

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Avaliação biológica *in vitro* da lectina BvL e a isoforma recombinante I (rBvL-I) sobre a viabilidade de linhagens celulares epiteliais

Amanda Sigal Soares

Pelotas, 2020

Amanda Sigal Soares

Avaliação biológica *in vitro* da lectina BvL e a isoforma recombinante I (rBvL-I) sobre a viabilidade de linhagens celulares epiteliais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Prof, Dr. Luciano da Silva Pinto

Pelotas, 2020.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S676a Soares, Amanda Sigal

Avaliação biológica *in vitro* da lectina BvL e a isoforma recombinante I (rBvL-I) sobre a viabilidade de linhagens celulares epiteliais / Amanda Sigal Soares ; Luciano da Silva Pinto, orientador. — Pelotas, 2020.

81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Lectiva BvL. 2. Fibroblasto. 3. *Bauhinia variegata*. 4. Cicatrização tecidual. 5. Proliferação celular. 6. Proteínas recombinantes.. I. Pinto, Luciano da Silva, orient. II. Título.

CDD : 574.19245

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Fabiana Seixas (UFPEL, Biotecnologia)

Prof. Dr. Tiago Collares (UFPEL, Biotecnologia)

Dr. Amilton Seixas (UFPEL, Parasitologia)

Dra. Caroline Rizzi (UFFS, Medicina)

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto (Orientador, UFPEL, Biotecnologia)

A minha família pelo amor incondicional e por me acompanharem em todos os passos dessa jornada. Eu não seria nada sem vocês!

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

A Universidade Federal de Pelotas que permitiu a realização deste título, que me proporcionou conhecimentos e vivências, no qual me fez sair da minha zona de conforto e fez com que eu amadurecesse e crescesse em todas as áreas da minha vida.

Aos professores da pós-graduação pelo conhecimento e dedicação com os alunos. Gostaria de agradecer a todos os meus colegas do Grupo BioPro pela convivência, apoio e experiências durante esses anos. Principalmente agradecer ao professor Luciano por compartilhar seu conhecimento e incentivar minha autonomia e crescimento.

Ao meu companheiro Érico, por me acompanhar neste período, me ajudando muitas vezes dando motivação, foco e força para concluir.

Aos meus pais por me darem a vida e me criarem com tanto amor e dedicação. Por me educarem e passarem todos os valores que tenho hoje. Vocês são parte indispensável na minha personalidade, caráter e coragem. Além de me darem confiança para que eu acreditasse que meus sonhos não devem ter limites.

Ao meu irmão, Bruno, que me fez crescer e querer ser melhor para ser um exemplo a ser seguido. Aquele que me conhece como ninguém e aguenta meus piores defeitos, mas também é o meu mais fiel companheiro de vida.

Resumo

SOARES, Amanda Sigal. **Avaliação biológica *in vitro* da lectina BvL e a isoforma recombinante I (rBvL-I) sobre a viabilidade de linhagens celulares epiteliais.** 2020. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Lectinas são um grupo de proteínas com diversas características particulares, sendo uma delas a capacidade de estimular a proliferação celular. São proteínas que reconhecem carboidratos de forma específica e reversível. Neste trabalho testamos a lectina BvL nativa de *Bauhinia variegata* e a isoforma recombinante BvL-I. A planta *Bauhinia variegata* pertence à família das *Leguminosae*, onde existem mais de 70 lectinas já reportadas. A lectina nativa nBvL é isolada da semente dessa planta e tem aproximadamente 33 kDa devido a glicosilação, enquanto que a isoforma recombinante I, rBvL-I, tem aproximadamente 28 kDa. A capacidade destas proteínas de induzir a proliferação celular foi avaliada em cultivos de células envolvidas no processo de regeneração tecidual, como fibroblastos humanos (HFF-1), queratinócitos humanos (HaCaT) e fibroblastos murinos (NIH/3T3) de camundongo. A lectina também foi testada em células de melanoma cancerígenas de pele humana (A-375), visando verificar uma possível ação sobre estas células. Foram feitos diversos ensaios para avaliar viabilidade e proliferação celular da lectina nessas células, como o ensaio de MTT, citometria de fluxo com os ensaio EdU e ensaio de contagem de células, microscopia confocal e *Western blot*. Foi possível verificar estímulo da proliferação de fibroblastos humanos e fibroblastos murinos.

Palavras-chave: Lectina BvL; *Bauhinia variegata*; Proteínas recombinantes; proliferação celular; fibroblastos; cicatrização tecidual.

Abstract

SOARES, Amanda Sigal. ***In vitro* biological evaluation of BvL lectin and recombinant isoform I (rBvL-I) on the viability of epithelial cell lines.** 2020. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Lectins are a group of proteins with several particular characteristics, one of which is the ability to stimulate cell proliferation. They are proteins that recognize carbohydrates in a specific and reversible way. In this work we tested the BvL native lectin from *Bauhinia variegata* and a recombinant isoform rBvL-I. The *Bauhinia variegata* plant belongs to the *Leguminosae* family, where there are more than 70 lectins already reported. Native nBvL lectin is isolated from the seed of this plant and has approximately 33 kDa due to glycosylation, whereas recombinant isoform I, rBvL-I, has approximately 28 kDa. The ability of these proteins to induce cell proliferation was evaluated in cell cultures involved in the tissue regeneration process, such as human fibroblasts (HFF-1), human keratinocytes (HaCaT) and mouse murine fibroblasts (NIH / 3T3). Lectin has also been tested on human skin cancer melanoma cells (A-375), in order to verify a possible action on these cells. Several tests were carried out to assess cell viability and proliferation of lectin in these cells, such as the MTT assay, flow cytometry with the EdU assay and cell count assay, confocal microscopy and *Western blot*. It was possible to verify the stimulus of the proliferation of human fibroblasts and murine fibroblasts.

Key-words: BvL lectin; *Bauhinia variegata*; Cell culture; Cell proliferation; Fibroblasts; Tissue healing.

