



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA LECTINA DE FOLHAS DE *Schinus terebinthifolia* (SteLL)
QUANTO À TOXICIDADE PARA CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E
CÉLULAS CANCEROSAS E À ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA *IN VIVO***

AMANDA DE OLIVEIRA MARINHO

**RECIFE
2021**

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

AMANDA DE OLIVEIRA MARINHO

**AVALIAÇÃO DA LECTINA DE FOLHAS DE *Schinus terebinthifolia* (SteLL)
QUANTO À TOXICIDADE PARA CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E
CÉLULAS CANCEROSAS E À ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA *IN VIVO***

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

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão.

Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Bezerra da Silva.

RECIFE
2021

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

Marinho, Amanda de Oliveira

Avaliação da lectina de folhas de *Schinus terebinthifolia* (SteLL) quanto à toxicidade para células-tronco mesenquimais e células cancerosas e à atividade antinociceptiva *in vivo* / Amanda de Oliveira Marinho - 2021.

96 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão.

Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Bezerra da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Lectinas. 2. Câncer. 3. Células-troncos. I. Napoleão, Thiago Henrique (orientador). II. Silva, Márcia Bezerra da (coorientadora). III. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-094-2022

AMANDA DE OLIVEIRA MARINHO

**AVALIAÇÃO DA LECTINA DE FOLHAS DE *Schinus terebinthifolia* (SteLL)
QUANTO À TOXICIDADE PARA CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E
CÉLULAS CANCEROSAS E À ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA *IN VIVO***

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

Aprovada: 06 / 08 / 2021

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Profa. Dra. Dalila de Brito Marques Ramos (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Piauí

À minha família, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus pela força, coragem e amadurecimento que tem me concedido ao longo de toda a minha caminhada.

À minha família que me apoia em todas as minhas decisões.

Quero agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão, que me acolheu com toda calma, disposição e conhecimentos contribuindo para construção de uma melhor aluna e pesquisadora.

Agradeço à minha coorientadora Profa. Dra. Márcia Bezerra da Silva pela parceria e colaboração no Laboratório de Cultura Celular do Departamento da Biofísica - UFPE.

Minha gratidão a Leydianne Patriota, uma pessoa muito especial que a pesquisa me deu de presente. Sua paciência, bondade e inteligência são dons de Deus. Sempre disposta a ajudar, foi fundamental para concretização deste trabalho.

Agradeço em especial a Jéssica Brito, pessoa incrível, corajosa e inteligente que me inspira sempre, sendo a responsável pelo meu direcionamento no mundo da pesquisa.

Agradeço a Thamara Procópio, uma pessoa maravilhosa, calma e inteligente que tive o prazer de conhecer e tornar amiga.

Agradeço a todos que fazem parte do Laboratório de Bioquímica de Proteínas (BIOPROT) por toda ajuda e ensinamentos.

Agradeço a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelas oportunidades de crescimento.

Por fim, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Pós-Graduação e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro para realização do projeto.

“Seja rio, siga fluindo mesmo com os obstáculos
o mar pode estar na próxima curva”

Bruno Missurino

RESUMO

As lectinas são proteínas que reconhecem e se ligam a carboidratos de forma específica e reversível. Desempenham atividades biológicas que acontecem devido a sua interação com glicanos presentes nas superfícies celulares de diversos organismos. As folhas de *Schinus terebinthifolia* Raddi. contêm uma lectina denominada de SteLL que apresenta atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antitumoral, antinociceptiva, citotóxica, imunomoduladora e inseticida. Esta dissertação teve como objetivo investigar os efeitos de SteLL na viabilidade de linhagens tumorais leucêmicas (K562- leucemia mielóide crônica; JURKAT- leucemia linfoblástica aguda) e células tronco mesenquimais (CTMs), assim como, investigar os efeitos imunomoduladores sobre as CTMs. Além disso, determinar a atividade antinociceptiva de SteLL em modelos experimentais de nocicepção aguda periférica e central em camundongos. As CTMs foram isoladas de cordão umbilical humano e a citotoxicidade de SteLL (0,048-100 µg/mL) foi avaliada pelo ensaio de MTT. Culturas de CTMs tratadas com SteLL (50 µg/mL) foram investigadas quanto à produção de citocinas e ocorrência de apoptose e/ou necrose. Culturas de K562 e de JURKAT foram tratadas com SteLL (12,5–50 µg/mL) e a ocorrência de apoptose e necrose foi analisada em ambas as linhagens tumorais. Para triagem dos efeitos antinociceptivos da lectina foi utilizado o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, os animais receberam os tratamentos (PBS, controle negativo; indometacina 20 mg/kg; morfina 10 mg/kg e SteLL 1, 5 e 10 mg/kg) por via intraperitoneal. No teste de formalina, o tempo que cada animal gastou lambendo a pata foi registrado nos primeiros 5 minutos (primeira fase - neurogênica) e no período de 15 a 30 minutos (segunda fase - inflamatória) após a injeção de formalina na região subplantar na pata. A investigação do envolvimento do domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) e dos receptores da via opioide na ação antinociceptiva da lectina foram avaliados. Para a avaliação da antinocicepção central, o teste de imersão da cauda foi realizado, sendo os animais tratados (PBS, controle negativo; morfina 10 mg/kg e SteLL 1, 5 e 10 mg/kg) e avaliados quanto aos períodos de latência para retirada da cauda 30, 60, 90 e 120 minutos após os tratamentos. SteLL não alterou a viabilidade de CTMs em nenhuma das concentrações, não induziu apoptose e necrose e não afetou a liberação das citocinas. SteLL (12,5, 25 e 50 µg/mL) exerceu efeito citotóxico em K562 por indução de apoptose em 92.3%, 92.3% e 97.7% das células, porém não foi citotóxica para JURKAT em nenhuma concentração. SteLL (1, 5 e 10 mg/kg) reduziu as contorções induzidas por ácido acético de maneira dose dependente em 84%, 90% e 100%. No teste de formalina, SteLL (1, 5 e 10

mg/kg) reduziu o tempo de lambida da pata em 49%, 48% e 51% na primeira fase. Na segunda fase, SteLL (1 e 10 mg/kg) reduziu em 83% e 81%. Esse efeito foi revertido pela administração da lectina incubada com glicoconjugado específico (ovoalbumina) e pelo antagonista não seletivo dos receptores opioides (naloxona). No teste de imersão de cauda, SteLL (1, 5 e 10 mg/kg) reduziu a percepção do estímulo térmico, mesmo duas horas após o tratamento. Em conclusão, SteLL não afeta a viabilidade de CTMs, porém não apresenta efeito imunomodulador sobre elas. Entretanto, apresentou importante efeito citotóxico contra a linhagem leucêmica K562 e demonstrou ação analgésica periférica e central, e o efeito antinociceptivo periférico envolve o DRC e os receptores opioides.

Palavras-chave: Lectinas; aroeira da praia; células tronco mesenquimais; anticâncer; dor; opioides.

ABSTRACT

Lectins are proteins that recognize and bind carbohydrates in a specific and reversible way. The biological activities performed by lectins happen due to their interaction with glycans present on the cell surfaces of several organisms. The leaves of *Schinus terebinthifolia* Raddi. contain a lectin called SteLL that has biological activities, such as antimicrobial, antitumor, antinociceptive, cytotoxic, immunomodulatory and insecticide. This dissertation aimed to investigate the effects of SteLL on the viability of leukemic tumor lines (K562-chronic myeloid leukemia; JURKAT-acute lymphoblastic leukemia) and mesenchymal stem cells (MSCs), as well as to investigate the immunomodulatory effects on MSCs. Furthermore, to determine the antinociceptive activity of SteLL in experimental models of acute peripheral and central nociception in mice. MSCs were isolated from human umbilical cord and the cytotoxicity of SteLL (0.048-100 µg/mL) was evaluated by the MTT assay. SteLL-treated MSC cultures (50 µg/mL) were investigated for cytokine production and occurrence of apoptosis and/or necrosis. Cultures of K562 and JURKAT were treated with SteLL (12.5–50 µg/mL) and the occurrence of apoptosis and necrosis was analyzed in both tumor lines. To screen for the antinociceptive effects of the lectin, the abdominal writhing test induced by acetic acid was used, the animals received the treatments (PBS, negative control; indomethacin 20 mg/kg; morphine 10 mg/kg and SteLL 1, 5 and 10 mg/kg). kg) intraperitoneally. In the formalin test, the time each animal spent licking the paw was recorded in the first 5 minutes (first phase - neurogenic) and in the period of 15 to 30 minutes (second phase - inflammatory) after the injection of formalin in the subplantar region of the paw. The investigation of the involvement of the carbohydrate recognition domain (CRD) and opioid pathway receptors in the antinociceptive action of lectin were evaluated. For the evaluation of central antinociception, the tail immersion test was performed, and the animals were treated (PBS, negative control; morphine 10 mg/kg and SteLL 1, 5 and 10 mg/kg) and evaluated for latency periods for tail removal 30, 60, 90 and 120 minutes after treatments. SteLL did not alter MSC viability at any concentration, did not induce apoptosis and necrosis, and did not affect cytokine release. SteLL (12.5, 25 and 50 µg/mL) exerted a cytotoxic effect on K562 by inducing apoptosis in 92.3%, 92.3% and 97.7% of cells, but it was not cytotoxic to JURKAT at any concentration. SteLL (1, 5 and 10 mg/kg) dose-dependently reduced acetic acid-induced writhing by 84%, 90% and 100%. In the formalin test, SteLL (1, 5 and 10 mg/kg) reduced paw licking time by 49%, 48% and 51% in the first phase. In the second phase,

SteLL (1 and 10 mg/kg) reduced by 83% and 81%. This effect was reversed by the administration of a lectin incubated with a specific glycoconjugate (ovalbumin) and by the non-selective antagonist of opioid receptors (naloxone). In the tail immersion test, SteLL (1, 5 and 10 mg/kg) reduced the perception of the thermal stimulus, even two hours after treatment. In conclusion, SteLL does not affect MSC viability, but it has no immunomodulatory effect on them. However, it showed an important cytotoxic effect against the K562 leukemic lineage and demonstrated peripheral and central analgesic action, and the peripheral antinociceptive effect involves the CKD and opioid receptors.

Keywords: Lectin; Brazilian pepper tree; mesenchymal stem cells; anticancer; pain; opioids.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1- Atividade hemaglutinante de lectina (A); inibição da atividade hemaglutinante de lectina (B).....	21
Figura 2- <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi (A); folhas com pares de folíolos (B); folíolo (C).....	24
Figura 3- Marcas registradas do câncer.....	31

ARTIGO 1

Figura 1- Avaliação da viabilidade de CTMs tratadas com diferentes concentrações de SteLL (0,048-100 µg/mL) por 24 h (A) e 48 h (B), através do ensaio do MTT. As barras representam a média da viabilidade celular (%) ± desvio padrão para três experimentos independentes realizados em triplicata, considerando o grupo controle como 100% de viabilidade.	49
Figura 2- Avaliação da citotoxicidade de SteLL para células tronco mesenquimais (CTMs). (A) <i>Dot plot</i> representativo do ensaio de avaliação de morte celular com dupla marcação - anexina V (AnnV) e iodeto de propídeo (PI) de culturas de CTMs humanas na ausência (controle) e presença de SteLL (50 µg/mL). (B) Percentual de CTMs com dupla marcação (AnnV ⁺ /PI ⁺). As barras representam a média da morte celular (%) ± desvio padrão para três experimentos independentes realizados em triplicata.	49
Figura 3- Avaliação dos níveis de citocinas de perfil pró-inflamatório (TNF-α e IFN-γ, IL-2, IL-6, IL-17) e anti-inflamatório (IL-4 e IL-10) em sobrenadantes de culturas de CTMs humanas na ausência (controle) e na presença de SteLL (50 µg/mL). As barras representam a média da concentração de citocinas (pg/mL) ± desvio padrão para três experimentos independentes realizados em triplicata.	51
Figura 4- Investigação de morte celular em culturas de linhagens tumorais leucêmicas tratadas com SteLL por 24 h. (A) K562. (B) JURKAT. Apenas células e meio foram o controle negativo e células tratadas com etanol o controle positivo. Foi considerada morte celular as somas das células em apoptose inicial, necrose e apoptose tardia. As barras	51

representam a média de morte celular \pm desvio padrão para três experimentos independentes realizados em triplicata. (****) indica diferença significativa ($p < 0.0001$) em comparação ao controle. (C) *Dot plot* representativo do ensaio de avaliação de morte celular com dupla marcação - anexina V (AnnV) e iodeto de propídio (PI) de culturas da linhagem tumoral K562. (A) Controle (apenas células e meio) e células tratadas com (B) SteLL (12.5 $\mu\text{g/mL}$), (C) SteLL (25 $\mu\text{g/mL}$) e (D) SteLL (50 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h.

ARTIGO 2

Figura 1 - Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético em animais 67
tratados com PBS (controle i.p.), indometacina (20 mg/kg i.p.), morfina (10 mg/kg i.p.) ou SteLL (1, 5 e 10 mg/kg i.p.). As barras representam a média do número de contorções abdominais \pm erro padrão da média. (****) indica diferença significativa de $p < 0,0001$ em comparação com o grupo controle, baseado na análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Control: Controle, Indo: Indometacina, Mor: Morfina.

Figura 2 - Teste de formalina em animais tratados com PBS (controle i.p.), indometacina 69
(20 mg/kg i.p.), morfina (10 mg/kg i.p.) ou SteLL (1, 5 e 10 mg/kg i.p.). (A) F1: primeira fase - neurogênica. (B) F2: segunda fase - inflamatória. As barras representam a média do tempo de lambida da pata \pm erro padrão da média. (****) indica diferença significativa de $p < 0,0001$ em comparação ao grupo controle, baseado na análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Control: Controle, Indo: Indometacina, Mor: Morfina.

Figura 3 - Investigação do envolvimento do domínio de reconhecimento a carboidratos 71
(DRC) no efeito antinociceptivo da lectina no teste de formalina. (A) F1: primeira fase - neurogênica, (B) F2: segunda fase - inflamatória. As barras representam a média do tempo de lambida da pata \pm erro padrão da média. (*) indica diferença significativa de $p < 0,05$ e (**) indica significância de $p < 0,005$, ambas em relação ao controle, baseado na análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Control: Controle, Ova: Ovoalbumina, Gli: Glicose.

Figura 4 - Investigação do envolvimento dos receptores opioides na atividade 72
antinociceptiva de SteLL no teste de formalina. A administração da naloxona (2 mg/kg i.p.), ocorreu 30 minutos antes da administração SteLL (10 mg/kg i.p.) ou morfina (10 mg/kg i.p.). (A) F1: primeira fase - neurogênica. (B) F2: segunda fase - inflamatória. As barras

representam a média do tempo de lambida da pata \pm erro padrão da média. (****), (**) e (*) indicam diferenças significativas de $p < 0,0001$, $p < 0,005$ e $p < 0,05$ em comparação ao controle, baseado na análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Control: Controle, Mor: Morfina, Nalox: Naloxona.

Figura 5 - Teste de imersão de cauda em animais tratados com PBS (controle, i.p.), morfina (10 mg/kg i.p.) ou SteLL (1, 5, 10 mg/ kg i.p.), realizado (A) 30 minutos, (B) 60 minutos, (C) 90 minutos e (D) 120 minutos após a administração dos tratamentos. As barras representam a média do tempo de latência da retirada da cauda \pm erro padrão da média. (***), (****) indicam diferenças significativas de $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ em comparação com o controle, baseado na análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Control: Controle, Mor: Morfina. 73

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1 -Células-tronco e seu uso na terapia celular.....	27
Tabela 2 -CTMs e sua utilização em estudos clínicos.....	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	OBJETIVOS.....	19
1.1.1	Objetivo Geral.....	19
1.1.2	Objetivos Específicos.....	19
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1	LECTINAS.....	20
2.1.1	Lectinas de plantas.....	22
2.1.2	<i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi.....	23
2.2	CÉLULAS-TRONCO.....	26
2.2.1	Células-tronco mesenquimais.....	28
2.3	CÂNCER.....	30
2.3.1	Lectinas com atividade citotóxica e antitumoral.....	32
2.4	DOR.....	34
2.4.1	Fisiopatologia da dor.....	34
2.4.2	Modelos experimentais de dor.....	37
2.4.3	Lectinas com ação antinociceptiva.....	38
3	RESULTADOS.....	40
3.1	ARTIGO 1- EFEITOS DA LECTINA DE FOLHAS DA <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi. SOBRE LINHAGENS TUMORAIS LEUCÊMICAS E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMS) HUMANAS.....	40
3.2	ARTIGO 2- EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA LECTINA DE FOLHAS DA <i>Schinus terebinthifolia</i> RADDI.(ANACARDIACEAE) EM CAMUNDONGOS.....	60
4	CONCLUSÕES.....	81
	REFERÊNCIAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas de origem não imune capazes de reconhecimento e ligação a carboidratos de maneira reversível e específica, sem modificá-los bioquimicamente. Estão amplamente distribuídas na natureza e são encontradas nos mais variados organismos. Nas plantas, são isoladas de raízes, rizomas, caules, sementes, flores, folhas e frutos. A interação entre as lectinas e os carboidratos de superfícies celulares é uma das vias de sinalização mais eficientes que ocorrem nos organismos, desencadeando diversos efeitos biológicos que podem ser explorados nos campos biológico, biomédico e biotecnológico (COELHO et al., 2017; CAVADA et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2020).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) podem ser obtidas de humanos e mamíferos a partir dos mais variados tecidos como cordão umbilical, tecido adiposo, tecidos dentários, dentre outros (CHULPANOVA et al., 2018). Consideradas multipotentes, diferenciam-se em linhagens mesenquimais (osteogênicas, condrogênicas, adipogênicas), além de apresentar propriedades imunomoduladoras úteis para terapias de doenças degenerativas e câncer (PITTENGER et al., 2004; CHAO et al., 2012; DING et al., 2015; LIN et al., 2019; CHEN et al., 2018). Estudos demonstram que as CTMs podem modular a funcionalidade de células apresentadoras de antígenos, células T e células NK (Natural Killer), principalmente por efeitos imunossupressores (RASMUSSON., 2006; ENGELA et al., 2012). As CTMs são capazes de migrar para locais lesionados ou de inflamação em resposta aos mediadores inflamatórios. Exercem efeitos reparadores por meio da transdiferenciação de células específicas do tecido ou por secreção de fatores imunorreguladores que facilitam o restabelecimento da homeostase tecidual (WANG et al., 2014). Acredita-se que as ações ocorrem tanto por contato celular em resposta às células imunes quanto pela secreção de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (ENGELA et al., 2012).

O câncer representa uma das principais causas de morte em todo mundo. De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2020 o câncer foi responsável por quase 10 milhões de mortes (OMS, 2020). Diante da sua complexidade, os principais tratamentos empregados são os agentes quimioterápicos, radioterapia e/ou remoção cirúrgica. Porém, são terapias agressivas que muitas vezes acometem as células normais e causam efeitos colaterais graves. Ainda, são vários os relatos do desenvolvimento de resistência que alguns tumores adquirem às drogas. A busca por moléculas capazes de

combater diferentes tipos de cânceres, com maior seletividade celular e que sejam menos agressivas, impulsiona pesquisas em todo o mundo (TESSMANN et al., 2017; SHIVAMADHU et al., 2017). A possibilidade de reconhecimento diferenciado de padrões de glicosilação em membranas de células normais e células tumorais é um importante fator associado à ação das lectinas, que então podem agir na própria superfície celular tumoral ou serem internalizadas (LICHTENSTEIN; RABINOVICH., 2013; YAU et al., 2015; LUZ et al., 2017).

A dor pode ser definida segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP- *International Association for the Study of Pain*) como sendo “Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada a dano real ou potencial ao tecido” (RAJA et al., 2020). No mundo, 1 em cada 5 adultos (20%) sofrem de dor e 1 em cada 10 adultos (10%) é diagnosticado com dor crônica a cada ano (SCHAIBLE et al., 2004; GOLDBERG et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 2015). O tratamento para o alívio da dor depende do tipo e etiologia, das diferentes intervenções a farmacológica é a mais empregada. Porém, são terapias que podem vir acompanhadas de efeitos colaterais graves, devido ao uso prolongado ou excessivo. Lectinas vegetais têm sido descritas com atividade antinociceptiva (PIRES et al., 2013; CAMPOS et al., 2016; PIRES et al., 2019; RAMOS et al., 2020).

Schinus terebinthifolia Raddi, é uma planta pertencente à família das Anacardiaceae, conhecida como aroeira-da-praia, aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira, pimenta-rosa (OLIVEIRA et al., 2014). Está presente entre as 71 espécies de plantas medicinais listadas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Na medicina popular é utilizada devido as propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas, analgésicas e cicatrizante (CARVALHO et al., 2013). As folhas de *S. terebinthifolia* contêm uma lectina (SteLL), que apresenta propriedades de reconhecimento e ligação a N-acetilglicosamina, quitina e glicoproteínas. Atividades biológicas descritas para SteLL incluem ação antimicrobiana (GOMES et al., 2013), antitumoral e antinociceptiva em camundongos portadores de sarcoma 180 (RAMOS et al.; 2019, 2020), anti-infecciosa (LIMA et al., 2019) e imunomoduladora (SANTOS et al., 2020).

Tendo em vista os relatores anteriores sobre SteLL, esta dissertação teve como objetivos avaliar a atividade citotóxica *in vitro* de SteLL em linhagens tumorais leucêmicas e em células-tronco mesenquimais (CTMs) isoladas de cordão umbilical humano da lectina

SteLL, bem como uma possível influência na secreção de agentes imunomoduladores pela CTMs. Além disso, foi investigada a atividade antinociceptiva em modelos experimentais de nocicepção periférica e central em camundongos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a lectina de folhas de *Schinus terebinthifolia* (SteLL) quanto à toxicidade para células-tronco mesenquimais e células cancerosas e à atividade antinociceptiva *in vivo*.

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Purificar a lectina (SteLL) de folhas *S. terebinthifolia* seguindo procedimento previamente estabelecido;
- ✓ Investigar a atividade citotóxica de SteLL em linhagens tumorais leucêmicas (K562 - leucemia mielóide crônica; JURKAT- leucemia linfoblástica aguda);
- ✓ Avaliar a atividade citotóxica de SteLL em células-tronco mesenquimais (CTMs) isoladas de cordão umbilical humano;
- ✓ Investigar a capacidade de SteLL em modular a produção de citocinas pelas CTMs;
- ✓ Avaliar a atividade antinociceptiva de SteLL em modelos de nocicepção periférica e central em camundongos;
- ✓ Investigar se a atividade antinociceptiva de SteLL envolve o domínio de ligação a carboidratos da lectina e receptores da via opioide.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 LECTINAS

As lectinas constituem um grupo de proteínas de origem não imune com capacidade de reconhecimento e ligação a carboidratos (CAVADA et al., 2020). O termo lectina (origem do latim *legere*, que significa selecionado), apresentado pela primeira vez por Boyd (1954), descreve um grupo de proteínas que se ligam a carboidratos sem modificá-los, reconhecimento esse que ocorre de forma reversível e específica (NASCIMENTO et al., 2020). Estão amplamente distribuídas na natureza, onde já foram isoladas de fungos (SINGH; BHARI; KAUR., 2011), bactérias (NIZET; VARKI; AEBI., 2017) plantas (GOMES et al., 2013) e animais (SREERAMULU et al., 2018).

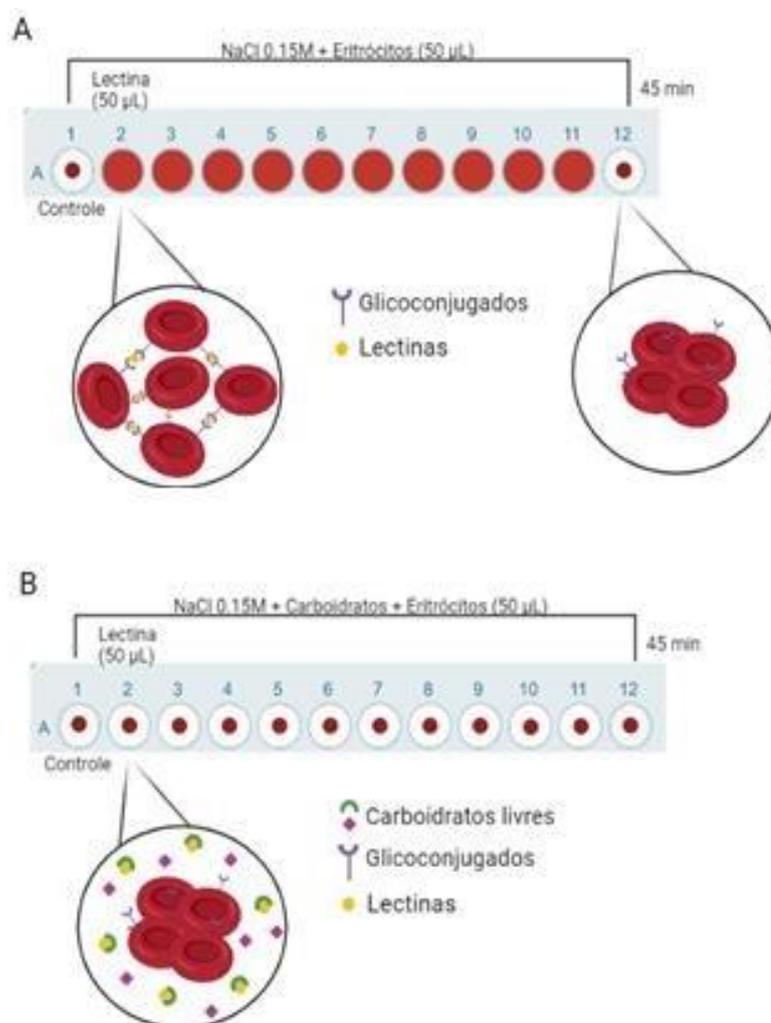
Possuem pelo menos um domínio não catalítico que permite o reconhecimento a carboidratos simples (monossacarídeos e dissacarídeos), oligossacarídeos complexos e/ou polissacarídeos, além de glicoconjugados (glicoproteínas e glicolipídeos) (MADHU et al., 2019). As interações entre lectinas e carboidratos envolvem ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals (PIETRZYK-BRZEZINSKA; BUJACK., 2020).

