).

No modelo de lesão por constrição crônica, o nervo ciático comum é exposto e quatro nós frouxos com fio são atados ao redor. Com isso, ocorre hiperalgesia térmica e mecânica,

hiperatividade química e alodinia ao frio. Lesão em fibras mielinizadas, fibras A delta e fibras não mielinizadas C são responsáveis por esse quadro semelhante à dor neuropática em humanos (Sousa *et al.*, 2016).

3.2. Plantas de Anacardiaceae estudadas quanto à ação antinociceptiva

3.2.1. Gênero *Anacardium*

Anacardium occidentale L., conhecido como cajueiro, é uma planta com considerável valor econômico e medicinal, sendo nativa da África, Índia e nordeste do Brasil. A atividade antinociceptiva de extrato aquoso da goma do cajueiro, sem a presença de polissacarídeos na sua composição, foi avaliada por Silva *et al.* (2018) em camundongos Swiss fêmeas. No teste de contorções induzidas por ácido acético, houve diminuição no número de contorções quando os animais foram tratados com o extrato nas concentrações de 75, 150 e 300 mg/kg, por gavagem. No teste da formalina, o extrato (150 mg/kg, via oral, v.o.) causou uma diminuição no tempo de lambida da pata na segunda fase do teste, sugerindo um efeito antinociceptivo periférico dependente de atividade anti-inflamatória. No teste de hiperalgesia mecânica induzida por carragenina, a administração do extrato diminuiu a diferença no limiar nociceptivo entre a pata não inflamada e a inflamada dos animais em resposta a um estímulo mecânico. Esses efeitos antinociceptivos do extrato foi em parte atribuído à presença dos ácidos anacárdicos, que eram os constituintes predominantes.

Extrato acetônico da casca do caule de *A. occidentale* nas doses 300 e 1000 mg/kg v.o. reduziu o número de contorções induzidas por ácido acético em camundongos Swiss machos. Essas mesmas doses, porém, não foram eficientes em aumentar o tempo de latência dos camundongos sobre a placa quente, demonstrando que esse extrato possui efeito antinociceptivo apenas periférico (Vanderlinde *et al.*, 2009).

3.2.2. Gênero *Antrocaryon*

Antrocaryon klaineum Pierre, também conhecido como mogno branco, cresce em países africanos e o decocto da casca do caule é bastante utilizado por indígenas como analgésico, antimalárico, antidiarreico, contra doenças da pele, doenças do fígado, úlcera de estômago e diabetes, dentre outras finalidades. Foi realizado um estudo para verificar a atividade antinociceptiva do extrato metanólico da casca do caule, nas doses de 200, 400 e

600 mg/kg v.o. usando diferentes modelos de dor em camundongos. Na dose de 600 mg/kg, o extrato reduziu significativamente a dor induzida pelo ácido acético e no teste da formalina reduziu significativamente o tempo de lambadura das patas em ambas as fases. Nessa dose, o extrato também foi efetivo nos modelos de dor neurogênica induzida por capsaicina e cinamaldeído. No teste da placa quente, a administração do extrato nas doses de 400 e 600 mg/kg aumentou o tempo de latência e esse efeito foi revertido pela administração prévia da naloxona, confirmando o envolvimento de receptores opioides no efeito antinociceptivo central. Os efeitos antinociceptivos desse extrato podem estar associados a presença de proantocianidinas, ácidos fenólicos e flavonoides em sua composição (Fongang *et al.*, 2017).

3.2.3. Gênero *Lannea*

Lannea coromandelica (Houtt.) Merr. é conhecida localmente como jiga em Bangladesh. Nesse país, várias partes dessa planta são utilizadas na medicina tradicional. O extrato etanólico das folhas de *L. coromandelica* foi testado nas concentrações 50, 100 e 200 mg/kg, via oral, usando diferentes modelos de dor: contorções abdominais induzidas por ácido acético, placa quente, teste de imersão da cauda, teste da formalina e teste de glutamato, em camundongos Swiss de ambos os sexos. A dose de 200 mg/kg aumentou o tempo de latência dos animais na placa quente, 90 e 120 minutos após a administração do extrato, sendo esse efeito revertido pela administração prévia da naloxona. No teste de imersão da cauda, as doses de 100 e 200 mg/kg foram efetivas em aumentar o tempo de latência de retirada da cauda. No teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, as três doses diminuíram o número de contorções e no teste da formalina, as doses de 100 e 200 mg/kg causaram um efeito antinociceptivo mais pronunciado na segunda fase do teste. O extrato também foi efetivo em inibir significativamente a nocicepção induzida por glutamato. Foi constatado que o efeito antinociceptivo envolve a via da guanosina monofosfato cíclica e a via dos canais de potássio sensíveis ao ATP. A triagem fitoquímica preliminar desse extrato revelou a presença de alcaloides, glicosídeos, carboidratos, saponinas e taninos (Imam & Moniruzzaman, 2014).

Extrato metanólico da casca de *L. coromandelica*, nas doses de 200 e 400 mg/kg aumentou de forma significativa o limiar de dor de camundongos albinos no teste de imersão da cauda. A dose de 400 mg/kg também aumentou o tempo de latência dos camundongos sobre a placa quente, 60 minutos após a administração. Essa mesma dose causou diminuição significativa no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. No teste da

formalina, a dose de 200 mg/kg reduziu significativamente o tempo que o animal gastou lambendo a pata apenas na fase tardia, enquanto a dose de 400 mg/kg foi efetiva nas duas fases do teste. Glicosídeos, flavonoides, triterpenoides, taninos e esteroides estão presentes nesse extrato (Alam *et al.*, 2012).

3.2.4. Gênero *Lithraea*

Lithrea molleoides (Vell.) Engl. é uma árvore encontrada na América do Sul (Argentina, Brasil e Uruguai), sendo bem conhecida pelas pessoas desses países por suas propriedades medicinais (Gorzalczany *et al.*, 2011), e popularmente chamada de aroeirão ou aroeira-brava (Messias *et al.*, 2015). O efeito antinociceptivo do extrato aquoso de suas folhas e de alguns compostos isolados (ácido vanílico e ácido chiquímico) foi investigado através dos testes da formalina, placa quente e contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos Swiss fêmeas. No teste da formalina, os animais foram tratados com o extrato aquoso nas doses 3 e 30 mg/kg i.p. ou 500 e 1000 mg/kg v.o., enquanto o ácido vanílico foi testado a 30 e 100 mg/kg i.p. e o ácido chiquímico a 10 e 100 mg/kg i.p. Os animais tratados com o extrato (30 mg/kg i.p. e 1000 mg/kg v.o.) apresentaram uma redução no tempo de resposta à dor na segunda fase, sendo a resposta maior no caso da administração intraperitoneal. Os tratamentos com ácido vanílico (100 mg/kg) e ácido chiquímico (30 e 100 mg/kg) também resultaram em inibição do tempo de lambida da pata na segunda fase (Morucci *et al.*, 2012).

No teste da placa quente, o extrato não alterou de forma significativa o tempo de latência dos animais sobre a placa, indicando que o mesmo não atua por mecanismos centrais. No teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, o efeito antinociceptivo máximo (95,1% de inibição) do extrato aquoso foi obtido na dose de 100 mg/kg i.p. e a dose de 1000 mg/kg v.o. produziu uma inibição significativa na resposta de contorção de 46,3%. Os ácidos chiquímico e vanílico apresentaram efeito antinociceptivo quando administrados a 30 mg/kg i.p. (55,4 e 57,1% respectivamente) e na dose de 100 mg/kg v.o. produziram uma resposta menos efetiva de 23,3% e 23,9%, respectivamente (Morucci *et al.*, 2012).

3.2.5. Gênero *Mangifera*

Mangifera indica L., árvore frutífera conhecida como mangueira que cresce em regiões tropicais e regiões subtropicais, tem grande importância medicinal. De seus extratos é

possível retirar a xantona glicosilada mangiferina, composto que foi testado em vários modelos de nocicepção: contorções induzidas por ácido acético, lambida de pata traseira induzida por capsaicina e formalina e testes de imersão da cauda e placa quente, em camundongos Swiss machos. Nas doses de 30 e 100 mg/kg v.o., mangiferina diminuiu o número de contorções abdominais, sendo esse efeito revertido pela naloxona. Nessas mesmas doses, causou redução no número de lambidas em ambas as fases do teste da formalina. A naloxona também bloqueou o efeito antinociceptivo da mangiferina nesse teste. No teste da capsaicina, as doses 10, 30 e 100 mg/kg reduziram a resposta de lambida da pata. Nos testes da placa quente e no teste de movimento da cauda, mangiferina não teve efeito antinociceptivo, sugerindo efeito analgésico apenas periférico e não central (Lopes *et al.*, 2013).

Em outro estudo, mangiferina (50 e 100 mg/kg, i.p.) reduziu o número de lambidas apenas na segunda fase do teste da formalina, usando ratos machos Sprague Dawley (Garrido-Suárez *et al.*, 2014). A diferença em comparação com o estudo mencionado no parágrafo anterior pode ser devido à forma de administração e ao modelo animal diferente.

O pré-tratamento com mangiferina 50 mg/kg, i.p., por 4 dias antes da lesão por constrição crônica do nervo ciático e 3 dias após a cirurgia atenuou significativamente as respostas nociceptivas induzidas por picada de alfinete. No mesmo estudo, pré-tratamento oral de ratos machos Sprague-Dawley com extrato aquoso da casca do caule de *M. indica* nas concentrações 125, 250 e 500 mg/kg, durante 7 dias, reduziu a nocicepção na segunda fase do teste da formalina. Além disso, o extrato aquoso reduziu a hiperalgesia mecânica crônica secundária induzida por formalina em longo prazo (Garrido-Suárez *et al.*, 2014).

3.2.6. Gênero *Myracrodruon*

Myracrodruon urundeuva Allemão é uma árvore comum no nordeste brasileiro, conhecida como aroeira-do-sertão, e muito utilizada na medicina popular para o tratamento de inflamações no trato genital feminino. Foi avaliado o efeito analgésico de uma fração enriquecida em chalconas, obtida a partir do extrato em acetato de etila da casca do caule, em camundongos Swiss fêmeas. Essa fração inibiu as contrações abdominais induzidas por ácido acético, nas doses de 5 e 10 mg/kg i.p. Essas mesmas doses foram menos eficientes quando administradas por via oral. No teste da formalina, a administração de 5 e 10 mg/kg i.p. causou 76% de inibição de resposta na segunda fase. As doses 10 e 20 mg/kg i.p. aumentaram o

tempo de latência dos camundongos sobre a placa quente 30, 60 e 90 minutos após a administração (Viana, Bandeira & Matos, 2003).

3.2.7. Gênero *Pistacia*

O efeito analgésico de extratos hidroetanólicos de folhas e galhas de *Pistacia integerrima* J. L. Stewart ex Brandis [atualmente denominada *Pistacia chinensis* subsp. *integerrima* (J. L. Stewart ex Brandis) Rech. f.] foi investigado usando os modelos de contorções abdominais induzidos por ácido acético, teste da formalina e o modelo da placa quente em camundongos BALB/c machos e fêmeas. O extrato das galhas reduziu o número de contorções abdominais nas doses de 50 mg/kg e 200 mg/kg v.o. em comparação com o grupo controle. Já o extrato das folhas apresentou menor atividade analgésica. Da mesma forma, no teste da placa quente, o extrato das folhas (50-200 mg/kg v.o.) não mostrou atividade analgésica significativa, enquanto o extrato de galhas (200 mg/kg v.o.) aumentou o tempo de latência dos animais sobre a placa aquecida (Ahmad *et al.*, 2010).

Na primeira fase do teste da formalina, extrato de folhas (100 mg/kg e 200 mg/kg v.o.) causou uma diminuição no tempo de lambertura da pata de 16,6% e 19,4%, respectivamente, enquanto o extrato de galhas, nessas mesmas concentrações, promoveu diminuição de 30,6% e 50%, respectivamente. Na fase tardia do teste, extratos de folhas (200 mg/kg v.o.) e de galhas (100-200 mg/kg v.o.) exerceram efeito significativo. Esses efeitos analgésicos observados podem estar relacionados à presença de flavonoides, triterpenoides e catequinas nos extratos (Ahmad *et al.*, 2010).

O efeito antinociceptivo do ácido pistagrêmico, composto triterpênico isolado da casca de galhas de *P. integerrima*, foi testado nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg i.p. em camundongos BALB/c de ambos os sexos. No teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, o composto causou uma inibição significativa, com efeito máximo de 68% na dose de 10 mg/kg. No teste de imersão da cauda, a máxima inibição da dor foi de 59,46% na dose de 10 mg/kg após 90 min de tratamento e a injeção de naloxona (5 mg/kg) não foi capaz de antagonizar o efeito antinociceptivo do ácido pistagrêmico (Rauf *et al.*, 2014).

Flavonoides (numerados de 1 a 4) isolados da fração clorofórmica de galhas de *P. integerrima* também foram testados quanto a seu efeito antinociceptivo nas concentrações 2,5, 5 e 10 mg/kg i.p. em camundongos BALB/c machos. Na concentração de 10 mg/kg, todos os quatro compostos atenuaram as contorções abdominais induzidas por ácido acético. No teste da formalina, a dose de 10 mg/kg dos compostos teve efeito antinociceptivo na primeira e na

segunda fases do teste. O pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg) não antagonizou o efeito antinociceptivo dos flavonoides. Os resultados sugerem que esses compostos atuam por mecanismos tanto centrais quanto periféricos sem o envolvimento de receptores opioides (Rauf *et al.*, 2016).

Pistacia vera L. é uma planta encontrada em toda a região sudeste da Anatólia, e usada na medicina popular para tratar a asma e dor de estômago. Os efeitos antinociceptivos de extratos aquosos e etanólico dos frutos, folhas, galhos e pedúnculos, bem como da oleoresina, foram investigados usando o modelo de contorção abdominal induzida pela p-benzoquinona em camundongos Swiss machos. Os extratos, nas doses 250 e 500 mg/kg v.o., não apresentaram efeito antinociceptivo, enquanto a oleoresina (500 mg/kg v.o.), a fração n-hexano da oleoresina (429,7 mg/kg v.o.) e α -pineno obtido da oleoresina (500 mg/kg v.o.) causaram uma inibição de 32,1 %, 27,5% e 23%, respectivamente, no número de contorções (Orhan *et al.*, 2006).

Extratos aquoso (40, 160, 280 e 400 mg/kg, i.p.) e etanólico (50, 200, 350 e 500 mg/kg, i.p.) das folhas de *P. vera* foram testados em modelos de nocicepção, usando camundongos albinos Swiss machos e fêmeas. No teste da placa quente, os extratos causaram uma atividade antinociceptiva dose-dependente após 30 a 60 minutos de tratamento, sendo esse efeito inibido pelo pré-tratamento com a naloxona. Os extratos também reduziram significativamente o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, não havendo diferença significativa entre eles e os controles diclofenaco (10 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) (Hosseinzadeh, Behravan & Soleimani, 2011).

3.2.8. Gênero *Rhus*

As folhas de *Rhus retinorrhoea* Steud. ex A.Rich. são utilizadas na medicina tradicional da Arábia Saudita para tratamento de condições inflamatórias e dores. Flavonoides acumulados na superfície dessas folhas foram extraídos e testados quanto à atividade antinociceptiva em camundongos Swiss de ambos os sexos. Os animais receberam uma dose de 100 ou 200 mg/kg v.o. da mistura de flavonoides. A maior dose reduziu significativamente o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Além disso, nessa mesma concentração, a mistura de flavonoides apresentou atividade analgésica no teste da placa quente (entre 15 e 60 minutos após a administração da mistura) e em um modelo de retirada da cauda, quando um terço dela foi introduzida sob uma lâmpada de aquecimento, entre 30 e 120 minutos após a administração (Alqasoumi *et al.*, 2009).

3.2.9. Gênero *Schinopsis*

Schinopsis brasiliensis Engl. é uma planta nativa da Caatinga (Lima-Saraiva *et al.*, 2017) e utilizada na medicina popular para aliviar a dor e tratar a inflamação. O efeito antinociceptivo do extrato hidroetanólico da casca de *S. brasiliensis* e de sua fração acetato de etila, nas doses 10, 30 ou 100 mg/kg v.o., foi avaliado usando o teste da formalina e modelo de placa quente em camundongos Swiss Webster fêmeas. O extrato e a fração apresentaram um efeito antinociceptivo central na dose de 100 mg/kg, aumentando o tempo de latência que os camundongos permaneceram na placa quente. A fração (100 mg/kg) reduziu a resposta à dor nas primeira e segunda fases do teste da formalina, enquanto o extrato (100 mg/kg) reduziu apenas a resposta à dor na segunda fase. Segundo os autores, essas atividades podem ser atribuídas ao ácido gálico, presente na casca e marcador químico dessa espécie (Santos *et al.*, 2018a).

3.2.10. Gênero *Schinus*

Schinus terebinthifolia Raddi é conhecida como aroeira brasileira, aroeira vermelha, aroeira da praia, pimenta rosa ou pimenta brasileira. É utilizada na medicina popular para tratamento de doenças causadas por microrganismos, condições inflamatórias, feridas na pele, problemas respiratórios, gota, tumores, diarreia e artrite (Ennigrou *et al.*, 2018; Schimitberger *et al.*, 2018; Nunes-Neto *et al.*, 2017; Uliana *et al.*, 2016; Rosas *et al.*, 2015). Fração metanólica obtida de folhas de *S. terebinthifolia* foi testada em um modelo de dor neuropática em ratos submetidos à lesão crônica do nervo ciático, que foram tratados com uma dose de 20 mg/kg i.p. por 3 e 10 dias. Essa lesão ocasionou uma diminuição do limiar mecânico em cerca de 51%, mas os ratos tratados com a fração não mostraram diminuição desse limiar. O tempo de latência sobre a placa quente dos animais tratados apenas com solução salina diminuiu 48,2%, enquanto os animais tratados com a fração não apresentaram nenhuma redução significativa, em comparação com o tempo medido antes da lesão. Sendo assim, os autores concluíram que a fração restaurou os limiares mecânicos e térmicos que tinham sido reduzidos pela lesão do nervo e sugeriram que esses efeitos podem estar relacionados a moléculas antioxidantes presentes na fração e que contribuíram para normalização do estado oxidativo da medula espinhal alterado pela lesão periférica (Scheid *et al.*, 2018).

Em outro estudo envolvendo lesão crônica do nervo ciático, verificou-se que tratamento de ratos Wistar machos com óleo essencial (100 mg/kg v.o.), *R*-(+)-limoneno (10 mg/kg v.o.) e α -felandreno (10 mg/kg v.o.) de frutos de *S. terebinthifolia*, por 15 dias após a cirurgia, preveniu aumento da sensibilidade induzida pela lesão a um estímulo mecânico medido nos dias 10 e 15 após a cirurgia. Além disso, os 15 dias de tratamento oral com α -felandreno reduziram a sensibilidade induzida a um estímulo frio por lesão de nervo poupado (Piccinelli *et al.*, 2015).

3.2.11. Gênero *Semecarpus*

A atividade analgésica de *Semecarpus anacardium* L.f., espécie bastante utilizada na medicina tradicional indiana, foi testada usando extratos da casca do caule em éter de petróleo (700 mg/kg), clorofórmico (700 mg/kg) e metanol (500 mg/kg), via oral, em camundongos Swiss machos. A atividade foi testada usando os modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e o modelo de imersão da cauda. Todos os extratos causaram uma diminuição significativa no número de contorções, sendo o melhor resultado encontrado para o extrato metanólico. No teste de imersão da cauda todos os extratos também exibiram analgesia significativa, chegando a um valor de analgesia máxima possível de 20,43% para os camundongos tratados com extrato metanólico, começando 30 min após administração e com efeito significativo por um período de 3 h de observação (Lingaraju *et al.*, 2011).

3.2.12. Gênero *Toxicodendron*

Toxicodendron pubescens Mill., conhecida como *Rhus tox* (RT) em medicamentos alternativos, foi estudada quanto ao seu efeito antinociceptivo sobre dor neuropática, utilizando o modelo de lesão por constrição crônica. Ratos Wistar de ambos os sexos foram tratados com 0,1 mL do extrato etanólico das folhas (10g/100mL), diluído (10^{-12}), via oral, começando no dia seguinte após a cirurgia, e o efeito foi verificado nos dias 3, 7, 11 e 14. A constrição do nervo ciático nos animais causou um desenvolvimento de alodinia térmica e mecânica e o tratamento com o extrato melhorou o quadro, sendo esse efeito associado à atenuação do estresse oxidativo, bem como a mecanismos anti-inflamatórios, com reduções significativas nos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Magar *et al.*, 2018).