Lista de figuras

Figura 1: Gel SDS-PAGE 15% da purificação da BvL nativa, empregando o marcador proteico de massa molecular <i>full range rainbow</i> (G&E).	25
Figura 2: Gel SDS-PAGE 15% da purificação da BvL recombinante, empregando o marcador proteico de massa molecular <i>full range rainbow</i> (G&E).	26
Figura 3: Ensaio de viabilidade celular pelo teste MTT em fibroblastos NIH/3T3 após o tratamento com nBvL.	27
Figuras 4: Ensaio de viabilidade celular pelo teste MTT em fibroblastos NIH/3T3 após o tratamento com nBvL inibida.....	28
Figura 5: Ensaio de viabilidade celular pelo teste EdU em fibroblastos NIH/3T3 após o tratamento de 48 horas com nBvL.....	29
Figura 6: <i>Western blot</i> empregando anticorpo anti β -actina nos cultivos celulares de fibroblastos NIH/3T3 tratadas por 48 horas com nBvL	31
Figura 7: <i>Western blot</i> empregando anticorpo anti-AkT total nos cultivos celulares de fibroblastos NIH/3T3 tratadas por 48 horas com nBvL.	31
Figura 8: Ensaio de viabilidade celular pelo teste MTT em fibroblastos HFF-1 após o tratamento com nBvL.	32
Figura 9: Ensaio de viabilidade celular pelo teste MTT em fibroblastos HFF-1 após o tratamento com rBvL.	33
Figura 10: Ensaio de viabilidade celular pelo teste EdU em fibroblastos HFF-1 após o tratamento de 72 horas com nBvL.....	34
Figura 11: Ensaio de viabilidade celular em fibroblastos HFF-1 após o tratamento de 72 horas com n BvL.....	34
Figura 12 (a, b, c): Análise de microscopia confocal usando o ensaio de dupla coloração em fibroblastos HFF-1 após o tratamento de 72 horas com nBvL.....	35
Figura 13: Ensaio de viabilidade celular de dupla coloração com fibroblastos HFF-1 tratados com nBvL.....	35
Figura 14 (a, b, c): Fotos de microscopia confocal do ensaio de dupla coloração em fibroblastos HFF-1 após o tratamento de 72 horas com rBvL.....	36
Figura 15: Ensaio de viabilidade celular dupla coloração com fibroblastos HFF-1 tratados com rBvL.....	36

Figura 16 (a, b, c): Análise de microscopia confocal usando o corante DAPI em fibroblastos HFF-1 após o tratamento de 72 horas com nBvL.....	37
Figura 17: Ensaio de viabilidade celular utilizando o corante DAPI tratando fibroblastos HFF-1 com nBvL.....	37
Figura 18 (a, b, c): Fotos de microscopia confocal utilizando o corante DAPI em fibroblastos HFF-1 após o tratamento de 72 horas com rBvL.....	38
Figura 19: Ensaio de viabilidade celular utilizando o corante DAPI tratando fibroblastos HFF-1 com rBvL.....	38
Figura 20: Ensaio de MTT em queratinócitos HaCaT após o tratamento com BvL.	39
Figura 21: Ensaio de MTT em células de melanoma A-375 após o tratamento com BvL.....	40

Lista de tabelas

Tabela 1: Ensaio de EdU na linhagem NIH/3T3 em diferentes concentrações celulares iniciais e em incubação de 18 horas com EdU e 48 horas de tratamento	30
---	----

Lista de abreviaturas e siglas

°C graus Celsius

A-375 linhagem melanoma maligno humano

BCA ácido bicinchonínico do inglês *bicinchoninic acid*

bFGF fator de crescimento básico de fibroblastos do inglês *basic fibroblast growth factor*

BSA Albumina de Soro Bovino

nBvL Lectina nativa da planta *Bauhinia variegata*

rBvL Lectina recombinante da planta *Bauhinia variegata*

CMF Tampão salina fosfato livre de cálcio e magnésio do inglês *phosphate buffered saline calcium magnese free*

CO₂ Gás carbônico

ConA Concanavalina A

DAPI 4'6'-diamino-2-fenil-indol

DMEM Meio modificado Dulbeco Eagle do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO Dimetilsulfóxido

EdU 5-etinil-2'-desoxiuridina do inglês 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

ELISA Ensaio de ligação imunoenzimática do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*

HaCaT Linhagem celular de queratinócito humano

HFF-1 Linhagem celular de fibroblasto humano

HIV vírus da imunodeficiência humana do inglês *Human Immunodeficiency Virus*

kDa kilodalton

ml mililitros

min minutos

MTT (3- (4,5-dimetiltiazol 2- il) -2,5 brometo difeniltetrazólico)

NIH/3T3 Linhagem celular de fibroblastos embrionários de ratos

mg miligramas

nm nanômetros

ON *overnight* (durante a noite)

PDGF fator de crescimento derivado de plaquetas do inglês *platelet-derived growth factor*

pH potencial Hidrogeniônico

PI3-k *fosfoinosítídeo* 3-quinase do inglês *phosphoinositide 3-quinase*

PKB protein quinase B do inglês *protein kinase B*

pg picogramas

qRT-PCR Reação em cadeia de polimerase quantitativa em Tempo Real do inglês *quantitative Real Time- Polymerase Chain Reaction*.