Um método utilizado para identificar a presença de lectina é a atividade hemaglutinante, baseado na interação de lectinas com os carboidratos presentes na superfície celular dos eritrócitos. É realizado em microplacas, permitindo fácil visualização de uma rede celular que permanece em suspensão devido a essa interação; caso não haja lectinas ou essas não sejam capazes de reconhecer os carboidratos do eritrócito, as hemácias se depositam no fundo do poço (Figura 1A) (SANTOS et al., 2013). Para a confirmação se a aglutinação é promovida por lectinas é realizado o teste de inibição, onde são adicionados carboidratos livres ou glicoproteínas na solução que interagem previamente com as lectinas, impedindo que elas se liguem à superfície dos eritrócitos e formem a rede de hemaglutinação (Figura 1B); esse teste evidencia também a especificidade da lectina (SANTOS et al., 2013).

Sabe-se que carboidratos de superfície celular estão envolvidos na interação, comunicação e adesão celular em diversos processos e capacidade das lectinas de reconhecê-los estimula a avaliação delas como ferramentas biológicas (WILSON et al., 2018). Dentre as respostas biológicas desempenhadas pelas lectinas, destacam-se as atividades antibacteriana (CORIOLANO et al., 2020; SILVA et al., 2019 a), antiviral (HUANG et al., 2018;

MORIMOTO; SATO., 2016), antifúngica (GOMES et al., 2013; JONES et al., 2017), inseticida (VANTI et al., 2018), antitumoral (PROCÓPIO et al., 2017; DAMASIO et al., 2014), anti-angiogênica (MADHU et al., 2019), anti-inflamatória (OLADOKUN et al., 2019; PIRES et al., 2019), mitogênica (SINGH; WALIA; KENNEDY., 2018), imunomoduladora (ARANDA-SOUZA et al., 2018; MISHRA et al., 2019), antioxidante (WU et al., 2016; LACERDA et al., 2017) e gastroprotetora (LACERDA et al., 2017; ABDON et al., 2012), dentre outras.

Figura 1- Atividade hemaglutinante de lectina (A); inibição da atividade hemaglutinante de lectina (B).



Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com a arquitetura geral do domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) as lectinas podem ser classificadas como: merolectinas que contêm apenas um DRC

dentro de sua estrutura polipeptídica, não sendo capazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. As hololectinas, com dois ou mais DRC homólogos, capazes de aglutinar células; neste grupo encontra-se a maioria das lectinas. Superlectinas com capacidade de ligação a diferentes carboidratos. Quimerolectinas com um ou mais domínios de ligação a carboidratos em conjunto com domínios que desempenham outras atividades bioquímicas, como atividade catalítica, independente ao domínio de reconhecimento (RIBEIRO; FERREIRA; FREITAS, 2018).

2.1.1 Lectinas de plantas

As plantas são fontes de compostos terapêuticos, utilizadas desde a Antiguidade na prevenção e/ou cura de doenças (BRASIL., 2016). O Brasil por ser um dos países com rica biodiversidade, constitui um celeiro de princípios ativos e/ou substâncias com melhor eficácia e menor toxicidade, que podem ser exploradas para síntese de novos medicamentos (HAO; YANG., 2016; HAO; XIAO., 2020).

As lectinas são encontradas em diversas espécies de plantas. Participam no processo de defesa, presentes em grandes quantidades nos órgãos que são mais vulneráveis a ataques de insetos, patógenos e pragas (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME., 2011). São isoladas de diversos tecidos, tais como: casca (COSTA et al., 2018), sementes (CARVALHO et al., 2015), folhas (GOMES et al., 2013; PROCÓPIO et al., 2017), flores (CHOLAK et al., 2016) e rizomas (BISWAS; CHATTOPADHYAYA, 2015).

Como alguns exemplos de lectinas de plantas e suas atividades, podemos citar: a lectina isolada das raízes de *Portulaca elatior* (PeroL), que apresentou atividade bacteriostática contra *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. A mesma também possui atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* (SILVA et al., 2019c). Lectina isolada do suco *Punica granatum* (PgteL) apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans* e *C. krusei*, causando rompimento da parede celular e colapso energético (SILVA et al., 2018). Lectina dos frutos de *Praecitrullus fistulosus* (PfL) demonstrou efeito citotóxico em células tumorais do cólon (HT29), além da atividade antitumoral *in vivo* diminuindo a densidade, secreção, angiogênese tumoral (MADHU et al., 2019). Lectina isolada do *Tamarindus indica* (TCLL), demonstrou atividade antiviral contra o vírus CHIKV (KAUR. et al., 2019).

Os potenciais antinociceptivo e anti-inflamatório das lectinas também têm sido relatados na literatura; um exemplo é a lectina extraída de sementes da *Tetracarpidium conophorum* (TcSL), que apresentou atividade antinociceptiva em ratos e atividade anti-inflamatória com diminuição de edema, migração leucocitária (OLADOKUN *et al.*, 2019). Vários estudos têm relatado lectinas com atividade imunomoduladora, dentre elas podemos citar: a isolada das inflorescências da *Alpinia purpurata* (ApuL) induziu através de PMCs a liberação de citocinas de perfil Th1, Th17, óxido nítrico, estimulou a IL-10, citocina com papel regulador no processo inflamatório, além de diferenciação e ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ (BRITO *et al.*, 2017).

Com base na estrutura molecular e na sequência dos DRCs, as lectinas de plantas podem ser classificadas nas seguintes famílias: amarantinas; Cianovirinas; aglutininas de *Agaricus bisporus*; aglutininas homólogas a quitinase; aglutinina de *Euonymus europaeus*; aglutinina de *Galanthus nivalis* família (GNA); proteínas com domínio de heveínico; Jacalina; lectinas de leguminosas; lectinas de domínio Lys M; família da Cucurbitaceae e família da Ricina-B. De acordo com a especificidade aos carboidratos a maioria das lectinas são classificadas como: ligadora de galactose (ADAMUDE *et al.*, 2020), manose (JONES *et al.*, 2017), N- acetilglicosamina (GOMES *et al.*, 2013) e D-glicose/manose (ROSA., 2019).

2.1.2 *Schinus terebinthifolia* Raddi

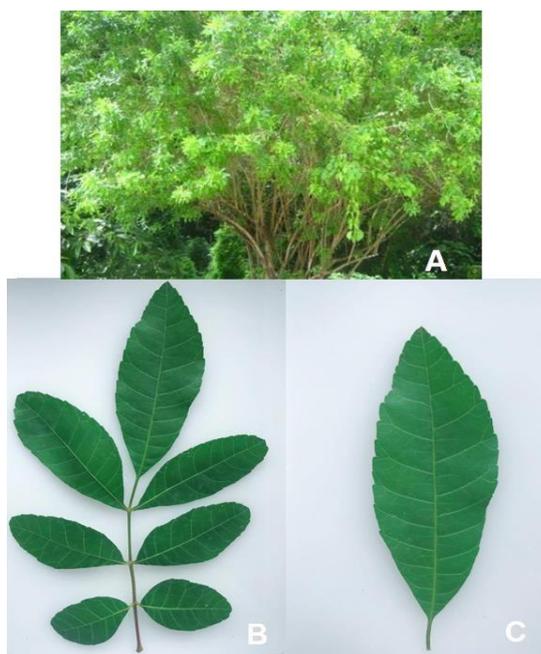
Schinus terebinthifolia Raddi pertence à família Anacardiaceae. Essa família possui cerca de 76 gêneros e 600 espécies, nas quais 15 gêneros e cerca de 70 espécies encontram-se no Brasil (ANDRADE; PONCELET; FERREIRA, 2017). A espécie *S. terebinthifolia* é nativa da América do Sul e Central e apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil. É popularmente conhecida como aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira e pimenta brasileira. Esta variação nos nomes ocorre principalmente por seus frutos possuírem aparência de uma pequena pimenta de coloração rosa-avermelhada, por isso, também pode ser chamada de pimenta-rosa (LENZI; ORTH., 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

É uma árvore de porte médio, entre 5-10 metros de altura, tronco com 30-60 cm de diâmetro revestido de casca grossa (Figura 2A). As folhas são compostas de 3 a 10 pares de folíolos aromáticos, medindo de 3 a 5 cm de comprimento por 2 a 3 cm de largura (Figura 2B e 2C). Os frutos são do tipo drupa, corpo globuloso ou ovoide, com cerca de 5 cm de

diâmetro, aromático, adocicado, de cor vermelha e lustrosa, são comumente usados na culinária pelo sabor e aroma. As flores são amarelas pálidas, pequenas e dispostas em cachos (ANDRADE; PONCELET; FERREIRA, 2017).

Com propriedades medicinais descritas desde a primeira edição da Farmacopeia Brasileira (1926), encontra-se entre as 71 espécies de plantas medicinais relatadas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), por seus efeitos benéficos à saúde da população e na produção de fitoterápicos (CARVALHO et al., 2013; DICIAULA et al., 2014).

Figura 2- *Schinus terebinthifolia* Raddi. (A) árvore; folhas com pares de folíolos (B); folíolo (C).



Fotos: Thamara Procópio

Os frutos de *S. terebinthifolia* são comumente usados como tempero, enquanto a casca, folhas e raízes são constituintes tradicionais da medicina popular, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas, analgésicas, depurativo, em infecções do trato urinário, doenças de pele, problemas gastrointestinais, dentre outras (MACHADO et al., 2008; CASTRO et al., 2011; CARVALHO et al., 2013; ROSAS et al., 2015; PALHETA et al., 2017). As atividades biológicas são atribuídas a compostos bioativos presentes nesta planta, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, compostos fenólicos, taninos,

alcalóides, saponinas (JORGE; MARKMANN., 1996; CARVALHO et al., 2013; FEUEREISEN et al., 2014; ENNIGROU et al., 2016).

Extratos obtidos de diferentes partes da *S. terebinthifolia* Raddi demonstram algum tipo de atividade biológica. Extratos de folhas apresentam atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e inseticida (ROSAS et al., 2015; PROCÓPIO et al., 2015; ULIANA et al., 2016). Extrato de frutos com potencial anti-hipertensivo e antioxidante (GLÓRIA et al., 2017). Óleos essenciais de folhas e frutos com atividade inseticida, antimicrobiana e antioxidante (SILVA et al., 2010; ULIANA et al., 2016). Em condições inflamatórias causada por artrite reumatoide, o extrato hidroalcoólico de folhas promoveu diminuição do influxo de neutrófilos aos tecidos sinoviais (ROSAS et al., 2015). Óleo essencial de folhas e frutos causou inibição da produção de óxido nítrico pelos macrófagos e a capacidade de eliminação dos radicais livres (DANNENBERG et al., 2016).

As folhas de *S. terebinthifolia* Raddi contêm uma lectina denominada SteLL, cujo processo de purificação inicia-se com a preparação do extrato das folhas, seguido por uma cromatografia de afinidade em coluna quitina, pelo fato de SteLL ter afinidade de ligação a N-acetilglicosamina. Trata-se de uma proteína glicosilada de massa molecular nativa de 12,4 kDa, estável diante a diferentes faixas de pH (5,0- 8,0), aquecimento (30-100 °C) e adição de íons de Ca^{2+} e Mg^{2+} (GOMES et al., 2013; SANTOS et al., 2020).

SteLL apresentou atividade antibacteriana, com potencial bacteriostático e bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além da atividade antifúngica ao crescimento de *Candida albicans* (GOMES et al., 2013); atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* capaz de causar apoptose células de Sarcoma-180 e a redução da massa tumoral em camundongos (RAMOS et al., 2019); atividade inseticida contra *Sitophilus zeamais* adultos causando um desequilíbrio no metabolismo digestivo, com efeito inibitório sobre as proteases e resultando na diminuição da sobrevivência (CAMAROTI et al., 2018); atividade imunomoduladora em esplenócitos de camundongos *in vitro*, estimulando a liberação de citocinas de perfil pró-inflamatório (IL-17A, TNF- α , IFN- γ e IL-2), anti-inflamatória (IL-4), além de redução na liberação de óxido nítrico (SANTOS et al., 2020); ação anti-infecciosa em larvas *Galleria mellonella* infectadas por *S. aureus*, aumentando a sobrevivência dos insetos (LIMA et al., 2019). Ainda, em macrófagos de camundongos não infectados, SteLL estimulou a liberação de citocinas IL-6, IL-10, IL-17A e TNF- α , óxido nítrico e ânion superóxido, enquanto em macrófagos infectados por *S. aureus* foi capaz de regular a expressão de IL-17A

e IFN- γ (LIMA et al., 2019). Por fim, SteLL apresentou ação antinociceptiva em modelo de tumor (sarcoma 180) ortopédico *in vivo*, sendo capaz de diminuir a hiperalgesia, com envolvimento de receptores opioides em sua essa atividade (RAMOS et al., 2020).

2.2 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são células precursoras/indiferenciadas com capacidade de auto-renovação e diferenciação em várias linhagens celulares. Essas células têm capacidade de realizar divisão simétrica e assimétrica. Na divisão simétrica uma célula-tronco se divide em duas células-tronco idênticas a ela (auto-renovação), continuando sua expansão celular. Na divisão assimétrica se origina uma célula idêntica a ela e uma célula especializada, responsável pelo processo de diferenciação que constitui o tecido adulto (LIU et al., 2005; XU et al., 2019a).

Baseado em seu potencial de diferenciação, classificam-se em: células-tronco totipotentes, que correspondem às células do embrião recém-formado, que formam a placenta e podem se diferenciar todos os tipos celulares do corpo; células-tronco pluripotentes, que surgem após 4 dias da fertilização, com a formação da massa celular interna do blastocisto, e estão envolvidas na formação de todos os tecidos do organismo; as multipotentes, que são células mais diferenciadas, capazes de originar tipos celulares limitados e células para o ambiente que residem, envolvidas na regeneração tecidual; as células onipotentes, que possuem capacidade de diferenciação limitada, um ou dois tipos celulares para tecido ou órgão específico (SOUZA et al., 2003; XU et al., 2019 a; ZAKRZEWSKI et al.; 2019).

A partir de sua origem, podem ser classificadas em dois grupos: células-tronco embrionárias, derivadas da massa celular interna do blastocisto embrionário, podendo se diferenciar nas três linhagens germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma); e células-tronco adultas ou somáticas, encontradas entre as células diferenciadas, desempenhando a homeostase do organismo. Geralmente, as células-tronco adultas são multipotentes e incluem as células-tronco neurais, células-tronco hematopoiéticas, células-tronco cardíacas, dentre outras (KALRA; TOMAR., 2014; XU et al., 2019a).

Pesquisas realizadas com células-tronco demonstram resultados promissores no que diz respeito na recuperação e cura de determinadas doenças, podendo ser utilizadas na recuperação funcional e tecidual do miocárdio, regeneração de neurônios na doença de

Parkinson (Tabela 1), porém apenas algumas terapias com células-tronco já estão para uso clínico (ROCHA; GLUCKMAN., 2005; G-I IM., 2017; ROGERS et al., 2020).

Tabela 1- Células-tronco e seu uso na terapia celular.

Célula-tronco	Doenças	Terapia Celular	Referências
Células-tronco hematopoiéticas e progenitoras Células-tronco neurais	Doença de Parkinson	Regeneração neural	XIFRO et al., 2016 L'EPISCOPO et al., 2018
Células-tronco cardíacas	Insuficiência cardíaca Infarto do miocárdio	Regeneração funcional e tecidual	CHUGH et al., 2012 ZWETSLOOT et al., 2016
Células-tronco pluripotentes induzidas	Diabetes tipo I Câncer	Proliferação celular endócrina produtoras de insulina Antitumoral	MOCHIDA et al., 2020 NIANIAS et al., 2019
Células-tronco perinatais	Distúrbios metabólicos	Diferenciação em células hepáticas	MIKI., 2018
Células-tronco hematopoiéticas Células-tronco hematopoiéticas	Mieloma múltiplo Doença falciforme Transplante de órgãos	Transplante autólogo Transplante alogênico e autólogo Imunomodulação	ARORA et al., 2019 TANHEHCO; BHATIA., 2019 ELAHIMEHR et al., 2016
Células-tronco do cordão umbilical	Osteoporose	Regeneração óssea	HONG et al., 2018

Fonte: Elaborada pela autora.

Das aplicações de lectinas no estudo com células-tronco, a tecnologia de *microarray* é a mais empregada, visando o desenvolvimento de um sistema rápido e sensível que permite o monitoramento dos glicanos de superfície celular. Sabe-se que durante o desenvolvimento os perfis glicanos sofrem mudanças características, dessa forma as lectinas são utilizadas como marcadores de células-tronco (HASEHIRA, HIRABAYASHI, TATENO, 2017). Marcadas por fluorocromos, as lectinas são capazes de detectar mudanças no perfil glicídico em processos de diferenciação celular (PARK et al., 2015; WILSON et al., 2018). Wearne et al.

(2006) mostraram que lectinas isoladas de plantas, dentre elas a lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA), lectina do fruto de *Musa acuminata* (BanLec), lectina do germe de *Triticum vulgare* (WGA) e a lectina de sementes de *Amaranthus caudatus* (ACA), são capazes de distinguir células-tronco em diferentes estágios de diferenciação.

Tateno et al (2011) desenvolveram uma plataforma de *microarray* com um total de 96 lectinas, para identificar diferenças entre os perfis de glicanos em superfícies de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (CTPIh) e células-tronco embrionárias humanas (CTEh). Já a lectina de *Erythrina cristagalli* (ECA) foi utilizada como matriz de suporte para proliferação e aumentou a eficiência do plaqueamento de células-tronco pluripotentes e células-tronco embrionárias humanas (MIKKOLA et al., 2012).

2.2.1 Células-tronco mesenquimais

Células-tronco mesenquimais (CTMs) são células adultas, não hematopoiéticas, que podem ser isoladas de humanos e animais. São capazes da auto-renovação e diferenciação em multilinhagens celulares. Segundo os critérios da Sociedade Internacional de Terapia Celular, para serem consideradas CTMs, devem ter uma boa adesão plástica, capacidade de diferenciar-se em linhagens mesodérmicas, como osteócitos, condrócitos e adipócitos, além de expressão a marcadores de superfície celular (*cluster of differentiation*) como os CDs 29, 44, 73, 90, 105 e expressão negativa marcadores de células hematopoiéticas como CDs 14, 34, 45 e para o antígeno leucocitário humano (HLA- DR) (DOMINICI et al., 2006; ULLAH et al., 2015).

Desde do primeiro relato de isolamento das CTMs a partir da medula óssea, já foi possível isolá-las dos mais variados tecidos como cordão umbilical, tecido adiposo, tecidos dentários, sangue menstrual, endométrio, ligamentos cruzados, dentre outros (WAGNER et al., 2005; GENG et al., 2009; CHENG et al., 2009; HUANG et al., 2009; ALLICKSON et al., 2011; SCHURING et al., 2011). Além de demonstrarem capacidade de diferenciação tanto *in vitro* quanto *in vivo* em tecidos mesenquimais, as CTMs apresentam notáveis propriedades como a plasticidade, também conhecida por transdiferenciação, onde são direcionadas aos locais lesionados e originam células não semelhantes ao mesoderma. A secreção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento também é uma característica das CTMs, pois através de interações com seus microambientes impedem que células vizinhas sofram apoptose,

estimulam a proliferação e regeneração do tecido lesado. Também é reportada a modulação do sistema imunológico com regulação positiva diante de processos inflamatórios, além do mecanismo de migração para os tecidos lesados com envolvimento de quimiocinas e moléculas de adesão (FOLESTAD et al., 2016).

CTMs demonstram ter um futuro promissor na medicina regenerativa. Estudos clínicos vêm aumentando a cada ano. De acordo com a Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA dos 5757 estudos clínicos envolvendo células-tronco, 966 são com CTMs em todo o mundo. Dados disponíveis demonstram o enorme potencial que as CTMs possuem no que diz respeito ao tratamento doenças, incluindo as hematológicas (LIU et al., 2017; WANG et al., 2018), autoimunes (LIANG et al., 2018), congênitas (FARAHABADI et al., 2020), dentre outras mostradas na Tabela 2.

Tabela 2- CTMs e sua utilização em estudos clínicos.

Doenças	Condição Clínica	Fonte das CTMs	Resultados	Referências
Neurodegenerativas	Doença de Parkinson	Medula Óssea	Estabilidade na evolução da doença	CANESI et al., 2016
Cardíacas	Insuficiência cardíaca	Cordão umbilical	Melhora funcional do ventrículo esquerdo, regeneração cardíaca	BARTOLUCCI et al., 2017 XU et al., 2019 b
	Infarto do miocárdio	Medula Óssea		
Ósseas	Osteoartrite de joelho	Medula Óssea	Melhora funcional e diminuição da dor	VEGA et al., 2015 LEE et al., 2019
		Tecido adiposo		
Virais	Insuficiência hepática (HBV)	Medula Óssea	Aumento da sobrevida, função hepática e diminuição de infecções	LIN et al., 2017
	Covid-19	Cordão umbilical	Diminuição da mortalidade, níveis de IL-6, PCR e da inflamação pulmonar	SHU et al., 2020

Fonte: Elaborada pela autora.

2.3 CÂNCER

O câncer é um dos principais problemas de saúde mundial, com crescente incidência e mortalidade. De acordo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o termo câncer descreve um conjunto de mais de 100 tipos doenças malignas de crescimento desordenado, características de expansão e disseminação de células anormais, que podem invadir tecidos ou órgãos diferentes de sua origem (INCA, 2020).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) no ano de 2018 cerca de 18 milhões novos casos de câncer foram diagnosticados, seguido por 9,6 milhões de mortes. Países com maior Índice em Desenvolvimento Humano (IDH) lideram as taxas de incidência, que são cerca de duas a três vezes maiores que em países de médio ou baixo IDH, sendo os mais frequentes foram os cânceres de pulmão, mama, colorretal e próstata (OMS, 2018). Para o Brasil, no triênio 2020-2022 a estimativa para cada ano é de cerca 685 mil novos casos de câncer, onde 57% são indivíduos do sexo masculino, acometidos pelo câncer de próstata (29,2%), já no sexo feminino o câncer de mama continua sendo o de maior incidência (29,7%) (INCA, 2020).

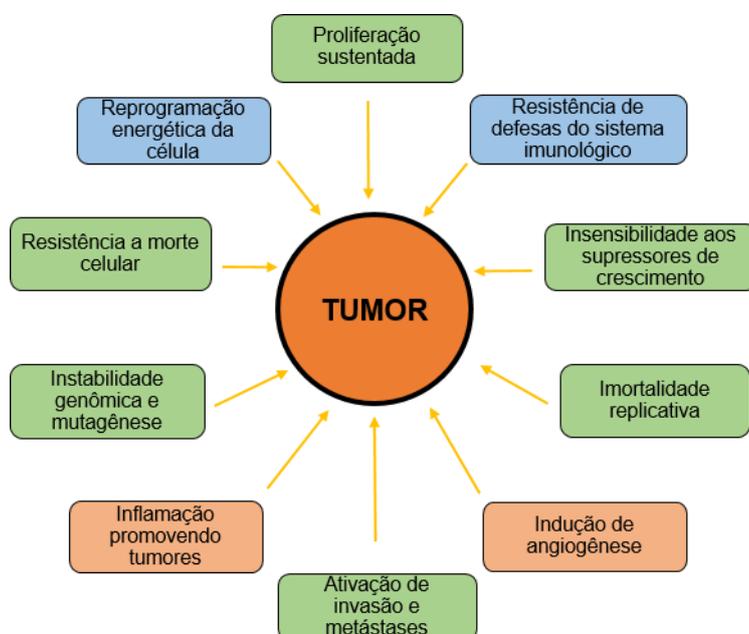
Genes de expressão responsáveis pelo controle das funções celulares normais do organismo, podem sofrer mutações, favorecendo comportamentos irregulares de vias celulares. Estas desordens acontecem de duas maneiras: a primeira por ativação de oncogenes, devido a mutações nos proto-oncogenes, que são responsáveis pelo controle da proliferação, sobrevivência e invasão celular. E segundo, pela inativação de genes supressores de tumores (TSGs), que são responsáveis por inibir a proliferação e sobrevivência, envolvidos também no ciclo celular e morte programada/apoptose (CAMPBELL et al., 2020). A resistência à apoptose é uma característica de diferentes tipos de câncer. Em um organismo normal, há um equilíbrio que envolve a divisão e a morte celular. Mutação em genes supressores como p53, proteína vital na regulação do ciclo celular, leva à perda de reguladores pró-apoptóticos, responsáveis pela detecção de perturbações celulares como danos ao DNA e estresse oxidativo (ARAÚJO et al., 2019; NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

Por ser uma doença complexa, as capacidades adquiridas durante os estágios de desenvolvimento dos tumores foram organizadas a fim de facilitar o entendimento da progressão tumoral, conhecidas como marcas registradas (*Hallmarks* do câncer). São elas: proliferação sustentada, insensibilidade aos supressores de crescimento, imortalidade replicativa, ativação de invasão e metástases, instabilidade genômica, mutagênese e

resistência a morte celular. Ao longo dos anos foram incluídas algumas outras características como: resistência às defesas do sistema imunológico, reprogramação energética da célula, indução de angiogênese e inflamação (Figura 3) (HANAHAN; WEINBERG.,2011; NENCLARES; HARRINGTON., 2020).

Diante da complexidade do câncer, o tratamento depende da sua localização, fatores de risco, gravidade e tipo tumoral. As opções são remoção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, dentre outros. São vários os agentes quimioterápicos empregados na terapia do câncer. Porém é uma terapia acompanhada de efeitos colaterais graves causada pela falta de seletividade celular (SHIVAMADHU et al., 2017). As leucemias representam as neoplasias hematológicas e podem se manifestar de forma aguda ou crônica. Os progenitores hematopoiéticos são capazes da autorrenovação e diferenciação em linhagens celulares que constituem o sistema hematopoiético. Porém, nas leucemias essas células param de responder aos fatores externos dentro do microambiente da medula óssea, desencadeando o descontrole desses processos, inclusive de apoptose. Conseqüentemente, o crescimento desordenado na medula óssea, contribui para que as células imaturas sejam encontradas no sangue periférico (WONG et al., 2018).

Figura 3- Marcas registradas do câncer.



Fonte: Elaborada pela autora.

2.3.1 Lectinas com atividade citotóxica e antitumoral

Ao longo dos anos, a busca por compostos naturais que desempenhem atividade contra as células tumorais tem sido intensa. As lectinas vegetais estão incluídas nesses compostos, sendo consideradas como grandes candidatas para a ação anticâncer (LUZ et al., 2017; RIBEIRO; FERREIRA; FREITAS., 2018). Em estudos *in vitro* e *in vivo*, diversas lectinas demonstram atividade antitumoral, sem causar citotoxicidade em células normais. Lectina isolada de casca da *Crataeva tapia* (CrataBL) promoveu a diminuição de Sarcoma-180 em camundongos (Swiss) na dose de 20 mg/kg (ARAÚJO et al., 2011). Lectina de rizoma da *Microgramma vacciniifolia* (MvRL) promoveu citotoxicidade de células tumorais de carcinoma mucoepidermóide pulmonar (HCI-H292, CI_{50} : 25,23 $\mu\text{g/mL}$) sem afetar viabilidade de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) mesmo em concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (ALBUQUERQUE et al., 2014). Lectina de sementes da *Moringa oleífera* (cMoL) diminuiu a viabilidade das células tumorais de melanoma B16-F10 nas concentrações de 3 a 16 μM (LUZ et al., 2017). Lectina de folíolos da *Calliandra surinamensis* (CasuL) reduziu viabilidade das células mielocíticas leucêmicas (K562) e células do câncer de mama (T47D), com CI_{50} de 67,08 e 58,75 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e sem efeito citotóxico em PBMCs (PROCÓPIO et al., 2017).