4. Conclusão

Os resultados dessa revisão indicam a presença de compostos antinociceptivos em diversas espécies da família Anacardiaceae, com atividade analgésica periférica e/ou central, sendo potenciais opções terapêuticas para o tratamento da dor. Dentre os compostos citados como possíveis responsáveis por esses efeitos antinociceptivos estão ácidos anacárdico, chiquímico, vanílico, gálico e pistagrêmico, mangiferina, *R*-(+)-limoneno e α -felandreno, bem como outros compostos pertencentes às classes dos ácidos fenólicos, flavonoides, alcaloides, glicosídeos, taninos, chalconas, catequinas, triterpenoides e esteroides.

Referências

- Ahmad NS, Waheed A, Farman M, Qayyum A. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Pistacia integerrima* extracts in mice. *J. Ethnopharmacol.* 129(2): 250–253, 2010.
- Akkol EK, Ilhan M, Süntar I, Ipek A. *Polygala anatolica* Boiss. et Heldr. : is a potential remedy for inflammation and pain? *B. Latinoam. Caribe Pl.* 17(6): 555–565, 2018.
- Alam B, Hossain S, Habib R, Rea J, Islam A. Antioxidant and analgesic activities of *Lannea coromandelica* Linn. bark extract. *Int. J. Pharmacol.* 8(4): 224–233, 2012.
- Alqasoumi S, Galal A, Gama A, Al-Yahya M, Rafatullah S. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of a flavonoidal mixture leaf surface of *Rhus retinorrhoea*. *Farmacologia.* 57(3): 346–354, 2009.
- Al-Sayed E & Abdel-Daim MM. Analgesic and anti-inflammatory activities of epicatechin gallate from *Bauhinia hookeri*. *Drug Dev. Res.* 79(4): 157–164, 2018.
- Aragão DP, Souza BS, Brito TV, Santana LAB, Silva RMP, Oliveira AP, Pereira ACTC, Ferreira GP, Barbosa ALR, Oliveira JS. The anti-inflammatory and antinociceptive activity of albumins from *Crotalaria retusa* seeds. *Biomed. Pharmacother.* 93: 536–542, 2017.
- Ariyaratne WAMP, Yakandawala D, Samuel MR, Wijesundara S. Evaluating the occurrence and conservation status of Sri Lankan species of Anacardiaceae. *Ceylon J. Sci.* 46(2): 59–67, 2017.
- Batista EKF, Trindade HI, Lira SRS, Muller JBBS, Silva LLB, Batista MCS. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. *Rev. Bras. Pl. Med.* 18(2): 433–441, 2016.

- Beirith A, Santos ARS, Calixto JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res.* 924(2): 219–228, 2002.
- Bridi H, Ccana-Ccapatinta GV, Stolz ED, Meirelles GC, Bordignon SAL, Rates SMK, von Poser GL. Dimeric acylphloroglucinols from *Hypericum austrobrasiliense* exhibiting antinociceptive activity in mice. *Phytochemistry.* 122: 178–183, 2016.
- Carvalho CES, Sobrinho-Junior EPC, Brito LM, Nicolau LAD, Carvalho TP, Moura AKS, Rodrigues KAF, Carneiro SMP, Arcanjo DDR, Citó AMGL, Carvalho FAA. Anti-*Leishmania* activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action. *Exp. Parasitol.* 175: 59–67, 2017.
- Carvalho AMR, Vasconcelos LF, Rocha NFM, Rios ERV, Dias ML, Fonteles MMF, Gaspar DM, Barbosa Filho JM, Gutierrez SJC, Sousa FCF. Antinociceptive activity of Riparin II from *Aniba riparia*: further elucidation of the possible mechanisms. *Chem. Biol. Interact.* 287: 49–56, 2018.
- Christenhusz MJM & Byng JW. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa.* 261(3): 201–217, 2016.
- Correia SJ, David JP, David JM. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. *Quim. Nova.* 29(6): 1287–1300, 2006.
- Dallazen JL, Maria-Ferreira D, Luz BB, Nascimento AM, Cipriani TR, Souza LM, Glugoski LP, Silva BJB, Geppetti P, Werner MFP. Distinct mechanisms underlying local antinociceptive and pronociceptive effects of natural alkylamides from *Acmella oleracea* compared to synthetic isobutylalkyl amide. *Fitoterapia.* 131: 225–235, 2018.
- Diatla A, Manga A, Gassama A, Lavaud C. Activité anti-hyperglycémiant et élucidation structurale des composés isolés des feuilles de *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae). *Eur. Sci. J.* 13(36): 312–324, 2017.
- Ennigrou A, Casabianca H, Vulliet E, Hanchi B, Hosni K. Assessing the fatty acid, essential oil composition, their radical scavenging and antibacterial activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi leaves and twigs. *J. Food Sci. Technol.* 55(4): 1582–1590, 2018.
- Fongang ALM, Nguemfo EL, Nangue YD, Zangueu CB, Fouokeng Y, Azebaze AGB, Llorent-Martínez EJ, Fernández-de Córdova ML, Dongmo AB, Vierling W. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the methanolic stem bark extract of *Antrocaryon klaineum* Pierre (Anacardiaceae) in mice and rat. *J. Ethnopharmacol.* 203: 11–19, 2017.
- Garrido-Suárez BB, Garrido G, Marian Castro-Labrada M, Merino N, Valdés O, Rodeiro I, Hernández I, Godoy-Figueiredo J, Ferreira SH, Delgado-Hernández R. Anti-hypernociceptive

effect of mangiferin in persistent and neuropathic pain models in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 124: 311–319, 2014.

Garrido-Suárez BB, Garrido G, García ME, Delgado-Hernández R. Antihyperalgesic effects of an aqueous stem bark extract of *Mangifera indica* L.: role of mangiferin isolated from the extract. *Phytother. Res.* 28(11): 1646–1653, 2014.

Gorzalczany S, Lopez P, Acevedo C, Ferraro G. Anti-inflammatory effect of *Lithrea molleoides* extracts and isolated active compounds. *J. Ethnopharmacol.* 133(3): 994–998, 2011.

Guimarães AG, Oliveira MA, Alves RS, Menezes PP, Serafini MR, Araujo AAS, Bezerra DP, Quintans Junior LJ. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. *Chem. Biol. Interact.* 227: 69–76, 2015.

Hasan MR, Uddin N, Sana T, Hossain MM, Mondal M, Kanta IJ, Choudhuri MSK. Analgesic and anti-inflammatory activities of methanolic extract of *Mallotus repandus* stem in animal models. *Orient Pharm. Exp. Med.* 18(2): 139–147, 2018.

Hishe HZ, Ambech TA, Hibben MG, Fanta BS. Anti-nociceptive effect of methanol extract of leaves of *Senna singueana* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 217: 49–53, 2018.

Hosseinzadeh H, Behravan E, Soleimani MM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Pistacia vera* leaf extract in mice. *Iran J. Pharm. Res.* 10(4): 821–828, 2011.

Imam MZ & Moniruzzaman M. Antinociceptive effect of ethanol extract of leaves of *Lannea coromandelica*. *J. Ethnopharmacol.* 154(1): 109–115, 2014.

Ivanova EA, Matyushkin AI, Blynskaya EV, Voronina TA. Local Analgesic activity of hemantane gel dosage forms evaluated using the formalin test in rats. *Pharm. Chem. J.* 52(8): 740–743, 2018.

Izquierdo T, Monteros-Zuñiga AE, Cervantes-Durán C, Lozada MC, Godínez-Chaparro B. Mechanisms underlying the antinociceptive effect of mangiferin in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.* 718: 393–400, 2013.

Lima-Saraiva SRG, Oliveira FGS, Oliveira Junior RG, Araújo CS, Oliveira AP, Pacheco AGM, Rolim LA, Amorim ELC, César FCS, Almeida JRGS. Chemical analysis and evaluation of antioxidant, antimicrobial, and photoprotective activities of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). *Sci. World J.* 2017: 1713921, 2017.

- Lingaraju GM, Hoskeri HJ, Krishna V, Babu PS. Analgesic activity and acute toxicity study of *Semecarpus anacardium* stem bark extracts using mice. *Pharmacogn. Res.* 3(1): 57–61, 2011.
- Lopes SC, Silva AVL, Arruda BR, Morais TC, Rios JB, Trevisan MTS, Rao VS, Santos FA. Peripheral antinociceptive action of mangiferin in mouse models of experimental pain: role of endogenous opioids, KATP-channels and adenosine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 110: 19–26, 2013.
- Luo W, Deng Z, Li R, Cheng G, Kotian RN, Li Y, Li W. Study of analgesic effect of earthworm extract. *Biosci. Rep.* 38(1): BSR20171554, 2018.
- Magar S, Nayak D, Mahajan UB, Patil KR, Shinde SD, Goyal SN, Swaminarayan S., Patil CR, Ojha S, Kundu CN. Ultra-diluted *Toxicodendron pubescens* attenuates pro-inflammatory cytokines and ROS- mediated neuropathic pain in rats. *Sci. Rep.* 8(1): 13562, 2018.
- Manglik A, Lin H, Aryal DK, McCorvy JD, Dengler D, Corder G, Levit A, Kling RC, Bernat V, Hübner H, Huang X, Sassano MF, Giguère PM, Löber S, Duan D, Scherrer G, Kobilka BK, Gmeiner P, Roth BL, Shoichet BK. Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature.* 537(7619): 185–190, 2016.
- Masroor D, Baig SG, Ahmed S, Ahmad SM, Hasan MM. Analgesic, anti-inflammatory and diuretic activities of *Cicer arietinum* L. *Pak. J. Pharm. Sci.* 31(2): 553–558, 2018.
- Messias MCTB, Menegatto MF, Prado ACC, Santos BR, Guimarães MFM. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: Um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med.* 17(1): 76–104, 2015.
- Morucci F, Lopez P, Miño J, Ferraro G, Gorzalczy S. Antinociceptive activity of aqueous extract and isolated compounds of *Lithrea molleoides*. *J. Ethnopharmacol.* 142(2): 401–406, 2012.
- Nunes-Neto PA, Peixoto-Sobrinho TJDS, Silva Júnior ED, Silva JL, Oliveira ARS, Pupo AS, Araújo AV, Costa-Silva JH, Wanderley AG. The effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) bark extract on histamine-induced paw edema and ileum smooth muscle contraction. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2017: 1416375, 2017.
- Oliveira FA, Rorato VC, Almeida-Apolonio AA, Rodrigues AB, Barros AL, Sangalli A, Arena AC, Mota JS, Grisolia AB, Oliveira KMP. In vitro antifungal activity of *Myracrodruon urundeuva* Allemão against human vaginal *Candida* species. *An. Acad. Bras. Cienc.* 89(3): 2423–2432, 2017.

- Orhan I, Küpeli E, Aslan M, Kartal M, Yesilada E. Bioassay-guided evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of pistachio, *Pistacia vera* L. *J. Ethnopharmacol.* 105(1-2): 235–240, 2006.
- Pavao-de-Souza GF, Zarpelon AC, Tedeschi GC, Mizokami SS, Sanson JS, Cunha TM, Ferreira SH, Cunha FQ, Casagrande R, Verri WA Jr. Acetic acid- and phenyl-p-benzoquinone-induced overt pain-like behavior depends on spinal activation of MAP kinases, PI3K and microglia in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 101(3): 320–328, 2012.
- Piccinelli AC, Santos JA, Konkiewitz EC, Oesterreich SA, Formagio AS, Croda J, Ziff EB, Kassuya CA. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. *Nutr. Neurosci.* 18(5): 217–224, 2015.
- Rauf A, Uddin G, Siddiqui BS, Khan H, Shah SU, Ben Hadda T, Mabkhot YN, Farooq U, Khan A. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Pistacia integerrima* galls. *Complement. Ther. Med.* 25: 132–138, 2016.
- Rauf A, Uddin G, Siddiqui BS, Khan A, Khan H, Arfan M, Muhammad N, Wadood A. In-vivo antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activity of pistagremic acid isolated from *Pistacia integerrima*. *Phytomedicine.* 21(12): 1509–1515, 2014.
- Rocha APC, Kraychete DC, Lemonica L, Carvalho LR, Barros GAM, Garcia JBS, Sakata RK. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 57(1): 94–105, 2007.
- Rosas EC, Correa LB, Pádua TD, Costa TE, Mazzei JL, Heringer AP, Bizarro CA, Kaplan MA, Figueiredo MR, Henriques MG. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. *J. Ethnopharmacol.* 175: 490–498, 2015.
- Santos CCS, Guilhon CC, Moreno DSA, Alviano CS, Estevam CDS, Blank AF, Fernandes PD. Anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant properties of *Schinopsis brasiliensis* bark. *J. Ethnopharmacol.* 213: 176–182, 2018a.
- Santos PL, Brito RG, Matos JPSCF, Quintans JSS, Quintans-Júnior LJ. Fos Protein as a marker of neuronal activity: a useful tool in the study of the mechanism of action of natural products with analgesic activity. *Mol. Neurobiol.* 55(6): 4560–4579, 2018b.
- Sawada LA, Monteiro VS, Rabelo GR, Dias GB, Cunha M, Nascimento JL, Bastos GN. *Libidibia ferrea* mature seeds promote antinociceptive effect by peripheral and central pathway: Possible involvement of opioid and cholinergic receptors. *Biomed. Res. Int.* 2014: 508725, 2014.

- Scheid T, Moraes MS, Henriques TP, Riffel APK, Belló-Klein A, Poser GLV, Ethur EM, Partata WA. Effects of methanol fraction from leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi on nociception and spinal-cord oxidative biomarkers in rats with neuropathic pain. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2018: 5783412, 2018.
- Schimitberger VMB, Pratti DLA, Cavalcanti LC, Ramalho VF, Costa APF, Scherer R, Kuster RM, Ramos AC, Silva AG. Volatile compounds profile changes from unripe to ripe fruits of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolia* Raddi). *Ind. Crops Prod.* 119: 125–131, 2018.
- Shrestha S, Natarajan S, Park JH, Lee DY, Cho JG, Kim GS, Jeon YJ, Yeon SW, Yang DC, Baek NI. Potential neuroprotective flavonoid-based inhibitors of CDK5/p25 from *Rhus parviflora*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23: 5150–5154, 2013.
- Siddiqui F, Abidi L, Lubna, Poh CF, Naqvi S, Faizi S, Farooq AD. Analgesic potential of *Opuntia dillenii* and its compounds opuntiol and opuntioside against pain models in mice. *Rec. Nat. Prod.* 10(6): 721–734, 2016.
- Silva DPB, Florentino IF, Moreira LKS, Brito AF, Carvalho VV, Rodrigues MF, Vasconcelos GA, Vaz BG, Pereira-Junior MA, Fernandes KF, Costa EA. Chemical characterization and pharmacological assessment of polysaccharide free, standardized cashew gum extract (*Anacardium occidentale* L.). *J. Ethnopharmacol.* 213: 395–402, 2018.
- Silva JC, Saraiva STGL, Oliveira Júnior RG, Almeida JRGS. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. *Rev. Bras. Farm.* 94(1): 18–23, 2013.
- Sousa AM, Lages GV, Pereira CL, Slullitel A. Experimental models for the study of neuropathic pain. *Rev. Dor.* 17(1): 27–30, 2016.
- Taiwo BJ, Fatokun AA, Olubiyi OO, Bamigboye-Taiwo OT, van Heerden FR, Wright CW. Identification of compounds with cytotoxic activity from the leaf of the Nigerian medicinal plant, *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae). *Bioorg. Med. Chem.* 25(8): 2327–2335, 2017.
- Tlili N, Feriani A, Allagui MS, Saadoui E, Khaldi A, Nasri N. Effects of *Rhus tripartitum* fruit extract on CCl₄-induced hepatotoxicity and cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 94(8): 801–807, 2016.
- Torres KA, Lima SM, Ueda SM. Activity of the aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi on strains of the *Candida* genus. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 38(12): 593–599, 2016.
- Uliana MP, Fronza M, Silva AG, Vargas TS, Andrade TU, Scherer R. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. *Ind. Crops Prod.* 83: 235–240, 2016.

- Vallath N, Salins N, Kumar M. Unpleasant subjective emotional experiencing of pain. *Indian J. Palliat. Care.* 19(1): 12–19, 2013.
- Vanderlinde FA, Landim HF, Costa EA, Galdino PM, Maciel , dos Anjos GC, Malvar DC, Côrtes WS, Rocha FF. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the acetone extract from *Anacardium occidentale* L. *Braz. J. Pharm. Sci.* 45(3): 437–442, 2009.
- Viana GS, Bandeira MA, Matos FJ. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. *Phytomedicine.* 10(2-3): 189–195, 2003.
- Xue N, Wu X, Wu L, Li L, Wang F. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of Naringenin in different nociceptive and inflammatory mice models. *Life Sci.* 217: 148–154, 2019.
- Zucoloto AZ, Manchope MF, Staurengo-Ferrari L, Alves-Filho JC, Cunha TM, Antunes MM, Menezes GB, Cunha FQ, Casagrande R, Verri Jr WA. Probucol attenuates overt pain-like behavior and carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia and leukocyte recruitment by inhibiting NF- κ B activation and cytokine production without antioxidant effects. *Inflamm. Res.* 66(7): 591–602, 2017.

Tabela 1. Espécies da família Anacardiaceae estudadas quanto ao seu potencial antinociceptivo.

Espécie	Parte da planta	Tipo de extrato/composto	Efeito/mecanismo antinociceptivo	Referência
<i>Anacardium occidentale</i>	Casca do caule	Extrato acetônico	Ação periférica	Vanderlinde <i>et al.</i> (2009)
	Goma	Extrato aquoso	Redução nos níveis de prostaglandina E2	Silva <i>et al.</i> (2018)
<i>Antrocaryon klaineianum</i>	Casca	Extrato metanólico	Atividade analgésica periférica e central	Fongang <i>et al.</i> (2017)
<i>Lannea coromandelica</i>	Casca	Extrato metanólico	Ação central e periférica	Alam <i>et al.</i> (2012)
	Folhas	Extrato etanólico	Ação central e periférica	Imam & Moniruzzaman (2014)
<i>Lithrea molleoides</i>	Folhas	Extrato aquoso Ácido vanílico Ácido chiquímico	Influência nos sistemas adrenérgico e dopaminérgico	Morucci <i>et al.</i> (2012)
<i>Mangifera indica</i>	Casca do caule	Mangiferina	Ação periférica, com envolvimento de receptores opioides endógenos, canais de potássio sensíveis ao ATP e receptores de adenosina. Atividade sobre vias nociceptivas mediadas pelos receptores $\alpha 2$ adrenérgicos.	Lopes <i>et al.</i> (2013) Garrido-Suárez <i>et al.</i> (2014)
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Casca do caule	Fração enriquecida em chalconas	Ação central e periférica	Viana, Bandeira & Matos (2003)
<i>Pistacia integerrima</i>	Folhas e galhas	Extrato	Ação central e periférica	Ahmad <i>et al.</i> (2010)
	Casca de galhas	Ácido pistagrêmico	Ação central e periférica, independente da atividade opioidérgica.	Rauf <i>et al.</i> (2014.)
	Galhas	Flavonoides	Ação central e periférica	Rauf <i>et al.</i> (2016)

<i>Pistacia vera</i>	Tronco	Oleoresina Fração n-hexano α -pineno	Diminuição das contorções abdominais induzidas por p -benzoquinona	Orhan <i>et al.</i> (2006)
	Folha	Extrato aquoso Extrato etanólico	Ação central e periférica. Envolvimento dos receptores opioides e a inibição da enzima ciclooxigenase.	Hosseinzadeh, Behravan & Soleimani (2011)
<i>Rhus retinorrhaea</i>	Folha	Flavonoides	Ação central e periférica.	Alqasoumi <i>et al.</i> (2009)
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	Casca do caule	Extrato hidroetanólico Fração acetato de etila	Ação central e periférica	Santos <i>et al.</i> (2018a)
<i>Schinus terebinthifolia</i>	Folhas	Fração metanólica	Mecanismos antioxidativos	Scheid <i>et al.</i> (2018)
	Frutos	R-(+)-limoneno α -felandreno Óleo essencial	Redução da sensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos	Piccinelli <i>et al.</i> (2015)
<i>Semecarpus anacardium</i>	Casca do caule	Extrato éter de petróleo Extrato clorofórmico Extrato metanólico	Ação central e periférica	Lingaraju <i>et al.</i> (2011)
<i>Toxicodendron pubescens</i>	Folhas	Extrato etanólico	Mecanismos antioxidativos e anti-inflamatórios	Magar <i>et al.</i> (2018)

3.2 ARTIGO 2- *Schinus terebinthifolia* LEAF LECTIN (SteLL) HAS ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY IN SARCOMA 180-BEARING MICE

Dalila B.M. Ramos^{a,b}, Maria T.M.F. Araújo^c, Tarcísio C.L. Araújo^c, Yasmym A. Silva^c, Angela C.L.A. Santos^c, Mariana G. Silva^c, Patrícia M.G. Paiva^b, Rosemairiy L. Mendes^c, Thiago H. Napoleão^{b,*}

^a*Campus Amilcar Ferreira Sobral, Universidade Federal do Piauí, Floriano, Piauí, Brazil.*

^b*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^c*Laboratório de Oncologia Experimental, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brazil.*

*Corresponding author. E-mail: thiago86@yahoo.com.br

Abstract

The variable efficacy and adverse effects of analgesic drugs have motivated the search for novel antinociceptive agents. It has been reported that the *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) has antitumor activity against sarcoma 180 in mice. This work evaluated whether SteLL would reduce cancer pain using an orthotopic tumor model. A sarcoma 180 cell suspension was inoculated into the right hind paws of mice, and the treatments (0.15 M NaCl, negative control; 10 mg/kg morphine, positive control; or SteLL at 1 and 2 mg/kg) were administered intraperitoneally 24 h after cell inoculation up to 14 days. Spontaneous nociception, mechanical hyperalgesia, and hot-plate tests were performed. Further, the volume and weight of the tumor-bearing paws were measured. SteLL (2 mg/kg) improved limb use during ambulation. The lectin (1 and 2 mg/kg) also inhibited mechanical hyperalgesia and increased the latency time during the hot-plate test. Naloxone was found to reverse this effect, indicating the involvement of opioid receptors. The tumor-bearing paws of mice treated with SteLL exhibited lower volumes and weight. SteLL reduced hyperalgesia due to sarcoma 180 in the paws of mice, and this effect can be related to its antitumor action.