RCF/ Força g Força Centrífuga Relativa do inglês *Relative Centrifugal Force*

rpm rotações por minuto

seg segundos

SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

SFB Soro fetal bovino

TGF- α e TGF- β fator de crescimento de transformação do inglês *transforming growth factor α e β*

ug microgramas

μl microlitros

UV Ultravioleta

Sumário

1. Introdução geral	1
2. Revisão bibliográfica.....	3
2.1 O tecido epitelial.....	3
2.1.1 A cicatrização do tecido epitelial	4
2.2 Causas de problemas e doenças de pele	6
2.3 Lectinas.....	8
2.4 <i>Bauhinia spp.</i>	10
2.5 <i>Bauhinia variegata</i>	11
2.6 A lectina da <i>Bauhinia variegata</i>	12
2.7 Proteínas recombinantes.....	13
2.8 Lectinas oriundas de plantas utilizadas na regeneração tecidual	14
3. Objetivos.....	15
3.1 Objetivos gerais	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. Metodologia	16
4.1 Purificação da lectina de BvL nativa (nBvL)	16
4.1.1 Purificação da lectina de BvL recombinante (rBvL).....	16
4.1.2 Quantificação das lectinas liofilizadas nBvL e rBvL	17
4.1.3 Teste de hemaglutinação para confirmação da recuperação da atividade das lectinas.....	18
4.2 Cultivo celular.....	18
4.3 Ensaio de viabilidade celular pela técnica MTT (3- (4,5-dimetiltiazol 2- il) -2,5 brometo difeniltetrazólico)	19
4.4 Ensaio de proliferação celular pelo ensaio EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina)	20
4.5 Ensaio de viabilidade celular utilizando citometria de fluxo com nBvL...	21

4.6 Microscopia confocal.....	21
4.6.1 Ensaio de dupla coloração de viabilidade celular	22
4.6.2 Ensaio de viabilidade celular utilizando o corante DAPI (4'6'-diamino-2-fenil-indol).....	22
4.7 <i>Western blot</i>	23
5. Resultados.....	25
5.1 Extração da lectina da <i>Bauhinia variegata</i> nativa.....	25
5.1.1 Obtenção da lectina <i>Bauhinia variegata</i> recombinante.....	25
5.2 Ensaio empregando a linhagem celular fibroblasto embrionário de rato (NIH/3T3).....	26
5.2.1 Ensaio EdU.....	29
5.3 <i>Western blot</i> para a detecção da expressão da proteína Akt.....	30
5.4 Ensaio empregando a linhagem celular fibroblasto humano (HFF-1).....	32
5.4.1 Ensaio de MTT utilizando nBvL.....	32
5.4.2 Ensaio MTT utilizando rBvL.....	33
5.4.3 Ensaio EdU.....	33
5.4.4 Ensaio de viabilidade celular utilizando citometria de fluxo com a nBvL.....	34
5.5 Microscopia confocal.....	35
5.5.1 Ensaio de dupla coloração de viabilidade celular utilizando tratamentos com nBvL.....	36
5.5.2 Ensaio de dupla coloração de viabilidade celular utilizando tratamentos com rBvL.....	37

5.5.3 Análise da viabilidade celular da linhagem de fibroblasto humano (HFF-1) usando o corante DAPI com diferentes tratamentos da lectina nBvL.....	38
5.5.4 Ensaio DAPI utilizando tratamentos com a rBvL.....	39
5.6 Teste de atividade biológica em linhagem celular HaCaT (queratinócito humano) usando ensaio de MTT.....	39
5.7 Teste de atividade biológica em linhagem A-375 (melanoma maligno humano) usando ensaio de MTT.....	40
6. Discussão dos resultados.....	41
7. Conclusões e perspectivas.....	46
8. Limitações e perspectivas.....	47
9. Referências bibliográficas.....	48

1. Introdução geral

Lectinas são caracterizadas por ser um grupo heterogêneo de proteínas com capacidade de se ligar reversivelmente a carboidratos. Característica essa importante, pois possibilita a estas proteínas diversas atividades biológicas, como por exemplo, comunicação celular, defesa contra invasores, como os parasitas, vírus e bactérias, atividade antioxidante, anticâncer (CAGLIARI et al., 2018; PINTO et al., 2019), sendo assim um potencial produto biotecnológico. Além de sua capacidade aglutinante, as lectinas possibilitam a identificação de grupos sanguíneos, a estimulação mitogênica, a caracterização de micro-organismos, a detecção e o isolamento de carboidratos nas superfícies celulares (SELL & COSTA, 2000; JIANG et al., 2010; LAGARDA-DIAZ et al., 2017;), entre muitas outras aplicações.

As espécies do gênero *Bauhinia* pertence à família das Leguminosae, com mais de 70 lectinas já reportadas na literatura (INGALE & HIVRALE, 2013). A *B. variegata* é uma delas e é tradicionalmente utilizada na medicina de culturas orientais, principalmente no tratamento de doenças e problemas de pele, e também, em doenças inflamatórias (ZHU et al., 2017; CAGLIARI et al., 2018). Devido a essas características, a *B. variegata* tem sido estudada por nosso grupo de pesquisa (NASCIMENTO-NETO et al., 2011; REIS et al., 2013; PINTO et al., 2019; ZHU et al., 2017).

A pele é o maior órgão do corpo humano e problemas relacionados a ele são numerosos, frequentes e afetam todas as idades, gêneros e classes de pessoas. A pele tem uma função essencial no indivíduo, pois é primeira barreira de defesa física do corpo contra agentes biológicos externos, contra cortes, fraturas, queimaduras, entre outros; além de ser responsável por manter a homeostase corporal (NASCIMENTO -NETO et al., 2011; REIS et al., 2015).

O processo de cicatrização é dividido em três fases: inflamação, proliferação e remodelação. Na fase de proliferação, várias células migram para o local da pele lesado, sendo as principais e essenciais os fibroblastos e os queratinócitos. Elas agem produzindo fatores de crescimento que estimulam

a proliferação celular e, conseqüentemente, o tecido lesado é regenerado (CARVALHO et al., 2002; SEO et al., 2017).

A lectina de *B. variegata* tem função de induzir a proliferação de células de fibroblasto. Porém, o mesmo agente terapêutico não pode induzir a proliferação de células malignas. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem demonstrado a capacidade da BvL de induzir a cicatrização de feridas *in vivo* (NASCIMENTO-NETO et al., 2011; REIS et al., 2013), entretanto ainda não estão descritas as atividades biológicas da lectina diretamente nas células envolvidas na cicatrização epidérmica e nem estão elucidados os mecanismos de ação induzidos pela BvL nestas células. Neste trabalho investigou-se a ação biológica da BvL nativa e da BvL recombinante em cultivos celulares de linhagens de fibroblastos humanos (HFF-1), fibroblastos murinos (NIH/3T3), queratinócitos humanos (HaCaT) e melanócitos humanos (A-375).