A ação citotóxica específica sobre células tumorais de algumas lectinas está associada à especificidade de ligação que essas proteínas possuem a carboidratos de superfície celular, reconhecendo mudanças na expressão da glicosilação nas membranas das células tumorais, (POIROUX et al., 2017; RIBEIRO; FERREIRA; FREITAS., 2018). As lectinas são citotóxicas para células tumorais por diferentes mecanismos, como interações com os receptores específicos glicosilados de membrana, internalização por endocitose (podendo ser localizadas em diferentes compartimentos celulares) e ativação de vias de sinalização ligadas à morte celular que podem ser indução de apoptose, autofagia, necrose e inibição do crescimento celular (LICHTENSTEIN; RABINOVICH., 2013; YAU et al., 2015; LUZ et al., 2017).

A morte celular é conduzida por um processo biológico intracelular bem regulado. Também ocorre em condições patológicas em resposta a uma lesão, inflamação, infecção ou intoxicações, mediada por vias de sinalização celulares. Mecanismos de morte celular

possuem um papel importante na homeostasia do organismo e falhas ou ativação desregulada dos mesmos estão relacionados a diversas doenças (WIMMER; SACHET; OEHLER., 2020).

A apoptose é um mecanismo de morte bastante regulado, que não ocorre somente em ocasiões de estresse ou dano, mas também durante o desenvolvimento celular e renovação tecidual (GALLUZZI et al., 2018). A ativação pode ocorrer por via extrínseca (citoplasmática) ou via intrínseca (mitocondrial). A extrínseca acontece pela ligação aos receptores de morte presentes nas superfícies celulares; um exemplo é o receptor do fator de necrose tumoral α (TNF- α). Na via intrínseca, a ativação ocorre através de estresse intracelular ou extracelular e as perturbações ocorrem principalmente no potencial interno da membrana mitocondrial, levando a uma perda da homeostase celular, estimulando a morte celular apoptótica (LUZ et al., 2017; RIBEIRO; FERREIRA; FREITAS., 2018). Os caminhos entre as duas vias são diferentes, mas resultam na ativação de proteases específicas, chamadas de caspases. As células em apoptose apresentam alterações morfológicas como aumento na permeabilidade da membrana, encolhimento da célula, condensação da cromatina (picnose) e fragmentação do DNA (cariorrexis) (YANG et al., 2020; NIKOLETOPOULOU et al., 2013; GALLUZZI et al., 2018).

Diferentemente, a necrose é iniciada por perturbações que envolvem o microambiente intracelular, diante de danos ou patologias, seguida por reações inflamatórias. As células necróticas ocasionam tanto uma inflamação local como em células vizinhas que sobreviveram aos danos, ocasionada pela perda da permeabilidade da membrana, liberando padrões moleculares associados aos danos (DAMPs) endógenos, responsáveis pela resposta inflamatória (GALLUZZI et al., 2018; KIM- CAMPBELL; GOMEZ; BAYIR., 2019). A necrose não é ativada diretamente por via das caspases e sim pela desorganização da função e estrutura da membrana mitocondrial interna, desencadeando as características morfológicas de células necróticas que são o aumento do retículo endoplasmático, condensação da cromatina, ruptura da membrana plasmática e lise celular (ZHU; SUN., 2018).

Diversos ensaios de citotoxicidade são realizados para avaliação dos tipos de morte celular, alguns deles via citometria de fluxo, que quantifica células apoptóticas e necróticas utilizando marcadores fluorescentes. Um dos corantes utilizados para a apoptose é a anexina-V conjugada com marcadores fluorescentes. A formação de corpos apoptóticos neste tipo de morte externaliza a fosfatidilserina, um fosfolípídeo normalmente presente apenas na camada interna da membrana. A anexina- V liga-se a esse lipídeo, marcando-o (CROWLEY

et al., 2016). Para células necróticas um dos marcadores utilizados é o iodeto de propídeo (PI), que entra nas células que perderam a integridade de membrana, associando-se aos ácidos nucleicos (RIEGER et al., 2011). Aliada à citometria, a microscopia óptica (alterações morfológicas) e estudos de mecanismos (vias de sinalização) auxiliam e comprovam o tipo de morte desencadeada (LUZ et al., 2017).

2.4 DOR

2.4.1 Fisiopatologia da dor

A dor é uma percepção sensorial de envolvimento fisiológico complexo, responsável por gerar impactos efetivos em ambiente externo e interno de organismos, além de ser uma experiência subjetiva incluindo comportamento cognitivo e emocional ou afetivo (KANIA et al., 2021). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP- *International Association for the Study of Pain*) define a dor como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada a dano real ou potencial ao tecido” (RAJA et al., 2020).

A nocicepção e a dor possuem conceitos diferentes. O termo nocicepção refere-se ao estímulo doloroso, tem o envolvimento das vias neuroanatômicas, além dos mecanismos neurológicos que detectam os sinais que chegam ao sistema nervoso central (SNC), resultado da ativação dos receptores sensoriais especializados (nociceptores). Já a dor é a percepção compreendida por áreas presentes no córtex cerebral responsáveis por uma resposta efetiva ao estímulo recebido (CESARE; NAUGHTON.,1997; JULIUS; BASBAUM., 2001; RODRIGUEZ et al., 2015).

Em termos de duração, a dor pode ser classificada como: dor aguda, associada a lesão ou trauma tecidual conhecido, responsiva à terapia, com desaparecimento conforme a efetividade ao tratamento ou cicatrização; ou dor crônica, que geralmente ultrapassa o período de recuperação do organismo, e mesmo com a resolução da lesão inicial a dor ainda persiste, sendo um importante fator de sofrimentos e incapacidade para os indivíduos. Mundialmente, 1 em cada 5 adultos (20%) sofrem de dor e 1 em cada 10 adultos (10%) é diagnosticado com dor crônica a cada ano (SCHAIBLE et al., 2004; GOLDBERG et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 2015). De acordo com o tipo de lesão, a dor pode ser classificada como sendo:

nociceptiva, neurogênica, neuropática, psicogênica ou inflamatória, resultantes da estimulação dos nociceptores, lesão do tecido neural, disfunção de um nervo, fatores psicológicos, ou resultantes de processos inflamatórios, respectivamente (RODRIGUEZ et al., 2015).

O processo da nocicepção acontece em 4 fases. A primeira, conhecida como transdução, é iniciada quando os nociceptores presentes na pele, articulações e nas membranas de órgãos convertem o estímulo nocivo em corrente elétrica, e conseqüentemente liberam substâncias sensibilizadoras de nociceptores (bradicininas, histaminas, prostaglandinas, substância P, dentre outras); essa corrente é conduzida então através de potenciais de ação (JULIUS; BASBAUM., 2001; SCHAIBLE et al., 2004; VANDERAH., 2007; RODRIGUEZ et al., 2015).

Os nociceptores são terminações nervosas livres ativadas por estímulos capazes de causar danos aos tecidos, como pressão mecânica, temperaturas extremas e produtos químicos, como os ácidos. Então, a transmissão do potencial de ação é conduzida ao longo dos axônios nociceptivos para os corpos celulares da raiz dorsal na medula espinhal através de fibras aferentes de primeira ordem, classificadas de acordo com a sua estrutura, diâmetro e velocidade de condução (BASBAUM et al., 2009).

Existem duas principais classes de nociceptores: fibras C e as fibras A- δ . As fibras C caracterizam-se por serem amielínicas, de pequeno diâmetro (0.4 – 1.4 μm), com velocidade de condução de 0,5 a 2,0 m/s, representando a maioria dos neurônios sensoriais do sistema nervoso periférico, responsivos ao calor e mecanicamente (fibras C polimodais), além da presença de fibras C sensíveis somente ao calor (nociceptores silenciosos), com limiares de dor altos e que desenvolvem sensibilidade mecânica apenas em um cenário de lesão ou processo inflamatório. Já as fibras A- δ são mielinizadas, de diâmetro médio (2.0 a 6.0 μm), maior velocidade de condução (12 a 30 m/s), transmitindo informações de alta intensidade e baixa latência, mediando a resposta dolorosa rápida (dor aguda). Além disso, as fibras A- δ podem ser divididas em dois grupos: tipo I, que correspondem a nociceptores mecânicos de alto limiar, respondem a estímulos mecânicos quanto químicos, além de limiares de calor. Já o tipo II possui limiar de calor mais baixo, porém um limiar mecânico alto (JULIUS; BASBAUM., 2001; SCHAIBLE et al., 2004; VANDERAH., 2007; RODRIGUEZ et al., 2015).

Acredita-se que devido às diferenças na velocidade de condução entre as fibras, os sinais das fibras A- δ chegam à medula espinhal antes dos da fibra C e que o estímulo doloroso

possibilita duas sensações de dor sucessivas e possivelmente distintas. Nas evidências vindas de estudos experimentais quando realizada a estimulação das fibras A, a sensação de dor acentuada é caracterizada em *picada*, já nas fibras C uma sensação fraca em queimação dolorida é descrita. O potencial de ação conduzido por essas fibras leva à despolarização da membrana, resultado da saída de potássio e entrada de sódio na célula; dessa forma a polaridade elétrica é adquirida e facilitando a chegada do sinal ao cérebro (JULIUS; BASBAUM., 2001; SCHAIBLE et al., 2004; VANDERAH., 2007; RODRIGUEZ et al., 2015). Todos os neurônios sensoriais primários possuem um corpo celular na raiz dorsal que dão origem a um único axônio que inerva o tecido alvo periférico ao SNC. O impulso elétrico disparado percorre toda a fibra nervosa até atingir neurônios nociceptivos de segunda ordem (BASBAUM; JULIUS., 2006).

A terceira fase é a percepção que chega ao cérebro em forma de sinapses para os neurônios. O principal neurotransmissor excitatório em todos os nociceptores é o glutamato, porém as fibras podem ser sensibilizadas por outras substâncias como a substância P e peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP). A percepção é sentida por duas vias, a primeira caracterizada por um sinal que vai do tálamo ao córtex sensorial primário, caracterizando o componente discriminativo, ou seja, a codificação e análise quanto à natureza, localização, intensidade e duração do estímulo nociceptivo. Em áreas corticais límbicas o aspecto afetivo-motivacional percebido gera o caráter desagradável e doloroso (CROSS., 1994; JULIUS; BASBAUM., 2001; SCHAIBLE et al., 2004; VANDERAH., 2007; RODRIGUEZ et al., 2015; KANIA et al., 2021).

O sistema de modulação é a última fase, ocorrendo em neurônios localizados no dorso posterior da medula espinhal que modulam as transmissões nociceptivas. A liberação de substâncias como serotonina (5-HT) e norepinefrina ativa os opiáceos endógenos (encefalinas, β -endorfinas) levando à inibição seletiva de transmissão do sinal da dor. Portanto, opioides endógenos podem atuar em terminações pré-sinápticas e pós-sinápticas de nociceptores, capazes de bloquear os canais de cálcio controlados por voltagem, bem como aumentar o efluxo de potássio (hiperpolarização) resultando na analgesia. Em indivíduos que relatam não sentir dor em condições de estresse, ou em situações que a dor apresenta-se de forma leve, a ativação do sistema modulador demonstra ser suficiente (CROSS., 1994; JULIUS; BASBAUM., 2001; SCHAIBLE et al., 2004; VANDERAH., 2007; RODRIGUEZ et al., 2015).

Processos que atuam como alerta para a melhor resposta à dor são conhecidos como facilitação e inibição: a facilitação leva ao comportamento protetor e inconsciente de sinalização ao indivíduo sobre lesão ao tecido, ajudando no desempenho de reações comportamentais como a de fuga ou luta contra o fator prejudicial. Já a inibição é caracterizada por períodos de ameaça, onde a transmissão de informações (sináptica) é inibida e assim, evita o comprometimento de funções e diminuição da dor (RODRIGUEZ et al., 2015).

Os efeitos farmacológicos de drogas opioides ou efeitos biológicos dos peptídeos endógenos iniciam-se através da ligação e ativação dos receptores opioides ligados a membrana, encontrados principalmente no sistema nervoso central (SNC) e periférico. Pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G, classificados em três diferentes tipos: μ (Mu), δ (Delta) e κ (Kappa), exibindo cerca de 60% de semelhanças nas sequências de aminoácidos e perfis de seletividade a ligantes específicos, além de padrões de distribuição neuroanatômica. Do ponto de vista clínico, o receptor μ têm grande importância, uma vez que os analgésicos mais potentes como morfina, fentanil e metadona provocam efeitos farmacológicos de analgesia, bem como o uso prolongado ou excessivo levam ao desenvolvimento da tolerância e a dependência física (WEI et al., 2004; SONG et al., 2017).

2.4.2 Modelos experimentais de dor

Pelo fato do processo de dor apresentar diferentes vias de sinalização, é necessário empregar modelos experimentais que diferenciem as possíveis ações analgésicas das substâncias em estudo, sejam elas por mecanismos centrais ou periféricos. Por não serem capazes de expressar os componentes subjetivos da dor, os animais são avaliados de acordo com a maneira que se comportam (nocicepção) diante dos testes (KANDEL et al., 2003).

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é um modelo não seletivo amplamente utilizado para triagem de novos agentes antinociceptivos. Estímulos nocivos como a injeção intraperitoneal de ácido acético desencadeia um processo irritativo em superfícies viscerais, aumento da permeabilidade vascular e liberação de mediadores inflamatórios, incluindo a bradicinina, histamina, serotonina, substância P e prostaglandinas. Contribuem para a ativação das terminações nervosas, as quais são responsáveis pela dor periférica e o desenvolvimento das contorções abdominais (CATERINA et al., 1997; BHUIYAN et al., 2020).

O teste de formalina é amplamente utilizado para medir a efetividade de candidatos a agentes antinociceptivos, apresentando fácil execução e possibilitando a avaliação de respostas comportamentais relacionadas à dor. A vantagem deste teste é a possibilidade de avaliar e diferenciar os dois tipos de dor: neurogênica e inflamatória. A fase inicial aguda (neurogênica) acontece nos primeiros 5 minutos após a injeção da formalina e leva à ativação de neurônios aferentes primários, estimulando de maneira direta os nociceptores, e à liberação da substância P. Após isso, por um período de cerca de 10 minutos, chamado de quiescência, ocorre a inibição da transmissão nociceptiva pelos circuitos supra espinhais e espinhais e, assim, há uma redução temporária da dor. Posteriormente, tem início uma fase mais prolongada (inflamatória) que ocorre entre 15 e 30 minutos após o estímulo e envolve a liberação de vários mediadores químicos, incluindo a serotonina, bradicinina, histamina e prostaglandinas, desencadeando um processo inflamatório nos tecidos periféricos e levando a alterações no processamento central da nocicepção, prolongando assim o comportamento doloroso nessa fase (HUNSKAAR, HOLE., 1987; TJOLSEN et al., 1992; TJOLSEN et al., 1997; FISCHER et al., 2014). Drogas de ação central, como opioides, inibem ambas as fases, enquanto as drogas que agem na periferia, como AINES e corticoides, inibem especialmente a fase inflamatória (GARCÍA et al., 2004).

No teste de imersão da cauda (tail-flick), a temperatura é o estímulo nociceptivo que provoca o movimento de retirada da cauda da água. Os nociceptores são estimulados principalmente as fibras polimodais C que percorrem para neurônios espinhais e sistemas neurais superiores, resultando na percepção do calor. Por esse motivo, o teste é aplicado para avaliação de compostos com efeito analgésico central, semelhantes aos promovidos por analgésicos opioides, que aumentam o tempo de latência de retirada da cauda (LYNN et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2009).

2.4.3 Lectinas com ação antinociceptiva

Lectinas também têm apresentado atividade antinociceptiva. Um exemplo é a lectina de sementes de *Canna limbata* (CLL; 0,1, 1, 5 e 10 mg/kg por via oral), que apresentou potencial analgésico por mecanismos periféricos, diminuindo o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em 60,3, 52,1, 70,8, 76,1%, respectivamente. No teste de formalina, causou a redução no tempo de lambida da pata de camundongos na fase

inflamatória em 48,1, 66,1, 69,6, 79,5%. Além da diminuição da migração celular para a cavidade peritoneal induzida por Zymosan A. Porém, CCL não aumentou o tempo de latência dos camundongos sobre a placa quente (ARAÚJO et al., 2013).

Lectina de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL; 15, 30 e 60 mg/kg por via intraperitoneal) reduziu significativamente o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos Swiss em 43,1, 50,1 e 71,3%, respectivamente. Nas doses de 30 e 60 mg/kg, aumentou o tempo de latência no teste da placa quente, 90 minutos após a administração. Foi sugerido um efeito analgésico periférico atribuído à inibição dos mediadores inflamatórios, além da ação central através da interação da lectina aos receptores envolvidos na nocicepção (CAMPOS et al., 2016).

Estudo realizado por Figueiredo et al (2009) mostrou que a lectina de sementes de *Canavalia boliviana* (CboL; 1, 5 e 10 mg/kg i.v.) reduziu as contorções abdominais em 60, 63 e 64%, além de ter sua ação revertida por seu carboidrato de ligação, a glicose. O efeito antinociceptivo foi significativo em ambas as fases do teste de formalina. Teve ação analgésica central com o aumento do período de latência em resposta a estímulos térmicos nos testes de placa quente e imersão de cauda, além da provável ação ser por interação com receptores opioides.

Nascimento et al (2015) estudaram o efeito antinociceptivo da lectina de sementes de *Andira anthelmia* (AAL; 0,01, 0,1 e 1 mg/kg i.v.) que reduziu as contorções abdominais induzidas por ácido acético em 68, 46 e 74% em camundongos. AAL (0.1 mg/kg) diminuiu o tempo de lambida da pata apenas na fase inflamatória (48%) e sua associação a D-manose bloqueou sua atividade. A lectina de sementes de *Canavalia grandiflora* (ConGf; 1, 10 e 100 mg/kg v.o) diminuiu o número de contorções induzidas por ácido acético em 70, 40 e 54 %, e na presença do seu açúcar de ligação α -D-metil-manosídeo teve o efeito antinociceptivo bloqueado (HOLANDA et al., 2009).

Lectina de sementes de *Lonchocarpus araripensis* (LAL; 0,1, 1 e 10 mg/kg i.v) em resposta à formalina, diminuiu o tempo de lambida da pata em 46, 70 e 79 %, também reduziu na concentração de 10 mg/kg o tempo de lambida da pata induzida pela capsaicina em 50 % e não inibiu a nocicepção nos testes de placa quente (AMORIM et al., 2016).

3 RESULTADOS

Os resultados dessa dissertação são apresentados na forma de artigos.

3.1 ARTIGO 1- EFEITOS DA LECTINA DE FOLHAS DA *Schinus terebinthifolia* Raddi. SOBRE LINHAGENS TUMORAIS LEUCÊMICAS E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMS) HUMANAS

Efeitos da lectina de folhas da *Schinus terebinthifolia* Raddi. sobre linhagens tumorais leucêmicas e células-tronco mesenquimais (CTMs) humanas

Amanda de Oliveira Marinho^a, Jéssica de Santana Brito^a, Leydianne Leite de Siqueira Patriota^a, Wyndly Daniel Cardoso Gaião^b, Diego José Lira Torres^c, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Vírginia Maria Barros de Lorena^c, Cláudio Gabriel Rodrigues^b, Márcia Bezerra da Silva^b, Thiago Henrique Napoleão^a

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

^b*Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^c*Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil.*

Resumo

Lectinas são proteínas que reconhecem carboidratos de maneira reversível e específica, sendo capazes de distinguir diferentes padrões de glicosilação nas superfícies celulares e induzir diversos tipos de respostas. A lectina de folhas de *Schinus terebinthifolia* (SteLL) possui diferentes atividades biológicas, incluindo antimicrobiana, imunomoduladora e antitumoral. Esse estudo teve como objetivo investigar os efeitos de SteLL na viabilidade de células leucêmicas humanas (K562, leucemia mieloide crônica; JURKAT, leucemia linfoblástica aguda) e células tronco mesenquimais (CTMs) isoladas de cordão umbilical humano, assim

como investigar possíveis efeitos imunomoduladores sobre as CTMs. A citotoxicidade de SteLL foi avaliada pelo ensaio do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] e/ou por avaliação de ocorrência de apoptose e/ou necrose. Ainda, culturas de CTMs tratadas com SteLL foram investigadas quanto à produção de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL17A, IFN- γ e TNF- α). SteLL (0,048-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não alterou a viabilidade das CTMs em nenhuma das concentrações, não induzindo apoptose ou necrose. Porém, não modulou a liberação das citocinas. A lectina, nas concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, exerceu efeito citotóxico sobre K562, induzindo apoptose em 92,3%, 92,3% e 97,7% das células, respectivamente. Por outro lado, não foi citotóxica para JURKAT em nenhuma concentração.

(12,5–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Em conclusão, SteLL não é tóxica para CTMs, porém também não teve efeito imunomodulador sobre elas, mas apresentou potencial *in vitro* para reduzir a viabilidade de células de leucemia mieloide crônica.

Palavras-chave: anticâncer; células-tronco mesenquimais; lectina; aroeira-da-praia.

Introdução

Células-tronco são capazes de autorrenovação e diferenciação em diferentes tipos celulares. No campo da terapia celular, essas células se destacam pelos resultados promissores na recuperação e cura de diversas doenças (ZWETSLOOT et al., 2016; MOCHIDA et al., 2020). Em estudo experimental realizado por Xifro et al. (2016) a infusão de células-tronco isoladas da medula óssea no mesencéfalo melhorou significativamente a perda e a funcionalidade de neurônios dopaminérgicos em modelo de doença de Parkinson em camundongos. As células-tronco mesenquimais (CTMs) podem ser isoladas de quase todos os tecidos do organismo humano, incluindo cordão umbilical, medula óssea, tecido adiposo e tecidos dentários (MURRAY; PÉAULT, 2015; CHULPANOVA et al., 2018). Consideradas multipotentes, diferenciam-se em diferentes linhagens mesenquimais (osteogênicas, condrogênicas, adipogênicas), além de apresentar propriedades imunomoduladoras úteis para terapias de doenças degenerativas e câncer (PITTENGER et al., 2004; CHAO et al., 2012 ; DING et al., 2015; CHEN et al., 2018; LIN et al., 2019).

Estudos pré-clínicos mostram que as CTMs modulam as respostas imune inata e adaptativa em várias doenças, inibindo respostas pró-inflamatórias e estimulando a respostas anti-inflamatórias. No microambiente celular, as CTMs secretam uma gama de quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento, bem como moléculas da matriz extracelular, que possuem propriedades terapêuticas úteis (ENGLISH., 2013; DABROWSKA et al., 2021).

Modulam a funcionalidade de células apresentadoras de antígenos, células T e células NK (Natural Killer), principalmente por efeitos imunossupressores (RASMUSSEN., 2006; ENGELA et al., 2012). As CTMs são capazes de migrar para locais lesionados ou de inflamação em resposta aos mediadores inflamatórios. Exercem efeitos reparadores por meio da transdiferenciação de células específicas do tecido ou por secreção de fatores imunorreguladores que facilitam o restabelecimento da homeostase tecidual (WANG et al., 2014). Acredita-se que as ações ocorrem tanto por contato celular em resposta às células imunes quanto pela secreção de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (ENGELA et al., 2012). Estudo realizado por Raffaghello et al. (2008) demonstrou que CTMs isoladas da medula óssea inibem a apoptose de neutrófilos ativados, e que o principal fator solúvel derivado das CTMs foi a IL-6. Nesse caso, essa célula exerceu ação anti-apoptótica por meio dos fatores solúveis, sem a necessidade de contato célula-célula.

As lectinas são proteínas capazes de reconhecer e se ligar a carboidratos de forma específica e reversível, sem modificá-los bioquimicamente (LIU; BIAN; BAO, 2010; KARNCHANATAT et al., 2012; MACEDO et al., 2015). Lectinas de plantas são amplamente estudadas e apresentam várias atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antitumoral e imunomoduladora (MOURA et al., 2017; PROCÓPIO et al., 2017; PATRIOTA et al., 2017; AHMED et al., 2017). Pesquisas envolvendo lectinas e células-tronco são estimuladas pelo potencial das lectinas de reconhecer carboidratos presentes em praticamente todas as membranas celulares (MIKKOLA et al., 2012). *Microarray* de alta densidade utilizando lectinas demonstrou ser útil para o reconhecimento de diferentes células-tronco (TATENO et al., 2011; HASEHIRA, HIRABAYASHI, TATENO, 2017). A lectina de *Erythrina cristagalli* (ECA) serviu como matriz de suporte para proliferação e aumentou a eficiência do plaqueamento de células-tronco pluripotentes e células-tronco embrionárias humanas (MIKKOLA et al., 2012).

O câncer é uma das principais causas de morte em todo mundo, sendo responsável por quase 10 milhões de mortes somente no ano de 2020 (OMS, 2020). Diante da complexidade

do câncer, os tratamentos empregados dependem da localização, fatores de riscos, gravidade e o tipo tumoral, estes incluem: agentes quimioterápicos, radioterapia, remoção cirúrgica, dentre outros. Porém, são terapias agressivas que muitas vezes acometem as células normais e causam efeitos colaterais graves, além da resistência que alguns tumores adquirem às drogas (TESSMANN et al., 2017; SHIVAMADHU et al., 2017). A busca por novas moléculas, menos agressivas, que sejam capazes de combater diferentes tipos de cânceres e melhorem a seletividade celular, é o que impulsionam pesquisas em todo o mundo (SHIVAMADHU et al., 2017). As lectinas encontram-se entre esses compostos e têm se destacado por apresentarem efeitos citotóxicos *in vitro* contra linhagens tumorais, ação antitumoral *in vivo* em modelos tumorais e auxiliarem no diagnóstico, monitoramento da progressão e evolução do câncer (PROCÓPIO et al., 2017; POIROUX et al., 2017; PATRIOTA et al., 2021). Lectinas são capazes de reconhecer especificamente as mudanças nos padrões de glicosilação nas membranas das células tumorais, e resultam em respostas efetivas como a de ativação de mecanismos para indução de morte celular e a inibição do crescimento tumoral (MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020; PATRIOTA et al., 2021).