Keywords: cancer pain; Brazilian pepper tree; analgesic effect; plant lectin; antitumor activity.

1. Introduction

Pain associated with cancer is one of the major problems faced by cancer patients, with moderate-to-severe pain being reported by 40% of the patients (Fink, 2018). The type and intensity of cancer pain depend on the location (organ and tissue), temporal pattern, and mechanisms of action, and can be broadly classified as nociceptive (resulting from somatic or visceral structures), neuropathic (inflammatory), or mixed (Wang, 2018) pain.

Morphine is a strong opioid, commonly used for the treatment of moderate-to-severe pain in cancer patients. It acts as μ -receptor agonist (Shinohara et al., 2018). Limitations associated with the use of morphine are decreased analgesic effect with chronic use and dependence (Pajohanfar et al., 2017). Other side effects include nausea, vomiting, pruritus, cognitive dysfunction, sedation, respiratory depression, constipation, and urinary retention (Webb and Leblanc, 2018).

Natural products represent a source of alternative compounds with analgesic action (Florentino et al., 2016; Sarmiento-Neto et al., 2016.; Oliveira et al., 2017), and some studies have demonstrated the antinociceptive effects of plant compounds in experimental models of cancer pain. For example, α -terpineol was shown to have antinociceptive effects on sarcoma 180-bearing mice via modulation of oxidative stress and inhibition of iNOS production (Gouveia et al., 2018). Carvacrol has also been shown to reduce tumor-associated pain in this same model (Guimarães et al., 2014).

Schinus terebinthifolia Raddi (Anacardiaceae) is a tree native to the Brazilian coast, and it is widely used in popular medicine owing to its anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic effects (Barbosa et al., 2007; Carvalho et al., 2013). A previous study has shown that the essential oil from *S. terebinthifolia* fruits, and its major compounds R-(+)-limonene and α -phellandrene, significantly inhibit mechanical hyperalgesia in the spared nerve injury (SNI) rat model of neuropathic pain (Piccinelli et al., 2015). An aqueous extract of *S. terebinthifolia* leaves has also been shown to possess antinociceptive activity, which is elicited through inhibition of painful stimuli, in the abdominal contortions, hot-plate, and tail removal models (Medeiros et al., 2015).

Lectins are proteins that bind specifically to carbohydrates (free or attached to proteins and lipids); they are widely distributed in nature, and found in vertebrates, invertebrates, bacteria, viruses, and plants (Gondim et al., 2017). Several biological activities of lectins have been described, including antinociception. A lectin from the alga *Caulerpa cupressoides* inhibited inflammatory nociception in the temporomandibular joint of rats by reducing TNF-

α , IL-1 β , COX-2, and ICAM-1 levels (Rivanor et al., 2018). The *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) significantly reduced abdominal writhing induced by acetic acid in animals and showed antinociceptive effects in the hot-plate test (Campos et al., 2016).

The leaves of *S. terebinthifolia* contain a chitin-binding lectin called SteLL, which exhibits antimicrobial activity (Gomes et al., 2013) and insecticidal effects on *Sitophilus zeamais* (Camaroti et al., 2018). In addition, it has been demonstrated that SteLL (1 and 5 mg/kg i.p.) exhibits *in vivo* antitumor activity against subcutaneous dorsal sarcoma 180 in mice (Ramos et al., 2019). Based on these reports and the use of the plant as an analgesic in folk medicine, we aimed to evaluate the antinociceptive activity of SteLL in mice bearing the sarcoma 180 tumor in the hind right paw.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The experiments were conducted at the *Laboratório de Imunologia e Práticas Cirúrgicas* of the *Universidade Federal do Vale do São Francisco* (UNIVASF). Swiss female mice (*Mus musculus*), aged 6-8 weeks, were obtained from the UNIVASF vivarium, and kept in polypropylene boxes with barred lids. The animals were maintained at a controlled temperature of 24°C, under a 12-h light/dark cycle, with *ad libitum* access to water and food (commercial mouse feed). The experimental protocols were conducted in accordance with internationally accepted principles for laboratory animal use and care and were approved by the Ethics Committee on Animal Use of UNIVASF (protocol No. 002/180816).

2.2. Extract preparation and lectin isolation

The leaves of *S. terebinthifolia* (name verified with <http://www.theplantlist.org>) were collected at the campus of the *Universidade Federal de Pernambuco* (Recife, Pernambuco, Brazil), with authorization (no. 36301) of the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio) from the Brazilian Ministry of Environment. The access was recorded (AED6BF8) in the *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado* (SisGen). A voucher specimen (no. 73,431) was archived in the herbarium of the *Instituto Agronômico de Pernambuco* (IPA), Recife, Brazil.

The leaves were washed with tap water, dried at 28°C for 7 days, and then crushed in a blender. The flour was suspended at a proportion of 10% (w/v) in 0.15 M NaCl and homogenized for 16 h at 4 °C. After centrifugation (15 min, 9000 g, 4 °C), a leaf extract was obtained. SteLL was isolated according to the protocol described by Gomes et al. (2013). The extract (147 mg of protein) was loaded onto a chitin (Sigma-Aldrich, USA) column (7.5 × 1.5 cm) previously equilibrated with 0.15 M NaCl at a flow rate of 20 mL/h. The column was washed with the equilibrating solution to remove unbound proteins, and then SteLL was eluted with 1.0 M acetic acid. Fractions of 2 mL were collected and monitored for absorbance at 280 nm. SteLL was dialyzed against distilled water (6 h, with two liquid changes) using a 10 kDa cut-off cellulose membrane (Sigma-Aldrich, USA), lyophilized, and re-suspended in 0.15 M NaCl. Protein concentration was determined based on the method described by Lowry et al. (1951) using a standard curve of bovine serum albumin (31.25–500 µg/mL). The carbohydrate-binding ability of SteLL was measured by hemagglutinating activity (HA) assay, which was performed as described by Procópio et al. (2017).

2.3. Induction of tumor and treatments

The tumor was induced by inoculating sarcoma 180 cell suspension in phosphate-buffered saline (10^6 cells/25 µL) into the right hind paws of the mice, except those belonging to the sham group. Each experimental group included 6 animals. All treatments were administered intraperitoneally, starting 24 h after cell inoculation up to 14 days. The sham and negative control groups received 0.15 M NaCl; 10 mg/kg morphine was used as the positive control. The other groups were treated with SteLL at 1 or 2 mg/kg. Twenty-four hours after administration of the last dose of treatment, the volume of the right paw was measured using a digital plethysmometer (LE 7500; PanLab, Italy) by immersing it up to the malleolus. Next, the animals were anesthetized with 100 mg/kg of ketamine i.p. and 10 mg/kg xylazine i.p., and blood was collected through brachial puncture into EDTA-containing tubes for hematological analysis using a VET SDH-3 automated analyzer (Labtest, Vista Alegre, Brazil). In addition, the paws with the tumors were removed through surgical excision and weighed.

2.4. Antinociceptive assays

The antinociceptive tests were performed on alternate days: the spontaneous nociception test was performed before tumor implantation and on days 5, 7, 9, 11, and 13. The mechanical hyperalgesia test was also performed prior to tumor induction and then on days 6, 8, 10, 12, and 14. The results of these tests are presented as the mean of the data collected on all days. The hot-plate test was conducted once on day 14.

2.4.1. Spontaneous nociception test

The mice were acclimatized in a mirrored box to quantify the number of spontaneous flinches of the injured paw, the number of licks, and the use of the limb while walking in continuous motion for a period of 10 min (Sabino et al., 2002). In this last case, we used a scale from 0 to 4, where 0 corresponded to total lack of use, 1 to partial non-use, 2 to limping and keeping, 3 to limping, and 4 to normal walking (Guimarães et al., 2014).

2.4.2. Mechanical hyperalgesia test

The mice were subjected to mechanical stimulation through gradual increase in pressure on the plantar surface of the tumor-bearing paw using a handheld force transducer (electronic algometer EFF-301; Insight, São Paulo, Brazil). This stimulus evokes a paw flexion reflex that corresponds to paw withdrawal followed by clear flinching movements (Guimarães et al., 2014).

2.4.3. Hot-plate test

This test evaluated how long the animals remained on a heated metal plate (55 ± 0.5 °C) before reacting by lifting or licking the legs. The measurements were obtained 30 and 90 min after the administration of SteLL or morphine on day 14 of the experiment. To assess the involvement of opioid receptors in the antinociceptive effect, naloxone (1.5 mg/kg, i.p.) was administered 30 min before the treatment.

2.5. Statistical analysis

The data obtained were analyzed using GraphPad Prism[®] software, version 5.0, and expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistically significant

differences between groups were calculated by applying ANOVA followed by Tukey's test. Values of $p < 0.05$ indicated significance when compared with the negative control.

3. Results and discussion

There is a constant search for novel analgesic drugs due to the complexity of pain as well as the varying degrees of efficacy and adverse effects of currently used drugs. Pain relief is important in terms of both psychological and physical aspects, preventing harmful consequences such as cardiovascular, gastrointestinal, and muscular alterations (Yaksh et al., 2015). Cancer pain may have several causes, including tissue damage and tumor pressure on bones, nerves, or organs. It can also be a consequence of treatment. It has been previously demonstrated that the saline extract from *S. terebinthifolia* leaves and SteLL have antitumor effects against sarcoma 180; the lectin was found to be the active component of the extract (Ramos et al., 2019). In the present study, we evaluated whether SteLL would also be able to reduce cancer pain in mice, using an orthotopic tumor model.

The treatments with SteLL for 14 days did not cause any significant changes in the hematological parameters of the mice (Table 1), which corroborates the findings of Ramos et al. (2019). In the spontaneous nociception test, animals from the negative control group (tumor-bearing, treated with 0.15 M NaCl) showed impaired limb use unlike the healthy (sham) animals (Figure 1A). SteLL (2 mg/kg) and morphine (10 mg/kg) caused a significant ($p < 0.05$) improvement in limb use during ambulation, which reached mean scores similar to those of the sham group. Regarding the number of licks, there were no significant differences ($p > 0.05$) between the groups (Figure 1B). Tumor presence induced mechanical hyperalgesia in mouse paws, and was not observed in the sham group (Figure 1C). Morphine and SteLL (1 and 2 mg/kg) significantly ($p < 0.05$) inhibited hyperalgesia unlike the negative control.

The hot-plate test uses temperature as a nociceptive stimulus, in which the nociceptors (mainly fibers C and A δ) are stimulated after the activation of the vanilloid receptors VR-1 and VRL-1. Only central analgesics can increase the response time in this test (Silva et al., 2013). Animals treated with morphine (10 mg/kg) presented a significant increase in latency time on the hot plate 30 min after administration compared to that by animals treated with the negative control (Figure 2A). As expected, naloxone (an opioid antagonist) could reverse the effect of morphine. SteLL did not show antinociceptive effects after 30 min. However, the lectin at 1 and 2 mg/kg increased the latency time when the animals were subjected to the test

90 min after administration (Figure 2B). Naloxone also reversed this effect, which indicates a possible involvement of the opioid receptors in the antinociceptive effect of the lectin.

The animals from the negative control group presented a significant increase in paw volume compared to that of the sham group (Figure 3A). No significant differences were observed between the negative control group and the groups treated with morphine. However, the groups that received intraperitoneal injection of SteLL at 1 and 2 mg/kg presented a significantly lower ($p < 0.05$) paw volume than the negative control, and no significant difference ($p > 0.05$) from the sham group. In addition, the animals treated with SteLL at 1 and 2 mg/kg presented a lower paw weight (Figure 3B) than the negative control animals. These data corroborate the findings of a previous report on antitumor activity of this lectin and suggest that the antinociceptive effect of SteLL detected in all the tests can be linked to the inhibition of tumor mass growth.

There is a relationship between ligands of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family and cancer pain. In human and murine cancer models, these ligands increase pain sensitivity through the selective activation of the VEGF receptor 1 (VEGFR1) expressed in sensory neurons. Local or systemic blockade of VEGFR1 attenuated mouse oncologic pain in several *in vivo* models, and thus an analgesic effect is considered as an additional effect of anti-angiogenic therapies targeting VEGF/VEGFR1 (Selvaraj et al., 2015). It has been shown that SteLL decreases the caliber of vessels around the sarcoma 180 tumor, suggesting an anti-angiogenic effect (Ramos et al., 2019). Thus, this effect may also be related to the minimization of cancer pain observed in the present study.

The antinociceptive action of lectins has been reported in healthy animals. The lectin from the seaweed *Amansia multifida*, administered to Swiss mice at 1, 5, and 10 mg/kg (i.p.), inhibited responses to thermal stimulation and its effect was blocked by naloxone (Neves et al., 2007). In addition to the fact that their action involves opioid receptors, the *A. multifida* lectin and SteLL were active at similar concentrations, producing effects similar to morphine used in equal or higher doses than the lectins: 5 mg/kg was tested by Neves et al. (2007) and 10 mg/kg was tested in the present work. The lectin BmoLL showed analgesic action in the hot plate test 90 min after it was administered to healthy Swiss mice at 30 and 60 mg/kg i.p. (Campos et al., 2016). SteLL showed antinociceptive action in much lower doses than BmoLL. However, it should be considered that the animals used here are tumor carriers, being subjected to endogenous pain, and thus an ameliorative effect can be more readily observed than when using healthy animals, in which the cause of pain is only the external stimulus applied (for example, temperature, palpation, pressure). On the other hand, it should be noted

that the group treated with SteLL often presented behavior similar to the sham group, evidencing the high potential of this lectin administered in low doses.

The mechanisms of action of lectins with antinociceptive activity are variable. For example, the lectin from the alga *Caulerpa cupressoides* did not show central antinociceptive activity in the hot-plate test, unlike SteLL. Indeed, the *C. cupressoides* lectin exerts antinociceptive effect predominantly through a peripheral mechanism, being active in models of inflammatory pain, such as the acetic acid writhing and formalin tests (Vanderlei et al., 2010). In addition, the *Canavalia brasiliensis* lectin presented both peripheral and central antinociceptive activity, which was mediated by the opioid system and involved δ - and κ - receptors and the lectin domain (Pires et al., 2013).

4. Conclusion

SteLL is capable of reducing hyperalgesia caused by the presence of sarcoma 180 in the paw, improving the use of the limbs by the tumor-bearing mice. The antinociceptive action appears to be related to the antitumor action of the lectin, as well as to a central action involving the modulation of opioid receptors.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants (446902/2014-4) and fellowship (PMGP and THN), and to the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE) for financial support (APQ-0108-2.08/14). They are also grateful to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, Financial Code 001).

References

- Barbosa, L.C.A., Demuner, A.J., Clemente, A.D., De Paula, V.F., Ismail, F.M.D., 2007. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Química Nova* 30, 1959-1965.
- Camaroti, J.R.S.L., Almeida, W.A., Belmonte, B.R., Oliveira, A.P.S., Lima, T.A., Ferreira, M.R.A., Paiva, P.M.G., Soares, L.A.L., Pontual, E.V., Napoleão, T.H., 2018. *Sitophilus*

- zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). Industrial Crops and Products 116, 81-89.
- Campos, J.K.L., Araújo, C.S.F., Araújo, T.F.S., Santos, A.F.S., Teixeira, J.A., Lima, V.L.M., Coelho, L.C.B.B., 2016. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. Biochimie Open 2, 62-68.
- Carvalho, M.G., Melo, A.G.N., Aragão, C.F.S., Raffin, F.N., Moura, T.F.A.L., 2013. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 15, 158-169.
- Fink, R.M., Brant, J.M., 2018. Complex cancer pain assessment. Hematology/Oncology Clinics of North America 32, 353-369.
- Florentino, I.F., Silva, D.P.B., Galdino, P.M., Lino, R.C., Martins, J.L.R., Silva, D.M., de Paula, J.R., Tresvenzol, L.M.F., Costa, E.A., 2016. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Memora nodosa* and allantoin in mice. Journal of Ethnopharmacology 186, 298-304.
- Gomes, F.S., Procópio, T.F., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2013. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. Journal of Applied Microbiology 114, 672-679.
- Gondim, A.C.S., Romero-Canelón, I., Sousa, E.H.S., Blindauer, C.A., Butler, J.S., Romero, M.J., Sanchez-Cano, C., Sousa, B.L., Chaves, R.P., Nagano, C.S., Cavada, B.S., Sadler, P.J., 2017. The potent anti-cancer activity of *Dioclea lasiocarpa* lectin. Journal of Inorganic Biochemistry 175, 179-189.
- Gouveia, D.N., Costa, J.S., Oliveira, M.A., Rabelo, T.K., Silva, A.M.O., Carvalho, A.A., Miguel-dos-Santos, R., Lauton-Santos, S., Scotti, L., Scotti, M.T., Santos, M.R.V., Quintans-Júnior, L.J., Junior, R.L.C.A., Guimarães, A.G., 2018. α -Terpineol reduces cancer pain via modulation of oxidative stress and inhibition of iNOS. Biomedicine & Pharmacotherapy 105, 652-661.
- Guimarães, A.G., Scotti, L., Scotti, M.T., Mendonça, F.J.B., Melo, N.S.R., Alves, R.S., de Lucca, W., Bezerra, D.P., Gelain, D.P., Quintans, L.J., 2014. Evidence for the involvement of descending pain-inhibitory mechanisms in the attenuation of cancer pain by carvacrol aided through a docking study. Life Sciences 116, 8-15.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry 193, 265-275.