2. Revisão bibliográfica

2.1 O tecido epitelial

Problemas relacionados à pele são numerosos, frequentes e afetam todas as idades, podendo causar diferentes tipos de danos. A pele é importante, pois é o maior órgão do corpo humano e é a primeira barreira de defesa física do corpo contra agentes biológicos e contra a perda de água. Como também a outros fatores como cortes, queimaduras, câncer, herpes, celulites, entre outros (DAWID-PAC et al., 2013; TABASSUM & HAMDANI, 2014). Consequentemente, é um órgão que deve ser preservado, pois é de extrema importância para a saúde do indivíduo. A pele contém muitas células e estruturas especializadas para exercer esta função. Além do que, existem diversas outras funções como regulação da temperatura, sensações, síntese e armazenamento de vitamina D com a ativação pelos raios ultravioletas (UV), absorção de oxigênio e drogas, e resistência à entrada ou saída de água excessiva (DAWID-PAC, 2013).

A pele é dividida em três camadas: a epiderme, derme e hipoderme. Cada camada possui uma diferente espessura, profundidade e função, podendo variar em certas partes do corpo e também de pessoa para pessoa (TABASSUM & HAMDANI, 2014). A epiderme é a camada mais fina e superficial, tendo espessura 0,05 mm, e tem como principais funções a proteção, pois ela forma uma barreira que impede a passagem de fatores externos, e mantém a homeostase do corpo. A derme é a camada do meio, de 1,5 mm de espessura, é composta por colágeno e algumas elastinas e glicosaminoglicana. As células mais presentes na derme são os fibroblastos, que são capazes de produzir enzimas remodeladoras como proteases e collagenases, que têm um papel crucial na cicatrização de feridas. E finalmente, a camada mais interna chamada hipoderme, a mais espessa com 3 mm, onde contem vasos sanguíneos, tecido adiposo e nervos que contribuem com propriedades mecânicas e de termorregulação da pele (TABASSUM & HAMDANI, 2014).

2.1.1 A cicatrização do tecido epitelial

A cicatrização é o processo em que ocorre a substituição de um tecido lesado por um tecido conjuntivo altamente vascularizado. As tentativas de restaurar a lesão induzida por uma agressão local resultam em reparo e substituição das células mortas por células saudáveis (CARVALHO et al., 2002; ANTHONY et al., 2016). O processo de cicatrização é dividido em três fases: inflamação, proliferação e remodelação. O primeiro passo é o início de uma reação inflamatória, onde as células fagocitárias recrutadas reabsorvem o sangue extravasado e os produtos da destruição celular. Nessa fase, existe a formação de um edema, que pode ser observado através da vermelhidão no local, inchaço, calor e dor. Em seguida, na fase proliferativa, várias células migram para o local da pele lesado, sendo as principais e essenciais os fibroblastos e os queratinócitos. Os queratinócitos secretam fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de transformação que tem função de estimular os fibroblastos da derme. Uma vez que os fibroblastos estão ativados, eles migram para o ferimento e se dá o início da produção de componentes da matriz extracelular, como por exemplo, colágeno, elastina e fibronectina (CARVALHO et al., 2002; THOMAS et al., 2007; DAWID-PAC et al., 2013; ANTHONY et al., 2016; SEO et al., 2017).

É visto na literatura que a produção de TGF- β pelos queratinócitos promove a diferenciação dos fibroblastos, por exemplo, em miofibroblastos através da proliferação da α -SMA (alpha-smooth muscle actin) que induz essa diferenciação (SHEPHARD et al., 2004). Diversos trabalhos mostram experimentos de co-cultura onde queratinócitos promovem a proliferação, migração e diferenciação de fibroblastos na derme, sugerindo interações entre a derme e a epiderme durante o processo de cicatrização. Nesses estudos, as principais vias de migração e proliferação são a ciclina B1, fosfo-CDK1, fosfo-AKT, C-X-C recetor de quimiocinas 4 (CXCR4) e matriz de metaloproteínas (MMPs), o que vem demonstrando a importância do sinergismo e interação entre essas células (SHEPHARD et al., 2004; THOMAS et al., 2007; WANG et al., 2015; ANTHONY et al., 2016; SEO et al., 2017).

Queratinócitos e fibroblastos produzem uma grande variedade de citocinas incluindo diversos fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, e também, diferentes matrizes de polímeros e enzimas catabólicas. Se essas células puderem interagir, pode haver uma estimulação de mecanismos parácrinos que iniciarão a produção de fatores de proliferação celular, como o fator de crescimento de transformação (TGF- α e TGF- β), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), que são conhecidos por ser importantes para a competência celular e nos processos de cicatrização e regeneração tecidual (DAWID-PAC, 2013; SHERPHARD et al., 2004; WANG et al., 2015; SEO et al., 2017).

Na fase final, conhecida como de remodelamento, os processos de reepitelização, angiogênese e fibrose, param, e a síntese de colágeno aumenta que é depositado no ferimento e forma a cicatriz. Com o passar do tempo esse colágeno vai se reorganizando e torna a cicatriz menos espessa e o tecido epitelial vai retornando suas conformações originais (PHAN *et al.*, 1998; CARVALHO et al., 2002; SHERPHARD et al., 2004; SEO et al., 2017). Portanto, o estímulo de proliferação celular é um mecanismo que agentes terapêuticos iniciam a reparação tecidual e os fibroblastos e queratinócitos são as principais células envolvidas no reparo de danos na pele (PHAN *et al.*, 1998; CARVALHO et al., 2002; DAWID-PAC et al., 2013; SEO et al., 2017).