A lectina isolada de folhas da *Schinus terebinthifolia* Raddi (SteLL) é uma glicoproteína de massa molecular de 12,4 kDa (GOMES et al., 2013; SANTOS et al., 2020). Diversas atividades biológicas vêm sendo descritas para SteLL, incluindo o efeito citotóxico *in vitro* contra células de sarcoma-180 e antitumoral *in vivo* em camundongos portadores desse tumor (RAMOS et al., 2019) e redução da hiperalgesia em modelo de dor oncogênica (RAMOS et al., 2020). Além disso, SteLL não apresentou citotoxicidade em esplenócitos de camundongos, estimulando a liberação de interleucinas (IL-2, IL-4 e IL-17A), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e reduzindo a secreção de óxido nítrico (NO) (SANTOS et al., 2020). Essa lectina também não foi citotóxica para macrófagos de camundongos, e estimulou a liberação das citocinas IL-6, IL-10, IL-17A e TNF- α , NO e ânion superóxido (LIMA et al., 2019).

Os relatos do potencial antitumoral e imunomodulador de SteLL estimulam a investigação da atividade citotóxica de SteLL em linhagens tumorais leucêmicas (K562 - leucemia mielóide crônica; JURKAT- leucemia linfoblástica aguda) e em células-tronco mesenquimais (CTMs) isoladas de cordão umbilical humano, bem como a capacidade de SteLL em modular a produção de citocinas pelas CTMs.

Materiais e métodos

Isolamento da SteLL

Folhas de *S. terebinthifolia* Raddi. foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco, na cidade do Recife, Brasil com autorização (n° 36301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. O acesso foi registrado (AED6BF8) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado. Um exemplar da espécie foi arquivado (n° 73.431) no Instituto Agrônomo de Pernambuco. As folhas foram lavadas com água corrente e em seguida com água destilada. Secas por 4 dias à 28 °C e depois trituradas até a obtenção de uma farinha com auxílio de processador industrial. Para obtenção do extrato, a farinha foi suspensa na proporção de 10% (v/v) em NaCl 0,15 M e após homogeneização por 16 h a 4 °C e centrifugação por (15 min, 9000 g, 4°C), foi obtido o extrato proteico.

SteLL foi isolada de acordo com o protocolo descrito por Gomes et al. (2013). O extrato proteico (45 mg) foi aplicado em uma coluna (7,5 x 1,5 cm) de quitina (Sigma-Aldrich, EUA) previamente equilibrada com NaCl 0,15 M. Posteriormente, a coluna foi lavada com o objetivo de remover as proteínas não ligadas e, em seguida, SteLL foi eluída com ácido acético 1,0 M. As frações coletadas foram acompanhadas quanto à absorbância (280 nm). SteLL foi dialisada contra água destilada por cerca de 6 h em uma membrana de celulose (Sigma-Aldrich, EUA), liofilizada e posteriormente ressuspensa em solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Determinação da atividade hemaglutinante (HA) e concentração proteica

A capacidade de ligação a carboidratos de SteLL foi determinada através do ensaio de atividade hemaglutinante (HA) conforme descrito por Procópio et al. (2017) utilizando suspensão de eritrócitos de coelhos tratados com glutaraldeído. A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Lowry et al. (1951) usando uma curva padrão de albumina bovina (31.25–500 µg/mL).

Coleta do cordão umbilical humano

As células-tronco mesenquimais (CTMs) foram isoladas de cordão umbilical humano coletados em partos cesáreos ocorridos no Hospital D'Avila, na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. As mães doadoras assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS/UFPE (90172918.3.0000.5208). Os cordões foram transportados ao laboratório em um recipiente estéril contendo solução salina com EDTA (2mM) e antibióticos – penicilina (150 U/ml), estreptomicina (150 µg/mL) e anfotericina (5 µg/ml) – sendo processados em até 6 h após o parto.

Isolamento e cultivo das CTMs

Para isolar as células, os cordões foram lavados e as veias perfundidas com PBS. Então, os cordões foram cortados em pequenos pedaços longitudinalmente (aproximadamente 2 cm de comprimento) removendo veias e artérias, que foram descartadas. O tecido contendo a geleia de Wharton foi então fragmentado e transferido para garrafas de cultura estéreis (75 cm²) contendo meio DMEM-*low glucose* (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SBF; 10% v/v), fator de nutrientes Ham's F-12 (20% v/v; Gibco) e os antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), sendo mantidos em estufa a 37 °C, 80% de umidade e 5% de CO₂. O método de isolamento das CTMs foi realizado sem tratamento enzimático, baseado na migração espontânea das células do tecido e sua propriedade de aderência ao plástico com uma média de duração de 21 dias. A identificação foi realizada pelas características conhecidas de CTMs tais como habilidade de aderência ao plástico, morfologia (aspecto fibroblastoide) e por imunofenotipagem.

Avaliação da citotoxicidade in vitro em CTMs tratadas com SteLL

CTMs (10⁵ células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços em meio DMEM *low glucose* e incubadas em estufa (37°C, 5% de CO₂) por um período de 24 h para aderência

à placa. Após esse período, SteLL foi ressuspensa no meio de cultura e adicionada nas placas em diluição seriada para atingir concentrações finais entre de 0,048 e 100 µg/mL nos poços. Poços contendo apenas células e meio de cultura foram usados como controle negativo. As placas foram incubadas novamente durante o período de 24 e 48 h. Em seguida, o teste de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) foi realizado para avaliação da citotoxicidade (PRÄBST et al., 2017). Após cada período de incubação, o MTT (20µL; 5 mg/mL) foi adicionado aos poços e a placa incubada por 4 h. Em seguida, todo o meio foi retirado e dimetil sulfóxido (DMSO, 100 µL) adicionado para solubilizar os cristais de formazan formados. A leitura da absorbância (590 nm) foi realizada em leitor de microplacas. Cada experimento foi realizado em triplicata.

Análise de morte celular em CTMs tratadas com SteLL

CTMs foram cultivadas em placas de 6 poços em meio DMEM *low glucose* e incubadas em estufa (37 °C, 5% de CO₂) por um período de 24 h para aderência à placa. Após esse período, as células foram tratadas com SteLL (50 µg/mL). Poços contendo apenas células e meio de cultura foram usados como controle negativo. Após o tratamento, as placas foram incubadas em estufa por 24 h. Em seguida, as células foram coletadas utilizando tripsina (Gibco) e incubadas novamente em estufa por 5 min para a dissociação de células da placa. A seguir, as CTMs foram coletadas, lavadas em PBS e centrifugadas (3000 rpm, 10 min). A ocorrência de apoptose e/ou necrose foi então avaliada utilizando o kit Annexin V-FITC/PI (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Assim, o sedimento obtido foi ressuspensa em 300 µL do tampão de ligação (50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM CaCl₂, pH 7,4) e transferido para tubos de citometria. Anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (AnnV-FITC) e iodeto de propídeo (PI) foram adicionados. A análise foi realizada no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences) com coleta de 10.000 eventos e analisados no próprio software. Células duplamente marcadas foram consideradas em apoptose tardia; células marcadas apenas com AnnV-FITC foram consideradas em estágio inicial de apoptose; células marcadas apenas com PI foram consideradas em processo de necrose; e células não marcadas foram consideradas viáveis. Cada experimento foi realizado em triplicata.

Dosagem de citocinas em sobrenadantes de culturas de CTMs

Sobrenadantes de culturas de CTMs, na ausência ou presença de SteLL (50 µg/mL) após 24 h de tratamento, foram coletados para quantificação de citocinas utilizando o kit de citocinas humanas Th1/Th2/Th17 –CBA (BD Biosciences, EUA) para detecção simultânea de interleucinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL17A), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interferon gama (IFN-γ). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante e dados foram adquiridos no citômetro BD Accuri C6. Seis curvas padrão de citocinas individuais (0–5000 pg/mL) foram realizadas para o ensaio.

Linhagens tumorais leucêmicas

As linhagens celulares humanas K562 (leucemia mieloide crônica) e JURKAT (leucemia linfoblástica aguda) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil. As células foram cultivadas em meio RPMI completo contendo 10% de SBF e 1% de solução de antibióticos (estreptomicina a 100 µg/mL e penicilina a 100 U/mL).

Avaliação de morte celular em linhagens tumorais leucêmicas tratadas com SteLL

Células tumorais K562 (10^5 células/poço) e JURKAT (10^5 células/poço) foram cultivadas em microplacas de 24 poços contendo meio RPMI 1640 com HEPES suplementado com soro fetal bovino a 10% (p/v). Em seguida, a K562 foi tratada com SteLL (12,5–50 µg/mL) e a JURKAT com SteLL (12,5–50 µg/mL). Poços contendo apenas células e meio de cultura foram usados como controle negativo. Poços tratados com etanol foram usados como controle positivo de morte. Após o período de incubação de 24 h em estufa (37°C, 5% de CO₂) as células foram lavadas com PBS e coletadas por centrifugação (5.000 rpm, 5 min) e avaliadas quanto à ocorrência de apoptose e/ou necrose conforme descrito acima.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados no software GraphPad Prism®, versão 8.0, expressos como média \pm desvio padrão (SD). As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram calculadas aplicando-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey. O teste *t* foi utilizado para analisar os resultados do ensaio das citocinas. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância quando comparados ao controle.

Resultados e discussão

As CTMs são um tipo de células-tronco adultas, multipotentes, sendo consideradas agentes terapêuticos celulares promissores, devido a suas propriedades de autorrenovação e diferenciação em linhagens celulares (GAO et al., 2016; GAO et al., 2017). As lectinas são aplicadas em estudos com células-tronco devido a sua capacidade de reconhecimento e ligação a carboidratos na superfície dessas células, sendo empregadas principalmente na técnica de *microarray* visando a busca por novos biomarcadores (NAND et al., 2014; DANG et al., 2020). Porém, é provável que a interação de lectinas com receptores glicosilados nessas células também levem a respostas intracelulares. Assim, nos propomos a avaliar os efeitos de SteLL sobre a produção de citocinas por CTMs.

Inicialmente, avaliamos se SteLL causaria algum efeito citotóxico em CTMs isoladas do cordão umbilical humano. CTMs não apresentaram redução significativa ($p > 0,05$) de viabilidade celular após tratadas com SteLL (0,048- 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por um período de 24 h (Figura 1A) e 48 h (Figura 1B). Assim, foi observado que SteLL não causou citotoxicidade relevante em CTMs.

A fim de confirmar a ausência de citotoxicidade e verificar se a lectina induz alguma via de apoptose ou necrose nas CTMs, realizamos o ensaio de avaliação de morte celular através de citometria de fluxo acoplada a marcações das células com Anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (AnnV-FITC) e iodeto de propídeo (PI). Como esperado, não foram detectadas diferenças significativas no número de células em necrose, apoptose inicial ou apoptose tardia em comparação com o controle não tratado (Figura 2 A). A viabilidade das CTMs tratadas com SteLL (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi de $97,4 \pm 0,9\%$ (Figura 2B). Esse resultado está de acordo com estudos anteriores que mostraram que SteLL não apresenta efeitos citotóxicos em células saudáveis. Santos et al. (2020) mostraram que SteLL (3.12-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não é citotóxica para esplenócitos de camundongos e a viabilidade de macrófagos

isolados de camundongos não foi afetada por SteLL (2,0–16,0 $\mu\text{g/mL}$) segundo Lima et al. (2019).

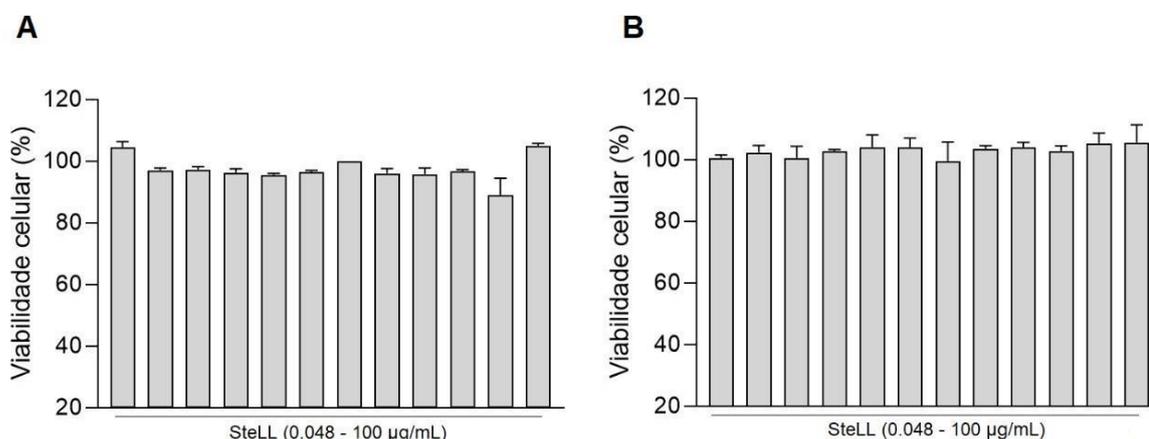


Figura 1- Avaliação da viabilidade de CTMs tratadas com diferentes concentrações de SteLL (0,048-100 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h (A) e 48 h (B), através do ensaio do MTT. As barras representam a média da viabilidade celular (%) \pm desvio padrão para três experimentos independentes realizados em triplicata, considerando o grupo controle como 100% de viabilidade.

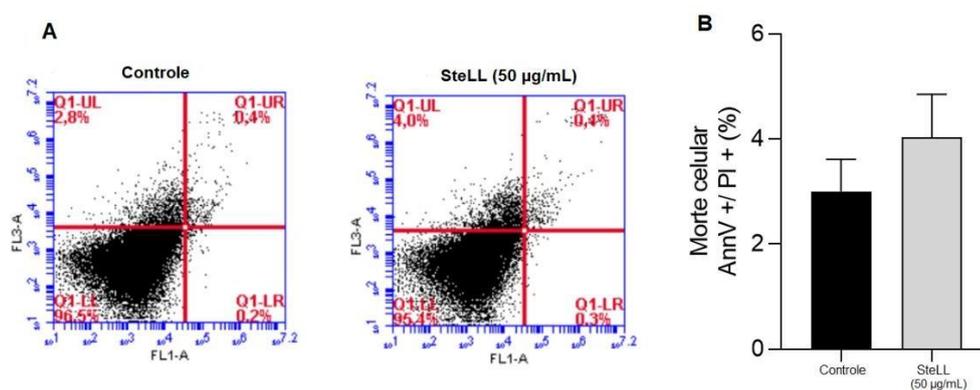


Figura 2- Avaliação da citotoxicidade de SteLL para células tronco mesenquimais (CTMs). (A) *Dot plot* representativo do ensaio de avaliação de morte celular com dupla marcação - anexina V (AnnV) e iodeto de propídeo (PI) de culturas de CTMs humanas na ausência (controle) e presença de SteLL (50 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h. (B) Percentual de CTMs com dupla marcação (AnnV⁺/PI⁺). As barras representam a média da morte celular (%) \pm desvio padrão para três experimentos independentes realizados em triplicata.

Avaliações da citotoxicidade de outras lectinas para CTMs têm sido descritas. A lectina de frondes de *Microgramma vacciniifolia* (MvFL) não apresentou citotoxicidade para CTMs em concentrações de 0,1–50 $\mu\text{g/mL}$, porém a 100 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a viabilidade para 80%. Porém, MvFL não induziu apoptose ou necrose nessas células (SILVA et al., 2020). A

lectina isolada da entrecasca da *Crataeva tapia* (CrataBL; 100 μ M) também afetou significativamente a viabilidade de CTMs após 24 h de tratamento, contudo, não induziu apoptose ou necrose (BONTURI et al., 2019). A lectina de *Viscum album coloratum* (VCA; 1-10 pg/mL) não apresentou efeito citotóxico e aumentou a autorrenovação e proliferação de CTMs, por interferir na expressão de fatores envolvidos no controle do ciclo celular (CHOI et al., 2012). Em outro estudo, realizado por Kim e colaboradores (2019), foi demonstrado que em a VCA (10 pg/mL) aumenta a viabilidade de CTMs.

As CTMs produziram citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-17) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), porém os níveis de secreção dessas citocinas não foram alterados significativamente após tratamento com SteLL (50 μ g/mL) (Figura 3). Em estudos anteriores SteLL (12,5 μ g/mL) demonstrou capacidade de estimular a liberação de citocinas (IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α), NO e ânion superóxido em cultura de macrófagos isolados de camundongos. Além disso, estimulou a produção de IL-17A, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-2 em cultura de esplenócitos isolados de camundongos (LIMA et al., 2019; SANTOS et al., 2020). Nossos resultados mostram que ação imunomoduladora de SteLL apresenta especificidades com relação ao tipo celular. Alguns estudos mostram que as lectinas podem exercer efeito imunomodulador em culturas celulares de CTMs. A lectina VCA (1 pg/ml) aumentou a expressão da IL-6, uma citocina de perfil pró-inflamatório envolvida na estimulação da proliferação das CTMs (KIM et al., 2019). Por outro lado, CrataBL reduziu a secreção de citocinas (IL-6, IL-8) nas concentrações de 50 e 100 μ M (BONTURI et al., 2019).

As leucemias representam as neoplasias hematológicas e podem se manifestar de forma aguda ou crônica. Os progenitores hematopoiéticos são capazes da autorrenovação e diferenciação em linhagens celulares que constituem o sistema hematopoiético. Porém, nas leucemias essas células param de responder aos fatores externos dentro do microambiente da medula óssea, desencadeando o descontrole desses processos, inclusive de apoptose. Consequentemente, o crescimento desordenado na medula óssea, contribui para que as células imaturas sejam encontradas no sangue periférico (WONG et al., 2018). SteLL (reduziu significativamente ($p < 0,0001$) a viabilidade de células da linhagem K562 em comparação com o controle (Figura 4A). A viabilidade da linhagem JURKAT não sofreu redução significativa na presença de SteLL, em nenhuma das concentrações (Figura 4B).

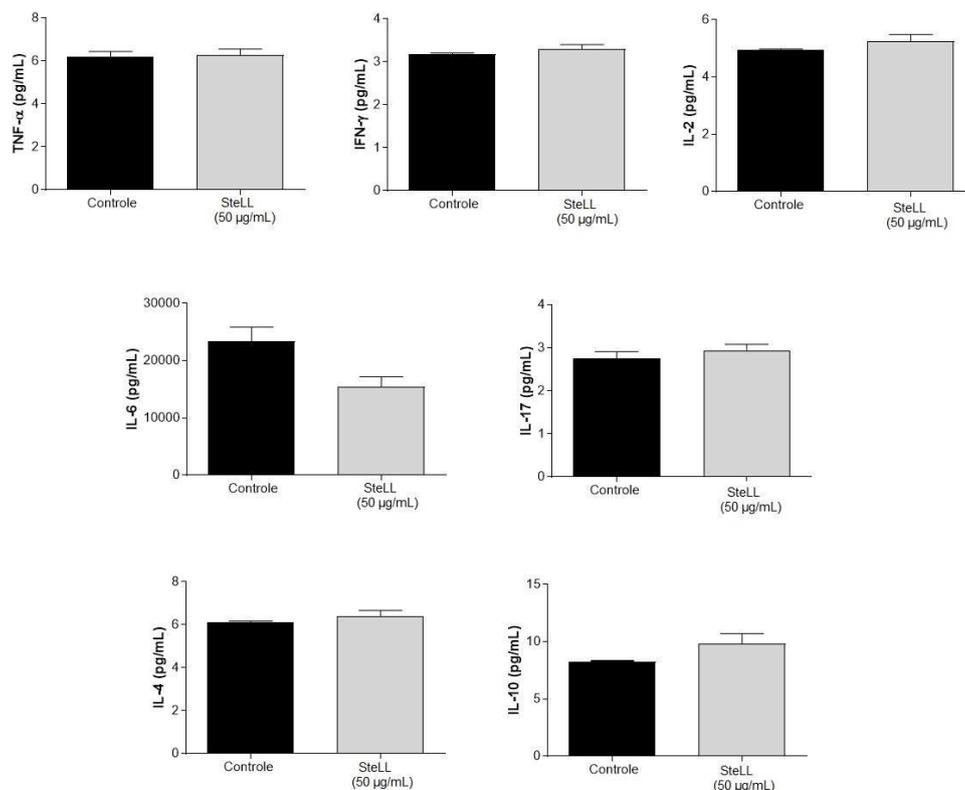


Figura 3- Avaliação dos níveis de citocinas de perfil pró-inflamatório (TNF- α e IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-17) e anti-inflamatório (IL-4 e IL-10) em sobrenadantes de culturas de CTMs humanas na ausência (controle) e na presença de SteLL (50 μ g/mL) por 24 h. As barras representam a média da concentração de citocinas (pg/mL) \pm desvio padrão para três experimentos independentes realizados em triplicata.

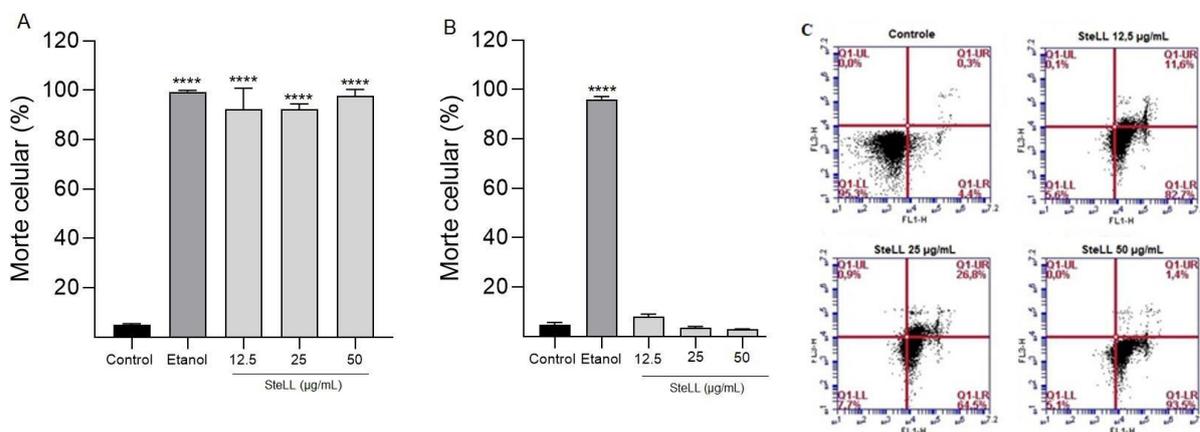


Figura 4- Investigação de morte celular em culturas de linhagens tumorais leucêmicas tratadas com SteLL por 24 h. (A) K562. (B) JURKAT. Apenas células e meio foram o controle negativo e células tratadas com etanol o controle positivo. Foi considerada morte celular as somas das células em apoptose inicial, necrose e apoptose tardia. As barras representam a média de morte celular \pm desvio padrão para três experimentos independentes

realizados em triplicata. (***) indica diferença significativa ($p < 0.0001$) em comparação ao controle. (C) *Dot plot* representativo do ensaio de avaliação de morte celular com dupla marcação - anexina V (AnnV) e iodeto de propídio (PI) de culturas da linhagem tumoral K562. Controle (apenas células e meio) e células tratadas com SteLL (12.5 µg/mL), SteLL (25 µg/mL) e SteLL (50 µg/mL) por 24 h.

Conforme apresentado na Figura (4C), a principal via de morte induzida por SteLL na linhagem K562 foi apoptose. Esse resultado está de acordo com o estudo realizado por Ramos et al. (2019) no qual SteLL apresentou citotoxicidade contra células de Sarcoma 180 (IC₅₀: 8.30 µg/mL), por meio da indução de apoptose. Outras lectinas são capazes de induzir apoptose em células tumorais (AHMED et al., 2017; KABIR et al., 2019; ISLAM et al., 2018).

A apoptose é caracterizada por ser um mecanismo de morte celular bastante regulado, tem como objetivo a remoção tanto de células que sofreram estresses e/ou danos, bem como é útil na renovação e desenvolvimento celular. Ocorre principalmente por duas vias, a primeira desencadeada por ativação de receptores de morte presentes na superfície celular (via extrínseca) e pela via dependente da mitocôndria (via intrínseca) (JIANG et al., 2015).

A capacidade de ligação das lectinas é altamente específica a carboidratos, o que permite o reconhecimento de diferenças entre os receptores glicoproteicos expressos em membranas de células tumorais e não tumorais. A interação de lectinas com glicoconjugados presentes nas superfícies de células tumorais podem causar respostas intracelulares que levam a apoptose e inibição do crescimento tumoral (MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020; PATRIOTA et al., 2021). Ainda, essa especificidade pode explicar o fato de SteLL ter sido ativo contra K562 e não contra JURKAT.

Lectina isolada da esponja marinha *Cliona varians* (CvL; 1-150 µg/mL) inibiu o crescimento de células leucêmicas K562 e JURKAT, com CI₅₀ de 70 e 100 µg/mL, respectivamente. Após o período de 72 h de incubação com a lectina, a morte celular de K562 foi induzida por apoptose (QUEIROZ et al., 2009). Lectina de raízes de *Astragalus membranaceus* (AML; 20 µg/mL) causou apoptose na linhagem K562 de maneira dependente do tempo, sendo detectadas alterações morfológicas como a condensação da cromatina, fragmentação nuclear e corpos apoptóticos foram observadas por microscopia de fluorescência (HUANG et al., 2012). Lectina de folíolos de *Calliandra surinamensis* (CasuL) reduziu a viabilidade das linhagens K562 após 72 horas de incubação, apresentando CI₅₀ de 5.7 µg/mL (PROCÓPIO et al., 2017).

Conclusão

SteLL não foi citotóxica para CTMs nem interferiu na capacidade dessas células em produzir citocinas. Essa lectina apresentou ação citotóxica na linhagem tumoral leucêmica K562 por meio da indução de apoptose. Estudos futuros podem ser realizados para investigar possíveis efeitos de SteLL na diferenciação de CTMs, bem como para esclarecer os mecanismos envolvidos na atividade antineoplásica da lectina.