- Medeiros, D.L., Guerra, G.C.B., Júnior, L.A.L., Oliveira, I.L., Câmara, P.R.S., 2015. Atividade antinociceptiva do extrato de *Schinus terebinthifolius* em modelos experimentais in vivo. *Medicina & Pesquisa* 2, 31-37.
- Neves, S.A., Freitas, A.L.P., Sousa, B.W., Rocha, M.I.A., Correia, M.V.O., Sampaio, D.A., Viana, G.S.B., 2007. Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40, 127-134.
- Oliveira, T.L.S., Morais, S.R., Sá, S., Oliveira, M.G., Florentino, I.F., Silva, D.M., Carvalho, V.V., Silva, V.B., Vaz, B.G., Sabino, J.R., Costa, E.A., Paula, J.R., 2017. Antinociceptive, anti-inflammatory and anxiolytic-like effects of the ethanolic extract, fractions and Hibalactone isolated from *Hydrocotyle umbellata* L. (Acariçoba) – Araliaceae. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 95, 837-846.
- Pajohanfar, N.S., Mohebbi, E., Hosseini-Bandegharai, A., Amin, M., Vaseghi, G., Amin, B., 2017. Simvastatin prevents morphine-induced tolerance and dependence in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 93, 406-411.
- Piccinelli, A.C., Santos, J.A., Konkiewitz, E.C., Oesterreich, S.A., Formagio, A.S.N., Croda, J., Ziff, E.B., Kassuya, C.A.L., 2015. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. *Nutritional Neuroscience* 18, 217-224.
- Pires, A.F., Assreuy, A.M.S., Lopes, É.A.B., Celedônio, N.R., Soares, C.E.A., Rodrigues, N.V.F.C., Sousa, P.L., Benevides, R.G., Nagano, C.S., Cavada, B.S., Leal-Cardoso, J.H., Coelho-de-Souza, A.N., Santos, C.F., 2013. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 27, 201-209.
- Procópio, T.F., Patriota, L.L.S., Moura, M.C., Silva, P.M., Oliveira, A.P.S., Carvalho, L.V.N., Lima, T.A., Soares, T., Silva, T.D., Coelho, L.C.B.B., Pitta, M.G.R., Rêgo, M.J.B.M., Figueiredo, R.C.B.Q., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., 2017. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. *International Journal of Biological Macromolecules* 98, 419-429.
- Ramos, D.B.M., Araújo, M.T.M.F., Araújo, T.C.L., Neto, O.G.S., Silva, M.G., Silva, Y.A., Torres, D.J.L., Patriota, L.L.S., Melo, C.M.L., Lorena, V.M.B., Paiva, P.M.G., Mendes, R.L., Napoleão, T.H., 2019. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice.

- Rivanor, R.L. C., Val, D.R., Ribeiro, N.A., Silveira, F.D., Assis, E.L., Franco, Á.X., Vieira, L.V., Queiroz, I.N.L., Chaves, H.V., Bezerra, M.M., Benevides, N.M.B., 2018. A lectin fraction from green seaweed *Caulerpa cupressoides* inhibits inflammatory nociception in the temporomandibular joint of rats dependent from peripheral mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules* 115, 331-340.
- Sabino, M.A.C., Ghilardi, J.R., Jongen, J.L.M., Keyser, C.P., Luger, N.M., Mach, D.B., Peters, C.M., Rogers, S.D., Schwei, M.J., de Felipe, C., Mantyh, P.W., 2002. Simultaneous reduction in cancer pain, bone destruction, and tumor growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *Cancer Research* 62, 7343-7349.
- Sarmiento-Neto, J.F., Nascimento, L.G., Felipe, C.F.B., Sousa, D.P., 2016. Analgesic potential of essential oils. *Molecules* 21, 20.
- Selvaraj, D., Gangadharan, V., Michalski, C.W., Kurejova, M., Stösser, S., Srivastava, K., Schweizerhof, M., Waltenberger, J., Ferrara, N., Heppenstall, P., Shibuya, M., Augustin, H.G., Kuner, R., 2015. A functional role for VEGFR1 expressed in peripheral sensory neurons in cancer pain. *Cancer Cell* 27, 780-796.
- Shinohara, A., Andoh, T., Saiki, I., Kuraishi, Y., 2018. Analgesic effects of systemic fentanyl on cancer pain are mediated by not only central but also peripheral opioid receptors in mice. *European Journal of Pharmacology* 833, 275–282
- Silva, J.C., Raquel, S., Lima, G., Gonçalves, R., Júnior, D.O., Guedes, R., 2013. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. *Revista Brasileira de Farmácia* 94, 18-23.
- Vanderlei, E.S.O., Patoilo, K.K.N.R., Lima, N.A., Lima, A.P.S., Rodrigues, J.A.G., Silva, L.M.C.M., Lima, M.E.P., Lima, V., Benevides, N.M.B., 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. *International Immunopharmacology* 10, 1113-1118.
- Wang, N., Dong, Y., Zhao, L., Zhao, H., Li, W., Cui, J., 2018. Factors associated with optimal pain management in advanced cancer patients. *Current Problems in Cancer* 43, 77-85.
- Webb, J.A., LeBlanc, T.W., 2018. Evidence-based management of cancer pain. *Seminars in Oncology Nursing* 34, 215-226
- Yaksh, T.L., Woller, S., Ramachandran, R., Sorkin, L., 2015. The search for novel analgesics: targets and mechanisms. *F1000Prime Reports* 7, 56.

Figure captions

Figure 1. Evaluation of the antinociceptive effect of *S. terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) on sarcoma 180-bearing mice through the spontaneous nociception (A, B) and mechanical hyperalgesia (C) tests. (A) The mean scores of the use of the hind right paw by healthy mice from the sham group and tumor-bearing mice treated for 14 days with 0.15 M NaCl (negative control), 10 mg/kg morphine (positive control), or SteLL at 1 and 2 mg/kg. (B) Number of licks on the right hind paw. (C) Intensity of the paw flexion reaction of the mice after mechanical stimulation using Von Frey filaments. The bars represent the mean $\pm$ SEM of all the values recorded during the assay on the days of evaluation. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among the groups.

Figure 2. Evaluation of the antinociceptive effect of *S. terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) on sarcoma 180-bearing mice in the hot plate test. The latency time in the hot plate was evaluated 30 min (A) and 90 min (B) after the administration of the last dose of each treatment on day 14. The groups were: healthy mice from the sham group and tumor-bearing mice treated for 14 days with 0.15 M NaCl (negative control), 10 mg/kg morphine (positive control) or SteLL at 1 and 2 mg/kg. The bars represent the mean $\pm$ SEM. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among the groups.

Figure 3. Evaluation of the volume (A) and weight (B) of the hind right paw of healthy mice (sham group) and the sarcoma 180-bearing mice treated or not with *S. terebinthifolia* leaf lectin, SteLL (1 and 2 mg/kg), for 14 days. In the negative control, the mice received 0.15 M NaCl. A group treated with morphine (10 mg/kg) was also evaluated. The bars represent the mean $\pm$ SEM. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among the groups.

Figure 1

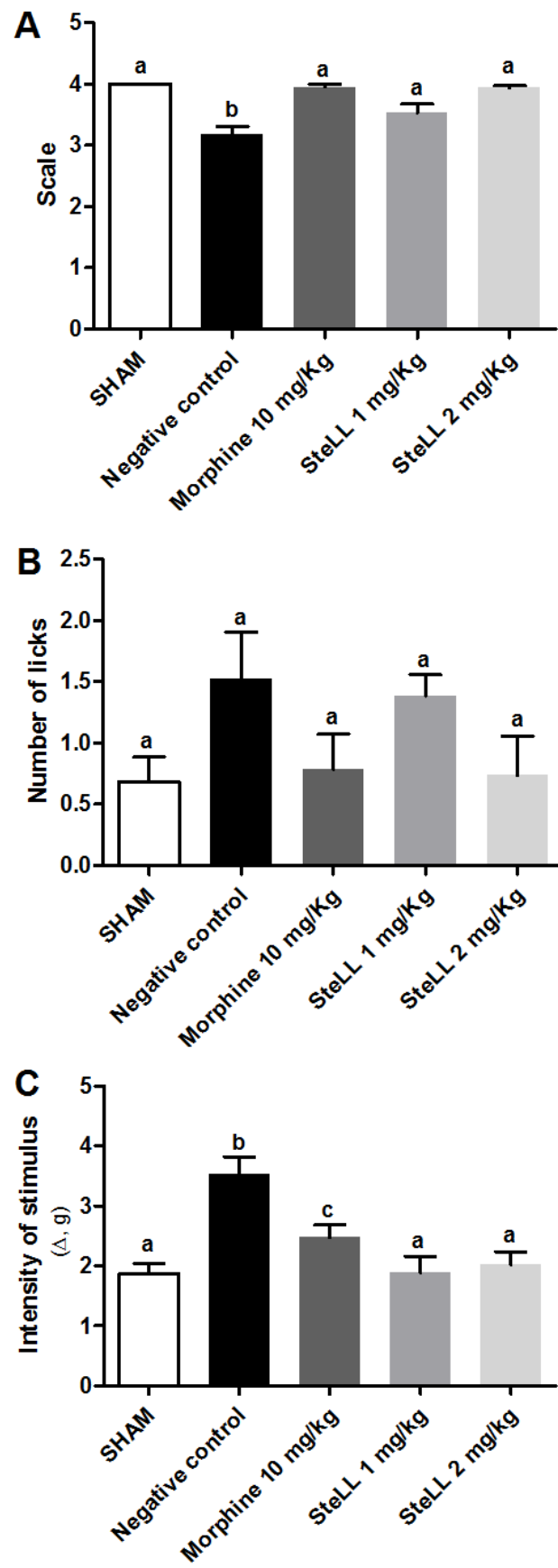


Figure 2

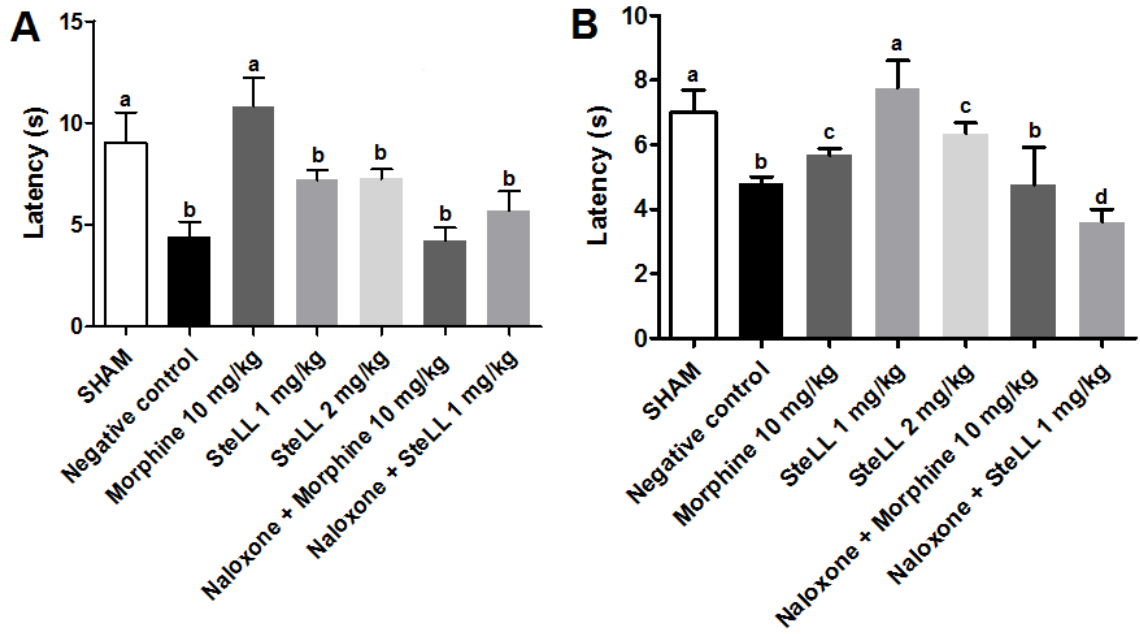


Figure 3

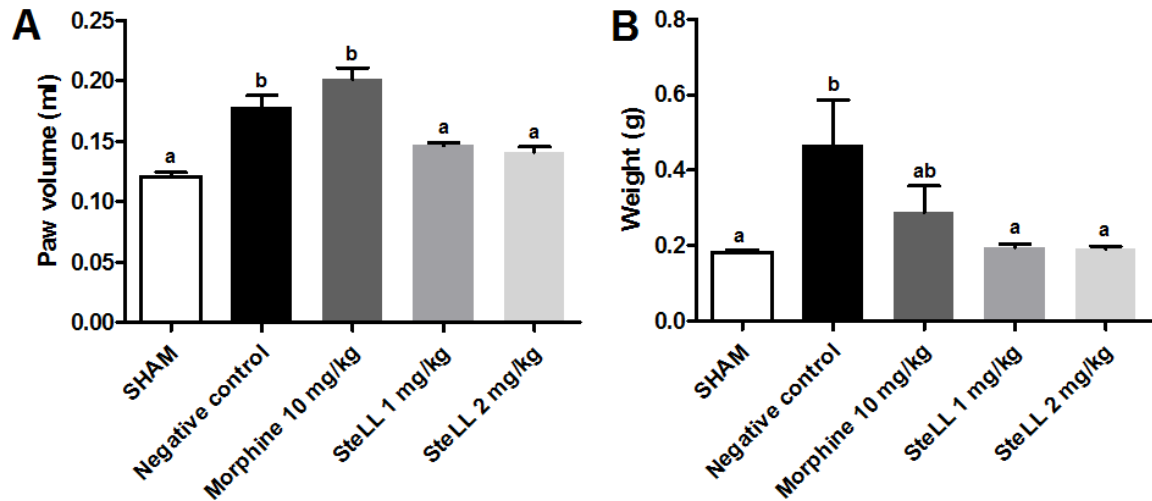


Table 1. Hematological parameters of healthy animals (Sham group) and sarcoma 180-bearing mice treated intraperitoneally during 14 days with 0.15 M NaCl (negative control), morphine 10 mg/kg and *S. terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) at 1 and 2 mg/kg.

Parameters	Groups			
	Sham	Negative control	SteLL 1 mg/kg	SteLL 2 mg/kg
Erythrocytes ($10^6/\text{mm}^3$)	6.73 ± 0.84	6.39 ± 0.53	6.99 ± 0.65	7.40 ± 0.16
Hemoglobin (g/dL)	12.35 ± 2.12	11.59 ± 1.04	12.72 ± 1.66	13.82 ± 0.34
Hematocrit (%)	37.05 ± 6.38	34.78 ± 3.13	38.16 ± 4.98	41.46 ± 1.02
MCV (μ^3)	53.75 ± 4.04	54.50 ± 1.58	53.40 ± 2.78	55.50 ± 1.04
MCH (pg)	16.25 ± 2.32	14.60 ± 0.48	14.52 ± 1.45	12.85 ± 0.16
Leukocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	4.53 ± 0.57	6.44 ± 0.86	5.02 ± 0.72	5.95 ± 1.74
Lymphocytes (%)	95.10 ± 0.90	82.18 ± 5.20	87.34 ± 5.67	77.48 ± 7.52
Granulocytes (%)	15.8 ± 1.01	15.12 ± 4.44	11.42 ± 5.83	19.42 ± 6.96
Monocytes (%)	3.32 ± 0.11	2.70 ± 0.91	1.24 ± 0.26	3.10 ± 0.96

The values corresponds to mean $\pm$ SEM. MCV: mean corpuscular volume. MCH: mean corpuscular hemoglobin.

4 CONCLUSÕES

O extrato salino e a lectina da folha de *Schinus terebinthifolia* (SteLL) são agentes antitumorais contra o sarcoma 180, sem promover alterações hematológicas relevantes e efeitos genotóxicos em camundongos; porém, alterações histológicas nos rins e fígado foram observadas. O efeito antitumoral pode estar relacionado à atividade citotóxica da lectina, através da indução de apoptose, e ação anti-angiogênica

Diversas espécies da família Anacardiaceae possuem compostos antinociceptivos com atividade analgésica periférica e/ou central, sendo potenciais opções terapêuticas para o tratamento da dor. Porém, nenhum estudo havia testado a atividade de uma lectina purificada de espécie dessa família

SteLL foi capaz de reduzir a hiperalgesia decorrente da presença do sarcoma 180 na pata, melhorando o uso dos membros pelos camundongos portadores de tumor. A ação antinociceptiva provavelmente está relacionada à ação antitumoral da lectina, bem como a uma ação central envolvendo a modulação de receptores opioides.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAO, M. M. et al. Therapeutical evaluation of bevacizumab application in relapsed pterygium. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 76, n. 5, p. 232-235, 2017.
- ALI, M.A. et al. Antibacterial activity and cytotoxicity of three lectins purified from *Cassia fistula* Linn. seeds. **Journal of Medical Sciences**. 2003;v3. n.3, p.240-244, 2003.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ALVES, S. M. et al. The efficacy of a lectin from *Abelmoschus esculentus* depends on central opioid receptor activation to reduce temporomandibular joint hypernociception in rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 101, p. 478-484, 2018.
- AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 2, p. 95-102, 2003.
- ARANDA-SOUZA, M. A. et al. A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. **Toxicon**, v. 82, p. 97-103, 2014.
- ARAÚJO, L. C. C. et al. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.
- ARAÚJO, R. M. S. et al. Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. **Natural Products and Bioprospecting**, v1, n.2, p. 97-100, 2011.
- ARORA, N.; GUPTA, A.; SINGH, P. P. Biological agents in gastrointestinal cancers: Adverse effects and their management. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 8, n.3, p. 485-498, 2017.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Cancer and Inflammation: Implications for Pharmacology and Therapeutics. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, n. 4, p. 401-406, 2010.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? **The Lancet**, 2001.
- BARRETO, R.C.; PEREIRA, G.A.S.; COSTA, L.J.; CAVALCANTI, H.R.B.B. O Duplo Papel da Inflamação no Surgimento das Lesões Cancerígenas. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. v.14(4), p.107-114, 2011.
- BARROSO-NETO, I. L. et al. Structural analysis of a *Dioclea sclerocarpa* lectin: Study on the vasorelaxant properties of Dioclea lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 464-470, 2016.

BEZERRA, G. A. *et al.* Structural studies of an anti-inflammatory lectin from *Canavalia boliviana* seeds in complex with dimannosides. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

BOSE, P. P. *et al.* A glucose/mannose binding lectin from litchi (*Litchi chinensis*) seeds: Biochemical and biophysical characterizations. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 6, p. 242–252, 2016.

BOSMAN, F. T. Integrative Molecular Tumor Classification: A Pathologist's View. **Encyclopedia of Cancer**, p. 279–285, 1 jan. 2019.

BRASILEIRO-FILHO, G. *Bogliolo - Patologia Geral, 5ª edição*. Guanabara Koogan, 2013.

BRENNER, D. R. *et al.* Cancer incidence attributable to inadequate physical activity in Alberta in 2012. **CMAJ Open**, v. 5, n. 2, p. E338–E344, 2017.

BRITO, J.S. *et al.* Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 865–872, 2017.

BROSSON, S. *et al.* Identification and preliminary characterization of a putative C-type lectin receptor-like protein in the T. cruzi tomato lectin endocytic-enriched proteome. **Microbiological Research**, v. 205, p. 73–79, 2017.

CAMPOS, J. K. L. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. **Biochimie Open**, v. 2, p. 62–68, 2016.

CARNEIRO, F.B. *et al.* Characterization of Leaf Extracts of *Schinus terebinthifolius* Raddi by GC-MS and Chemometric Analysis. **Pharmacognosy Magazine**, v.13, n.51, 2017.

CARVALHO, M. *et al.* Schinus terebinthifolius Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 15, p. 158–169, 2013.

CASTANHEIRA, L. E. *et al.* 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.

CHARAFEDDINE, M. A. *et al.* Proportion of cancer in a Middle eastern country attributable to established risk factors. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 337, 2017.

COELHO, J. S. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 7, p. 934–938, 2009.

COELHO, L.C.B.B. *et al.* Lectins, interconnecting proteins with biotechnological / pharmacological and therapeutic applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–2, 2017.

COLE, E. R. *et al.* Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 821–828, 2014.

COOPER G. M. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Development and Causes of Cancer. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>.

CUNHA, C. R. A. Avaliação da atividade antitumoral da lectina recombinante de *Cratylia mollis* (rCramoll) livre e encapsulada em lipossomas furtivos. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia). Departamento de Bioquímica. Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

CUNHA, C. R. A. et al. Encapsulation into stealth liposomes enhances the antitumor action of recombinant *Cratylia mollis* lectin expressed in *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. SEP, p. 1–11, 2016.

DERBAL, Y. Perspective on the dynamics of cancer. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 14, n. 1, p. 18, 2017.

DESHPANDE, P. P.; BISWAS, S.; TORCHILIN, V. P. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. **Nanomedicine (London, England)**, v. 8, n. 9, p. 1509–28, 2013.

DHANASEKARAN, R.; KWO, P. Y. The liver in oncology. **Clin Liver Dis**, v. 21, p. 697–707, 2017.

DOBBINS, M.; DECORBY, K.; CHOI, B. C. K. The Association between Obesity and Cancer Risk: A meta-analysis of observational studies from 1985 to 2011. **ISRN Preventive Medicine**, v. 2013, p. 1–16, 2013.

EMBRAPA. Cultivo da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) para produção de pimenta-rosa. [recurso eletrônico] / Edinelson José Maciel Neves ... [et al.]. - Colombo : Embrapa Florestas, 2016. 24 p. : il. color. - (Documentos / Embrapa Florestas, ISSN 1980-3958 ; 294)

FANG, E. F. et al. A lectin with anti-HIV-1 reverse transcriptase, antitumor, and nitric oxide inducing activities from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. Extralong Autumn Purple Bean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2221–2229, 2010.