Linhagens celulares são utilizadas para experimentos *in vitro* de proliferação e migração celular epitelial por agentes terapêuticos. Entretanto, o mesmo agente terapêutico não pode induzir a proliferação de células malignas, uma vez que o seu uso terapêutico tornaria inviável. Algumas linhagens utilizadas neste trabalho foram os fibroblastos humanos (HFF-1), fibroblasto embrionários de ratos (NIH/3T3), queratinócitos humanos (HaCaT) e o melanoma maligno humano (A-375). A linhagem HFF-1 são fibroblastos originados de prepúcio humano que foram primeiramente empregadas para suporte de cultivo de células embrionárias (AMIT et al., 2003), e comumente também são usados para demonstrar o efeito de substâncias na indução da cicatrização de feridas cutâneas (por exemplo: ZHAO et al., 2013). A NIH/3T3 tem sido amplamente utilizada como modelo para testar a atividade de cicatrização de feridas *in vitro* devido às características de migração celular,

proliferação e produção de colágeno, observadas nessas células (KUONEN et al., 2013), e, também porque ela tem uma geração mais rápida do que as células humanas. A HaCaT é uma linhagem imortal que exibe diferenciação normal, é uma ferramenta para estudo da queratinização das células humanas, e, também, é a linhagem celular mais próxima de queratinócitos normais e consequentemente oferece um modelo adequado para estudo de mecanismos regulatórios no processo de diferenciação de células da epiderme humana (CELL LINES SERVICE, n.d.). A A-375 é derivada de uma mulher de 54 anos que possuía melanoma maligno. A célula de melanoma maligno tem sido utilizada para obter fatores parácrinos que prolonguem a cultura de células do estroma mesenquimal, e usadas também para estudos tumorigênicos (SIGMA-ALDRICH, n.d.).

2.2 Causas de problemas e doenças de pele

As principais causas de problemas e doenças de pele são: erupções cutâneas, que são causadas por irritações, alergias, infecções, defeitos estruturais, poros bloqueados ou mau funcionamento de glândulas. Infecções virais, quando há infecção das camadas internas da pele, um exemplo muito comum é o vírus da herpes. Infecções bacterianas, principalmente as causadas pelos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, podem infectar diversas camadas da pele chegando até nas mais profundas e podem se espalhar pelo corpo. Infecções fúngicas são invasões superficiais na pele. E, infecções por parasitas, que podem ocorrer após a exposição do organismo em questão, como é o caso dos piolhos (TABASSUM & HAMDANI, 2014).

Ainda, pode-se destacar as desordens de pigmentação, que tem diversas causas como ausência de melanócitos, exposição a corantes e químicos, algumas infecções, mudanças hormonais, desordem metabólica, idade, entre outros. Os traumas são danos causados na pele como queimaduras, cortes e acidentes de fraturas, e como consequência deixa o corpo susceptível a muitas outras infecções e doenças (TABASSUM & HAMDANI, 2014).

A maioria dos problemas de pele irá resultar numa cicatriz ou ferida, as intensidades e severidade são diversas, variando muito de caso para caso. Porém, independente da severidade é uma regeneração demorada. Em casos mais graves, é provável que a pele nunca mais volte ao que era. No entanto, diversas técnicas e produtos vêm sendo estudados e comprovados mostrando uma ação de regeneração celular surpreendente, o que é benéfico e de muito interesse aos pacientes (CARVALHO et al., 2002; DAWID-PAC, 2013; SEO et al., 2017).

2.3 Lectinas

O termo lectina é derivado do verbo grego *legere* que significa 'selecionar'. Inicialmente descrevia apenas a habilidade da ligação de lectinas em diferentes tipos de eritrócitos dos grupos sanguíneos ABO. Contudo, desde 1954, suas características seguiram sendo exploradas e hoje há uma gama de funções e aplicações destas proteínas descritas na literatura (CAGLIARI et al., 2018; PINTO et al., 2019). Devido as suas propriedades de ligação específica a carboidratos, as lectinas podem ser utilizadas para mediar diversos eventos biológicos onde existe uma necessidade crucial no reconhecimento proteína/carboidrato, como por exemplo, na comunicação celular, defesa de invasores, fertilização, desenvolvimento celular, infecções de parasitas, metástases de tumores, inflamações, entre outras (INGALE & HIVRALE, 2013; CAGLIARI et al., 2018; PINTO et al., 2019).

Lectinas são universalmente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em todos os organismos eucarióticos, e em diversas espécies de bactérias e vírus (PINTO et al., 2019; MISHRA et al., 2019). A maioria das lectinas já caracterizadas são de plantas e estas particularmente são encontradas estocadas como proteínas em sementes, no entanto, também é observada em outros órgãos vegetais como raízes, folhas, rizomas, bulbos, tubérculos, caules, flores, frutos, seiva do floema e néctar (LAGARDA-DIAZ et al., 2017). Além disso, elas têm um papel crucial na defesa das plantas e atuam de maneira fisiológica, química, celular e também molecular (INGALE & HIVRALE, 2013).

Lectinas são um grupo heterogêneo de proteínas ou glicoproteínas, não imunes, com capacidade de se ligar reversivelmente a carboidratos (CAGLIARI et al., 2018; PINTO et al., 2019), porém são diferentes de anticorpos, enzimas com atividade de ligação à glicanas, e proteínas de transporte (WU & LIU, 2019). Cada lectina tem preferência por se ligar a determinado carboidrato, como por exemplo, lactose e quitina, ou também a polímeros de glicose (INGALE & HIVRALE, 2013, CAGLIARI et al., 2018). A interação com carboidratos se dá, principalmente, através de ligações de hidrogênio e interações de van Der Waals, secundariamente por interações hidrofóbicas, e menos frequentemente, por interações eletrostáticas (VAN DAMME, 2011). Lectinas possuem afinidade por pelo menos um carboidrato. Baseado nesta propriedade existem três tipos de lectinas que são denominadas merolectinas, hololectinas e chimerolectinas. Merolectinas possuem apenas um domínio de ligação a carboidratos, hololectinas apresentam dois ou mais domínios, e, chimerolectinas são fusões de proteínas que contêm um ou mais domínio de ligação a carboidratos e esses domínios não são necessariamente relacionados (SHARON & LIS, 2003; JIANG et al., 2010).