Referências

- AHMED, F.R.S.; AMIN, R.; HASAN, I.; ASADUZZAMAN, A.K.M.; KABIR, S.R. Antitumor properties of a methyl- β -D-galactopyranoside specific lectin from *Kaempferia rotunda* against Ehrlich ascites carcinoma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.102, p.952–959, 2017.
- BONTURI, C.R.; SILVA, M.C. C.; MOTALN, H.; SALU, B. R.; FERREIRA, R. S.; BATISTA, F. P.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; TURNŠEK, T. L.; OLIVA, M. L. V. A Bifunctional Molecule with Lectin and Protease Inhibitor Activities Isolated from *Crataeva tapia* Bark Significantly Affects Cocultures of Mesenchymal Stem Cells and Glioblastoma Cells. **Molecules**, v.24, 2109, 2019.
- CHAO, K. C.; YANG, H. T.; CHEN, M. W. Human umbilical cord mesenchymal stem cells suppress breast cancer tumorigenesis through direct cell-cell contact and internalization. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.16, p.1803–1815, 2012.
- CHEN, X.; WANG, S.; CAO, W. Mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation in cell therapy of neurodegenerative diseases. **Cellular Immunology**, v.326, p.8-14, 2018.
- CHOI, J.H.; LYU, S. Y.; LEE, H. J.; JUNG, J.; PARK, W.B.; KIM, G.J. Korean mistletoe lectin regulates self-renewal of placenta-derived mesenchymal stem cells via autophagic mechanisms. **Cell Proliferation**, v.45, p.420–429, 2012.
- CHULPANOVA, D.S.; KITAEVA, K.V.; TAZETDINOVA, L.G.; JAMES, V.; RIZVANOV, A.A.; SOLOVYEVA, V.V. Application of Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Agent Delivery in Anti-tumor Treatment. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, 2018.
- DABROWSKA, S.; ANDRZEJEWSKA, A.; JANOWSKI, M.; LUKOMSKA, B. Immunomodulatory and Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells and

- Extracellular Vesicles: Therapeutic Outlook for Inflammatory and Degenerative Diseases. **Frontiers in immunology**, v. 11, 591065, 2021.
- DANG, K.; ZHANG, W.; JIANG, S.; LIN, X.; QIAN, A. Application of Lectin Microarrays for Biomarker Discovery. **Chemistry Open**, v.9, p.285–300, 2020.
- DING, D.; CHANG, Y.; SHYU, W.; LIN, S. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Era for Stem Cell Therapy. **Cell Transplantation**, v.24, p. 339–347, 2015.
- ENGELA, A. U.; BAAN, C. C.; DOR, F. J. M. F.; WEIMAR, W.; HOOGDUIJN, M. J. On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. **Front. Immunol**, 3: 126, 2012.
- ENGLISH, K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. **Immunol Cell Biol.** v.91, p.19-26, 2013.
- GAO, F.; CHIU, S.; MOTAN, D.; ZHANG, Z.; CHEN, L.; JI, H-L.; TSE, H-F.; FU, Q-L.; LIAN, Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. **Cell Death Dis**, v.7, e2062, 2016.
- GAO, W.; SUN, Y.; SHI, J. et al. Effects of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells on differentiation, maturation, and function of dendritic cells. **Stem Cell Research Therapy**, v. 8, p.48, 2017.
- GOMES, F. S.; PROCÓPIO, T. S.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **J. Appl Microbiol**, v.114, n.3, p.672-679, 2013.
- HASEHIRA, K.; HIRABAYASHI, J.; TATENNO, H. Structural and quantitative evidence of α 2–6-sialylated N-glycans as markers of the differentiation potential of human mesenchymal stem cells. **Glycoconjugate Journal**, v. 34, p.797–806, 2017.
- HUANG, L. H.; YAN, Q. J.; KOPPARAPU, N. K.; JIANG, Z. Q.; SUN, Y. *Astragalus membranaceus* lectin (AML) induces caspase-dependent apoptosis in human leukemia cells. **Cell Proliferation**, v. 45, 1, 2012.
- ISLAM, F.; GOPALAN, V.; LAM, A. K.-Y.; KABIR, S. R. Pea lectin inhibits cell growth by inducing apoptosis in SW480 and SW48 cell lines. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.117, p.1050–1057, 2018.
- JIANG, Q. L.; ZHANG, S.; TIAN, M.; ZHANG, S. Y.; XIE, T.; CHEN, D. Y.; CHEN, Y. J.; HE, J.; LIU, J.; OUVANG, L.; JIANG, X. Plants lectins, from ancient sugar-binding

- proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. **Cell Proliferation**, v. 48, p. 17-28, 2015.
- KABIR, K.M.A.; RUHULAMIN, HASAN, I.; ASADUZZAMAN, A.K.M.; KHATUN, H.; KABIR, S.R. *Geodorumdensi florum* rhizome lectin inhibits Ehrlich ascites carcinoma cell growth by inducing apoptosis through the regulation of BAX, p53 and NF- κ B genes expression. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 92-98, 2019.
- KARNCHANATAT, A. Antimicrobial Activity of Lectins from Plants. **Antimicrobial Agents**, v. 8, p. 145-178, 2012.
- KIM, T.; CHOI, C. S.; LIM, H.; JUN.; MOON. Alterations in IL-6/STAT3 Signaling by Korean Mistletoe Lectin Regulate the Self-Renewal Activity of Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Nutrients**, v. 11, p. 2604, 2019.
- LIMA, I. M. S. F.; ZAGMIGNAM, A.; SANTOS, D. M.; MAIA, H. S.; SILVA, L. S.; CUTRIM, B. S.; VIEIRA, S. L.; FILHO, C. M. B.; SOUSA, E. M.; NAPOLEÃO, T. H.; KROGFELT, K. A.; LOBNER-OLESEN, A.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, L. C. N. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) has anti-infective action and modulates the response of *Staphylococcus aureus*-infected macrophages. **Sci Rep.**, v. 9, 2019.
- LIN, W.; HUANG, L.; LI, Y.; FANG, B.; LI, G.; CHEN, L.; XU, L. Mesenchymal Stem Cells and Cancer: Clinical Challenges and Opportunities. **BioMed Research International**, p.1-12, 2019.
- LIU, B.; BIAN, H.; BAO, J. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Letters**, v. 287, p. 1-12, 2010.
- MACEDO, M.L.R.; OLIVEIRA, C.F.R.; OLIVEIRA, C.T. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. **Molecules**, v.20, p.2014-2033, 2015.
- MAZALOVSKA, M.; KOUOKAM, J. C. Transiently Expressed Mistletoe Lectin II in *Nicotiana benthamiana* Demonstrates Anticancer Activity *In Vitro*. **Molecules**, v. 25, p.2562, 2020.
- MIKKOLA, M.; TOIVONEN, S.; TAMMINEN, K.; ALFTHAN, K.; TUURI, T.; SATOMAA, T.; NATUNEN, J.; SAARINEN, J.; TIITTANEN, M.; LAMPINEN, M.; VALMU, L.; PARTANEN, J.; OTONKOSKI, T. Lectin from *Erythrina cristagalli*

supports undifferentiated growth and differentiation of human pluripotent stem cells.

Stem Cells Dev, v. 22, p. 707-712, 2012.

MOCHIDA, T.; UENO, H.; YAMAZOE, N. T.; HIYOSHI, H.; ITO, R.; MATSUMOTO, H.;

TOYODA, T. Insulin-deficient diabetic condition upregulates the insulin-secreting capacity of human induced pluripotent stem cell-derived pancreatic endocrine progenitor cells after implantation in mice. **Diabetes**, v. 69, p. 634-646, 2020.

MOURA, M.C.; TRENTIN, D.S.; NAPOLEÃO, T.H.; PRIMON-BARROS, M.; XAVIER,

A.S.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, P.M.G.; MACEDO, A.J.; COELHO, L.C.B.B. Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. **Journal of Applied Microbiology** v. 123, p. 861-874, 2017.

MURRAY, I.; PÉAULT, B. Q. A. Mesenchymal stem cells — where do they come from and

is it important?. **BMC Biology**, v.13, p. 1-6, 2015.

NAND, A.; SINGH V.; WANG P.; NA J.; ZHU J. Glycoprotein profiling of stem cells using

lectin microarray based on surface plasmon resonance imaging. **Anal Biochem**, 465C:114–120, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Cancer fact sheet. Genebra: OMS, 2020.

Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 14 jul. 2021.

PRÄBST, K.; ENGELHARDT, H.; RINGGELER, S.; HÜBNER, H. Basic Colorimetric

Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Cell Viability Assays*, p. 1–17, 2017.

PATRIOTA, L. L. S.; RAMOS, D. B.; SILVA, Y. A.; SANTOS, A. C. L. A.; ARAÚJO, M.

T. M. F.; BRITO, J. S.; TORRES, D. J. L.; OLIVEIRA, A. M.; SILVA, D. C. N.; LORENA, V. M. B.; PAIVA, P. M. G.; MENDES, R. L.; NAPOLEÃO, T. H.

Microgramma vacciniifolia frond lectin (MvFL) exhibits antitumor activity against sarcoma 180 in mice. **Phytomedicine Plus**, v. 1, 100013, 2021.

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. *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.

- PITTENGER, M.F.; MARTIN, B.J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circulation Research**, v.95, p. 9-20, 2004.
- POIROUX, G.; BARRE, A.; VAN DAMME, E.; BENOIST, H.; ROUGÉ, P. Plant Lectins Targeting O-Glycans at the Cell Surface as Tools for Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18(6), p.1232, 2017.
- PROCÓPIO, T.F.; PATRIOTA, L.L.S.; MOURA, M.C.; DA SILVA, P.M.; DE OLIVEIRA, A.P.; CARVALHO, L.V.N.; LIMA, T.A.; SOARES, T.; DA SILVA, T.D.; COELHO, L.C.B.B.; PITTA, M.G.R.; RÊGO, M.J.M.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H. 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.
- QUEIROZ, A. F. S.; SILVA, R. A.; MOURA, R. M.; DREYFUSS, J. L.; GAMERO, E. J. P.; SOUZA, A. C. S.; TERSARIOL, I. L. S.; SANTOS, E. A.; NADER, B. H.; JUSTO, G. Z.; SALES, M. P. Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells. **Cancer Chemother Pharmacol**, 63, p. 1023-1033, 2009.
- RAFFAGHELLO, L.; BIANCHI, G.; BARTOLOTTA, M.; MONTECUCCO, F.; BUSCA, A.; DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L.; PISTOIA, V. Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis: A Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche. **Stem Cells**, v. 26, p. 151-162, 2008.
- RAMOS, D. B. M.; ARAÚJO, M. T. M. F.; ARAÚJO, T. C. L.; SILVA, Y. A.; SANTOS, A. C. L. A.; SILVA, M. G.; PAIVA, P. M. G.; MENDES, R. L.; NAPOLEÃO, T. H. Antinociceptive activity of *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.259, 2020.
- RAMOS, D. B. M.; ARAÚJO, M. T. M.; 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. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 233, p. 148-157, 2019.
- RASMUSSEN, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research**, v. 312, p. 2169–2179, 2006.

- SANTOS, A. J. C. A.; BARROS, B. R. S.; AGUIAR, L. M. S.; PATRIOTA, L. L. S.; LIMA, T. A.; ZINGALI, R. B.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; MELO, C. M. L.; PONTUAL, E. V. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) is an immunomodulatory agent by altering cytokine release by mice splenocytes. **3 Biotech.**, v. 10:144, 2020.
- SHIVAMADHU, M. C.; SRINIVAS, B. K.; JAYARAMA, S.; CHANDRASHEKARAI AH, S. A. Anti-cancer and anti-angiogenic effects of partially purified lectin from *Praecitrullus fistulosus* fruit on in vitro and in vivo model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1299-1309, 2017.
- SILVA, A. R.; PATRIOTA, L. L. S.; BRITO, J. S. GAIÃO, W. D. C.; TORRES, D. J. L.; LORENA, V. M. B.; SILVA, M. B.; NAPOLEÃO, T. H. Evaluation of the cytotoxicity of lectin from *Microgramma vacciniifolia* fronds (MvFL) to human mesenchymal stem cells and leukemia cell lines (K562 and JUKART). **Biofarm**, v. 16, p. 44, 2020.
- TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell signalling. *J. Cell Sci*, v. 125, p. 807-815, 2012.
- TATENO, H.; TOYOTA, M.; SAITO, S.; ONUMA, Y.; ITO, Y.; HIEMORI, K.; ASASHIMA, M. Glycome Diagnosis of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Lectin Microarray. **Journal of Biological Chemistry**, v.286, p.20345–20353, 2011.
- TESSMANN, J. W.; BUSS, J.; BEGNINI, K. R.; BERNEIRA, F. R.; PAULA, C. M. P.; PEREIRA, T.; COLLARES.; SEIXAS, F. K. Antitumor potential of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H- pyrazoles in human bladder cancer cells. **Biomed. Pharmacother**, v. 94, p. 37-46, 2017.
- WANG, Y., CHEN, X., CAO, W.; SHI, Y Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. **Nat Immunol**, v.15, p. 1009–1016, 2014.
- WONG, S. W.; LENZINI, S.; SHIN, J. W. Perspective: Biophysical regulation of cancerous and normal blood cell lineages in hematopoietic malignancies. **APL Bioeng**, v. 2(3): 031802, 2018.
- XIFRO, W. A.; VICINO, U.; MARTIN, M. I. M.; BORTOLOZZI, A.; BOVÉ, J.; VILA, M.; COSMA, M. P. Functional Rescue of Dopaminergic Neuron Loss in Parkinson's Disease Mice After Transplantation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. **EBioMedicine**. V.8, p.83-95, 2016.

ZWETSLOOT, P. P.; VÉGH, A. M.; JANSEN, S. J. L.; HOUT, G. P. V.; CURRIE, G. L.; SENA, E. S.; GREMMELS, H.; BUIKEMA, J. W.; GOUMANS, M. J.; MACLEOD, M. R.; DOEVENDANS, P. A.; CHAMULEAU, S. A.; SLUIJTER, J. P. Cardiac Stem Cell Treatment in Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Studies. **Circ Res**, v. 118, p.1223-1232, 2016.

3.2 ARTIGO 2- EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA LECTINA DE FOLHAS DA *Schinus terebinthifolia* RADDI. (ANACARDIACEAE) EM CAMUNDONGOS

Efeito antinociceptivo da lectina de folhas da *Schinus terebinthifolia* Raddi. (Anacardiaceae) em camundongos

Amanda de Oliveira Marinho^a, Jéssica de Santana Brito^a, Abdênego Rodrigues da Silva^a, Suéllen Pedrosa da Silva^a, Alisson Macário de Oliveira^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Leydianne Leite de Siqueira Patriota^a, Thiago Henrique Napoleão^a

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

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antinociceptiva da lectina de folhas da *Schinus terebinthifolia* (SteLL) através de modelos experimentais agudos de nocicepção periférica e central em camundongos. Os animais foram tratados por via intraperitoneal com PBS (controle), indometacina (20 mg/kg), morfina (10 mg/kg) ou SteLL (1, 5 e 10 mg/kg). Para triagem dos efeitos antinociceptivos da lectina, foi utilizado o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. O teste de formalina foi usado para avaliar os efeitos de SteLL na dor neurogênica (primeira fase) e na dor inflamatória (segunda fase), bem como para investigar o envolvimento do domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC) e de receptores opioides no efeito antinociceptivo. A fim de avaliar a antinocicepção central, foi realizado o teste de imersão de cauda. SteLL (1, 5 e 10 mg/kg) reduziu de maneira dose dependente o número de contorções induzidas por ácido acético em 84%, 90% e 100%. Na primeira fase do teste de formalina, SteLL (1, 5 e 10 mg/kg) reduziu o tempo de lambida da pata em 49%, 48% e 51%. Na segunda fase, SteLL (1 e 10 mg/kg) reduziu em 83% e 81%, respectivamente. Esse efeito antinociceptivo foi revertido pela incubação prévia da lectina com ovoalbumina (indicando possível envolvimento do DRC) e pela administração de naloxona (sugerindo uma modulação via receptores opioides). No teste de imersão de cauda, SteLL (1, 5 e 10 mg/kg) reduziu a sensibilidade para a percepção do estímulo térmico, mesmo

após 2 horas de sua aplicação. Em conclusão, SteLL apresenta ação analgésica periférica e central. Esses resultados abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de agentes analgésicos utilizando a lectina.

Palavras-chave: dor; analgesia; opioides; lectina; aroeira da praia.

Introdução

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, *International Association for the Study of Pain*), a dor é definida como “uma experiência sensorial ou emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita nos termos de tal lesão” (KANIA et al., 2021). A dor pode ser fisiológica ou patológica, sendo uma resposta do Sistema Nervoso Central (SNC) desencadeada a partir de uma lesão tecidual ou de um distúrbio emocional (ASSIS et al., 2020).

Diferentes intervenções são empregadas para o alívio da dor, porém a abordagem farmacológica é a mais utilizada. Dependendo do tipo e etiologia da dor, o tratamento é realizado por drogas analgésicas de ação central (ex. opioides) ou periférica (ex. anti-inflamatórios não esteroidais, AINEs). Contudo, é enorme a incidência de efeitos colaterais devido ao uso prolongado ou excessivo dessas substâncias. Por exemplo, o acetaminofeno (paracetamol) é uma droga analgésica e antipirética amplamente utilizada no mundo e considerada segura em níveis terapêuticos, mas em casos de overdoses possui potencial hepatotóxico que pode progredir até a insuficiência hepática aguda (JAESCHKE et al., 2018; RAMACHANDRAN; JAESCHKE, 2019).

Dessa forma, o controle da dor permanece como um desafio clínico e há a necessidade de se buscar novas opções terapêuticas para seu alívio. Nesse contexto, destacam-se os produtos naturais, como aqueles derivados de plantas, que têm sido a fonte de maior sucesso de potenciais medicamentos, por apresentarem mecanismos de ação diferenciados para diversos tipos de doenças e pela possibilidade de serem protótipos para a síntese de novas biomoléculas (GOUVEIA et al., 2019). As plantas usadas na medicina popular para redução da dor contribuem para o direcionamento de estudos que buscam alternativas analgésicas à base de plantas (FAWOLE et al., 2010; DZOYEM; ELOFF, 2015).

Schinus terebinthifolia Raddi (Anacardiaceae) é uma planta nativa da América do Sul e Central que apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil e é popularmente conhecida

como aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira, pimenta brasileira ou pimenta-rosa (ANDRADE; PONCELET; FERREIRA, 2017). No Brasil, a *S. terebinthifolia* Raddi encontra-se entre as 71 espécies de plantas medicinais relatadas pela Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) por seus efeitos benéficos à saúde da população e contribuição efetiva para produção de fitoterápicos (CARVALHO et al., 2013). Segundo a monografia da espécie disponibilizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), os chás das cascas e folhas são usados popularmente para tratar dor de dente e dor de garganta (ANVISA, 2014). O uso de preparações à base dessa planta também tem sido relatado para dores menstruais (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Preparações obtidas das folhas da *S. terebinthifolia* apresentam atividade antinociceptiva em modelos experimentais de dor. O extrato metanólico de folhas reduziu a nocicepção nas fases neurogênica e inflamatória no modelo de nocicepção aguda induzida por formalina; apresentou ação antihiperálgica em modelo de hiperálgia mecânica induzida por carragenina; e sobre a hiperálgia mecânica em modelo de artrite, todos efeitos avaliados em camundongos (OLIVEIRA-JR et al., 2020). Além disso, fração metanólica de folhas demonstrou ação antinociceptiva por reduzir a nocicepção em modelo de dor neuropática causada por lesão do nervo ciático em ratos (SCHEID et al., 2018).

Lectinas constituem um grupo de proteínas com capacidade de reconhecimento e ligação a carboidratos e glicoconjugados, por possuírem pelo menos um domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC), não catalítico e que interage de maneira seletiva, reversível e sem alterar a estrutura dos açúcares (NASCIMENTO et al., 2020). Diversas atividades biológicas são descritas para lectinas de plantas, incluindo a antinociceptiva. Por exemplo, lectina de sementes de *Andira anthelmia* (AAL) apresentou ação analgésica por reduzir contorções abdominais induzidas por ácido acético e o tempo de lambida na fase inflamatória do teste de formalina em camundongos (NASCIMENTO et al., 2015). A lectina de folhas *Bauhinia monandra* (BmoLL) reduziu as contorções abdominais induzidas por ácido acético e aumentou o tempo de latência no teste de placa quente em camundongos (CAMPOS et al., 2016). Já a lectina de sementes *Abelmoschus esculentus* (AEL) reduziu a hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na articulação temporomandibular de ratos via receptores opioides κ e δ (ALVES et al., 2018).

As folhas de *S. terebinthifolia* Raddi contêm uma lectina denominada SteLL, que é uma glicoproteína de massa molecular nativa de 12,4 kDa, estável diante de diferentes faixas

de pH, temperatura e resistente à adição de íons (GOMES et al., 2013; SANTOS et al., 2020). As potencialidades biomédicas e biotecnológicas de SteLL vêm sendo descritas e incluem: efeitos bacteriostático e bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e antifúngico frente a espécies de *Candida* (GOMES et al., 2013); ação citotóxica *in vitro* sobre células de Sarcoma-180 e antitumoral *in vivo* em camundongos portadores de Sarcoma-180 (RAMOS et al., 2019); atividade imunomoduladora em esplenócitos de camundongos, estimulando a liberação de interleucinas (IL-2, IL-4 e IL-17A), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e reduzindo a secreção de óxido nítrico (SANTOS et al., 2020); ação anti-infecciosa e modulação da resposta imunológica em macrófagos de camundongo infectados por *Staphylococcus aureus*, regulando a expressão de IL-17A e IFN- γ (LIMA et al., 2019); e por fim ação antinociceptiva em modelo de tumor ortopédico *in vivo*, sendo capaz de diminuir a hiperalgesia (RAMOS et al., 2020).

Esse estudo anterior sobre a atividade antinociceptiva de SteLL em modelo experimental de dor oncológica constituiu em um estímulo para a continuidade de investigações do potencial analgésico dessa lectina, bem como uma evidência de que ela pode estar relacionada aos efeitos antinociceptivos relatados para as folhas de *S. terebinthifolia*. No presente trabalho, investigamos inicialmente a atividade antinociceptiva *in vivo* de SteLL em modelo de triagem não seletivo (teste de contorções abdominais induzido por ácido acético), em modelo de nocicepção periférica (teste de formalina) e central (teste de imersão de cauda). Além disso, avaliamos o envolvimento do DRC da lectina e a participação de receptores da via opioide no efeito antinociceptivo através do teste de formalina.

Materiais e Métodos

Material vegetal e isolamento de SteLL

Folhas de *S. terebinthifolia* Raddi. foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco, na cidade do Recife, Brasil com autorização (nº 36301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. O acesso foi registrado (AED6BF8) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado. Um exemplar da espécie foi arquivado (nº 73,431) no Instituto Agrônomo de Pernambuco.

As folhas foram lavadas com água corrente e em seguida com água destilada, secas por 4 dias a 28 °C e depois trituradas até a obtenção de uma farinha com auxílio de processador industrial. Para obtenção do extrato, a farinha foi suspensa na proporção de 10% (v/v) em NaCl 0,15 M e homogeneizada por 16 h a 4°C. Após esse período, a suspensão foi centrifugada por (15 min, 9000g, 4 °C). SteLL foi isolada de acordo com o protocolo descrito por Gomes et al. (2013). O extrato das folhas (45 mg) foi aplicado em uma coluna (7,5 x 1,5 cm) de quitina (Sigma-Aldrich, EUA) previamente equilibrada com NaCl 0,15 M. Posteriormente, a coluna foi lavada com o objetivo de remover as proteínas não ligadas e, em seguida, SteLL foi eluída com ácido acético a 1,0 M. As frações coletadas foram acompanhadas quanto à absorbância (280 nm). As frações contendo SteLL isolada foram reunidas e a lectina foi dialisada contra água destilada por cerca de 6 h em uma membrana de celulose (Sigma-Aldrich), liofilizada e posteriormente ressuspensa em solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Determinação da atividade hemaglutinante (HA), inibição da AH e concentração proteica

A capacidade de ligação a carboidratos de SteLL foi verificada através do ensaio de HA conforme descrito por Procópio et al. (2017) utilizando suspensão de eritrócitos de coelhos tratados com glutaraldeído. Para o ensaio de inibição de HA, as amostras de lectina foram incubadas por 15 min com monossacarídeos (frutose, glicose e N-acetilglucosamina; 0,2 M) ou glicoproteínas (ovocaseína e ovalbumina; 0,2 M) antes da adição da suspensão de eritrócitos (PROCÓPIO et al., 2017). A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Lowry et al. (1951) usando uma curva padrão de albumina bovina (31.25–500 µg/mL).

Avaliação da atividade antinociceptiva de SteLL

Animais

Os experimentos foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (processo nº 0063/2021). Camundongos machos Swiss (*Mus musculus*) com 6-8 semanas de idade e pesando entre 25-40 g foram

adquiridos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE) e adaptados no biotério do Departamento de Bioquímica (UFPE), sendo alojados em temperatura de 22 °C, ciclo claro-escuro de 12:12 horas e com acesso ilimitado a água e alimento.

Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste foi realizado pelo método proposto por Koster e colaboradores (1959) com algumas modificações descritas por Singh e Majumdar (1995). Os animais foram separados em seis grupos (n=6/grupo) e tratados com PBS (controle) por via intraperitoneal (i.p.), SteLL (1, 5 e 10 mg/kg i.p.), indometacina (20 mg/kg i.p.) ou morfina (10 mg/kg i.p.). Após os tratamentos, cada animal recebeu uma injeção intraperitoneal de ácido acético (0,8%, 20 µL). PBS e SteLL foram administrados 1 hora antes do ácido acético e a indometacina e morfina foram administradas 30 minutos antes. Os camundongos foram colocados em uma caixa de polietileno para o registro do período de latência (tempo até a primeira contorção) e o número de contorções abdominais foi registrado no intervalo de 5 a 15 minutos.

Teste de formalina

O teste foi realizado de acordo com Hunskaar e Hole (1987). Os animais foram divididos em seis grupos (n=6/grupo) e posteriormente tratados com PBS (controle, i.p.), SteLL (1, 5 e 10 mg/kg i.p.), indometacina (20 mg/kg i.p.) ou morfina (10 mg/kg i.p.). PBS e SteLL foram administradas 1 hora antes da injeção da formalina, enquanto a indometacina e morfina foram administradas 30 min antes. Após os tratamentos, 20 µL de formalina a 2,5% em PBS foram injetados na região subplantar da pata traseira direita de cada animal. O tempo gasto por cada animal lambendo a pata foi registrado durante os primeiros 5 min após a aplicação da formalina (F1: primeira fase - dor neurogênica), e em seguida no intervalo de 15 a 30 min (F2: segunda fase - dor inflamatória) após a injeção.