FARAJI, A. et al. Association of ABCB1 and SLC22A16 gene polymorphisms with incidence of doxorubicin-induced febrile neutropenia: A survey of Iranian breast cancer patients. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, 2016.

FIGUEIRÔA, E. O. et al. pCramoll and rCramoll lectins induce cell death in human prostate adenocarcinoma (PC-3) cells by impairment of mitochondrial homeostasis. **Toxicology in vitro**, v. 43, n. January, p. 40–46, 2017.

FONSECA, C., S.; QUEIROZ, E. D.; VENTUROLI, F. Identificação de espécies florestais na Escola de Agronomia da UFG. Goiânia, Fábio Venturoli, 2017. 70p

FRANCESONE, R.; HOU, V.; GRIVENNIKOV, S. I. Microbiome, inflammation, and cancer. **The Cancer Journal**, v. 20, n. 3, p. 181–189, 2014.

FREITAS, R. S. et al. Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and $\text{tnf-}\alpha$ and $\text{il-1}\beta$ suppression. **International Immunopharmacology**, v. 38, p. 313–323, 2016.

GAOFU, Q. et al. In vitro assessment of plant lectins with anti-pinewood nematode activity. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 1, p. 40–45, 2008.

GOMES, E. C. L. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação do fármaco bevacizumabe por cromatografia a líquido de alta eficiência. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 608–611, 2012

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 672–679, 2013.

GONDIM, A. C. S. Atividade antitumoral e antiviral de lectinas de leguminosas (tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae): ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Tese (Doutorado em Bioquímica). Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, 2014.

GRAY, J. M. et al. State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment. **Environmental Health**, v. 16, n. 1, p. 94, 2017.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n.6, p. 883–899. 2010.

GUIMARÃES, A. G. et al. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 69–76, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation**Cell, 2011.

HAN, H. et al. Hypertension and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **Scientific reports**, v. 7, p. 44877, 2017.

HANOUN, M. et al. Neural regulation of hematopoiesis, inflammation, and cancer. **Neuron**, v. 86, n. 2, p. 360–373, 2015.

HASHIM, O. H.; JAYAPALAN, J. J.; LEE, C.-S. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. **PeerJ**, v. 5, p. e3784, 2017.

HOCHBERG, U.; ELGUETA, M.F.; PEREZ, J. Interventional analgesic management of lung cancer pain. **Frontiers in Oncology**, v. 7, 2017.

HOPPER, J. T. S. et al. The tetrameric plant lectin banlec neutralizes HIV through bidentate binding to specific viral glycans. **Structure**, v. 25, n. 5, p. 773–782.e5, 2017.

HUANG, T.-T. et al. Resveratrol induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via activation of multiple apoptotic pathways. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 3, p. 720–728, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro : Inca, 2011. 128 p. : il

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

ITAKURA, Y. et al. Sugar-binding profiles of chitin-binding lectins from the hevein family: A comprehensive study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

JOHNSON, C. M. et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. **Cancer causes & control : CCC**, v. 24, n. 6, p. 1207–22, 2013.

KNELSON, E. H.; NEE, J. C.; BLOBE, G. C. Heparan sulfate signaling in cancer. **Trends in Biochemical Sciences**, 2014.

LACERDA, R. R. et al. Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L. var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 95, p. 1072–1081, 2017.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: Production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2011.

LIAO, J. H. et al. A multivalent marine lectin from *Crenomytilus grayanus* possesses anti-cancer activity through recognizing globotriose Gb3. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 14, p. 4787–4795, 2016.

LISBOA, M.S. et al. Estudo etnobotânico em comunidade quilombola Salamina/Putumujú em Maragogipe, Bahia. **Revista Fitos**, v. 11, n.1, p. 1-118, 2017.

LIU, B. et al. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 482, n. 1–2, p. 1–6, 2009.

LI, W. WEN et al. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, p.282-286, 2011.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, 2003.

MACKINTOSH, M. L. et al. The impact of obesity and bariatric surgery on circulating and tissue biomarkers of endometrial cancer risk. v. 650, p. 641–650, 2019.

- MAHAJAN, S. et al. Microbial F-type lectin domains with affinity for blood group antigens. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 491, n. 3, p. 708–713, 2017.
- MALTA, T. M. et al. Machine learning identifies stemness features associated with oncogenic dedifferentiation. **Cell**, v. 173, n. 2, p. 338–354.e15, 2018.
- MARTEL, C. et al. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 4, p. 664–670, 2017.
- MASHREGHI, M. et al. Angiogenesis biomarkers and their targeting ligands as potential targets for tumor angiogenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, p.2949–2965, 2018.
- MEHRZADI, S. et al. Hepatoprotective effect of berberine against methotrexate induced liver toxicity in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, n. August 2017, p. 233–239, 2018.
- MEDEIROS, M. L.S. et al. Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*, International Journal of Biological Macromolecules <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.167>
- MISRA, S. et al. Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 2015.
- MOLINARO, M. et al. Recent advances on pathophysiology, diagnostic and therapeutic insights in cardiac dysfunction induced by antineoplastic drugs. **BioMed Research International**, 2015.
- MORENO, F.B.M.B. et al. Identification of a new quaternary association for legume lectins. **Journal of Structural Biology**, v.161, p.133-143, 2008.
- MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. **Medicinal plants of Brazil**. Michigan: Reference Publications Incorporation. 2000. 501p.
- MORTON, J. F. Brazilian pepper-Its impact on people, animals and the environment. **Economic Botany**, v. 32, n. 4, p. 353–359, 1978.
- MU, J. et al. A novel high-mannose specific lectin from the green alga *Halimeda renschii* exhibits a potent anti-influenza virus activity through high-affinity binding to the viral hemagglutinin. **Marine Drugs**, v. 15, n. 8, 2017.
- MURRAY, R.H.; BENDER, D.A.; BOTHAM, K.M.; KENNELLY, P.J.; RODWELL, V. W.; WEIL, P.A. Bioquímica ilustrada de Harper. -29.ed. – Porto Alegre: AMGH, 2014.
- NAKAHARA, S.; RAZ, A. Biological modulation by lectins and their ligands in tumor progression and metastasis. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 8, n. 1, p. 22–36, 2008.
- NGAI, P. H. K.; NG, T. B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 314, n. 4, p. 988–993, 2004.

NUNES, B.S. et al Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 379, p. 609–616, 2009.

OLIVEIRA, A. P. S. et al. Biotechnological value of *Moringa oleifera* seed cake as source of insecticidal lectin against *Aedes aegypti*. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1683–1690, 2016.

OLIVEIRA, L.F.M. et al. Tempo de destilação e perfil volátil do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius*) em Sergipe. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.2, p.243-249, 2014.

ONUCHIC, A.C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev. Med.** (São Paulo), v.89, n.1, p. 21-31, 2010

.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Cancer. Disponível em:<
<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 11 de nov. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Guide To Cancer Early Diagnosis**. 2017.

OSTERNE, V. J. S. et al. Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 271–282, 2017.

PALHARINI, J. G. et al. Eutirucallin: A Lectin with antitumor and antimicrobial properties. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017.

PATRIOTA, L. L.S. et al. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 36–46, 2017.

PELL, S. K. Anacardiaceae. Cashew family.2009.Version 03 January 2009 (under construction). <http://tolweb.org/Anacardiaceae/21262/2009.01.03> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>

PICCINELLI, A. C. et al. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. **Nutritional Neuroscience**, v. 18, n. 5, p. 217–224, 2015.

PIRES, A.F. et al. Lectin purified from *Lonchocarpus campestris* seeds inhibits inflammatory nociception. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 53-60, 2019.

PLANTE, G. E.; VANITALLIE, T. B. Opioids for cancer pain: The challenge of optimizing treatment. **Metabolism: Clinical and Experimental**, 2010.

POIROUX, G. et al. Plant lectins targeting O-glycans at the cell surface as tools for cancer diagnosis, prognosis and therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, 2017.

POLK, A. et al. A systematic review of the pathophysiology of 5-fluorouracil-induced cardiotoxicity. **BMC pharmacology & toxicology**, v. 15, p. 47, 2014.

PROCÓPIO, T. F. et al. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 419–429, 2017.

PROCÓPIO, T. F. et al. *Schinus terebinthifolius* Leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–19, 2015.

QUEIRES, L. C. S. et al. Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. **Anticancer Research**, v. 26, n. 1 A, p. 379–387, 2006.

RAMAN, K.; KUBERAN, B. Chemical tumor biology of heparan sulfate proteoglycans. **Current chemical biology**, v. 4, n. 1, p. 20–31, 2010.

RAMOS, D. B. M. et al. Antimicrobial activity of *Cladonia verticillaris* lichen preparations on bacteria and fungi of medical importance. **Chinese Journal of Biology**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

RATNA, A.; MANDREKAR, P. Alcohol and cancer: Mechanisms and therapies. **Biomolecules**, 2017.

REID, B. M.; PERMUTH, J. B.; SELLERS, T. A. Epidemiology of ovarian cancer: a review. **Cancer biology & medicine**, v. 14, n. 1, p. 9–32, 2017.

RIVANOR, R. L. C. et al. A lectin fraction from green seaweed *Caulerpa cupressoides* inhibits inflammatory nociception in the temporomandibular joint of rats dependent from peripheral mechanisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 331–340, 2018.

ROSAS, E. C. et al. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 490–498, 2015.

RUNSAENG, P.; PUENGYAM, P.; UTARABHAND, P. A mannose-specific C-type lectin from *Fenneropenaeus merguensis* exhibited antimicrobial activity to mediate shrimp innate immunity. **Molecular Immunology**, v. 92, n. September, p. 87–98, 2017.

SANTOS, A. F. et al. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 794–798, 2010.

SANTOS JÚNIOR, H. M. et al. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 2, p. 231–238, 2010.

SANTOS, S. B. et al. Comparação da eficácia da aroeira oral (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com omeprazol em pacientes com gastrite e sintomas dispépticos: Estudo randomizado e duplo-cego. **GED - Gastreenterologia Endoscopia Digestiva**, v. 29, n. 4, p. 118–125, 2010.

- SATO, D. Y. O. et al. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. **Homeopathy**, v. 94, n. 1, p. 26–32, 2005.
- SCHMIDT, B. L. The neurobiology of cancer pain. **Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillo facial Surgeons**, v. 73, n. 12, p. S132–S135, 2015.
- SHARON, N.; LIS, H. **History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules** Glycobiology, 2004.
- SIEGEL, R.; MILLER, K.; JEMAL, A. Cancer statistics , 2015 . **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 1, p. 29, 2015.
- SILVA, D. S. M. DE A. et al. Avaliação da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no tratamento da mucosite oral induzida pela radioterapia exclusiva ou associada à quimioterapia: estudo piloto. **Revista de Saúde Coletiva da UEFS**, v. 6, n. 2, p. 59–65, 2016.
- SILVA, E.B. et al. Efeitos terapêuticos da utilização da aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi): uma Revisão da Literatura. **International Journal of Nutrology**, v. 11, n. S 01, p. Trab361, 2018.
- SILVA, M. C. et al . Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, supl. 1, p. 103-107, May 2010 .
- SILVA, M.D.C. et al. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 334-340, 2009.
- SILVA, P. M. et al. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 695–702, 2016.
- SINGH BAINS, J. et al. Mitogenic and anti-proliferative activity of a lectin from the tubers of Voodoo lily (*Sauromatum venosum*). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1723, p. 163–174, 2005.
- SINGH, R. et al. Peanut lectin stimulates proliferation of colon cancer cells by interaction with glycosylated CD44v6 isoforms and consequential activation of c-Met and MAPK: Functional implications for disease-associated glycosylation changes. **Glycobiology**, v. 16, n. 7, p. 594–601, 2006.
- SINGH, R. S. et al. Cyanobacterial lectins characteristics and their role as antiviral agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 474-496, 2017.
- SOARES, P. M. G. et al. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 46–49, 2013.

SONG, M.; CHAN, A. T. Environmental factors, gut microbiota, and colorectal cancer prevention. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 2, p. 275–289, 2019.

SONG, Q.; MERAJVER, S. D.; LI, J. Z. Cancer classification in the genomic era : five contemporary problems. **Human Genomics**, v. 9, n.27, p. 1–8, 2015.

SOUSA, A. M. et al. Modelos experimentais para o estudo da dor neuropática. **Revista dor**, São Paulo , v. 17, supl. 1, p. 27-30, 2016 .

SOUZA, L.P.F. et al. Lectins from *Synadenium carinatum* (ScLL) and *Artocarpus heterophyllus* (ArtinM) are able to induce beneficial immunomodulatory effects in a murine model for treatment of *Toxoplasma gondii* infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. November, p. 1–10, 2016.

STEWART, C. M. et al. The value of cell-free DNA for molecular pathology. **Journal of Pathology**, v. 244, n. 5, p. 616–627, 2018.

STOCK, C. C. et al. Sarcoma 180 screening data. **Cancer research**, v. 20, 1960.

THAKUR, K. et al. *Sauromatum guttatum* lectin: Spectral studies, lectin-carbohydrate interaction, molecular cloning and in silico analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1267–1279, 2017.

TARNOWSKI, G. S.; MOUNTAIN, I. M.; STOCK, C. C. Influence of genotype of host on regression of solid and ascitic forms of sarcoma 180 and effect of chemotherapy on the solid form. **Cancer Research**, v. 33, n. 8, p. 1885–1888, 1973.

THOMAS, S. et al. Methotrexate is a JAK/STAT pathway inhibitor. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, 2015.

TSENG, C.-H. Type 2 Diabetes Mellitus and Kidney Cancer Risk: A Retrospective Cohort Analysis of the National Health Insurance. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0142480, 2015.

ULIANA, M.P. et al. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops & Products**, v. 83, p. 235–240, 2016.

VALADEZ-VEGA, C. et al. Purification, biochemical characterization, and bioactive properties of a lectin purified from the seeds of white tepary bean (*Phaseolus acutifolius* variety *latifolius*). **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2561–2582, 2011.

VAN DEN BEUKEN-VAN EVERDINGEN, M. H.J. et al. Update on prevalence of pain in patients with cancer: systematic review and meta-analysis. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 51, n. 6, p. 1070–1090.e9, 2016.

VARKI, A. et al. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Chapter 47. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453023/> doi: 10.1101/glycobiology.3e.047

VASUDEV, N. S.; REYNOLDS, A. R. Anti-angiogenic therapy for cancer: Current progress, unresolved questions and future directions. **Angiogenesis**, v. 17, p. 471–494, 2014.

WANG, H.; GAO, J.; NG, T. B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 275, n. 3, p. 810–6, 2000.

YANG, N. et al. Structural basis for the tumor cell apoptosis-inducing activity of an antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. **Journal of Molecular Biology**, v. 387, n. 3, p. 694–705, 2009.

YOON, T. J. et al. Antitumor activity of the *Korean mistletoe* lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 10, p. 861–7, 2003.

YOON, T. J. et al. Lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) induce apoptosis in tumor cells. **Cancer Letters**, v. 136, n. 1, p. 33–40, 1999.

ZENG, F. et al. Occupational exposure to pesticides and other biocides and risk of thyroid cancer. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 74, n. 7, p. 502–510, 2017.

ZHANG, Q.; ZHU, B.; LI, Y. Resolution of cancer-promoting inflammation: A new approach for anticancer therapy. **Frontiers in Immunology**, 2017.

ZUO, Z. et al. Purification and characterization of a novel plant lectin from *Pinellia ternata* with antineoplastic activity. **Springer Plus**, v. 1, n. 1, p. 13, 2012.

**APÊNDICE A- ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO JOURNAL OF
ETHNOPHARMACOLOGY**

**Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and
lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice**

Journal of Ethnopharmacology, volume 233, p. 148-157, 2019.

doi:10.1016/j.jep.2019.01.011



Fator de impacto: 3.115 (JCR-2018)



Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice

Dalila de Brito Marques Ramos^{a,b}, Maria Taís de Moura Fontes Araújo^c, Tarcísio Cícero de Lima Araújo^c, Osmar Galvão dos Santos Neto^c, Mariana Gama e Silva^c, Yasmym Araújo Silva^c, Diego José Lira Torres^d, Leydianne Leite de Siqueira Patriota^a, Cristiane Moutinho Lagos de Melo^e, Virginia Maria Barros de Lorena^d, Patrícia Maria Guedes Paiva^b, Rosemary Luciane Mendes^c, Thiago Henrique Napoleão^{b,*}

^a Campus Amílcar Ferreira Sobral, Universidade Federal do Piauí, Floriano, Piauí, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^c Laboratório de Oncologia Experimental, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brazil

^d Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil

^e Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Brazilian pepper tree
Anticancer
Lectin
Antiangiogenic activity
Genotoxicity evaluation

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Schinus terebinthifolia* Raddi is a plant broadly used in folk medicine and the use of its leaf extract as an antitumor agent has been reported.

Aim of the study: To evaluate the antitumor potential and the toxicity of saline extract (SE) and lectin (SteLL) from *S. terebinthifolia* leaves in sarcoma 180-bearing mice.

Materials and methods: Cytotoxicity to sarcoma 180 cells was tested *in vitro*, and antitumor assay was performed using Swiss female mice. The treatments (0.15 M NaCl, negative control; methotrexate 1.5 mg/kg, positive control; SE 100 mg/kg; SteLL 1 and 5 mg/kg) by intraperitoneal injections started on the 8th day after tumor inoculation and lasted 7 days. It was analyzed: tumor weight; number and gauge of tumor vessels; hematological and biochemical parameters; histopathological changes; and occurrence of micronuclei in bone marrow cells.

Results: SE and SteLL showed IC₅₀ values (concentrations that reduced cell viability to 50%) of 301.65 and 8.30 µg/mL, respectively. The lectin was able to induce apoptosis. Treatments with the extract and lectin caused a 57.6–73.6% reduction in tumor weight, which was not significantly different from the reduction in the methotrexate group. Tumors of animals treated with SteLL at 5 mg/kg showed reduced number of secondary vessels while the gauge was lower in all treated groups. In the groups treated with SteLL, tumors showed reduced and slightly vascularized parenchyma, with necrosis in the center and at the periphery. No alterations in the blood levels of urea, creatine, and glucose were detected while serum AST level was moderately increased in the SE group. Histopathological analysis revealed vacuolization and steatosis in the liver of animals treated with the extract and lectin. In addition, the treatments with SE and SteLL resulted in the reduction of filtration space and alterations in tubular architecture in kidneys. In respect to hematological parameters, it was only detected increase in the number of monocytes in SE group. The extract and lectin did not induce the formation of micronuclei in the bone marrow cells.

Conclusions: SE and SteLL had antitumor effect against sarcoma 180 without inducing hematological changes and genotoxic effects in mice; however, some degree of hepatic and renal toxicity was observed, suggesting the evaluation of drug delivery strategies in the future.

Abbreviations: AST, aspartate aminotransferase; FBS, fetal bovine serum; HA, hemagglutinating activity; IC₅₀, concentrations that reduce cell viability to 50%; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) – 5-(3-carboxymethoxyphenyl) – 2-(4-sulfophenyl) – 2H-tetrazolium; MTX, methotrexate; PBS, phosphate-buffered saline; PHA, *Phaseolus vulgaris* agglutinin; SDS-PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulphate; SE, saline extract; SteLL, *Schinus terebinthifolia* leaf lectin

* Corresponding author.

E-mail addresses: thiagohn86@yahoo.com.br, thiago.napoleao@ufpe.br (T.H. Napoleão).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.011>

Received 5 December 2018; Received in revised form 12 January 2019; Accepted 14 January 2019

Available online 15 January 2019

0378-8741/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer, malignant tumors, and neoplasms are terms used for several diseases characterized by cells with abnormal growth and invasive ability, corresponding to the second leading cause of death globally (World Health Organization, 2017). In addition to the high incidence of these diseases, many of the chemotherapeutics currently available have high toxicity to non-target cells while some tumors are resistant to the drugs, which stimulate the search for new therapies (Tessmann et al., 2017).

Lectins are proteins capable of binding to carbohydrates in a specific and reversible manner, being able to interact differentially with glycoconjugates present at cell surfaces (Coelho et al., 2017). These proteins have been studied for several biomedical applications, including their potential as new antitumor agents and use in the diagnosis of cancer. Some lectins can specifically recognize malignant transformed cells by the altered glycosylated patterns of the membrane which are different from those of normal cells; hence these proteins are interesting candidates for cancer chemotherapy (Liao et al., 2016; Poiroux et al., 2017).