Existem diversas formas para classificar um grupo de lectinas de plantas, que pode ser de acordo com o tipo de açúcar de ligação da lectina, ou de acordo com a similaridade de suas estruturas tridimensionais, ou devido a sua relação sorológica, ou devido as suas sequências gênicas similares, ou relações evolutivas, entre outras formas (JIANG et al., 2010, CAGLIARI et al., 2018). A forma de classificação que era mais utilizada e está entrando em desuso consiste na classificação pelo carboidrato de afinidade da lectina e é dividida em cinco grupos: manose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, fucose e ácido N-acetilneuramínico. Com a exceção de fucose, todos estes açúcares estão na configuração D (AMBROSI et al., 2005; HENDRICKSON & SHERDEV, 2018). Atualmente as lectinas de plantas têm sido classificadas em 12 famílias que são: família ABA (*Agaricus bisporus* agglutinin), Amarantinas, CRA (chitinase-related agglutinin), Cianovirinas, família EEA (*Euonymus europaeus* agglutinin), GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin), Hevein, Jacalinas, Legume, domínio LysM (lysin motif), Nictaba e famílias Ricina B (HENDRICKSON & SHERDEV, 2018).

A maioria das lectinas contém dois ou mais sítios de ligação a carboidratos. Consequentemente, sua interação com os açúcares presentes na superfície de eritrócitos resulta no agrupamento de várias células do sangue, formando uma malha e subsequente precipitação. Esse processo é conhecido como aglutinação, que é um atributo importante da atividade de lectinas e tem sido utilizado rotineiramente e classicamente para a detecção e caracterização dessa classe de proteínas, e pode ser inibido pela adição do carboidrato para o qual a lectina é específica (AMBROSI et al., 2005).

Alguns fatores influenciam a atividade das lectinas, tais como íons, pH e temperatura (DIAS et al., 2006). O fator pH pode ser de grande importância para a atividade de lectinas, pois variações no pH podem alterar a capacidade de aglutinar hemácias (ZANETTI et al., 2007). Quanto à variação de temperatura, as lectinas se mostram ativas biologicamente desde após meses de congelamento, ou também submetidas a temperaturas mais elevadas (DIAS et al., 2006).

As lectinas vêm sendo estudadas para fins biomédicos devido suas inúmeras propriedades e aplicações. Podendo ser citada a capacidade aglutinante, a identificação de grupos sanguíneos, a estimulação mitogênica, a caracterização de micro-organismos, a detecção e o isolamento de carboidratos em superfície celular (SELL & COSTA, 2000; WU & LIU, 2019), a toxicidade celular (ESTRADA-MARTINEZ et al., 2017), inibição de crescimento bacteriano e viral, propriedade inseticida (LAGARDA-DIAZ et al., 2017), propriedade anti-HIV, atividade similar a nucleases (INGALE & HIVRALE, 2013), anti câncer (BHUTIA et al., 2019; PINTO et al., 2019) propriedades anti-inflamatórias (ZHU et al., 2017) e estudos da arquitetura da superfície celular (JIANG et al., 2010) e receptores (POIROUX et al., 2017; BELLANDE et al., 2017). A maioria das aplicações observadas sobre lectinas é em estudos de atividade mitogênica em linfócitos humanos, atividade contra células cancerígenas e atividade antifúngica (INGALE & HIVRALE, 2013; FIGUEIRÔA et al., 2017).

2.4 *Bauhinia* spp.

A espécie de *Bauhinia* pertence à família das Leguminosae e a subfamília *Caesalpinoideae* ou *Caesalpinaceae* (ORWA et al., 2009). A família das Leguminosae em geral é considerada uma fonte rica de lectinas, onde mais de 70 lectinas já foram reportadas (INGALE & HIVRALE, 2013). Existem diversas espécies *Bauhinia* spp., por exemplo, *B. variegata*, *B. forficata*, *B. purpurea*, *B. monandra*, *B. pentandra*, *B. racemosa*, *B. tomentosa*, entre muitas outras espécies (MENG et al., 2014).

Estas são espécies de clima tropical e subtropical, que é caracterizado por verões quentes e secos e invernos não muito rigorosos. Para o seu desenvolvimento é necessário abundância de luz e uma boa drenagem do solo. Geadas severas podem matar as folhas de mudas novas, porém elas conseguirão se recuperar no verão. Essas árvores são bastante resistentes à seca, no entanto são suscetíveis a fogos (ORWA et al., 2009).

2.5 *Bauhinia variegata*

B. variegata é documentada como nativa em países como a China, Colômbia, Índia, Mianmar, Nepal, Paquistão, Tailândia e Vietnã. Contudo, é considerado como exótica nos seguintes países: Brasil, Egito, Quênia, Porto Rico, Tanzânia, Uganda, Zanzibar e Zimbábue (ORWA et al., 2009; SHARMA et al., 2019). A árvore da *B. variegata* é considerada uma planta decídua. No fim do outono ocorre a queda das folhas, e ela permanece sem elas até o início da primavera. Essa planta tem uma floração muito precoce, podendo ser observada nos primeiros três anos de idade. A floração ocorre na ausência das folhas e tem coloração rosa e contém cinco pétalas. As sementes se dispersam e germinam em espaços com luz e umidade favoráveis, quando não favorável ela apenas seca e serve de alimento para pássaros (ORWA et al., 2009). Pode crescer em vários tipos de solos como, por exemplo, solos rochosos, solos com cascalho, arenosos, ou argilosos. É considerada uma planta de tamanho pequeno a médio, alcançando uma altura igual ou superior a 15 metros e diâmetro de 50 centímetros. As folhas possuem entre 1 a 2 milímetros, são

precocemente caducas e tem um tom próximo ao verde escuro (ORWA et al. 2009).