Investigação do envolvimento do domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC) no efeito antinociceptivo da lectina

SteLL (10 mg/kg) foi previamente incubada por 1 hora a 37 °C com glicoconjugado (ovoalbumina a 0,1 M) capaz de inibir sua atividade hemaglutinante ou com carboidrato (glicose a 0,1 M) incapaz de fazer essa inibição. SteLL, ovoalbumina e glicose foram incubados individualmente sob as mesmas condições (PIRES et al., 2013). Posteriormente, os animais foram divididos em seis grupos (n=6/grupo), tratados com PBS (controle i.p.), ovoalbumina (i.p.), glicose (i.p.), SteLL (10 mg/kg i.p.), SteLL (10 mg/kg + ovoalbumina, i.p.) ou SteLL (10 mg / kg + glicose, i.p.). O teste de formalina foi realizado 1 hora após os tratamentos.

Investigação da participação de receptores opioides no efeito antinociceptivo da lectina

Para avaliar o envolvimento de receptores opioides no efeito antinociceptivo de SteLL, naloxona (2 mg/kg i.p.) foi administrada 15 min antes dos tratamentos (ALVES et al., 2018). Os animais foram divididos em seis grupos (n=6/grupo) e tratados com PBS (controle i.p.), naloxona (2 mg/kg i.p.), morfina (10 mg/kg i.p.), naloxona + morfina (i.p.), SteLL (10 mg/kg i.p.) ou SteLL + naloxona (i.p.). O teste de formalina foi realizado 1 hora após o tratamento com PBS ou SteLL e 30 minutos após a administração da morfina.

Teste de imersão de cauda

O teste de imersão de cauda foi realizado conforme Khatun e colaboradores (2015) para avaliação da atividade analgésica central. Os animais foram pré-selecionados quanto à sensibilidade através da imersão da cauda em água morna ($55 \pm 1^\circ\text{C}$); aqueles que retiraram a cauda rapidamente (2-5 segundos) foram selecionados para o ensaio. Os camundongos foram divididos em cinco grupos (n= 6/grupo) e tratados com PBS (controle i.p.), morfina (10 mg/kg i.p.) ou SteLL (1, 5 ou 10 mg/kg i.p.). O período de latência (tempo para cada animal retirar sua cauda da água morna) foi determinado em 30, 60, 90 e 120 minutos após os tratamentos. Uma latência de 20 s foi considerada analgesia completa, e a cauda do animal foi retirada para evitar queimaduras.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados no software GraphPad Prism®, versão 8.0, e expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais foram calculadas aplicando-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística quando comparados ao controle.

Resultados e discussão

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é amplamente utilizado para triagem de novos agentes analgésicos e anti-inflamatórios. Estímulos nocivos como o ácido acético levam à ativação de neurônios sensoriais periféricos, conhecidos como nociceptores, que transmitem informações aos centros de processamento da dor localizados na medula espinhal e cérebro. Além disso, o ácido acético desencadeia um processo irritativo em superfícies viscerais, aumento da permeabilidade vascular e liberação de mediadores inflamatórios, incluindo a bradicinina, histamina, serotonina, substância P e prostaglandinas, as quais são responsáveis pela sensação dolorosa e pelas contorções abdominais (CATERINA et al., 1997; BHUIYAN et al., 2020).

StELL inibiu significativamente ($p < 0,0001$) e de maneira dose-dependente (Figura 1) o número de contorções induzidas por ácido acético em todas as concentrações testadas, causando inibição de 84%, 90% e 100% nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. Indometacina e morfina reduziram a resposta nociceptiva em 47% e 96%, respectivamente.

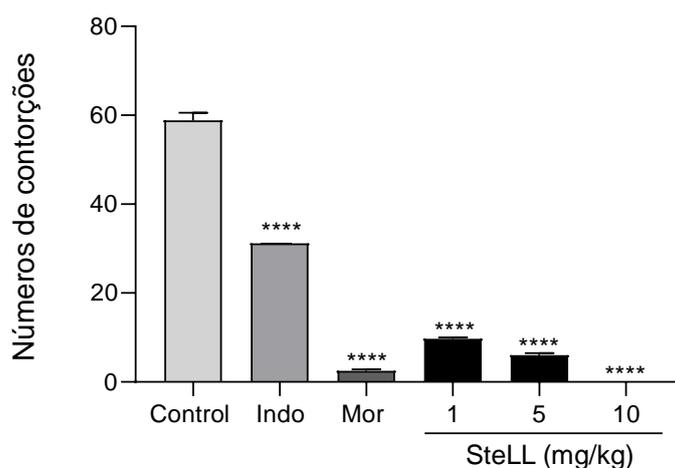


Figura 1- Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético em animais tratados com PBS (controle i.p.), indometacina (20 mg/kg i.p.), morfina (10 mg/kg i.p.) ou SteLL (1, 5 e 10 mg/kg i.p.). As barras representam a média do número de contorções abdominais \pm erro padrão da média. (***) indica diferença significativa de $p < 0,0001$ em comparação com o grupo controle, baseado na análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Control: Controle, Indo: Indometacina, Mor: Morfina.

Outras lectinas de plantas têm sido descritas com atividade antinociceptiva neste modelo experimental. Em concentrações semelhantes a SteLL, porém por via intravenosa, a lectina de sementes de *Canavalia boliviana* (CboL; 1, 5 e 10 mg/kg) reduziu as contorções abdominais em 60, 63 e 64% (FIGUEIREDO et al., 2009). A lectina de sementes de *Andira anthelmia* (AAL; 0.01, 0.1 e 1 mg/kg) administrada por via intravenosa foi capaz de diminuir o número de contorções abdominais em 68, 46 e 74%, em concentrações inferiores e similar a SteLL (NASCIMENTO et al., 2015). A administração oral da lectina de sementes *Canavalia brasiliensis* (ConBr; 30, 100 e 300 mg/kg), em concentrações muito superiores a SteLL, diminuiu as contorções abdominais em 46, 69 e 53% (PIRES et al., 2013). A lectina de folhas *Bauhinia monandra* (BmoLL; 15, 30 e 60 mg/kg) administrada por via intraperitoneal reduziu em 43,1, 54,2 e 71,3% as contorções abdominais, porém em concentrações superiores a SteLL (CAMPOS et al., 2016). Assim, observamos que SteLL demonstrou melhor ação analgésica em comparação com outras lectinas de plantas, uma vez que mesmo na menor concentração de SteLL (1 mg/kg) seu efeito inibitório (84%) se sobressaiu comparado com aqueles encontrados para CboL, AAL, ConBr e BmoLL.

O teste de formalina é amplamente utilizado para medir a efetividade de candidatos à agentes antinociceptivos, sendo um modelo bifásico que apresenta como vantagem a capacidade de diferenciar os dois tipos de dor: neurogênica e inflamatória. SteLL agiu na primeira fase do teste reduzindo significativamente ($p < 0,0001$) o tempo de lambida em 49%, 48% e 51% nas doses de 1, 5, 10 mg/kg, respectivamente, não sendo observado um efeito dose-dependente (Figura 2A). Morfina e indometacina causaram 92% e 64% de inibição, respectivamente. Na segunda fase do teste, SteLL reduziu significativamente o tempo de lambida ($p < 0,0001$) em todas as concentrações, com inibição de 83%, 65% e 81% nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg (Figura 2B). Indometacina e morfina promoveram inibição de 85% e 96% na segunda fase, respectivamente.

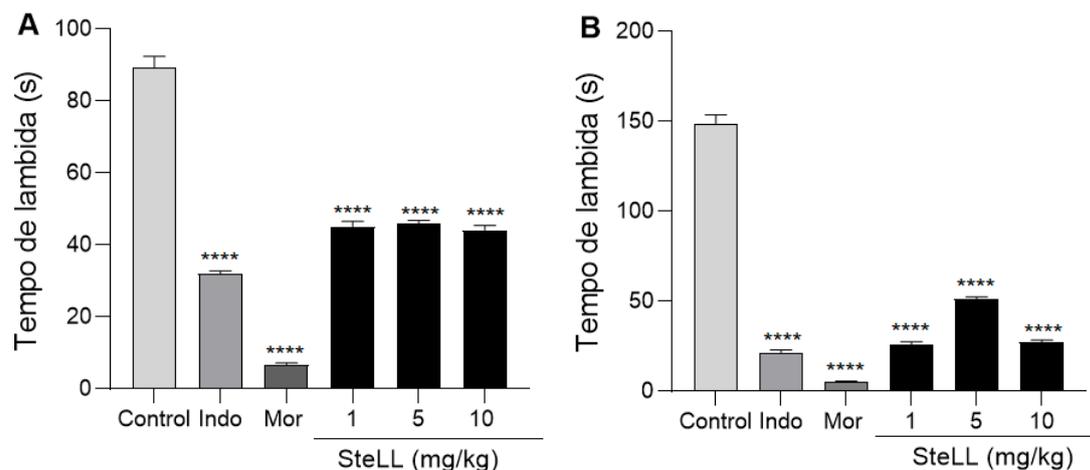


Figura 2- Teste de formalina em animais tratados com PBS (controle i.p.), indometacina (20 mg/kg i.p.), morfina (10 mg/kg i.p.) ou SteLL (1, 5 e 10 mg/kg i.p.). (A) F1: primeira fase - neurogênica. (B) F2: segunda fase - inflamatória. As barras representam a média do tempo de lambida da pata \pm erro padrão da média. (****) indica diferença significativa de $p < 0,0001$ em comparação ao grupo controle, baseado na análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Control: Controle, Indo: Indometacina, Mor: Morfina.

A fase neurogênica acontece nos primeiros 5 min após a injeção da formalina e leva à ativação de neurônios aferentes primários, estimulando de maneira direta os nociceptores e a liberação da substância P. Após isso, por um período de cerca de 10 min, chamado de quiescência, ocorre a inibição da transmissão nociceptiva pelos circuitos supra espinhais e espinhais, e assim, há uma redução temporária da dor. Posteriormente, tem início a segunda fase (F2: inflamatória) que ocorre entre 15 e 30 minutos após o estímulo e envolve a liberação de vários mediadores químicos, incluindo a serotonina, bradicinina, histamina, prostaglandinas, desencadeando um processo inflamatório nos tecidos periféricos e levando a alterações no processamento central da nocicepção, prolongando assim o comportamento doloroso nessa fase (HUNSKAAR, HOLE., 1987; TJOLSEN et al., 1992; TJOLSEN et al., 1997; FISCHER et al., 2014).

Possivelmente, a atividade analgésica periférica desempenhada por SteLL pode estar envolvida com a inibição da biossíntese ou liberação de mediadores inflamatórios, pois estudos anteriores relataram sua capacidade de modular mediadores inflamatórios como citocinas e óxido nítrico (LIMA et al., 2019; SANTOS et al., 2020).

Outros estudos mostram que lectinas têm efeito antinociceptivo periférico, e apresentam resultados semelhantes aos obtidos para SteLL, com efeito inibitório em ambas as fases do teste de formalina (VANDERLEI et al., 2010; ARAÚJO et al., 2013; PIRES et al.,

2019; OLADOKUN et al., 2019). Um exemplo é a lectina de sementes de *Lonchocarpus araripensis* (LAL; 10 mg/kg i.v.) que reduziu em 52% o tempo de lambida na primeira fase, e 46%, 70% e 79% na segunda fase em diferentes concentrações (0,1, 1 e 10 mg/kg i.v.) (AMORIM et al., 2016). Outro exemplo é a lectina de sementes de *Lonchocarpus campestris* (LCaL; 10 mg/kg s.c.) que diminuiu o tempo de lambida na primeira fase em 37% e na segunda fase em 73% (OLADOKUN et al., 2019). Em ambos os estudos, mesmo que por vias de administração diferentes, as maiores doses administradas foram similares à usada para SteLL e os resultados encontrados foram semelhantes.

SteLL (10 mg/kg) teve sua ação nociceptiva revertida em ambas as fases do teste de formalina quando incubada com ovoalbumina previamente à sua aplicação; por outro lado, a incubação prévia com glicose não foi capaz de reverter o efeito de SteLL em nenhuma das fases (Figura 3). Quando administrados isoladamente, ovoalbumina e glicose não apresentaram nenhum efeito antinociceptivo. Em conjunto, esses resultados indicam o provável envolvimento do DRC da lectina na atividade antinociceptiva desempenhada, uma vez que a AH de SteLL (512 UAH) foi totalmente inibida na presença de ovoalbumina, porém permaneceu inalterada na presença de glicose. De fato, uma variedade de processos biológicos desempenhados por lectinas relaciona-se com a sua capacidade de interação com carboidratos através do DRC (MARQUES et al., 2017).

Tem sido demonstrado que muitas atividades biológicas de lectinas ocorrem via DRC, incluindo a atividade antinociceptiva. Lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr; 100 mg/kg v.o) teve atividade no teste de formalina e no teste de placa quente bloqueada por seu carboidrato de ligação α -D-metil-manosídeo (PIRES et al., 2013). Lectina de sementes de *A. anthelmia* (AAL; 0.1 mg/kg i.v.) teve a ação analgésica no teste de formalina bloqueada por D-manose (NASCIMENTO et al., 2015). Lectina de sementes *Canavalia grandiflora* (ConGf; 1 mg/kg v.o), quando associada ao seu açúcar de ligação α -D-metil-manosídeo, teve o efeito antinociceptivo bloqueado no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (HOLANDA et al., 2009). Ainda, a lectina de sementes de *Lonchocarpus araripensis* (LAL; 10 mg/kg i.v) teve sua ação antinociceptiva inibida por N-acetilglicosamina no teste de formalina (AMORIM et al., 2016).

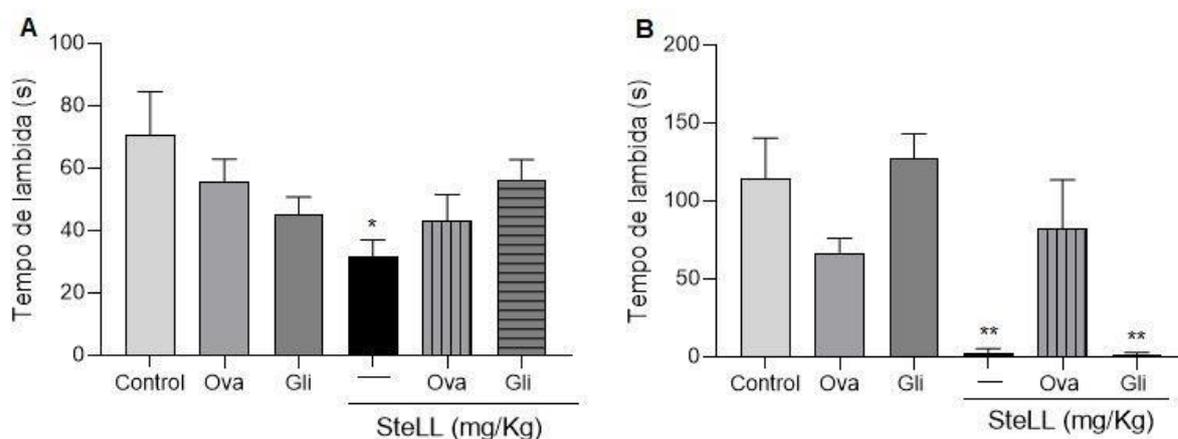


Figura 3- Investigação do envolvimento do domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC) no efeito antinociceptivo da lectina no teste de formalina. (A) F1: primeira fase - neurogênica, (B) F2: segunda fase - inflamatória. As barras representam a média do tempo de lambida da pata \pm erro padrão da média. (*) indica diferença significativa de $p < 0,05$ e (**) indica significância de $p < 0,005$, ambas em relação ao controle, baseado na análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Control: Controle, Ova: Ovalbumina, Gli: Glicose.

Receptores opioides (ROs) pertencem a família de receptores acoplados a proteína G, os principais incluem: μ (Mu), δ (Delta) e κ (Kappa). Estudos evidenciam que os ROs são glicosilados, por exemplo o receptor μ contém cinco locais para possíveis N-glicosilações (DUARTE; DEVI., 2020). Por serem glicosilados, os ROs apresentam possíveis sítios para interações com lectinas. A naloxona reverteu parcialmente a atividade de SteLL (10mg/kg), principalmente na fase inflamatória do teste da formalina (Figura 4). Nossos dados corroboram com o estudo realizado por Ramos e colaboradores (2020), em que o efeito antinociceptivo de SteLL sobre a hiperalgesia em modelo de dor oncológica foi revertido pela naloxona, indicando provável envolvimento dos receptores opioides. Outras lectinas já foram relatadas com o efeito antinociceptivo bloqueado por antagonistas opioides (VIANA et al., 2002; VANDERLEI et al., 2010; PIRES et al., 2013; ALVES et al., 2018). Por exemplo, a ConBr (100 mg/kg v.o.) teve sua ação parcialmente revertida pela naloxona no teste de formalina e no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (PIRES et al., 2013). Drogas de ação central, como opioides, inibem ambas as fases, enquanto as drogas que agem na periferia, como AINES e corticoides, inibem especialmente a fase inflamatória (GARCÍA et al., 2004).

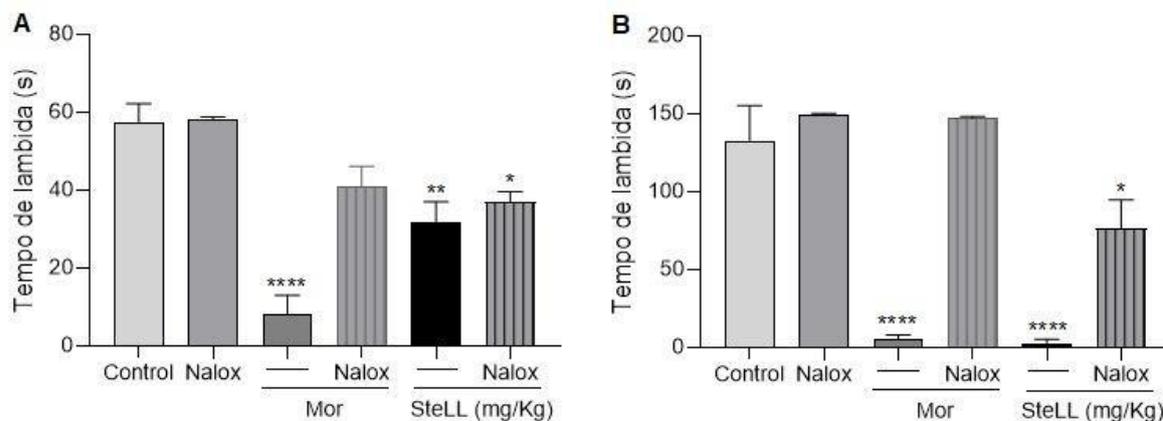


Figura 4- Investigação do envolvimento dos receptores opioides na atividade antinociceptiva de SteLL no teste de formalina. A administração da naloxona (2 mg/ kg i.p.), ocorreu 30 minutos antes da administração SteLL (10 mg/kg i.p.) ou morfina (10 mg/kg i.p.). (A) F1: primeira fase - neurogênica. (B) F2: segunda fase - inflamatória. As barras representam a média do tempo de lambida da pata ± erro padrão da média. (****), (**) e (*) indicam diferenças significativas de $p < 0,0001$, $p < 0,005$ e $p < 0,05$ em comparação ao controle, baseado na análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Control: Controle, Mor: Morfina, Nalox: Naloxona.

No teste de imersão da cauda, a temperatura é o estímulo nociceptivo. Os nociceptores são estimulados, principalmente as fibras polimodais C que percorrem para neurônios espinhais e sistemas neurais superiores, resultando na percepção do calor. Por esse motivo, o teste é aplicado para avaliação de compostos com atividade analgésica central, capazes de aumentar o tempo de latência para a retirada da cauda (LYNN et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2009). Os animais tratados com SteLL 1 mg/kg exibiram uma diminuição significativa na sensibilidade para retirada da cauda, apresentando alto limiar de dor, mesmo duas horas após a administração da lectina, em comparação com o controle (Figura 5D). Como esperado, a morfina também aumentou significativamente a latência em resposta à dor em comparação ao grupo controle.

Outras lectinas apresentam ação analgésica central. Por exemplo, ConBr (10, 30 e 100 mg/kg v.o.) e a BmoLL (30 e 60 mg/kg i.p.) apresentaram um aumento no tempo de latência no teste de placa quente em camundongos (PIRES et al., 2013; CAMPOS et al., 2016). Além disso, em estudo anterior SteLL (1 e 2 mg/kg) demonstrou atividade antinociceptiva no teste de placa quente após 90 min da administração e sua ação foi modulada por receptores opioides (RAMOS et al., 2020). Esses resultados fortalecem nossa hipótese de que SteLL, além de atuar a nível periférico, também apresenta ação central. As substâncias que atuam a nível de sistema nervoso central, como a morfina, suprimem respostas de neurônios espinhais

ao estímulo térmico na cauda, dessa forma aumentando o tempo de latência (FISCHER et al., 2008).

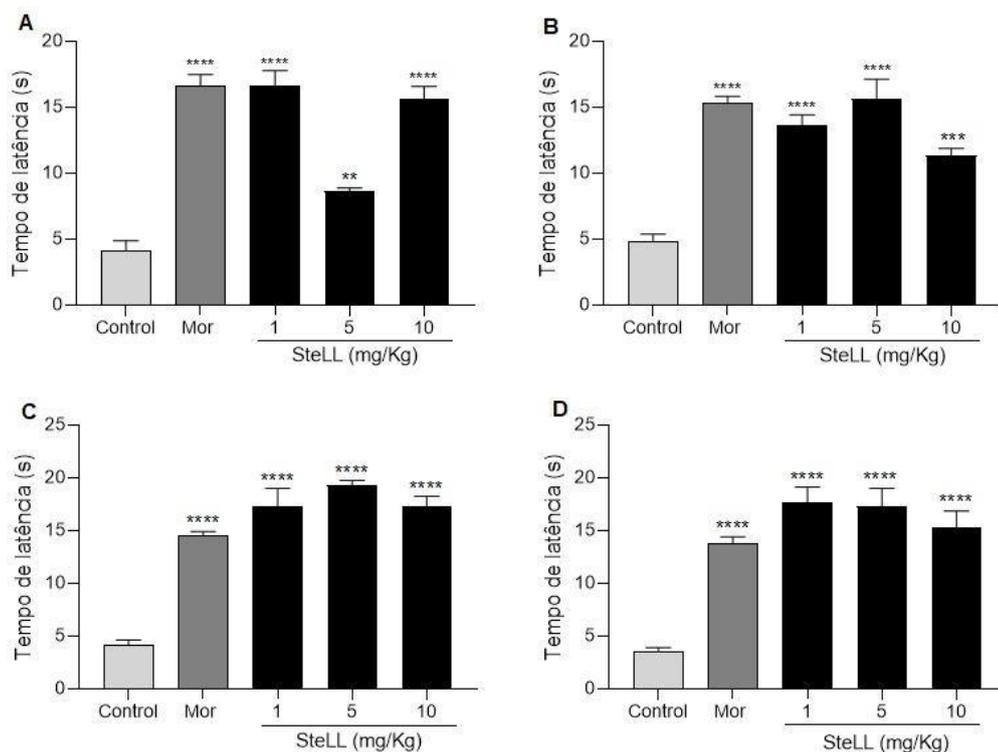


Figura 5- Teste de imersão de cauda em animais tratados com PBS (controle, i.p.), morfina (10 mg/kg i.p.) ou SteLL (1, 5, 10 mg/ kg i.p.), realizado (A) 30 minutos, (B) 60 minutos, (C) 90 minutos e (D) 120 minutos após a administração dos tratamentos. As barras representam a média do tempo de latência da retirada da cauda \pm erro padrão da média. (***), (****) indicam diferenças significativas de $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ em comparação com o controle, baseado na análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Control: Controle, Mor: Morfina.

Conclusão

SteLL apresenta ação analgésica periférica, efeito que envolve o DRC da lectina e é mediado por receptores opioides. Além disso, SteLL apresentou atuação analgésica a nível do SNC. Esses resultados abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de agentes analgésicos utilizando a lectina. Assim como, estimulam a investigação do possível efeito anti-inflamatório da lectina e sua avaliação em outros modelos experimentais de dor.

Referências

- ALVES, S. M.; FREITAS, R. S.; VAL, D. R.; VIEIRA, L. V.; ASSIS, E. L.; GOMES, F. I. F.; GADELHA, C. A. A.; GADELHA, T. S.; LACERDA, J. T. J. G.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; PINTO, V. P. T.; FILHO, G. C.; BEZERRA, M. M.; CHAVES, H. V. The efficacy of a lectin from *Abelmoschus Esculentus* depends on central opioid receptor activation to reduce temporomandibular joint hypernociception in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v.101, p. 478–484, 2018.
- ANDRADE, K. S.; PONCELET, D.; FERREIRA, S. R. S. Sustainable extraction and encapsulation of pink pepper oil. **Journal of Food Engineering**. p.1-8, 2017.
- ARAÚJO, T. S.; TEXEIRA, C. S.; FALCÃO, M. A. P.; JUNIOR, V. R. P.; SANTIAGO, M. Q.; BENEVIDES, R. G.; DELATORRE, P.; MARTINS, J. L.; MOREIRA, M. S. A.; CAVADA, B. S.; CAMPESATTO, E. A.; ROCHA, B. A. M. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Chitin-binding Lectin from *Canna Limbata* Seeds. **Appl Biochem Biotechnol.**, v. 171, p. 1944–1955, 2013.
- AMORIM, R. M. F.; PIRES, A. F.; NASCIMENTO, T. S.; CAVADA, B. S.; NASCIMENTO, K. S.; CAJAZEIRAS, J. B.; CARDOSO, J. H. L.; MOTA, M. R. L.; ASSREUY, A. M. The leguminous lectin of *Lonchocarpus araripensis* promotes antinociception via mechanisms that include neuronal inhibition of Na⁺ current. **Inflamm. Res**, v. 65, p. 701–708, 2016.
- ANVISA. Ministério da Saúde. Monografia da Espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia). Brasília, 2014.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MONTEIRO, J.M.; RAMOS, M.A.; AMORIM, E.L.C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **J Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 76–91, 2007.
- ALENCAR, N. M. N. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.**, v. 308, p. 407-414, 2009.
- ASSIS, D.B.; CARVALHO, A. N. H.; VILAR, F. D.; NUNES, A. H. H.; MARINHO, B. R.; NADER, B.; SANTOS, M. M.; DIAS, C. R.; LUCIANA, S.; TULLIUS, S. M.; NÓBREGA, A. R. Antinociceptive Activity of Chemical Components of Essential Oils That Involves Docking Studies: A Review. **Front Pharmacol.**, v. 11, p. 777, 2020.