Schinus terebinthifolia Raddi is a plant belonging to Anacardiaceae family, popularly known as "aroeira da praia" in Portuguese and Brazilian pepper tree in English. This plant is well recognized due to its medicinal properties; it has been used against inflammation, urinary tract infections, and skin ulcers (Carvalho et al., 2013). In addition, reviews on the medicinal importance of this plant have reported the use of leaf decoction and macerated root juice as antitumor agents (Morton, 1978; Mors et al., 2000). Antioxidant activity was detected in the ethanol extracts of the leaves, bark, stem and fruits (Costa et al., 2015). It was demonstrated that a hydro-alcoholic leaf extract has anti-inflammatory activity in zymosan-induced arthritis model, reducing joint diameter and neutrophil influx for synovial tissues (Rosas et al., 2015). Dichloromethane extract from fruits showed cytotoxic activity on Caco-2 (human epithelial colorectal adenocarcinoma) cells (Oliveira et al., 2018) and aqueous extract from the leaves was cytotoxic to DU-145, PC-3 and LNCaP (prostate cancer) cells (Queires et al., 2013). In addition, essential oil obtained from *S. terebinthifolia* berries showed cytotoxicity to breast cancer cells MCF-7 (Bendaoud et al., 2010). Studies performed by our group showed that saline extract (SE) of *S. terebinthifolia* leaves contains a chitin-binding lectin (SteLL) that can be isolated by affinity chromatography. SteLL has been found to possess antibacterial activity against human pathogenic species (Gomes et al., 2013).

The present work aimed to evaluate the antitumor potential of the SE from *S. terebinthifolia* leaves and isolated SteLL. For this, we used mice transplanted with sarcoma 180 cells, which are able to generate an ascites tumor (also known as Crocker tumor) broadly used for the evaluation of anticancer drugs *in vivo* (Gao et al., 2017). In addition, toxicological parameters and genotoxicity were measured upon treatments with the extract and SteLL.

2. Materials and methods

2.1. Extract preparation and lectin isolation

Leaves of *S. terebinthifolia* (plant name checked in theplantlist.org) were collected at the campus of the Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brazil), with authorization (36301) of the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade from Brazilian Ministry of Environment. The access was recorded (AED6BF8) in the Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). The leaves were washed with tap water, dried at 28 °C for 7 days and then pulverized in a blender. The flour was suspended in 0.15 M NaCl (10% w/v) and homogenized for 16 h at 4 °C. After centrifugation (15 min, 9000g, 4 °C), the saline extract (SE) was obtained. Protein concentration was determined according to Lowry

et al. (1951) using a standard curve of bovine serum albumin (31.25–500 µg/mL). The carbohydrate-binding ability of lectin molecules present in SE was monitored by hemagglutinating activity (HA) assay as described by Procópio et al. (2017).

SteLL was isolated from SE according to the protocol described by Gomes et al. (2013). SE (147 mg of protein) was loaded on a chitin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) column (7.5 × 1.5 cm) previously equilibrated with 0.15 M NaCl at a flow rate of 20 mL/h. The column was washed with the equilibrating solution to remove unbound proteins and afterwards, SteLL was eluted with 1.0 M acetic acid. Fractions of 2 mL were collected and monitored for absorbance at 280 nm. SteLL was dialyzed against distilled water (6 h, with two liquid changes) using a 10-kDa cut-off cellulose membrane (Sigma-Aldrich), lyophilized and resuspended in 0.15 M NaCl. Protein concentration and HA were evaluated and SteLL homogeneity was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under denaturing conditions as described by Laemmli (1970).

2.2. Ethical permission and approval

All the experimental procedures described below were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Universidade Federal do Vale do São Francisco (authorization number 0002/180816).

2.3. Evaluation of *in vitro* cytotoxicity to sarcoma 180 cells

For the cytotoxicity assay, 2 mL of ascitic fluid were withdrawn from the peritoneal cavity of sarcoma 180-bearing animals, washed with PBS and centrifuged at 100g for 3 min. The supernatant was discarded and then RPMI 1640 medium with HEPES (Cultilab Materiais para Cultura de Células, Campinas, Brazil), supplemented with 10% (w/v) fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich), was added. Cell viability was evaluated by the trypan blue exclusion method (Phillips, 1973) using a Neubauer chamber. Next, the cells were plated in 96-well microplates (1 × 10⁵ cells per well) and SE or SteLL was added to the wells such that the final concentration ranged between 25 and 400 µg/mL (SE) or 1.56 and 25 µg/mL (SteLL). Methotrexate (Sigma-Aldrich) at 1.56–400 µg/mL was used as positive control and 0.15 M NaCl was used as negative control. The plates were homogenized on a shaker (Biomixer) and then incubated for 24 h at 37 °C. After this period, the MTS reagent—CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega Corporation, WI, USA) was added to each well according to the manufacturer's instructions. After 4 h of incubation, the absorbance at 492 nm was recorded using a TP-READER microplate reader (ThermoPlate, Brazil). The percentage of viable cells was calculated in comparison with the negative control and the concentration of sample that was able to reduce cell viability by 50% (IC₅₀) was calculated by probit regression (dose-response analysis) in MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

In order to determine the type of death induced by SteLL, the cells were cultured for 24 h in absence (control) or presence of SteLL at the IC₅₀ and 2 × IC₅₀. In addition, 20 µg/mL of PHA – *Phaseolus vulgaris* lectin (Sigma-Aldrich) – and 10 µg/mL methotrexate were used as positive controls. After centrifuging (450g, 4 °C, 10 min) and discarding the supernatant, 1.0 mL of PBS was added to the precipitate. The cells were resuspended and centrifuged again in the same conditions. The pellet was resuspended in 300 µL of a binding buffer (10.0 mM HEPES (pH 7.4), 150.0 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 1.0 mM MgCl₂, and 1.8 mM CaCl₂) and annexin V (AnnV) conjugated with fluorescein isothiocyanate (1:500) and propidium iodide (PI, 20 µg/mL) were added. The cells were analyzed in a BD Accuri C6 cytometer (BD Biosciences, San José, USA) and 20,000 events were recorded for each sample. The results were analyzed using the BD Accuri C6 Software. AnnV–/PI+ cells were considered necrotic and AnnV+ /PI– cells were considered to be in the early stages of apoptosis. Double staining was recorded as necrosis or late apoptosis and double negatives were

considered viable cells.

2.4. Antitumor assay

2.4.1. Treatment of animals

The antitumor activity was evaluated using Swiss female mice, 6–8-week-old, maintained under laboratory conditions of 24 °C, 12:12 light/dark photoperiod, and with free access to water and food. The mice were divided into six groups composed of six animals. The sarcoma 180 (American Type Culture Collection, 2017) cell suspension in PBS (5×10^6 cells/100 μ L) was subcutaneously inoculated on the back of each mouse, except those belonging to the Sham group. The treatments of the animals started on the 8th day after inoculation and lasted for 7 consecutive days. The Sham and negative control groups received 0.15 M NaCl i.p. and the positive control was treated with methotrexate at 1.5 mg/kg i.p. The other groups were treated with SE at 100 mg/kg i.p., SteLL at 1 mg/kg i.p., and SteLL at 5 mg/kg i.p. On the 15th day after inoculation of the tumors, the animals were euthanized using ketamine at 100 mg/kg (i.p) and xylazine at 10 mg/kg (i.p.).

2.4.2. Evaluation of water and food consumption

The weight of the animals and the food consumption were measured daily by using a semi-analytical balance. The water consumption was measured using a graduated cylinder. To obtain the values of relative water and food consumption, the following formula was used: Relative consumption = food consumed (g) or water consumed (mL) / body weight (g) $\times$ 100.

2.4.3. Evaluation of hematological and biochemical parameters

Twenty-four hours after the administration of the last dose, the anesthetized animals were submitted to retro-orbital blood collection in EDTA-treated tubes. The blood was used for hematological analysis and the serum was used for the biochemical assays. Global leucometry, counting of platelets and erythrocytes, determination of hematocrit, and measurements of mean corpuscular volume and mean hemoglobin concentration were carried out using a VET SDH-3 automated analyzer (Labtest, Vista Alegre, Brazil). Specific kits for the detection of urea (Urea 500, Doles, Goiânia, Brazil) and creatinine (Labtest, Vista Alegre, Brazil) were employed to determine the serum levels of these substances using a biochemical analyzer BIO 2000 (Bioplus, Barueri, Brazil). Glucose and aspartate aminotransferase (AST) levels were determined using specific kits (Glicose Enzimática Líquida, Doles, Goiânia, Brazil; and Transaminase Oxalacética, Labtest, Vista Alegre, Brazil), following the protocols of the respective manufacturers.

2.4.4. Evaluation of antiangiogenic activity

The skin of the region adjacent to the tumor was carefully dissected to evaluate the antiangiogenic activity of the treatments with SE, SteLL, and methotrexate. The tissues were photographed and analyzed for the number and gauge of primary and secondary blood vessels using the vessel width plugin of ImageJ software version 1.48 (Liuhanen et al., 2013).

2.4.5. Micronucleus counting and morphological evaluation in bone marrow cells

The femurs of the animals were excised and had the distal ends cut with the aid of a syringe. Next, the femur was perfused to obtain the bone marrow using FBS. The obtained cell suspension was centrifuged for 5 min at 1000 rpm. Next, the supernatant was discarded, and the cell concentrate was used to perform a slide smear, which was stained using Leishman dye (Laborclin, Pinhais, Brazil) and then analyzed using an optical microscope, using an immersion objective. The number of micronuclei and the cell morphology were observed. The frequency of micronuclei was determined by counting 1000 erythrocytes per slide.

2.4.6. Histopathological analysis

The tumor, lungs, liver, kidneys, spleen, heart, stomach and pancreas of each animal were removed and weighed. The relative weight of each organ was calculated using the formula: Relative weight = organ weight (g) / body weight (g) $\times$ 100. Tumors, livers and kidneys were packed into histological cassettes, fixed with buffered formalin and, after 12 h, transferred to 70% (v/v) ethanol. The organs were then processed for histopathological analysis with the impregnation in paraffin according to the protocol established by Tolosa et al. (2003). Sections of 5 μ m were cut using a Leica RM 25 RT microtome (Leica Biosystems, Nußloch Germany), stained with hematoxylin-eosin and analyzed by optical microscopy.

2.5. Statistical analysis

The data are expressed as means of replicates $\pm$ standard error values, which were calculated using GraphPad Prism version 5 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Significant differences ($p < 0.05$) between treatment groups were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's test using the GraphPad Prism software.

3. Results and discussion

Schinus terebinthifolia has been broadly used in folk medicine for several purposes, including as anticancer agent. The cytotoxic activity of extracts and essential oil from different parts of this plant has been reported as mentioned in 'Introduction'. However, studies on the *in vivo* anticancer potential of *S. terebinthifolia* leaves were not found in the literature, in spite of their traditional use against tumors (Morton, 1978; Mors et al., 2000). Thus, in the present work, we evaluated the antitumor effect of SE of *S. terebinthifolia* leaves and lectin (SteLL), a compound isolated from the leaves.

The SE used in this work was prepared according to the method described by Procópio et al. (2015); these authors also reported that the extract contains polymeric proanthocyanidins, hydrolysable tannins, heteroside and aglycone flavonoids, cinnamic acid derivatives, steroids and lectin. In the present study, thin layer chromatography analysis of the extract showed similar composition (data not shown). Affinity chromatography of SE on chitin column resulted in a single adsorbed peak eluted with 1.0 M acetic acid, corresponding to SteLL, with specific HA of 10,284. SteLL showed a single 14-kDa polypeptide band on SDS-PAGE (Fig. 1A), similar to the profile reported by Gomes et al. (2013) and confirming the homogeneity of the preparation used in the present work.

SE promoted a decrease in the viability of sarcoma 180 cells (Fig. 1B) with IC_{50} of 301.65 [230.02–373.27] μ g/mL. SteLL showed a stronger cytotoxic action (Fig. 1C) since the IC_{50} value was 8.30 [6.79–9.99] μ g/mL, approximately 36 times lower than that of the extract. Methotrexate decreased the viability of the tumor cells tested, presenting an IC_{50} of 16.64 [14.10–18.31] μ g/mL. This result indicates that the lectin is an active ingredient of SE against the cells. Flow cytometry analysis revealed that SteLL, at the IC_{50} and $2 \times IC_{50}$, induced the occurrence of apoptosis in tumor cells (Fig. 2). PHA and methotrexate also induced cell death.

Zuo et al. (2012) reported that treatment with 40 μ g/mL of a lectin from *Pinellia ternata* resulted in 85.2% inhibition of the proliferation of sarcoma 180 cells after 48 h of treatment. For SteLL, a concentration of 25 μ g/mL was able to promote a 82.68% decrease in viability of tumor cells after 24 h. On the other hand, the maximum inhibition promoted by SE was 58.49%, at a concentration of 400 μ g/mL.

Once the cytotoxic activities of SE and SteLL on sarcoma 180 cells were detected, the antitumor activity *in vivo* was evaluated. In general, the mice developed dense and ellipsoid-shaped tumor masses with irregular marginal border. These tumor masses contained areas of adipose tissue in their periphery, which were removed before processing

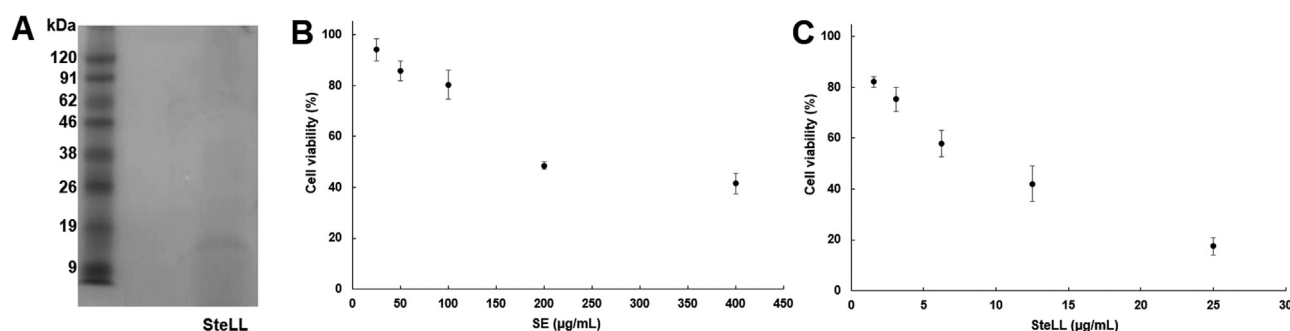


Fig. 1. Evaluation of *in vitro* cytotoxicity of saline extract (SE) from *Schinus terebinthifolia* leaves and *S. terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) to sarcoma-180 cells. The SDS-PAGE of SteLL (100 µg) confirmed the homogeneity of the lectin preparation (A). The viability of the sarcoma-180 cell decreased in a dose-response manner when incubated with SE (B) and SteLL (C).

for histopathological analysis. The highest concentration of SteLL tested was 20 times lower than that of SE since this lectin showed to be a much stronger cytotoxic agent than the extract. Fig. 3 shows the mean values of tumor weight at the end of the assay, revealing that all treatments reduced tumor weight in comparison with the negative control. In the treatment with SE, there was a 57.6% reduction in tumor weight whereas in the treatments with SteLL, there was a 73.6% and a 57.6% reduction in weights at 1 mg/kg and 5 mg/kg respectively. The standard drug methotrexate induced an 80.3% reduction in tumor weight.

There were no significant differences ($p > 0.05$) in the tumor weights observed in the treatments with SE, the two SteLL doses, and the positive control.

Several studies reported the potential of lectins for antitumor activity. Cunha et al. (2016) evaluated the antitumor activity of recombinant lectin from *Cratylia mollis* seeds (rCramoll) (both in its free and encapsulated forms) against sarcoma 180. The authors started the treatment 24 h after tumor induction at a dose of 7 mg/kg; the results demonstrated that rCramoll in the encapsulated form was more

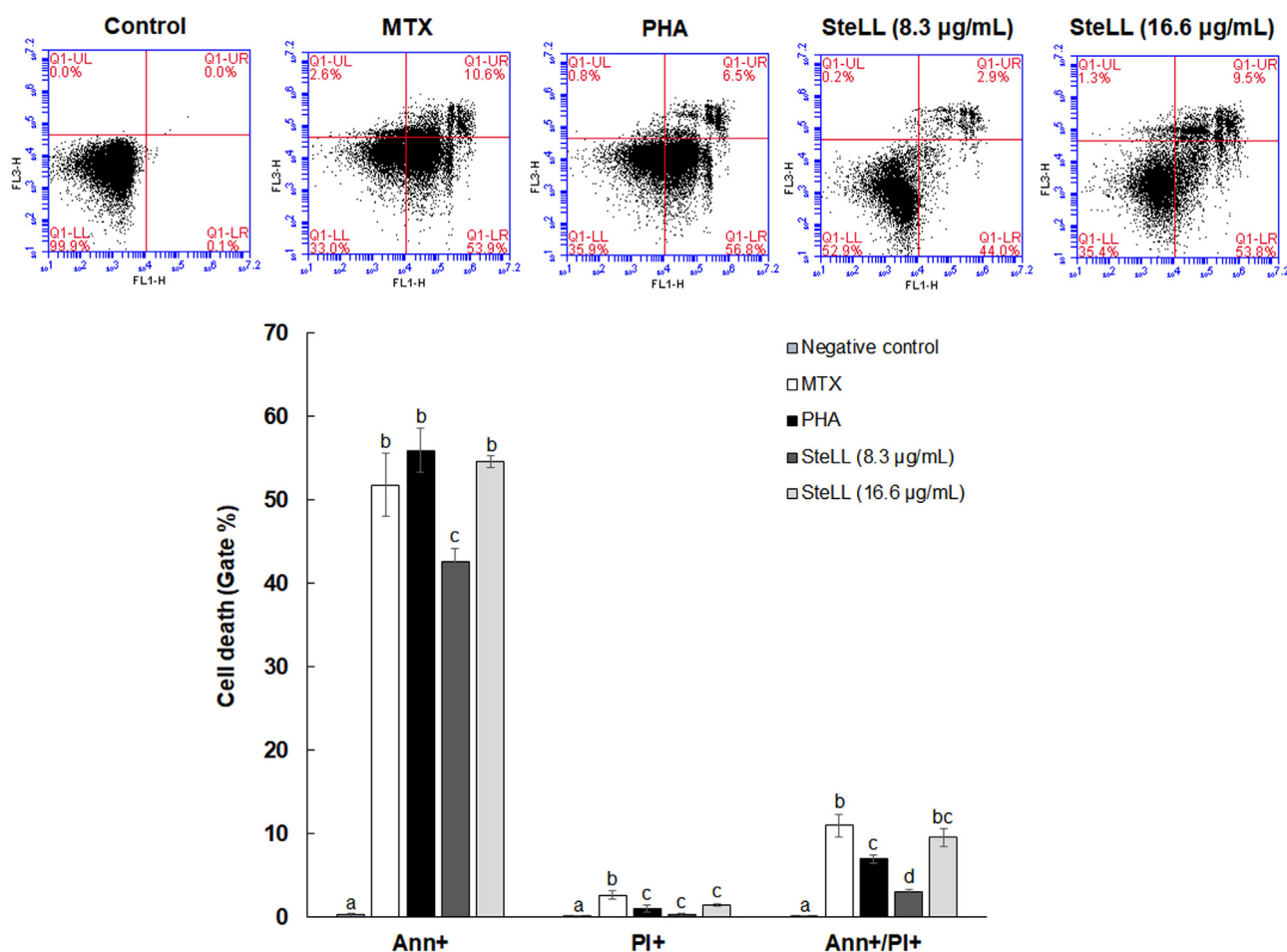


Fig. 2. Investigation of the cell death induced by *Schinus terebinthifolia* lectin (SteLL) at the IC_{50} (8.3 µg/mL) and $2 \times IC_{50}$ (16.6 µg/mL) in sarcoma 180 cells after incubation for 24 h. Cytotoxic effect was assessed by flow cytometry using annexin V (AnnV) and propidium iodide (PI). AnnV+/PI+ cells were considered necrotic and AnnV+/PI- cells were considered apoptotic. Double staining was considered as late apoptosis or necrosis. Methotrexate (MTX, 10 µg/mL) and the *Phaseolus vulgaris* lectin (PHA, 20 µg/mL) were used as positive controls. Representative FL1 vs. FL3 dot plots can also be seen. The bars represent the mean $\pm$ standard deviation of three experiments. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

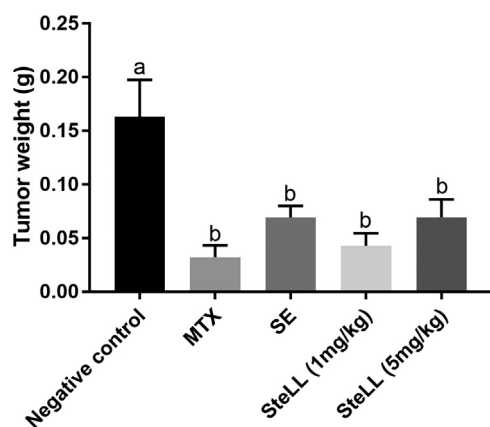


Fig. 3. Weight of sarcoma 180 tumors after treatment of animals for 7 days with intraperitoneal injection of 0.15 M NaCl (negative control), methotrexate (MTX, positive control), saline extract from *S. terebinthifolia* leaves (SE, 100 mg/kg) and *S. terebinthifolia* leaf lectin (SteLL at 1 and 5 mg/kg). Each bar represents the mean $\pm$ SE of the weight of the tumor of each animal. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

effective in inhibiting the tumor than the free lectin (inhibition of 75% and 59%, respectively) after 7 days of treatment. In the present study, the antitumor effect of SteLL (at 1 mg/kg and 5 mg/kg) was evaluated on tumors implanted 7 days before treatment, and high percentages of inhibition close to those obtained with rCramoll were observed.