B. variegata é tradicionalmente utilizada na medicina em algumas culturas orientais, por exemplo, a chinesa e a indiana. Ela tem sido utilizada em tratamentos de úlceras, e outras doenças de pele (MOHSIN & AKHTAR, 2017; HAGO et al., 2019; SHARMA et al., 2019); também tem atividade em muitas doenças inflamatórias, é antibacteriana, antioxidante, e tem atividade anticancerígena (INGALE & HIVRALE, 2013; ZHU et al., 2017; CARDOSO et al., 2018; BHUTIA et al., 2019; GAUTAM et al., 2019). Além disso, suas raízes são utilizadas como antídoto a picada de algumas cobras (MISHRA, SHARMA & KUMAR, 2013). Outras espécies da *Bauhinia* também apresentam aplicações medicinais. Por exemplo, *B. candicans* é bastante utilizada no tratamento de diabetes no Brasil (SOARES & SCARMINIO, 2008), assim como a *B. forficata* (SALQUEIRO et al., 2016). *B. guianensis* é utilizada em problemas renais, síndromes respiratórias e diarreias, e o chá de sua raiz é utilizado no tratamento contra amebas. *B. variegata* é comumente utilizada como adstringente e tônico, também em doenças de pele e úlceras (SOARES & SCARMINIO, 2008).

2.6 A lectina da *Bauhinia variegata*

A lectina da *B. variegata*, denominada BvL, é isolada da semente da árvore que é popularmente conhecida como “pata-de-vaca” e seu peso molecular é de aproximadamente 33 KDa. Ela apresenta diversas atividades biológicas (PINTO et al., 2008; MISHRA, A. & SHARMA. 2013), como atividade anti fúngica (KLAFKE et al., 2013), capacidade de reduzir a adesão inicial de bactérias orais (por exemplo: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*) para uma superfície revestida de saliva (KLAFKE et al., 2013; KLAFKE et al., 2016). Além disso, é visto na literatura que a lectina BvL apresenta atividade de inibição do crescimento de células de melanoma da linhagem LOX IMVI (LUBKOWSKI et al., 2016) e de células de câncer de carcinoma nasofaringe das linhagens CNE1 e HONE1 (CHAN et al., 2014).

Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado a capacidade da lectina BvL de induzir a cicatrização de feridas *in vivo* e de estimular *in vitro* a proliferação de células de fibroblastos (NASCIMENTO-NETO et al., 2011; REIS et al., 2013), o que é consequência da habilidade dessas moléculas de ligar-se a receptores celulares e estimular a proliferação celular, o que indica potencial para acelerar a cicatrização e a regeneração de células epiteliais.

2.7 Importância da produção de proteínas recombinantes e a produção de lectinas

Em 1972, o pesquisador Paul Berg realizou a primeira experiência bem sucedida onde foram ligadas duas cadeias genéticas diferentes: a cadeia de DNA do fago λ junto ao operon da galactose de *Escherichia coli*, inserindo-os no DNA do vírus SV40. Esta descoberta revolucionou a ciência. Essa técnica permite que a partir de um fragmento de DNA de uma proteína seja possível obter em larga escala proteínas de interesse de uma forma controlada, com custo benefício melhor e em menos tempo, sem depender da extração na natureza (SHARON et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2013; ROSANO & CECCARELLI, 2014; MART et al., 2018). Esta técnica vem sendo aplicada na área de terapia gênica, melhoramento animal e vegetal, criação de modelos animais, produção em larga escala de proteínas para uso em vacinas, medicamentos e tratamentos em humanos (ANDREE et al., 2002).

Existem na literatura diversas lectinas recombinantes com aplicações na área médica, biomédica, farmacêutica, vegetal e animal (OLIVEIRA et al., 2011). Alguns exemplos que podem ser citados são a frutalina (OLIVEIRA et al., 2009) e HPA (MARKIV et al., 2011), utilizadas como biomarcador para tumores; AAL (YANG et al., 2005), aviscumine (ZWIERZINA et al., 2011), jacalina (SAHASRABUDDHE et al., 2006), MVL (LI & ZANG, 2011) e PCL (LI et al., 2011), com atividade antitumores; atividade antimicrobiana as lectinas AILP (KIM et al., 2007), Cramoll 1 (VAREJÃO et al., 2010) e PTA (LING et al., 2010); atividade antiviral as lectinas GNA (FOUQUAERT et al., 2009), GRFT (GIOMARELLI et al., 2006), orysata (AL ATALAH et al., 2011) e PCL (LI et al., 2011); com atividade de proliferação de células a lectina mutante MAH

(MAENUMA et al., 2008); com atividade na saúde bucal a lectina SBA (TREMBLAY et al., 2011); e para terapias de reconstrução a lectina MBL (MICHELOW et al., 2011).

2.8 Lectinas oriundas de plantas utilizadas na regeneração tecidual

As lectinas isoladas de plantas veem sendo cada vez mais estudadas e utilizadas em diferentes problemas e doenças de pele, pois elas promovem a regeneração e cicatrização em diversos órgãos, sendo que cada lectina possui sua ação em determinado órgão. Para exemplificar algumas lectinas: a lectina KM+ isolada da *Astocarpus integrifolia* (CHAHUD et al., 2009), lectina concanavalina A ou ConA isolada da *Canavalia ensiformis* (MORRIS et al., 2006), lectina WGA (*wheat germ agglutinin*) isolada da *Triticum vulgaris*, lectina LCA isolada da *Lens culinaris*, lectina MPA isolada da *Maclura pomifera*, lectina LPA isolada da *Linulus polyrbemus*, lectina DBA isolada da *Dolichus biflorus* (KUCEROVA et al., 2006), lectina SBA (*soybean agglutinin*) isolada da soja (ILENE et al., 1980), entre muitas outras.