- BHUIYAN, M. D. M. R.; BHUIYA, N. M. M. A.; HASAN, M.D. N.; NAHAR, U. J. *In vivo* and *in silico* evaluation of antinociceptive activities of seed extract from the *Holarrhena antidysenterica* plant. **Heliyon**, v. 6, e03932, 2020.
- 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. *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (StELL). **Ind. Crop. Prod.**, v. 116, p. 81–89, 2018.
- CAMPOS, J. K. L.; ARAÚJO, C. S. F.; ARAÚJO, T. F. S.; SANTOS, A. F. S.; TEXEIRA, J. A.; LIMA, V. L. M.; COELHO, L. C. B. B. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. **Biochimie Open.**, v. 2, p.62-68, 2016.
- CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Rev. Bras. de Plantas Medicinai**s, v. 15, 2013.
- CATERINA, M. J., SCHUMACHER, M. A., TOMINAGA, M., ROSEN, T. A., LEVINE, J. D., JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389, 816–824, 1997.
- CAVADA, B. S.; OSTERNE, V. J. S.; OLIVEIRA, M. V.; JUNIOR, V. R. P.; SILVA, M. T. L.; BARI, A. U.; LIMA, L. D.; LOSSIO, C. F.; NASCIMENTO, K. S. Reviewing Mimosoideae lectins: A group of under explored legume lectins. **Int. J. Bio. Macromol.** v. 154, 159-165, 2020.
- 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. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-Based Complement. Altern. Med.**, v. 2017, p. 1–22, 2017.
- UARTE, M. L.; DEVI, L. A. Post- translational modifications of opioid receptors. **Trends in Neurosciences**, v. 43, p. 417-432, 2020.
- DZOYEM, J. P.; ELOFF, J. N. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, p. 194-201, 2015.
- ENGELA, A. U.; BAAN, C. C.; DOR, F. J. M. F.; WEIMAR, W.; HOOGDUIJN, M. J. On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. **Front. Immunol**, v. 3, 126, 2012.

- FAWOLE, O. A.; AMOO, S. O.; NDHLALA, A. R.; LIGHT, M.E.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Anti-inflammatory, anticholinesterase, antioxidant and phytochemical properties of medicinal plants used for pain-related ailments in South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 235–241, 2010.
- FIGUEIREDO, J. G.; BITENCOURT, F. S.; BESERRA, I. G.; TEXEIRA, C. S.; LUZ, P. B.; BEZERRA, E. H. S.; MOTA, M. R. L.; ASSREUY, A. M. S.; CUNHA, F. Q.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M. N. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, n, 407, 2009.
- FISCHER, L. G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; DELLE-MONACHE, F.; DELLE-MONACHE, G.; CECHINEL-FILHO, V.; SOUSA, M. M. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. **Biol Pharm Bull**, v. 31, p. 235 – 239, 2008.
- FISCHER, M.; CARLI, G.; RABOISSON, P.; REEH, P. The interphase of the formalin test. **Pain.**, v.155, p. 511–521, 2014.
- GARCÍA, M. D.; FERNÁNDEZ, M. A.; ALVAREZ, A.; SAENZ M.T. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. ozua (Mirtaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 91(1), p. 69-73, 2004.
- GOMES, F. S.; PROCÓPIO, T. S.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **J. Appl Microbiol**, v.114, n.3, p.672-679, 2013.
- GOUVEIA, D. N.; GUIMARÃES, A. G.; SANTOS, W. B. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Natural products as a perspective for cancer pain management: A systematic review. **Phytomed.**, v. 58, 152766, 2019.
- HOLANDA, F. R.; SOUSA, A. N. C.; ASSREUY, A. M. S.; CARDOSO, J. H. L.; PIRES, A. F.; NASCIMENTO, K. S.; TEXEIRA, C. S.; CAVA, B. S.; SANTOS, C. F. Antinociceptive activity of lectins from Diocleinae seeds on acetic acid-induced writhing test in mice. **Bentham Science Publishers Ltd.**, v. 16, p. 1088-1092, 2009.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain.**, v. 30, p.103-14, 1987.

- JAESCHKE, H.; DUAN, L.; AKAKPO, J. Y.; FARHOOD, A.; RAMACHANDRAN, A. The role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology.*, v. 113, p. 709-718, 2018.
- KANIA, B. F.; WRONSKA, D.; BRACHA, U. Pain, pathophysiological mechanisms, and new therapeutic options for alternative analgesic agents in sheep: A review and investigation. *Animals.*, v. 11: 909, 2021.
- KHATUN, A.; IMAM, M. Z.; RANA, M. S. Antinociceptive effect of methanol extract of leaves of *Persicaria hydropiper* in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine.**, v. 15: 63, 2015.
- KOSTER R.; ANDERSON M.; DE BEER E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings.**, 18, 412, 1959.
- LIMA, I. M. S. F.; ZAGMIGNAM, A.; SANTOS, D. M.; MAIA, H. S.; SILVA, L. S.; CUTRIM, B. S.; VIEIRA, S. L.; FILHO, C. M. B.; SOUSA, E. M.; NAPOLEÃO, T. H.; KROGFELT, K. A.; LOBNER-OLESEN, A.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, L. C. N. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) has anti-infective action and modulates the response of *Staphylococcus aureus*-infected macrophages. **Sci Rep.**, v. 9, 2019.
- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.**, 193, 265–275, 1951.
- LYNN, B.; FAULSTROH, K.; PIERAU, F.K. The classification and properties of nociceptive afferent units from the skin of the anaesthetized pig. **Eur J Neurosci.** v. 7, p. 431-437, 1995.
- MADHU, C. S.; BALAJI, K.S.; SHANKAR, J.; SHARADA, A. C. Antitumor effects of chitin specific lectin from *Praecitrullus fistulosus* by targeting angiogenesis and apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 518, p. 381-387, 2019.
- NAPOLEÃO, T. H.; ALBUQUERQUE, L. P.; SANTOS, N. D. L.; NOVA, I. C. V.; LIMA, T. A.; PAIVA, P. M. G.; PONTUAL, E. V. Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. **Pest Manag. Sci.**, v. 75, p. 1212–1222, 2019.
- NASCIMENTO, K. S.; NASCIMENTO, F. L. F.; SILVA, M. T. L.; NOBRE, C. B.; MOREIRA, C. G.; BRIZENO, L. A. C.; PONTE, E. L.; ASSREUY, A. M. S.; CAVA, B. S. Purification thermostable antinociceptive lectin isolated from *Andira anthelmia*. **J. Mol. Recognit.** v. 29, p. 248-252, 2015.

- NASCIMENTO, K. S.; SILVA, M. T. L.; OLIVEIRA, M. V.; LOSSIO, C. F.; JUNIOR, V. R. P.; OSTERNE, V. J. S.; CAVA, B. S. Dalbergieae lectins: A review of lectins from species of a primitive Papilionoideae (leguminous) tribe. **Int. J. Bio. Macromol.** v.144, 509-526, 2020.
- NEVES, S. A.; FREITAS, A. L. P.; SOUZA, B. W. S.; ROCHA, M. L. A.; CORREIA, M. V. O.; SAMPAIO, D. A.; VIANA, G. S. B. Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Braz J Med Biol Res.**, v. 40, p. 127-134, 2007.
- OLADOKUN, B. O.; OMISORED, O. N.; OSUKOYA, O. A.; KUKU, A. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Tetracarpidium conophorum* seed lectin. **Scientific African.**, v. 3, e00073, 2019.
- OLIVEIRA-JR, P. C.; BALEN, E.; ARRIGO, J. S.; FORMAGIO, A. S. N.; SILVA, M. M.; KASSUYA, C. A. L. Analgesic effect of methanolic extract obtained from *Schinus terebinthifolius* leaves. **Biomed Biopharm Res.**, v. 17, p. 175–180, 2020.
- PIRES, A. F.; ASSREUY, A. M. S.; LOPES, E. 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.; SOUZA, A. N. C.; SANTOS, C. F. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 27, p. 201-209, 2013.
- PIRES, A. F.; BEZERRA, M. M.; AMORIM, R. M. F.; NASCIMENTO, F. L. F.; MARINHO, M. M.; MOURA, R. M.; SILVA, M. T. L.; CORREIA, J. L. A.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. S.; NASCIMENTO, K. S. Lectin purified from *Lonchocarpus campestris* seeds inhibits inflammatory nociception. **Int J Biol Macromol.**, v. 125, p. 53-60, 2019.
- PROCÓPIO, T. F.; PATRIOTA, L. L. S.; MOURA, M. C.; SILVA, P. M.; OLIVEIRA, P. S.; CARVALHO, L. V. N.; LIMA, T. A.; SORES, 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. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **Int. J. Bio. Macromol.**, v. 98, p. 419-429, 2017.
- RAMACHANDRAN, A.; JAESCHKE, H. Acetaminophen hepatotoxicity. **Seminars in Liver Disease.**, v. 39, p. 221-234, 2019.

- RAMOS, D. B. M.; ARAÚJO, M. T. M. F.; ARAÚJO, T. C. L.; SILVA, Y. A.; SANTOS, A. C. L. A.; SILVA, M. G.; PAIVA, P. M. G.; MENDES, R. L.; NAPOLEÃO, T. H. Antinociceptive activity of *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.259, 2020.
- RAMOS, D. B. M.; ARAÚJO, M. T. M.; 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. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 233, p. 148-157, 2019.
- SANTOS, A. F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; BEZERRA, R. F.; CARVALHO, E. V. M. M.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Strategies to obtain lectins from distinct sources. L.V. Berhardt (Ed.), **Advances in Medicine and Biology**, v. 63, Nova Science Publishers Inc. p. 33-60, 2013.
- SANTOS, A. J. C. A.; BARROS, B. R. S.; AGUIAR, L. M. S.; PATRIOTA, L. L. S.; LIMA, T. A.; ZINGALI, R. B.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; MELO, C. M. L.; PONTUAL, E. V. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) is an immunomodulatory agent by altering cytokine release by mice splenocytes. **3 Biotech.**, v. 10:144, 2020.
- SCHEID, T.; MORAES, M. S.; HENRIQUES, T. P.; RIFFEL, A. P. K.; BELLÓ-KLEIN, A.; POSER, G. L. V.; ETHUR, E. M.; PARTATA, W. A. Effects of Methanol Fraction from Leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi on Nociception and Spinal-Cord Oxidative Biomarkers in Rats with Neuropathic Pain. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.**, p. 1–11, 2018.
- SINGH. S.; MAJUMDAR. D. K. Analgesic Activity of *Ocimum sanctum* and its Possible Mechanism of Action. **International Journal of Pharmacognosy.**, v. 3, p. 188-192, 1995.
- TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the methoh. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.
- TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: Dickenson A., Besson JM. (eds) **The Pharmacology of Pain.**, v. 130, 1997.
- VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; DAMME, E. J. M. V. Plant lectins as defense protein against phytophagous insects. **Phytochemistry.**, v. 72, p. 1538-1550, 2011.
- VANDERLEI, E. S. O.; PATOILLO, 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. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **International Immunopharmacology.**, v. 10, p. 1113-1118, 2010.
- VIANA, G. S. B.; FREITAS, A. L. P.; LIMA, M. M. L.; VIEIRA, L. A. P.; ANDRADE, M. C. H.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Brythamnion seaforthii* (Turner) Kütz. And *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. **Braz. J. Med. Biol Res.**, v. 35 (6), 2002.

4 CONCLUSÕES

- A lectina SteLL não exerceu efeito citotóxico para CTMs nem interferiu na capacidade dessas células em produzir citocinas. Estudos futuros podem ser realizados para investigar possíveis efeitos de SteLL na diferenciação de CTMs.
- SteLL apresentou ação citotóxica na linhagem tumoral leucêmica K562 por meio da indução de apoptose. Investigações adicionais podem ser empregadas para esclarecer os mecanismos envolvidos na atividade antineoplásica da lectina.
- SteLL apresentou ação analgésica em modelos de nocicepção (teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e teste de formalina), efeito que envolve o DRC da lectina e é mediado por receptores opioides.
- Além disso, a lectina apresentou atuação analgésica a nível do SNC, aumentando o tempo de latência para a retirada da cauda em resposta ao estímulo térmico no teste de imersão da cauda.
- Esses resultados abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de agentes analgésicos utilizando a lectina. Assim como, estimulam a investigação do possível efeito anti-inflamatório da lectina e sua avaliação em outros modelos experimentais de dor.

REFERÊNCIAS

- ABDON, A. P. V.; SOUZA, G. C.; SOUZA, L. N. C.; VASCONCELOS, R. P.; CASTRO, C. A.; GUEDES, M. M.; JÚNIOR, R. C. P. L.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; CAMPOS, A. R. Gastroprotective potential of frutalin, a D-galactose binding lectin, against ethanol-induced gastric lesions. **Fitoterapia**, v. 83, p. 604-608, 2012.
- ADAMUDE, F. A.; NWOBODO, N. N.; DINGWOKE, E. J.; AGUH, I. B.; NWOSU, O. E.; UBHENIN, A. Identification and characterization of lectin gene isolated from an indigenous *Albizia lebbek* seeds. **Scientific African**, v. 7, e.00234, 2020.
- ALATYYAT, S. M.; ALASMARI, H. M.; ALEID, O. A.; ABDEL-MAKSOU, M. S.; ELSHERBINY, N. Umbilical cord stem cells: Background, processing and applications. **Tissue and Cell**. v. 65, p. 101351, 2020.
- ALBUQUERQUE, L. P.; PONTUAL, E. V.; SANTANA, G. M. S.; SILVA, L. R. S.; AUIAR, J. S.; COELHO, L. C. B. B.; RÊGO, M. J. B. M.; PITTA, M. G. R.; SILVA, T. G.; MELO, A. M. M. A.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**, v. 138, p. 23-27, 2014.
- ALLICKSON, J. G.; SANCHEZ, A.; YEFIMENKO, N.; BORLONGAN, C. V.; SANBERG, P. R. Recent studies assessing the proliferative capability of a novel adult stem cell identified in menstrual blood. **Open Stem Cell J**. v.3, p. 4–10, 2011.
- AMORIM, R. M. F.; PIRES, A. F.; NASCIMENTO, T. S.; CAVADA, B. S.; NASCIMENTO, K. S.; CAJAZEIRAS, J. B.; CARDOSO, J. H. L.; MOTA, M. R. L.; ASSREUY, A. M. The leguminous lectin of *Lonchocarpus araripensis* promotes antinociception via mechanisms that include neuronal inhibition of Na⁺ current. **Inflamm. Res**, v. 65, p. 701–708, 2016.
- ANDRADE, K. S.; PONCELET, D.; FERREIRA, S. R. S. Sustainable extraction and encapsulation of pink pepper oil. **Journal of Food Engineering**. p.1-8, 2017.
- ARANDA-SOUZA, M. A.; LORENA, V. M. B.; CORREIA, M. T. S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. In vitro effect of *Bothrops leucurus* lectin (BLL) against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* infection. **Int. J. Bio. Macromol**, v.120, p. 431-439, 2018.
- ARAÚJO, G. L. S.; PARRELA, A. F. B.; BORGES, J. M. S.; TRINDADE, J. V. F.; SOUZA, L. T.; JÚNIOR, M. F. Apoptose como perspectiva de cura do câncer. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 28, p. 32-35, 2019.
- 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. Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. **Nat. Prod. Bioprospect**, v. 1, p. 97-100, 2011.

ARAÚJO, T. S.; TEXEIRA, C. S.; FALCÃO, M. A. P.; JUNIOR, V. R. P.; SANTIAGO, M. Q.; BENEVIDES, R. G.; DELATORRE, P.; MARTINS, J. L.; MOREIRA, M. S. A.; CAVADA, B. S.; CAMPESATTO, E. A.; ROCHA, B. A. M. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Chitin-binding Lectin from *Canna Limbata* Seeds. **Appl Biochem Biotechnol.**, v. 171, p. 1944–1955, 2013.

ARORA, S.; MAJHAIL, N. S.; LIU, H. Hematopoietic Progenitor Cell Mobilization for Autologous Stem Cell Transplantation in Multiple Myeloma in Contemporary Era. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk.** v. 19 p. 200-205, 2019.

BARTOLUCCI, J.; VERDUGO, F. J.; GONZÁLEZ, P. L.; LARREA, R. E.; ABARZUA, E.; GOSET, C.; ROJO, P.; PALMA, I.; LAMICH, R.; PEDREROS, P. A.; VALDIVIA, G.; LOPEZ, V. M.; NAZZAL, C.; MIRANDA, F. A.; CUENCA, J.; BROBECK, M.J.; PATEL, A. N.; FIGUEROA, F.E.; KHOURY, M. Safety and Efficacy of the Intravenous Infusion of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Patients With Heart Failure: A Phase 1/2 Randomized Controlled Trial (RIMECARD Trial [Randomized Clinical Trial of Intravenous Infusion Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Cardiopathy]). **Circ Res.** v. 121(10):1192-1204, 2017.

BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Toward better pain control. **Scientific American.** v. 294, p. 60-67. 2006.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell.** v.139, p.267-84, 2009.

BHUIYAN, M. D. M. R.; BHUIYA, N. M. M. A.; HASAN, M.D. N.; NAHAR, U. J. *In vivo* and *in silico* evaluation of antinociceptive activities of seed extract from the *Holarrhena antidysenterica* plant. **Heliyon**, v. 6, e03932, 2020.

BISWAS, H.; CHATTOPADHYAYA, R. Stability of *Curcuma longa* rhizome lectin: Role of N-linked glycosylation. **Glycobiology**, v. 26, n. 4, p. 410-426, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília, 2016.

BRITO, J. S.; FERREIRA, G. R. S.; KLIMCZAK, E.; GRYSHUK, L.; SANTOS, N. D. L.; PATRIOTA, L. L. S.; MOREIRA, L. R.; SOARES, A. K. A.; BARBOZA, B. R.; PAIVA, P. M. G.; NAVARRO, D. M. A. F.; LORENA, V. M. B.; MELO, C. M. L.; CORIOLANO, M. C.; NAPOLEÃO, T. H. 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.

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. Sitophilus zeamais adults have survival and nutrition affected by Schinus terebinthifolius leaf extract and its lectin (SteLL). **Industrial Crops and Products**, v. 116, p. 81–89, 2018.

CAMPBELL, P.; STUART, J.; GETZ, G.; KORBEL, J.; STEIN, L. Pan- câncer analysis of whole genomes. **Nature**, v. 578, p. 82-93, 2020.

CAMPOS, J. K. L.; ARAÚJO, C. S. F.; ARAÚJO, T. F. S.; SANTOS, A. F. S.; TEXEIRA, J. A.; LIMA, V. L. M.; COELHO, L. C. B. B. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. **Biochimie Open.**, v. 2, p.62-68, 2016.

CANESI, M.; GIORDANO, R.; LAZZARI, L.; ISALBERTI, M.; ISAIAS, I.U.; BENTI, R.; RAMPINI, P.; MAROTTA, G.; COLOMBO, A.; CEREDA, E.; DIPAOLO, M.; MONTEMURRO, T.; VIGANÒ, M.; BUDELLI, S.; MONTELATICI, E.; LAVAZZA, C.; CORTELEZZI, A.; PEZZOLI, G. Finding a new therapeutic approach for no-option Parkinsonisms: mesenchymal stromal cells for progressive supranuclear palsy. **J Transl Med**, v. 14(1): 127, 2016.

CARVALHO, A. S.; SILVA, M. V.; GOMES, F. S.; PAIVA, P. M. G.; MALAFAIA, C. B.; SILVA, T. D.; VAZ, A. F. M.; SILVA, A. G.; ARRUDA, I. R. S.; NAPOLEÃO, T. H.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CORREIA, M. T. S. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **Int. J. of Bio. Macromol**, v. 75, p. 402-408, 2015.

CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Rev. Bras. de Plantas Medicinai**s, v. 15, 2013.

CASTRO, J. A.; BRASILEIRO, B. P.; LYRA, D. H.; PEREIRA, D. A.; CHAVES, J. L.; AMARAL, C. L. F. Ethnobotanical study of tradicional uses of medicinal plants: The flora of caatinga in the community of Cravolândia-BA, Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 1905-1917, 2011.

CATERINA, M. J., SCHUMACHER, M. A., TOMINAGA, M., ROSEN, T. A., LEVINE, J. D., JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389, 816–824, 1997.

CAVADA, B. S.; OSTERNE, V. J. S.; OLIVEIRA, M. V.; PINTO-JUNIOR, V. R.; SILVA, M. T. L.; BARI, A. U.; LIMA, L. D.; LOSSIO, C. F.; NASCIMENTO, K. S. Reviewing Mimosoideae lectins: A group of under explored legume lectins. **Int. J. Bio. Macromol.** v. 154, 159-165, 2020.

CESARE, P.; NAUGHTON, P. Peripheral pain mechanisms. **Curr Opin Neurobiol.** v. 7, p. 493-9, 1997.

CHAO, K. C.; YANG, H. T.; CHEN, M. W. Human umbilical cord mesenchymal stem cells suppress breast cancer tumourigenesis through direct cell-cell contact and internalization. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.16, p.1803–1815, 2012.

CHEN, X.; WANG, S.; CAO, W. Mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation in cell therapy of neurodegenerative diseases. **Cellular Immunology**, v.326, p.8-14, 2018.

CHENG, M. T.; YANG, H. W.; CHEN, T. H.; LEE, O. K. S. Isolation and characterization of multipotent stem cells from human cruciate ligaments. **Cell Proliferation**, v. 42, p. 448-460, 2009.

CHOLAK, I. S.; ABUDAYEH, Z. H. M.; KARPIUK, U. V.; ABUALASSAL, Q.; HASSOUNEH, L. K. M. A study of lectin activity in buds of *Sophora japonica* L. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 9, p. 1877-1881, 2016.

CHUGH, A. R.; BEACHE, G.; LOUGHRAN, J. H.; MEWTON, N.; ELMORE, J. B.; KAJSTURA, J.; PAPPAS, P.; TATOLES, A.; STODDARD, M. F.; LIMA, J. A. C.; SLAUGHTER, M. S.; ANVERSA, P.; BOLLI, R. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. **Circulation**, v.126, p. 54-64, 2012.

CHULPANOVA, D.S.; KITAEVA, K.V.; TAZETDINOVA, L.G.; JAMES, V.; RIZVANOV, A.A.; SOLOVYEVA, V.V. Application of Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Agent Delivery in Anti-tumor Treatment. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, 2018.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, P.M.S.; OLIVEIRA, W.F.; MOURA, M.C.; PONTUAL, E.V.; GOMES, F.S.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H.; CORREIA, M.T.S. Lectins as antimicrobial agentes, **J. Appl. Microbiol**, v. 125, p. 1238-1252, 2017.

CORIOLOANO, M. C.; BRITO, J. S.; FERREIRA, G. R. S.; MOURA, M. C.; MELO, C. M. L.; SOARES, A. K. A.; LORENA, V. M. B.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B. Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has differential action on growth, mebrane permeability and protease secretory ability of Gram-positive and Gram-negative pathogens. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 198-205, 2020.

COSTA, R. B.; CAMPANA, P. T.; CHAMBERGO, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; PEREIRA, H. J. V.; OLIVA, M. L. V.; GOMES, F.S. Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark. **Int. J. of Bio. Macromol**, v. 119, p. 517- 523, 2018.

CROSS, A. S. Pathophysiology of pain. **Mayo Clin Proc**, v. 69(4), p. 375-83, 1994.

CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; SCOTT, A. P.; WATERHOUSE, N. J. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 11, 2016.

DAMASIO, D. C.; NOLTE, S.; POLAK, L. P.; BRANDT, A. P.; BONAN, N. B.; ZISCHLER, L.; STUELP-CAMPELO, P. M.; CADENA, S. M. S. C.; NORONHA, L.; ELÍFIO-ESPOSITO, S. L.; MORENO-AMARAL, A. N. The lectin BJcuL induces apoptosis through TRAIL expression, caspase cascade activation and mitochondrial membrane permeability in a human colon adenocarcinoma cell line. **Toxicon**, v. 90, p. 299-307, 2014.

DANNENBERG, G. S.; FUNCK, G. D.; MATTEI, F. J.; SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus*

terebinthifolius Raddi) *in vitro* and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 120-127, 2016.

DICIAULA, M. C.; LOPES, G. C.; SCARMINIO, I. S.; MELLO, J. C. P. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a UV-Vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. **Química Nova**, v. 37, p. 158–163, 2014.

DING, D.; CHANG, Y.; SHYU, W.; LIN, S. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Era for Stem Cell Therapy. **Cell Transplantation**, v.24, p. 339–347, 2015.
DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, DEANS R, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. v.8, p.315-7, 2006.

ELAHIMEHR, R.; SCHEINOK, A. T.; MCKAY, D. B. Hematopoietic stem cells and solid organ transplantation. **Transplantation Reviews**. v. 30, p. 227–234, 2016.

ENNIGROU, A.; CASABIANCA, H.; LAARIF, A.; HANCHI, B.; HOSNI, K. Maturation-related changes in phytochemicals and biological activities of the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruits. **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 407–415, 2016.

FARAHABADI, M. T.; MAHMOUDI, M.; HASHEMI, S. M.; REZAEI, N. Evaluation of the effects of mesenchymal stem cells on neutrophils isolated from severe congenital neutropenia patients. **International Immunopharmacology**. v. 83, 1064463, 2020.

FEUEREISEN, M.; HOPPE, J.; ZIMMERMANN, B. F.; WEBER, F.; KAYSERS, N. S.; SCHIEBER, A. Characterization of phenolic compounds in brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) exocarp. **Agric. Food Chem**, v. 62, p. 6219 – 6226, 2014.
FIGUEIREDO, J. G.; BITENCOURT, F. S.; BESERRA, I. G.; TEXEIRA, C. S.; LUZ, P. B.; BEZERRA, E. H. S.; MOTA, M. R. L.; ASSREUY, A. M. S.; CUNHA, F. Q.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M. N. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, n, 407, 2009.

FISCHER, M.; CARLI, G.; RABOISSON, P.; REEH, P. The interphase of the formalin test. **Pain.**, v.155, p. 511–521, 2014.

FOLESTAD, E.; KUNATH, A.; WAGSÄTER, D. PDGF-C and PDGF-D signaling in vascular diseases and animal models. **Molecular Aspects of Medicine**, v.62, p.1–11, 2018.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; AARONSON, S. A.; ABRAMS, J. M.; ADAM, D.; *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, p. 486-541, 2018.

GARCÍA, M. D.; FERNÁNDEZ, M. A.; ALVAREZ, A.; SAENZ M.T. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. ozua (Mirtaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 91(1), p. 69-73, 2004.

G-I. IM. Clinical use of stem cells in orthopaedics. **European Cells and Materials**, v. 33, p. 183-196, 2017.

GLÓRIA, L. L.; ARANTES, M. B. S.; PEREIRA, S. M. F.; VIEIRA, G. S.; MARTINS, C. X.; JUNIOR, A. R. C.; ANTUNES, F.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C.; CRUZ, L. L.; CHAVES, D. S. A.; FREITAS, S. P.; OLIVEIRA, D. B. Phenolic Compounds Present *Schinus terebinthifolius* Raddi Influence the Lowering of Blood Pressure in Rats. **Molecules**, v. 22, 1792, 2017.