Lectin isolated from *Russula* mushrooms caused a 67.6% inhibition in the growth of sarcoma 180 in animals that received an intraperitoneal dose of 5 mg/kg for 20 consecutive days, with treatment starting on the day that the tumor was inoculated (Zhang et al., 2010). At that same dose, SteLL achieved a 57.6% inhibition over a shorter duration of treatment, with treatment starting 7 days after the tumor was inoculated. SteLL was also more effective than CrataBL, a lectin from *Crataeva tapia* bark, which promoted a 41% reduction in the tumor weight of sarcoma 180 in animals treated for 7 days with a dose of 20 mg/kg (Araújo et al., 2011).

Angiogenesis is closely related to carcinogenesis; hence, anti-angiogenic agents are already part of the therapeutic measures for some types of cancer. For this reason, a large number of novel molecules isolated from plants or marine invertebrates that may interfere with this complex process have been studied. In this work, the vascular network around the tumors was photographed (Fig. 4A) and analyzed. No significant differences were observed in the number of primary and secondary vessels around the tumor of the animals treated with SE and SteLL at the concentration of 1 mg/kg (Fig. 4B). However, animals treated with methotrexate and SteLL at 5 mg/kg had a reduction in the number of secondary vessels (Fig. 4B). Regarding vessel gauge, all groups showed a significant ($p < 0.05$) reduction in vessel diameter in comparison with the negative control (Fig. 4C).

Histopathological analysis of the tumors from the animals in the negative control group (Fig. 5A) revealed a periphery composed of a pseudocapsule of connective tissue showing a discrete inflammatory infiltrate. Adjacent adipose tissue was invaded by tumor cell nests in some cases. The neoplastic parenchyma was composed of pleomorphic cells with irregular shape and sometimes, a vesiculated and hypocarotous cytoplasm. The cells also had eosinophilic (hyperchromasia) nuclear material showing loose chromatin and prominent nucleoli, multinucleation, and increased nucleus-cytoplasm ratio. The stroma showed abundant fibroblasts and the center of the tumor was characterized by an extensive area of caseous necrosis.

The periphery of the tumors of the methotrexate-treated animals (Fig. 5B) was characterized by a parenchyma composed of a few layers of cells organized as cords. In comparison with the negative control, the

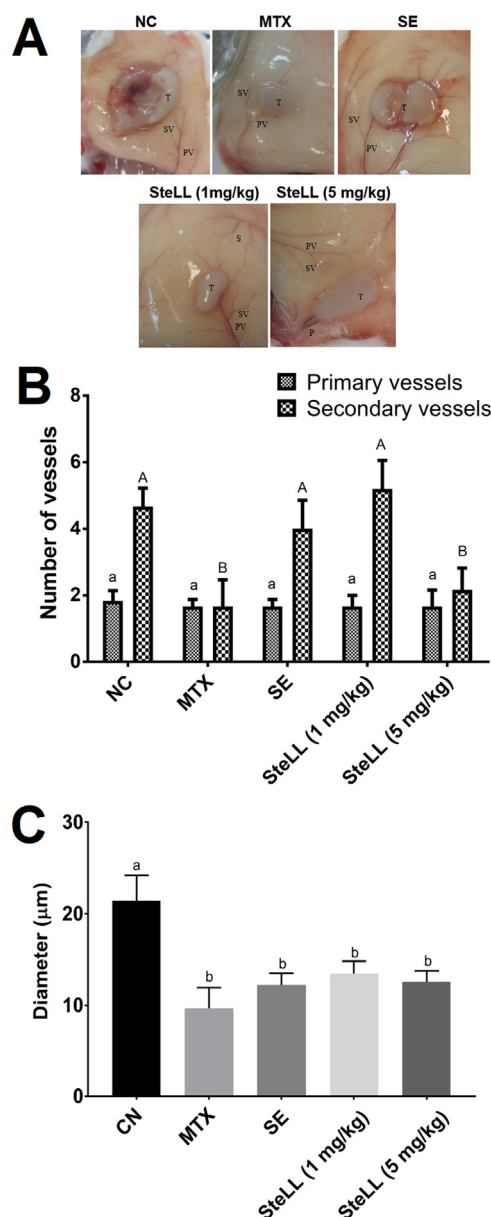


Fig. 4. Evaluation of the number of primary and secondary vessels around the sarcoma 180 tumor. (A) Representative photos of the tumors (T) and the vascular network (PV: primary vessel; SV: secondary vessel). (B) Number of vessels. (C) Gauge of vessels. The animals were treated for 7 days with intraperitoneal injection of 0.15 M NaCl (negative control), methotrexate (MTX, positive control), saline extract from *S. terebinthifolia* leaves (SE, 100 mg/kg) and *S. terebinthifolia* leaf lectin (SteLL at 1 and 5 mg/kg). Each bar represents the mean $\pm$ SE of the results for six animals. Different lowercase or uppercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

tumor cells were smaller and more homogeneous, and the necrosis region was larger. The stroma, although very noticeable, did not show prominent vascularization.

In the group treated with SE (Fig. 5C), the pseudocapsule of the neoplastic mass showed inflammatory infiltrates and nests of cancer cells that have invaded the skeletal striated muscle tissue located in the periphery of the tumor (implantation site). This region, as well as all the tumor parenchyma, was highly vascularized and composed of a thin layer of mononucleated or multinucleated cells, with loose chromatin and evident nucleolus. Hyperchromasia and cytoplasmic vacuolization adjacent to an extensive area of caseous necrosis were observed. These

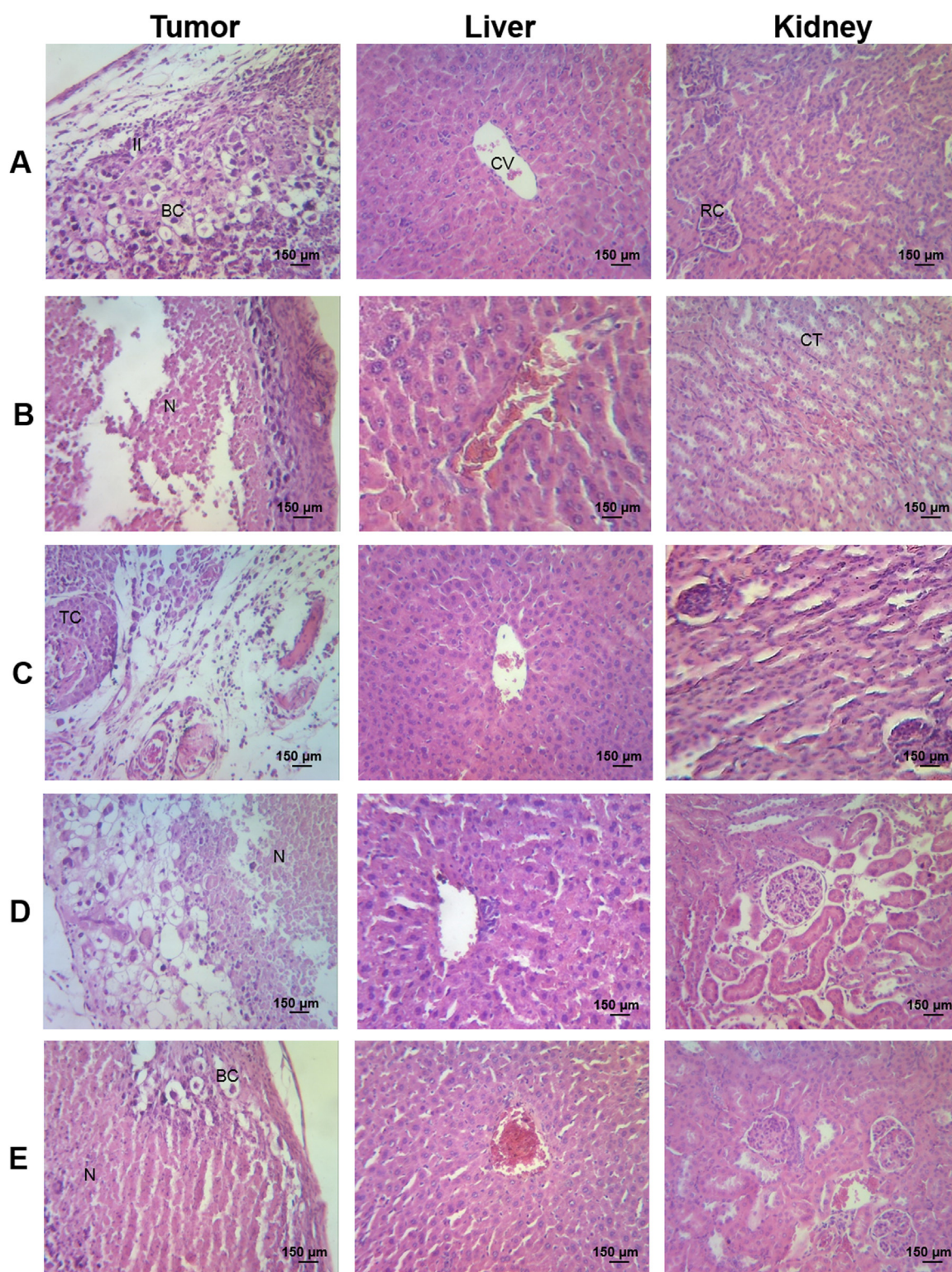


Fig. 5. Histopathological evaluation of the tumor, liver and kidney of the animals treated with intraperitoneal injection of 0.15 M NaCl (A), methotrexate (B), saline extract from *S. terebinthifolia* leaves, SE, at 100 mg/kg (C) and *S. terebinthifolia* leaf lectin, SteLL, at 1.0 mg/kg (D) and 5 mg/kg (E). The treatments started at the 8th day after tumor inoculation and lasted 7 days. II = Inflammatory infiltrate; CT = collecting tubules; BC = Balloon-like cells; CV = centrilobular vein; RC = Renal corpuscle; TC = tumor cells; N = necrosis.

data agree with the results found in the antiangiogenic analysis, in which there was no reduction in the number of primary and secondary vessels, but only in their gauge.

Tumors of the group treated with SteLL at 1 mg/kg (Fig. 5D) were characterized by parenchyma cells with extensive areas of necrosis

showing the same morphological characteristics found in the group treated with the extract. Discrete inflammatory infiltrates were observed at the periphery of the necrotic areas. In the histopathological analysis of the tumors of the group treated with SteLL at 5 mg/kg group (Fig. 5E), we observed a reduced and slightly vascularized parenchyma,

composed of cells with homogeneous morphological characteristics, some of them with vacuolated cytoplasm (balloon-like cells). The center of the neoplasia was necrotic, and unlike the other groups, necrosis was also observed at the periphery of the restricted tumor mass. These results highlight the qualitative differences between the treatments with SE and SteLL, revealing that the treatment with the lectin at the highest concentration was more effective in promoting degeneration of the tumor, although the weight reduction was not significantly lower than those of the other treatments. This supports the higher efficacy of the isolated lectin in comparison with the extract, as demonstrated by the *in vitro* cytotoxicity assay.

Lectins have been reported to exert immunomodulatory effects that can aid to combat cancer and microbial infections; these proteins can modulate the production of nitric oxide, cytokines, and chemokines as well clonal expansion and activation of lymphocytes (Patriota et al., 2017; Procópio et al., 2018). The antitumor activity of SteLL can be due to the activation of anti-cancer immune responses *in vivo* and studies are currently being performed to evaluate the immunomodulatory properties of this lectin.

The interesting results described above demonstrated the antitumor potential of SE and particularly that of SteLL. However, the toxicity of new drug candidates is a limitation to their effective adoption. Thus, a toxicological analysis using different parameters was also performed. Twenty-four hours after the beginning of the treatments (9th day), there was a significant decrease ($p < 0.05$) in the relative water consumption of all the groups in comparison with the negative control and the Sham group, mainly in treatments with SE and SteLL at 5 mg/kg (Fig. 6A). However, there was a resumption of water consumption in the SE and SteLL groups during the experiment, as can be observed at the 14th day, with values higher or close to that of the Sham group; the water consumption value in the group treated with SteLL at 1 mg/kg was similar to that of the negative control (Fig. 6A). On the other hand, this was not observed for the group of animals treated with

Table 1

Mean initial and final body weight of healthy animals (Sham group) as well as of Sarcoma 180-bearing animals treated with 0.15 M NaCl (negative control), methotrexate 1.5 mg/kg (MTX), saline extract from *S. terebinthifolia* leaves at 100 mg/kg (SE) and isolated SteLL at 1 and 5 mg/kg.

Groups	Body weight (g)		Variation (g)
	Initial	Final	
Sham	31.17 ± 0.40	31.50 ± 0.85	0.33 ± 0.84 a
Negative control	35.00 ± 0.37	37.17 ± 0.40	2.17 ± 0.47 a
MTX	31.83 ± 0.40	30.00 ± 0.73	− 1.83 ± 0.79 b
SE	33.33 ± 0.21	33.67 ± 0.42	0.34 ± 0.55 a
SteLL 1 mg/kg	27.50 ± 0.56	32.00 ± 0.37	4.50 ± 0.42 c
SteLL 5 mg/kg	27.83 ± 0.40	29.33 ± 0.71	1.50 ± 0.56 a

Each value corresponds to the mean ± SE of data from six animals. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the groups by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

methotrexate, whose relative water intake value was only 3.34% at the 14th day.

In terms of relative food consumption (Fig. 6B), the treatment with SteLL at 5 mg/kg led to a significant ($p < 0.05$) reduction on the 9th day in comparison with Sham and negative control groups. On the 14th day, the animals treated with SE and SteLL showed relative food consumption similar ($p > 0.05$) to animals in the Sham and negative control groups. On the other hand, administration of methotrexate led to a remarkable reduction in food consumption throughout the experiment.

Although the administration of SE and SteLL led to a lower consumption of water and food, there was no weight loss at the end of the assay and even with the highest weight gain (4.5 g) observed in the group treated with SteLL at 1 mg/kg (Table 1). On the other hand, the group treated with the methotrexate was the only group that lost

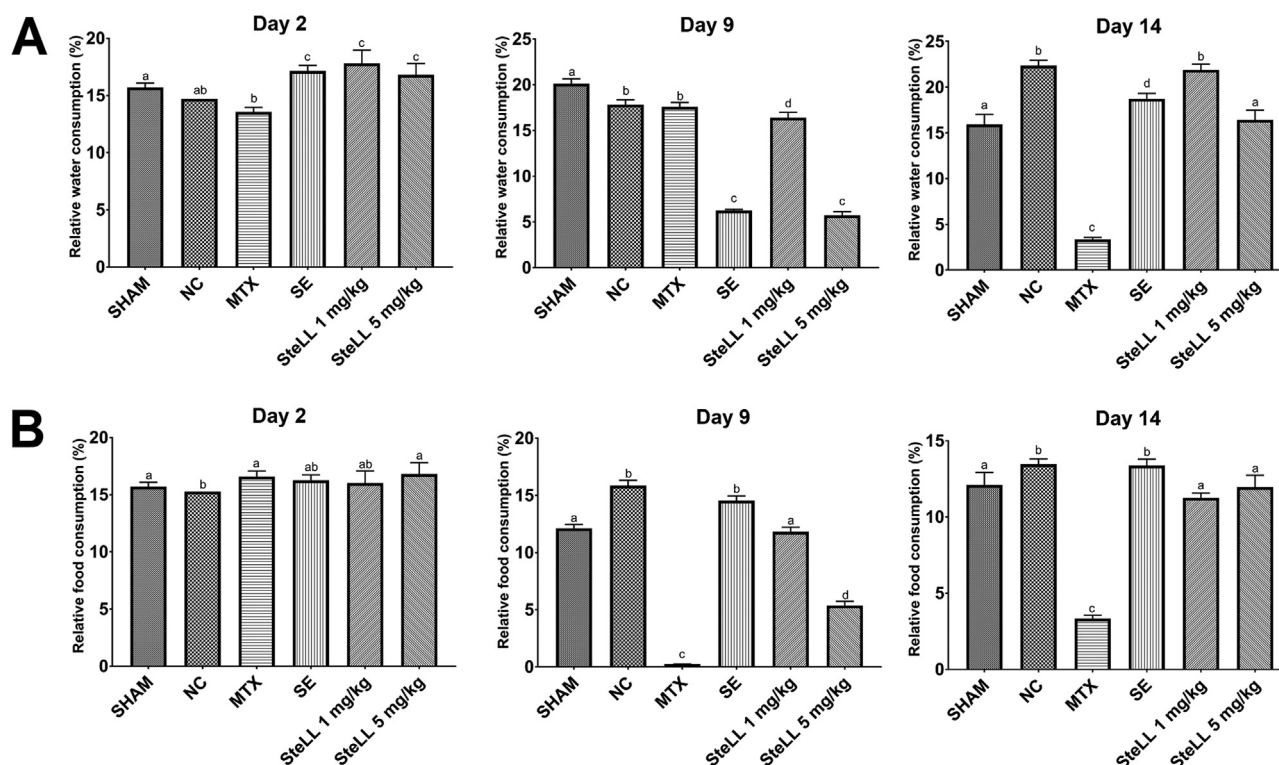


Fig. 6. Relative consumption of water (A) and food (B) at the 2nd, 9th and 14th day after tumor cell inoculation by animals treated with intraperitoneal injection of 0.15 M NaCl (negative control), methotrexate (MTX, positive control), saline extract from *S. terebinthifolia* leaves (SE, 100 mg/kg) and *S. terebinthifolia* leaf lectin (SteLL at 1 and 5 mg/kg). The treatments started at the 8th day after tumor inoculation and lasted 7 days. Each bar represents the mean ± SE of the results for six animals. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Table 2

Relative weight of organs of healthy animals (Sham group) as well as of Sarcoma 180-bearing animals treated with 0.15 M NaCl (negative control), methotrexate 1.5 mg/kg (MTX), saline extract from *S. terebinthifolia* leaves at 100 mg/kg (SE) and isolated SteLL at 1 and 5 mg/kg.

Organs	Groups					
	Sham	Negative control	MTX	SE	SteLL 1 mg/kg	SteLL 5 mg/kg
Heart	0.50 ± 0.01 ab	0.48 ± 0.03 a	0.44 ± 0.01 b	0.52 ± 0.01 a	0.43 ± 0.02 b	0.49 ± 0.05 ab
Kidney	0.59 ± 0.01 ab	0.58 ± 0.03 a	0.53 ± 0.01 b	0.57 ± 0.02 ab	0.60 ± 0.03 ab	0.58 ± 0.01 ab
Liver	5.27 ± 0.04 ac	5.78 ± 0.22 b	4.60 ± 0.16 a	5.33 ± 0.14 c	5.04 ± 0.26 ac	5.05 ± 0.18 a
Lung	0.64 ± 0.02 ab	0.64 ± 0.03 a	0.59 ± 0.02 b	0.70 ± 0.02 a	0.71 ± 0.03 a	0.72 ± 0.01 ab
Pancreas	0.15 ± 0.03 a	0.23 ± 0.04 a	0.15 ± 0.03 a	0.21 ± 0.04 a	0.19 ± 0.05 a	0.27 ± 0.06 a
Spleen	0.85 ± 0.05 a	1.11 ± 0.12 b	0.33 ± 0.03 c	0.86 ± 0.04 a	0.99 ± 0.06 ab	1.07 ± 0.04 ab
Stomach	1.97 ± 0.24 a	1.74 ± 0.09 a	4.98 ± 0.66 b	1.73 ± 0.07 a	1.54 ± 0.15 a	1.58 ± 0.13 a

Each value corresponds to the mean ± SE of data from six animals. For each organ, different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the groups by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

weight. It has been demonstrated that methotrexate causes intestinal mucositis and this, in turn, may delay gastric emptying and gastro-intestinal transit in rats (Soares et al., 2011), which may explain the great reduction in consumption of water and food and the weight loss.