GOLDBERG, D.S.; GEE, S. J. Pain as a global public health priority. **BMC Public Health**, v. 11, 770, 2011.

GOMES, F. S.; PROCÓPIO, T. S.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **J. Appl Microbiol**, v.114, n.3, p.672-679, 2013.

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

HAO, D. C.; YANG, L. Drug metabolism and disposition diversity of Ranunculales phytometabolites: A systems perspective. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v.12, p. 1047-1065, 2016.

HAO, D.; XIAO, P. Pharmaceutical resource discovery from traditional medicinal plants: Pharmacophylogeny and pharmacophylogenomics. **Chinese Herbal Medicines**, v. 12, p.104-117, 2020.

HOLANDA, F. R.; SOUSA, A. N. C.; ASSREUY, A. M. S.; CARDOSO, J. H. L.; PIRES, A. F.; NASCIMENTO, K. S.; TEXEIRA, C. S.; CAVA, B. S.; SANTOS, C. F. Antinociceptive activity of lectins from Diocleinae seeds on acetic acid-induced writhing test in mice. **Bentham Science Publishers Ltd.**, v. 16, p. 1088-1092, 2009.

HONG, B.; LEE, S.; SHIN, N.; KO, Y.; KIM, D.; LEE, J.; LEE, W. Bone regeneration with umbilical cord blood mesenchymal stem cells in femoral defects of ovariectomized rats. **Osteoporosis and Sarcopenia**. p. 1-7, 2018.

HUANG, G.T., GRONTHOS, S. AND SHI, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. **J. Dent. Res.** v. 88, p. 792–806, 2009.

HUANG, X.; HAN, K.; LI, T.; WANG, W.; REN, Q. Novel L-type lectin from fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* participates in antibacterial and antiviral immune responses. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 77, p. 304-311, 2018.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain.**, v. 30, p.103-14, 1987.

JONES, T. H.; MCCLELLAND, E. E.; MCFEETERS, H.; MCFEETERS, R. L. Novel Antifungal Activity for the Lectin Scytovirin: Inhibition of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 755, 2017.

JORGE, L. I. F.; MARKMANN, B. E. O. Exame químico e microscópico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira). **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 17, p. 139 - 145, 1996.

JULIUS D, BASBAUM A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature.** v.413, p. 203-10, 2001.

KALRA, K.; TOMAR, P. C. Stem Cell: Basics, Classification and Applications. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v.2, p. 919-930, 2014.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. Princípios de Neurociência. São Paulo: Manole, 2003.

KANIA, B. F.; WRONSKA, D.; BRACHA, U. Pain, pathophysiological mechanisms, and new therapeutic options for alternative analgesic agents in sheep: A review and investigation. **Animals.**, v. 11: 909, 2021.

KAUR, R.; NEETU.; MUDGAL, R.; JOSE, J.; KUMAR, P.; TOMAR, S. Glycan-dependent chikungunya viral infection divulged by antiviral activity of NAG specific chi-like lectin. **Virology**, v. 526, p. 91-98, 2019.

KIM-CAMPBELL, N.; GOMEZ, H.; BAYIR, H. Cell Death Pathways: Apoptosis and Regulated Necrosis. **Critical Care Nephrology (Third Edition)**, e. 2, p. 113-121, 2019.

L' EPISCOPO, F.; TIROLO, C.; PERUZZOTTI-JAMETTI, L.; SERAPIDE, M. F.; TESTA, N.; CANIGLIA, S.; BALZAROTTI, B.; PLUCHINO, S.; MARCHETTI, B. Neural Stem Cell Grafts Promote Astroglia-Driven Neurorestoration in the Aged Parkinsonian Brain via Wnt/ β -Catenin Signaling. **Stem Cells**, v. 36, p.1179-1197, 2018.

LACERDA, R. R.; NASCIMENTO, E. S.; LACERDA, J. T. J. G.; PINTO, L. S.; RIZZI, C.; BEZERRA, M. M.; PINTO, I. R.; FILHO, S. M. P.; PINTO, V. P. T.; FILHO, G. C.; GADELHA, C. A. A.; GADELHA, T. S. Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L. var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. **Int. J. Bio. Macromol.**, v. 95, p. 1072-1081, 2017.

LEE, W. S.; KIM, H. J.; KIM, K. I.; KIM, G. B.; JIN, W. Intra-Articular Injection of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Phase IIb, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. **Stem Cells Transl Med.** v 8(6):504-511, 2019.

- LENZI, M., ORTH, A. I. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), em Florianópolis-SC, Brasil. **Rev. Bras. Frutic.** v. 26, 2004.
- LIANG J, ZHANG H, KONG W, DENG W, WANG D, FENG X, ZHAO C, HUA B, WANG H, SUN L. Safety analysis in patients with autoimmune disease receiving allogeneic mesenchymal stem cells infusion: a long-term retrospective study. **Stem Cell Res Ther.** v. 9(1): 312, 2018.
- LICHTENSTEIN, R. G.; RABINOVICH G. A. Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. **Cell Death Differ.** v. 20, p. 976–986, 2013.
- LIMA, I. M. S. F.; ZAGMIGNAM, A.; SANTOS, D. M.; MAIA, H. S.; SILVA, L. S.; CUTRIM, B. S.; VIEIRA, S. L.; FILHO, C. M. B.; SOUSA, E. M.; NAPOLEÃO, T. H.; KROGFELT, K. A.; LOBNER-OLESEN, A.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, L. C. N. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) has anti-infective action and modulates the response of *Staphylococcus aureus*-infected macrophages. **Sci Rep.**, v. 9, 2019.
- LIN, B.L.; CHEN, J. F.; QIU, W. H.; WANG, K.W.; XIE, D.Y.; CHEN, X. Y.; LIU, Q.L.; PENG L.; LI, J. G.; MEI, Y. Y.; WENG, W. Z.; PENG, Y. W.; CAO, H. J.; XIE, J. Q.; XIE, S. B.; XIANG, A. P.; GAO, Z. L. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure: A randomized controlled trial. **Hepatology.** v. 66(1):209-219, 2017
- LIN, W.; HUANG, L.; LI, Y.; FANG, B.; LI, G.; CHEN, L.; XU, L. Mesenchymal Stem Cells and Cancer: Clinical Challenges and Opportunities. **BioMed Research International**, p.1-12, 2019.
- LIU, S.; DONTU, G.; WICHA, M. S. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. **Breast Cancer Research**, v. 7, p. 86-96, 2005.
- LUZ, L. A., ROSSATO, F. A.; COSTA, R. A. P.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Cytotoxicity of the coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) to B16-F10 melanoma cells. **Toxicology in Vitro**, v.44, p. 94-99, 2017.
- LYNN, B.; FAULSTROH, K.; PIERAU, F.K. The classification and properties of nociceptive afferent units from the skin of the anaesthetized pig. **Eur J Neurosci.** v. 7, p. 431-437, 1995.
- MACHADO, S. C. C.; ROSAS, E. C.; BRITO, F. A.; HERINGE, A. P.; OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; HENRIQUES, M. G. M. O. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 1552-1560, 2008.
- MADHU, C. S.; BALAJI, K. S.; SHANKAR, J.; SHARADA, A. C. Antitumor effects of chitin specific lectin from *Praecitrullus fistulosus* by targeting angiogenesis and apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 518, p. 381-387, 2019.
- MIKI T. Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells. **Am J Reprod Immunol.** v.80, e13003, 2018.

MIKKOLA, M.; TOIVONEN, S.; TAMMINEN, K.; ALFTHAN, K.; TUURI, T.; SATOMAA, T.; NATUNEN, J.; SAARINEN, J.; TIITTANEN, M.; LAMPINEN, M.; VALMU, L.; PARTANEN, J.; OTONKOSKI, T. Lectin from *Erythrina cristagalli* supports undifferentiated growth and differentiation of human pluripotent stem cells. **Stem Cells Dev**, v. 22, p. 707-712, 2012.

MISHRA, A.; BEHURA, A.; MAWATWAL, S.; KUMAR, A.; NAIK, L.; MOHANTY, S. S.; MANNA, D.; DOKANIA, P.; MISHRA, A.; PATRA, S. K.; DHIMAN, R. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical toxicology**, v. 134, 110827, 2019.

MOCHIDA, T.; UENO, H.; TSUBOOKA-YAMAZOE, N.; HIYOSHI, H.; ITO, R.; MATSUMOTO, H.; TOYODA, T. Insulin-Deficient Diabetic Condition Upregulates the Insulin-Secreting Capacity of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Pancreatic Endocrine Progenitor Cells After Implantation in Mice. **Diabetes**, v. 69, p. 634-646, 2020.

MORIMOTO, K.; SATO, Y. Anti-influenza virus activity of high-mannose binding lectins derived from genus *Pseudomonas*. **Virus Research**, v. 223, p. 64-72, 2016.

NASCIMENTO, K. S.; NASCIMENTO, F. L. F.; SILVA, M. T. L.; NOBRE, C. B.; MOREIRA, C. G.; BRIZENO, L. A. C.; PONTE, E. L.; ASSREUY, A. M. S.; CAVA, B. S. Purification thermostable antinociceptive lectin isolated from *Andira anthelmia*. **J. Mol. Recognit.** v. 29, p. 248-252, 2015.

NASCIMENTO, K. S.; SILVA, M. T. L.; OLIVEIRA, M. V.; LOSSIO, C. F.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; CAVADA, B. S. Dalbergieae lectins: A review of lectins from species of a primitive Papilionoideae (leguminous) tribe. **Int. J. Bio. Macromol.** v.144, 509-526, 2020.

NENCLARES, P.; HARRINGTON, K. J. The biology of cancer. **Medicine**. v. 48, p. 67-72, 2020.

NIANIAS, A.; THEMELI, M. Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Lymphocytes for Adoptive Cell Immunotherapy: Recent Advances and Challenges. **Curr Hematol Malig Rep.** v. 14, p.261-268, 2019.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, p. 3448-3459, 2013.

NIZET, V.; VARKI, A.; AEBI, M. Microbial lectins: hemagglutinins, adhesins, and toxins. **Essentials of Glycobiology**, ed. 3, cap. 37, p. 1-11, 2017.

OLADOKUN, B. O.; OMISORE, O. N.; OSUKOYA, O. A.; KUKU, A. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Tetracarpidium conophorum* seed lectin. **Scientific African**, v. 3, e. 00073, 2019.

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.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Cancer fact sheet. Genebra: OMS, 2020.
Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 14 jul. 2021.

PALHETA, I. C.; MARTINS, A. C. C. T.; LUCAS, F. C. A.; JARDIM, M. A. G.
Ethnobotanical study of medicinal plants in urban home gardens in the city of Abaetetuba, Paá state, Brazil. **Boletín Latino americano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 16, p. 206 - 262, 2017.

PARK, D.; BRUNE, K.A.; MITRA, A.; MARUSINA, A.I.; MAVERAKIS, E.; LEBRILLA, C.B. Characteristic Changes in Cell Surface Glycosylation Accompany Intestinal Epithelial Cell (IEC) Differentiation: High Mannose Structures Dominate the Cell Surface Glycome of Undifferentiated Enterocytes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 14, p.2910-2921, 2015.

PIETRZYK- BRZEZINSKA, A. J.; BUJACK, A. H-type lectins–Structural characteristics and their applications in diagnostics, analytics and drug delivery. **Int. J. Bio. Macromol**, v.152, p.735-747, 2020.

PIRES, A. F.; ASSREUY, A. M. S.; LOPES, E. 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.; SOUZA, A. N. C.; SANTOS, C. F. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 27, p. 201-209, 2013.

PIRES, A. F.; BEZERRA, M. M.; AMORIM, R. M. F.; NASCIMENTO, F. L. F.; MARINHO, M. M.; MOURA, R. M.; SILVA, M. T. L.; CORREIA, J. L. A.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. S.; NASCIMENTO, K. S. Lectin purified from *Lonchocarpus campestris* seeds inhibits inflammatory nociception. **Int. J. Bio. Macromol**, v. 125, p. 53-60, 2019.

PITTENGER, M.F.; MARTIN, B.J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circulation Research**, v.95, p. 9-20, 2004.

POIROUX, G.; BARRE, A.; DAMME, E. J. M.; BENOIST, H.; ROUGÉ, P. Plant Lectins Targeting O-Glycans at the Cell Surface as Tools for Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy. **Int. J. Mol. Sci.** v. 18, p.1232, 2017.

PROCÓPIO, T. F.; FERNANDES, K. M.; PONTUAL, E. V.; XIMENES, R.M.; DE OLIVEIRA, A.R.; SOUZA, C.; MELO, A. M.; NAVARRO, D. M.; PAIVA, P. M.; MARTINS, G. F.; NAPOLEÃO, T. H.; *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* Larvae. **PLoS One**, v. 10, e0126612, 2015.

PROCÓPIO, T. F.; PATRIOTA, L. L. S.; MOURA, M. C.; SILVA, P. M.; OLIVEIRA, P. S.; CARVALHO, L. V. N.; LIMA, T. A.; SORES, 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. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **Int. J. Bio. Macromol**, v. 98, p. 419-429, 2017.

RAJA, S. N.; CARR, D. B.; COHEN, M.; NINNERU, N. B.; FLOR, H.; GIBSON, S.; KEEFE, F. J.; JEFFREY, S.; MOGIL, J. S.; RINGKAMP, M. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: Concepts, challenges, and compromises. **Pain.**, v. 161, p. 1976–1982, 2020.

RAMOS, D. B. M.; ARAÚJO, M. T. M. F.; ARAÚJO, T. C. L.; SILVA, Y. A.; SANTOS, A. C. L. A.; SILVA, M. G.; PAIVA, P. M. G.; MENDES, R. L.; NAPOLEÃO, T. H. Antinociceptive activity of *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 259, 2020.

RAMOS, D. B. M.; ARAÚJO, M. T. M.; 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. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 233, p. 148-157, 2019.

RASMUSSEN, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research**, v. 312, p. 2169–2179, 2006.

RIBEIRO, A. C.; FERREIRA, R.; FREITAS, R. Chapter 1- Plant lectins: Bioactivities and bioapplications. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 58, capítulo. 1, p. 1-42, 2018.

RIEGER, A. M.; NELSON, K. L.; KONOWALCHUK, J. D.; BARREDA, D. R. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. **J. Vis. Exp**, v. 50, p. 1-4, 2011.

ROCHA, V.; GLUCKMAN, E. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.12, p. 34-41, 2005.

RODRIGUEZ L. Pathophysiology of pain: implications for perioperative nursing. **AORN J**. v.101(3):338-44, 2015.

ROGERS, C. J.; HARMAN, R. J.; BUNNELL, B. B. A.; SCHREIBER, M. A.; XIANG, C.; WANG, F-S.; SANTIDRIAN, A. F.; MINEV, B. R. Rationale for the clinical use of adipose-derived mesenchymal stem cells for COVID-19 patients. **Journal of Translational Medicine**, 18:203, p. 1-19, 2020.

ROSA, C. R. C. **Aislamiento y Caracterización bioquímica de proteínas Citotóxicas (Lectinas) de Semillas de *Cucurbita maxima* “zapallo”**.2019. Tese (Doutorado título profissional em bióloga) –Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Facultad de Ciências Biológicas, Arequipa, 2019.

ROSAS, E. C.; CORREA, L. B.; PÁDUA, T. A.; COSTA, T. E. M. M.; MAZZEI, J. L.; HERINGER, A. P.; BIZARRO, C. A.; KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; HENRIQUES, M. G. 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.

SANTOS, A. F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; BEZERRA, R. F.; CARVALHO, E. V. M. M.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Strategies to obtain lectins from distinct sources. **Advances in Medicine and Biology**, v. 63, p. 33-60, 2013.

SANTOS, A. J. C. A.; BARROS, B. R. S.; AGUIAR, L. M. S.; PATRIOTA, L. L. S.; LIMA, T. A.; ZINGALI, R. B.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; MELO, C. M. L.; PONTUAL, E. V. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) is an immunomodulatory agent by altering cytokine release by mice splenocytes. **3 Biotech**, v. 10:144, 2020.

SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch Surg**. v. 389, p. 237-43, 2004.

SCHURING, A. N.; SCHULTE, N.; KELSCH, R.; ROPKE, A.; KIESEL, L.; GOTTE, M. Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. **Fertil. Steril** v.95, p.423-426, 2011.

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

SHU, L.; NIU, C.; LI, R.; HUANG, T.; WANG, Y.; HUANG, M.; JI, N.; ZHENG, Y.; CHEN, X.; SHI, L.; WU, M.; DENG, K.; WEI, J.; WANG, X.; CAO, Y.; YAN, J.; FENG, G. Treatment of severe COVID-19 with human umbilical cord mesenchymal stem cells. **Stem Cell Res Ther**. v. 18;11(1):361, 2020.

SILVA, A. G.; ALMEIDA, D. L.; RONCHI, S. N.; BENTO, A. C.; SCHERER, R.; RAMOS, A.C.; CRUZ, Z. M. The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). **Parasit Vectors**, v. 79, 2010.

SILVA, J. D. F.; SILVA, S. P.; SILVA, P. M.; VIEIRA, A. M.; ARAÚJO, L. C. C.; LIMA, T. L.; OLIVEIRA, A. P. S.; CARVALHO, L. V. N.; PITTA, M. G. R.; RÊGO, M. J. B. M.; PINHEIRO, I. O.; ZINGALI, R. B.; CAVALCANTI, M. S. M.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **Int. J. Bio. Macromol**, v. 126, p. 291-297, 2019 c.

SILVA, P. M. S.; OLIVEIRA, W. F.; ALBUQUERQUE, P. B. S.; CORREIA, M. T.S.; COELHO, L. C. B. B. Insights into anti-pathogenic activities of mannose lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.140, p. 234-244, 2019. b

SILVA, P. M.; BALDRY, M.; PENG, P.; SILVA, J. N. O.; SOARES, T.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; FEITOSA, A. P. S.; PAIVA, P. M. G.; INGMER, H.; NAPOLEÃO, T. H.

Punica granatum sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Int. J. Bio. Macromol**, v. 123, p. 600-608, 2019 a.

SILVA, P. M.; MOURA, M. C.; GOMES, F. S.; TRETIN, D. S.; OLIVEIRA, A. P. S.; MELO, G. S. V.; PITTA, M. G. R.; RÊGO, M. J. B. M.; COELHO, L. C. B. B.; MACEDO, A. J.; FIGUEREIDO, R. C. B. Q.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H. PgTeL, uma lectin found in *Punica granatum* juice, is na antifungal agente against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Int. J. Bio. Macromol**, v 108, p. 391- 400, 2018.

SINGH, R. S.; BHARI, R.; KAUR, H. P. Current trends of lectins from microfungi. **Crit. Ver. Biotechnol.** v. 31, p. 193-210, 2011.

SINGH, R. S.; WALIA, A. K.; KENNEDY, J. F. Purification and characterization of a mitogenic lectin form *Penicillium duclauxii*. **Int. J. Bio. Macromol**, v. 116, p. 426-433, 2018.

SONG, K. Y.; CHOI, H. S.; LAW, P. Y.; WEI, L. N.; LOH, H. H. Post-Transcriptional Regulation of the Human Mu-Opioid Receptor (MOR) by Morphine-Induced RNA Binding Proteins hnRNP K and PCBP1. **Journal of cellular physiology**, v. 232, p. 576–584, 2017.

SOUZA, V. F.; LIMA, L. M. C.; REIS, S. R. A.; RAMALHO, L. M. P.; SANTOS, J. N. Células-tronco: Uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, p. 251-256, 2003.

SREERAMULU, B.; ARUMUGAM, G.; PAULCHAMY, R.; KARUPPIAH. H.; SUNDARAM J. β -Galactoside binding lectin from caddisfly larvae, *Stenopsyche kodaikanalensis* with selective modes of antibacterial activity: Purification and characterization. **Int J Biol Macromol**, v. 115, p. 1033-1045, 2018.

TANHEHCO, Y. C., & BHATIA, M. Hematopoietic stem cell transplantation and cellular therapy in sickle cell disease. **Current Opinion in Hematology**. v.26, p.448–452, 2019.

TESSMANN, J. W.; BUSS, J.; BEGNINI, K. R.; BERNEIRA, F. R.; PAULA, C. M. P.; PEREIRA, T.; COLLARES.; SEIXAS, F. K. Antitumor potential of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H- pyrazoles in human bladder cancer cells. **Biomed. Pharmacother**, v. 94, p. 37-46, 2017.

TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the methoh. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: Dickenson A., Besson JM. (eds) **The Pharmacology of Pain**, v. 130, 1997.

ULIANA, M. P.; FRONZA, M.; SILVA, A. G.; VARGAS, T. S.; ANDRADE, T. U.; SCHERER, R. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v.83, p.235–240, 2016.

ULLAH, I.; SUBBARAO, R. B.; RHO, G. J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. **Biosci Rep.** v.35, e00191, 2015.

VANDENBORRE, G., SMAGGHE, G., VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1538-1550, 2011.

VANDERAH, T. W. Pathophysiology of pain. **Med Clin North Am**, v. 91(1), p.1-12, 2007.
VANTI, G. L.; KATAGERI, I. S.; INAMDAR, S. R.; HIREMATHADA, V.; SWAMY, B. M. Potent insect binding lectin from *Sclerotium rolfsii* impart resistance to sucking and chewing type insects in cotton. **J. Biotechnol**, v. 278, p. 20-27, 2018.

VEGA, A.; MARTÍN-FERRERO, M. A.; DEL CANTO F.; ALBERCA, M.; GARCÍA, V.; MUNAR, A.; OROZCO, L.; SOLER, R.; FUERTES, J. J.; HUGUET, M.; SÁNCHEZ, A.; GARCÍA-SANCHO J. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial. **Transplantation**, v. 99(8):1681-90, 2015.

WAGNER, W., WEIN, F., SECKINGER, A., FRANKHAUSER, M., WIRKNER, U., KRAUSE, U., BLAKE, J., SCHWAGER, C., ECKSTEIN, V., ANSORGE, W. AND HO, A.D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Exp. Hematol.** v. 33, p. 1402–1416, 2005.

WANG, L. I.; ZHU, C. Y.; DE-XUN MA, ZHEN-YANG GU, CHANG-CHUN XU, FEI-YAN WANG, JI-GANG CHEN, CHENG-JUN LIU, LI-XUN GUAN, RUI GAO, ZHE GAO, SHU FANG, DU-JUN ZHUO, SHU-FENG LIU; CHUN-JI GAO. Efficacy and safety of mesenchymal stromal cells for the prophylaxis of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Ann Hematol.** v. 97, p.1941–1950, 2018.

WANG, Y., CHEN, X., CAO, W.; SHI, Y Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. **Nat Immunol**, v.15, p. 1009–1016, 2014.

WEARNE, K.A.; WINTER, H.C.; O'SHEA, K.; GOLDSTEIN; I.J. Use of lectins for probing differentiated human embryonic stem cells for carbohydrates, **Glycobiology**, v.16, p.981–990, 2006.

WEI, L. N.; LAW, P. Y.; LOH, H. H. Post-transcriptional regulation of opioid receptors in the nervous system. **Frontiers in bioscience**, v. 9, p. 1665–1679, 2004.

WILSON, K. M.; JAGGER, A.M.; WALKER, M.; SEINKMANE, E.; FOX, J.M.; KRÖGER, R.; GENEVER, P.; UNGAR, D. Glycans modify mesenchymal stem cell differentiation to impact on the function of resulting osteoblasts. **Journal of Cell Science**, v. 131, jcs209452, 2018.

WIMMER, K.; SACHET, M.; OEHLER, R. Circulating Biomarkers of Cell Death. **Clinica Chimica Acta**, v.500, p.87-97, 2020.

WU, M.; TONG, C.; WU, Y.; LIU, S.; LI, W. A novel thyroglobulin-binding lectin from the brown alga *Hizikia fusiformis* and its antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 201, p. 7-13, 2016.

XIFRO, W. A.; VICINO, U.; MARTIN, M. I. M.; BORTOLOZZI, A.; BOVÉ, J.; VILA, M.; COSMA, M. P. Functional Rescue of Dopaminergic Neuron Loss in Parkinson's Disease Mice After Transplantation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. **EBioMedicine**, v.8, p.83-95, 2016.

XU, J.Y.; QIAN, H.Y.; HUANG, P.S.; XU, J.; XIONG, Y.Y.; JIANG, W.Y.; XU, Y.; LENG, W.X.; LI, X.D.; CHEN, G. H.; TANG, R. J.; HUANG, C. R.; HU, M. J.; JIN, C.; WU, Y.; ZHANG, J.; QIAN, J.; XU, B.; ZHAO, S.H.; LU, M.J.; SHEN, R.; FANG, W.; WU, W.C.; CHEN, X.; WANG, Y.; LI, W.; LU, X. F.; JIANG, X. F.; MA, C.C.; LI, J.W.; GENG, Y. J.; QIAO, S.B.; GAO, R. L.; YANG, Y. J. Transplantation efficacy of autologous bone marrow mesenchymal stem cells combined with atorvastatin for acute myocardial infarction (TEAM-AMI): rationale and design of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-center, Phase II TEAM-AMI trial. **Regen Med**. v.14, p. 1077-1087, 2019 b.

XU, Y.; CHEN, C.; HELLWARTH, P. B.; BAO, X. Biomaterials for stem cell engineering and biomanufacturing. **Bioactive Materials**, v. 4, p. 366–379, 2019 a.

YANG, Y., FENG, R.; WANG, Y.; SUN, H.; ZON, Q.; LI, H. Toll-like receptors: Triggers of regulated cell death and promising targets for cancer therapy. **Immunology Letters**, v. 223, p. 1-9, 2020.

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

ZAKRZEWSKI, W.; DOBRZYŃSKI, M.; SZYMONOWICZ, M.; RYBAK, Z. Stem cells: past, present, and future. **Stem Cell Res Ther**, v. 10 (1):68, 2019.

ZHU, H.; SUN, A. Programmed necrosis in heart disease: Molecular mechanisms and clinical implications. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 116, p. 125-134, 2018.

ZWETSLOOT, P. P.; VÉGH, A. M. D.; LORKEERS, S. J. J.; HOUT G. P. J.; CURRIE, G. L.; SENA, E. S.; GREMMELS, H.; BUIKEMA, J. W.; GOUMANS, M. J.; MACLEOD, M. R.; DOEVENDANS, P. A.; CHAMULEAU, S. A.; SLUIJTER, J. P. Cardiac Stem Cell Treatment in Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Studies. **Circ Res**, v.118, p.1223-32, 2016.