Very minor significant ($p < 0.05$) differences were detected between the relative weight of the heart and liver of animals treated with SE or SteLL and those of the negative control, while no changes were observed with the other organs (Table 2). In addition, no difference was detected in the Sham group. These results indicate that the treatments with the extract and lectin did not lead to hypertrophy or hypotrophy of mice organs. Conversely, the group of animals treated with methotrexate had a decrease in the relative weight of the liver and spleen and an increase in the relative weight of the stomach, which were significantly different ($p < 0.05$) from those of the other groups (Table 2).

A significant decrease in the overall leukocyte number in animals treated with methotrexate was observed in comparison with that in animals from all the other groups (Table 3). For the treatments with *S. terebinthifolia* agents, an increase in the number of monocytes was detected in SE group, in comparison with the negative control. The other hematological parameters were not statistically different ($p > 0.05$) between the treatments, the Sham and the negative control groups.

Table 4 also shows that serum AST levels were moderately increased (2–3 times) in all treatments, in comparison with the negative control, although the increase was only significant ($p < 0.05$) in the SE group. In spite of this, macroscopic alterations and changes in the relative weight of the liver were not observed in SE and SteLL groups. On the other hand, there was a reduction in the relative weight of the liver in

the group treated with methotrexate. Microscopic analysis showed that the livers of the animals from the negative control (Fig. 4A) contained hepatocytes that did not exhibit cellular atypia and were arranged in cords of cells directed at the centrilobular veins. The hepatic vessels were hyperemic. Sparse hepatocytes with possible hyaline degeneration or presence of some unstained vacuoles were observed. The livers of the animals treated with methotrexate (Fig. 5B) showed preserved lobular architecture, but hyperemic portal and lobular vessels. Foci of tissue destruction (areas of necrosis) were also observed, which may explain the reduction in the relative weight. In addition, they showed discrete regions with reactional alterations with discrete inflammatory infiltrates. For the animals treated with SE (Fig. 5C) and SteLL (Figs. 5D and 5E), the livers showed preserved lobular architecture, but the presence of hepatocytes with multiple vacuoles and central nucleus suggestive of microvesicular steatosis was also observed. These changes may be associated with the increase in serum AST levels.

No significant differences were found in the glucose, urea, and creatine levels of the animals among the different treated groups (Table 4). The kidneys of animals from the negative control (Fig. 5A) and methotrexate (Fig. 5B) groups had preserved medullary and cortical architectures, with adequate vascularization, and without signs of cellular changes. Only one animal from the methotrexate group had a small area of hemorrhage. In the group treated with SE (Fig. 5C), hyperemic vessels and mild edema were observed in the medullary layer, although no areas of reversible or irreversible cell damage were observed. For the animals treated with SteLL (Figs. 5D and 5E), the nephrons had renal corpuscles with reduced filtration space and altered architecture of the proximal and distal contorted tubules, as well as regions of reorganization in the cortical parenchyma. The proximal

Table 3

Hematological parameters of healthy animals (Sham group) as well as of Sarcoma 180-bearing animals treated with 0.15 M NaCl (negative control), methotrexate 1.5 mg/kg (MTX), saline extract from *S. terebinthifolia* leaves at 100 mg/kg (SE) and isolated SteLL.

Parameters	Groups					
	SHAM	Negative control	MTX	SE	SteLL 1 mg/kg	SteLL 5 mg/kg
Erythrocytes ($10^6/\text{mm}^3$)	5.96 ± 0.19 a	6.30 ± 0.38 a	7.88 ± 0.44 a	6.88 ± 1.02 a	7.50 ± 0.13 a	7.26 ± 0.19 a
Hemoglobin (g/dL)	10.29 ± 0.39 a	11.38 ± 0.58 a	13.82 ± 0.72 a	12.93 ± 2.55 a	14.26 ± 0.32 a	13.15 ± 0.67 a
Hematocrit (%)	30.88 ± 1.18 a	34.14 ± 1.76 a	41.48 ± 2.17 a	39.99 ± 6.59 a	42.81 ± 0.98 a	39.48 ± 2.01 a
MCV (fL)	51.60 ± 1.20 a	54.20 ± 0.73 a	53.00 ± 0.83 a	57.40 ± 1.60 a	57.50 ± 2.04 a	54.17 ± 1.22 a
MCH (pg)	17.20 ± 0.48 a	18.20 ± 0.20 ab	17.80 ± 0.37 ab	19.40 ± 0.50 b	19.17 ± 0.60 ab	18.00 ± 0.44 ab
Leukocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	5.44 ± 0.66 ab	10.21 ± 1.79 b	3.22 ± 0.59c	9.85 ± 2.26 b	7.94 ± 0.68 ab	10.43 ± 1.03 b
Rods (%)	0.80 ± 0.37 a	0.80 ± 0.48 a	0.80 ± 0.80 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a
Segmented (%)	45.60 ± 4.43 a	46.40 ± 6.66 a	46.20 ± 4.07 a	47.80 ± 5.60 a	49.83 ± 6.43 a	41.67 ± 3.20 a
Eosinophils (%)	0.60 ± 0.40 a	0.60 ± 0.40 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
Basophils (%)	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
Lymphocytes (%)	51.20 ± 4.18 a	52.00 ± 6.64 a	50.80 ± 4.80 a	48.60 ± 5.70 a	48.50 ± 6.41 a	56.67 ± 3.58 a
Monocytes (%)	1.80 ± 0.58 ab	0.20 ± 0.20 a	2.20 ± 0.91 ab	3.60 ± 0.40 b	1.67 ± 0.55 ab	1.66 ± 0.55 ab
Platelets (10^3)	1.22 ± 0.54 a	1.60 ± 0.62 a	0.53 ± 0.07 a	0.55 ± 0.23 a	0.87 ± 0.19 a	1.10 ± 0.10 a

Each value corresponds to the mean ± SE of data from six animals. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the groups by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

Table 4

Biochemical parameters of healthy animals (Sham group) as well as of Sarcoma 180-bearing animals treated with 0.15 M NaCl (negative control), methotrexate 1.5 mg/kg (MTX), saline extract from *S. terebinthifolia* leaves at 100 mg/kg (SE) and isolated SteLL.

Groups	Parameters			
	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	AST (U/mL)	Glucose (mg/dL)
Sham	157.6 ± 31.98 a	1.33 ± 0.23 a	38.17 ± 5.89 a	64.01 ± 6.00 a
Negative control	82.5 ± 15.65 a	1.51 ± 0.23 a	37.13 ± 10.33 a	68.57 ± 4.55 a
MTX	48.2 ± 19.06 a	0.93 ± 0.13 a	71.36 ± 8.05 b	73.83 ± 11.72 a
SE	171.2 ± 49.00 a	0.93 ± 0.13 a	65.75 ± 7.47 b	66.72 ± 7.43 a
SteLL 1 mg/kg	50.2 ± 7.66 a	0.93 ± 0.13 a	56.09 ± 4.78 ab	44.69 ± 3.87 a
SteLL 5 mg/kg	144.0 ± 38.25 a	0.93 ± 0.13 a	51.08 ± 3.88 ab	63.66 ± 6.67 a

Each value corresponds to the mean ± SE of data from six animals. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the groups by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

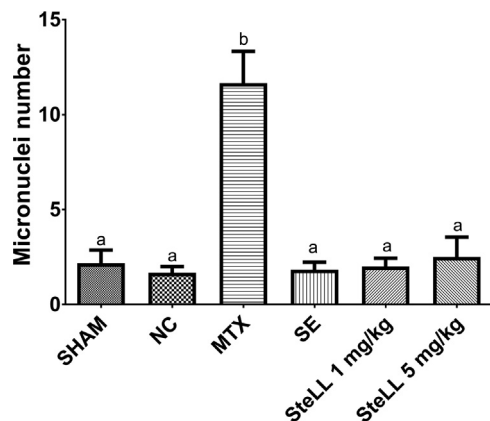


Fig. 7. Frequency of micronuclei in bone marrow cells of animals treated with intraperitoneal injection of 0.15 M NaCl (negative control), methotrexate (MTX, positive control), saline extract from *S. terebinthifolia* leaves (SE, 100 mg/kg) and *S. terebinthifolia* leaf lectin (SteLL at 1 and 5 mg/kg). Each bar represents the mean ± SE of the results for six animals and 1000 cells were count for each animal. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

convoluted tubules with cells showing projections at the cell boundary were sometimes non-juxtaposed. Intense vascularization characterized by multiple capillaries and presence of red blood cells were observed, possibly indicating the process of angiogenesis. Discrete regions with reactional changes with discrete inflammatory infiltrates were also observed. The characteristics were more pronounced in the animals treated with the lowest dose (1 mg/kg). These results suggest some degree of renal toxicity of SteLL, although the basic physiological function of the kidneys was not altered in the period evaluated, as indicated by the urea and creatinine levels.

A possible genotoxic effect of SE and SteLL was also evaluated through micronucleus counting and morphological analysis of bone marrow cells. Micronucleus frequency was significantly higher ($p < 0.05$) than in the negative control only in the methotrexate-treated group (Fig. 7). Indeed, methotrexate was already indicated as highly clastogenic, inducing chromosomal aberrations and significant increase in the number of micronuclei (Choudhury et al., 2000). The data demonstrate that treatment with SE and SteLL did not present genotoxic action on the evaluated cells. Terra Junior et al. (2015) reported that aqueous infusion from *S. terebinthifolia* leaves did not show genotoxic effects on bone marrow cells when administered by gavage to Wistar rats at 25, 50, 100, 150, and 200 mg/kg.

The data described in this paper reveal the pharmacological potential of SteLL and confirm that this lectin is an antitumor agent present in the leaves of *S. terebinthifolia*, popularly used for this purpose. The results obtained raise some issues that can be object of study in future works: (i) is the antitumor activity of SteLL specific for sarcoma

180 cells or can it be observed in other models? (ii) against what types of cancer/stages/conditions could the lectin be effective? In addition, the data serve as basis for the design of toxicological experiments aiming to determine the minimal effective dose, maximal tolerated dose and therapeutic index of SteLL.

4. Conclusion

The SE of *S. terebinthifolia* leaves and the isolated lectin are anti-tumor agents against sarcoma 180 without promoting weight loss, hematological changes, and genotoxic effects in mice. However, some degree of hepatic alterations and renal toxicity was observed, pointing to the need of drug delivery strategies whether future studies led to the development of an anticancer drug containing SteLL. The antitumor effect may be linked to the cytotoxic activity of lectin through the induction of apoptosis.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants (446902/2014-4) and fellowship (PMGP and THN), and to the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE) for financial support (APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15). They are also grateful to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, Financial Code 001).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author's contributions

DBMR, MTMFA, TCLA, OGSN, MGS, YAS, DJLT and LLSP conducted the experiments. VMBL, PMGP, RLM and THN contributed the reagents, materials, and analytical tools. DBMR, CMLM, PMGP, RLM and THN analyzed and interpreted the data. DBMR and THN wrote the paper. DBMR, CMLM, VMBL, RLM and THN established the study design. CMLM, RLM and THN performed critical revision of the final version of the article

References

- American Type Culture Collection, 2017. Sarcoma 180 (ATCC® TIB-66™). <<https://www.atcc.org/Products/All/TIB-66.aspx>>.
- Araújo, R.M.S., Vaz, A.F.M., Aguiar, J.S., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., Melo, A.M.M., Silva, T.G., Correia, M.T.S., 2011. Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. *Nat. Prod. Bioprospect.* 1, 97–100. <https://doi.org/10.1007/s13659-011-0014-8>.
- Bendaoud, H., Romdhane, M., Souchard, J.P., Cazaux, S., Bouajila, J., 2010. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. *J. Food Sci.* 75, C466–C472. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01711.x>.

- Carvalho, M., Melo, A., Aragão, C., Raffin, F.N., Moura, T.F.A.L., 2013. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. *Rev. Bras. Plant. Med.* 15, 158–169. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000100022>.
- Choudhury, R.C., Ghosh, S.K., Palo, A.K., 2000. Cytogenetic toxicity of methotrexate in mouse bone marrow. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 8, 191–196. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(00\)00041-7](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(00)00041-7).
- Coelho, L.C.B.B., Silva, P.M.S., Lima, V.L.M., Pontual, E.V., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Correia, M.T.S., 2017. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2017, 1594074. <https://doi.org/10.1155/2017/1594074>.
- Costa, C.O.S., Ribeiro, P.R., Loureiro, M.B., Simões, R.C., De Castro, R.D., Fernandez, L.G., 2015. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. *Pharmacogn. Mag.* 11, 607–614. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.160459>.
- Cunha, C.R.A., Silva, L.C.N., Almeida, F.J.F., Ferraz, M.S., Varejão, N., Cartaxo, M.F.S., Miranda, R.C.M., Aguiar, F.C.A., Santos, N.P.S., Coelho, L.C.B.B., Santos-Magalhães, N.S., Correia, M.T.S., 2016. Encapsulation into stealth liposomes enhances the antitumor action of recombinant *Cratylia mollis* lectin expressed in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 7, 1355. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01355>.
- Gao, L., Xia, L., Zhang, R., Duan, D., Liu, X., Xu, J., Luo, L., 2017. Enhanced antitumor efficacy of poly (D,L-lactide-co-glycolide)-based methotrexate-loaded implants on sarcoma 180 tumor-bearing mice. *Drug Des. Dev. Ther.* 11, 3065–3075. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S143942>.
- Gomes, F.S., Procópio, T.F., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2013. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *J. Appl. Microbiol.* 114, 672–679. <https://doi.org/10.1111/jam.12086>.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Liao, J.H., Chien, C.T.H., Wu, H.Y., Huang, K.F., Wang, I., Ho, M.R., Tu, I.F., Lee, I.M., Li, W., Shih, Y.L., Wu, C.Y., Lukyanov, P.A., Hsu, S.T.D., Wu, S.H., 2016. A multivalent marine lectin from *Crenomytilus grayanus* possesses anti-cancer activity through recognizing globotriose Gb3. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 4787–4795. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b00111>.
- Liuhanen, S., Sallisalminen, M., Pettilä, V., Oksala, N., Tenhunen, J., 2013. Indirect measurement of the vascular endothelial glycocalyx layer thickness in human submucosal capillaries with a plug-in for Image. *J. Comput. Methods Prog. Biomed.* 110, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2012.10.019>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4).
- Mors, W.B., Rizzini, C.T., Pereira, N.A., 2000. Medicinal plants of Brazil, Michigan, Reference Publications.
- Morton, J.F., 1978. Brazilian pepper - Its impact on people, animals and the environment. *Econ. Bot.* 32, 353–359. <https://doi.org/10.1007/BF02907927>.
- Oliveira, M.S., Gontijo, S.M., Teixeira, M.S., Teixeira, K.I.R., Takahashi, J.A., Millan, R.D.S., Segura, M.E.C., 2018. Chemical composition and antifungal and anticancer activities of extracts and essential oils of *Schinus terebinthifolius* Raddi fruit. *Rev. Fitos* 12, 135–146. <https://doi.org/10.5935/2446-4775.20180013>.
- Patriota, L.L.S., Procópio, T.F., Brito, J.S., Sebag, V., Oliveira, A.P.S., Soares, A.K.A., Moreira, L.R., Lima, T.A., Soares, T., Silva, T.D., Paiva, P.M.G., Lorena, V.M.B., Melo, C.M.L., Albuquerque, L.P., Napoleão, T.H., 2017. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 103, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2017.05.037>.
- Phillips, H.J., 1973. Dye exclusion tests for cell viability. In: *Tissue Culture: Methods and Applications*. Academic Press, Cambridge, pp. 406–408. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-427150-0.50101-7>.
- Poiroux, G., Barre, A., van Damme, E.J.M., Benoist, H., Rougé, P., 2017. Plant lectins targeting O-glycans at the cell surface as tools for cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1232. <https://doi.org/10.3390/ijms18061232>.
- Procópio, T.F., Fernandes, K.M., Pontual, E.V., Ximenes, R.M., Oliveira, A.R.C., Souza, C.S., Melo, A.M.M.A., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., Martins, G.F., Napoleão, T.H., 2015. *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. *PLoS One* 10, 0126612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126612>.
- Procópio, T.F., Patriota, L.L.S., Barros, B.R.S., Aguiar, L.M.S., Lorena, V.M.B., Paiva, P.M.G., Melo, C.M.L., Napoleão, T.H., 2018. *Calliandra surinamensis* lectin (CasuL) does not impair the functionality of mice splenocytes, promoting cell signaling and cytokine production. *Biomed. Pharmacother.* 107, 650–655. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.043>.
- Procópio, T.F., Patriota, L.L.S., Moura, M.C., Silva, P.M., Oliveira, A.P.S., Carvalho, L.V.N., Lima, T.A., Soares, T., Silva, T.D., Coelho, L.C.B.B., Pitta, M.G.R., Rêgo, M.J.B.M., Figueiredo, R.C.B.Q., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., 2017. 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, 419–429. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2017.02.019>.
- Queires, L.C., Crépin, M., Vacherot, F., la Taille, A., Rodrigues, L.E., 2013. In vitro effects of polyphenols extracted from the aroeira plant (*Schinus terebinthifolius* Raddi) on the growth of prostate cancer cells (LNCaP, PC-3 and DU145). *Braz. J. Med. Hum. Health* 1, 71–82. <https://doi.org/10.17267/2317-3386bjmh.v1i1.114>.
- Rosas, E.C., Correa, L.B., Pádua, T.D.A., Costa, T.E.M.M., Luiz Mazzei, J., Heringer, A.P., Bizarro, C.A., Kaplan, M.A.C., Figueiredo, M.R., Henriques, M.G., 2015. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. *J. Ethnopharmacol.* 175, 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.014>.
- Soares, P.M.G., Lopes, L.O., Mota, J.M.S.C., Belarmino-Filho, J.N., Ribeiro, R.A., Souza, M.H.L.P., 2011. Methotrexate-induced intestinal mucositis delays gastric emptying and gastrointestinal transit of liquids in awake rats. *Exp. Gastroenterol.* 48, 80–85. <https://doi.org/10.1590/S0004-28032011000100016>.
- Terra Junior, O.N., Maldonado, G.C., Alfradique, G.R., Arnóbio, A., 2015. Study of acute genotoxic potential of an aqueous extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi: an *in vivo* micronucleus assay. *Adv. Stud. Biol.* 7, 351–364. <https://doi.org/10.12988/asb.2015.5420>.
- Tessmann, J.W., Buss, J., Beghini, K.R., Berneira, L.M., Paula, F.R., Pereira, C.M.P., Collares, T., Seixas, F.K., 2017. Antitumor potential of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles in human bladder cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* 94, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.060>.
- Tolosa E.M.C., Rodrigues, C.J., Behmer, O.A., Freitas-Neto A.G., 2003. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica, second ed. São Paulo, Manole.
- World Health Organization, 2017. Cancer. <http://www.who.int/cancer/en/>.
- Zhang, G., Sun, J., Wang, H., Ng, T.B., 2010. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula* mushroom. *Phytomedicine* 17, 775–781. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.02.001>.
- Zuo, Z., Fan, H., Wang, X., Zhou, W., Li, L., 2012. Purification and characterization of a novel plant lectin from *Pinellia ternata* with antineoplastic activity. *Springerplus* 1, 13. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-13>.

ANEXO A- CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
MINISTÉRIO DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Certificado de autorização

Certificamos que a proposta intitulada: "AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAL, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO SALINO E DA LECTINA DA FOLHA DE *Schinus terebinthifolius*", registrada com o nº 0002/180816, sob a responsabilidade de Dalila de Brito Marques Ramos - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, em 18/07/2016.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Agosto/ 2016 a julho/ 2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i>
Nº de animais	120
Peso/Idade	25-30g / 6- 8 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério da UNIVASF campus Petrolina - CCA

Em: 19/08/2016

Dra. Andréa Vieira Colombo
Coordenadora da Comissão de Ética da UNIVASF