Neste contexto e como descrito anteriormente, nosso grupo de pesquisa tem demonstrado a capacidade da BvL de induzir a cicatrização de feridas *in vivo*, entretanto não estão descritas as atividades biológicas da lectina diretamente nas células envolvidas na cicatrização epidérmica e nem estão elucidados os mecanismos de ação induzidos pela BvL nestas células. Este trabalho então investigou a ação biológica da BvL nativa e recombinante em cultivos celulares de linhagens de fibroblastos humanos (HFF-1), fibroblastos murinos (NIH/3T3), queratinócitos humanos (HaCaT) e melanócitos humanos (A-375).

3. Objetivos do Trabalho

3.1 Objetivos gerais

Estudar a ação biológica da lectina de *B. variegata* nativa e recombinante em diversas linhagens celulares envolvidas na proliferação celular epidérmica.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade da lectina na indução de proliferação celular em linhagens de fibroblastos (HFF-1 e NIH/3T3) queratinócitos (HaCaT) e melanoma maligno (A-375).
- Investigar o mecanismo de ação dessa proteína nas células empregadas pela técnica de *Western Blot*.

4. Metodologia

4.1 Purificação da lectina de BvL nativa (nBvL)

Sementes de *B. variegata* foram descascadas, trituradas para a obtenção da lectina BvL na sua forma nativa. O pó resultante foi delipidado com hexano para remoção das gorduras presentes na amostra. Para a extração da lectina, o material foi suspenso em Tris HCl 50 mM NaCl 150 mM pH 7,6, agitado ON a 4 °C e centrifugado (11000 RFC a 4°C por 15 minutos) e precipitado com sulfato de amônio por 6 horas. Após a centrifugação por (11000 RFC a 4°C por 15 minutos), o material foi dialisado quatro vezes em água destilada e duas vezes em Tris HCl 50 mM NaCl 150 mM (pH 7,6). O extrato foi então purificação por cromatografia de afinidade na coluna de agarose-lactose previamente equilibrada com Tris HCl 50 mM NaCl 150 mM (pH 7,6), mantendo a amostra em refluxo ON. A lectina é eluída com 20ml de glicina (pH 2,6) e monitorada por espectrometria a 280 nm. Após a eluição, o material é dialisado com água destilada durante 36 horas, e então congelado para posteriormente ser liofilizado. A pureza da amostra foi avaliada por SDS-PAGE 12% (REIS et al., 2015).

4.1.1 Purificação da lectina de BvL recombinante (rBvL)

Os plasmídeos recombinantes previamente construídos (Pinto et al., 2008) foram inseridos por choque térmico em *E. coli* BL21 Star (DE3) e cultivados em LB sólido com 100 µg/mL de ampicilina a 37°C. Uma colônia foi selecionada e cultivada em 25 mL de LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina *overnight*, 37°C sob agitação de 180 rpm. Este cultivo foi utilizado para inocular 500 mL do mesmo meio, mantido nas mesmas condições. Quando a cultura atingiu fase logarítmica intermediária de crescimento ($OD_{600} = 0,6-0,8$), a expressão foi induzida pela adição de 1 mM de isopropil βD-tiogalactosídeo (IPTG), mantendo a cultura nas mesmas condições por 3h.

Após indução, uma alíquota de células foi coletada para análise em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), visando à confirmação da expressão da lectina recombinante. As células em cultivo foram coletadas por

centrifugação ($8000 \times g$, 15 min, 4°C), o *pellet* foi lavado com tampão salina-fosfato (PBS) e congelado a -20°C . As células foram solubilizadas em solução tampão de lise celular (NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 200 mM, Imidazol 20 mM, pH 7,4), e rompidas por sonicação (6 ciclos de 30 seg, com 10 seg de intervalo). Em seguida, as amostras foram centrifugadas $12000 \times g$ por 40 min a 4°C . O sobrenadante contendo o extrato de proteínas solúveis foi armazenado a 4°C e o *pellet* solubilizado novamente, desta vez no mesmo tampão, acrescido de 6 M de ureia. Após nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante contendo a proteína recombinante foi separado e armazenado a 4°C . Ambas frações, hidrofílicas e hidrofóbicas foram investigadas por SDS-PAGE, visando identificar a solubilidade da proteína recombinante expressa.

A proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade a íons metais (IMAC)/níquel, utilizando coluna His-Trap FF (GE), no sistema automatizado AKTA-Purifier (GE). Durante a purificação foi realizado um processo de redobramento da proteína imobilizada na coluna, onde a ureia é removida lentamente a partir da geração de um gradiente linear. A faixa de gradiente empregado foi 6 M – 20 mM de ureia. Após remoção da proteína da coluna por eluição com gradiente de imidazol 20 mM – 500 mM, as alíquotas contendo proteína purificada foram combinadas e dialisadas contra PBS e água. A amostra final contendo rBvL purificada foi liofilizada para armazenamento e concentração. A concentração final da proteína foi determinada por teste colorimétrico comercial BCA (Pierce/Thermo Fisher) e analisada por SDS-PAGE.

4.1.2 Quantificação da lectina nBvL e rBvL liofilizada

Dois métodos de quantificação de proteínas foram utilizados, o método de BSA e o método de curva em gel SDS-PAGE. Para a determinação da concentração das proteínas totais foi empregado pelo o método BCA (PIERCETM BCA Protein Assay kit, Thermo Scientific), empregando-se albumina sérica bovina como padrão. As amostras e os padrões foram incubadas por 30 min a 37 graus com o reagente de BCA e as absorbâncias foram medidas em leitor de ELISA a 562 nm. As amostras e padrões foram

ensaiadas em triplicata e os resultados foram calculados através da curva de calibração empregando-se a equação da reta gerada pela regressão linear, empregando-se as curvas com valor de $r^2 \geq 0,998$.

No método de BCA, os padrões foram diluídos para a obtenção das seguintes concentrações de proteínas (5, 10, 20, 30, 40 e 50 ug) e analisado no gel de SDS 10% juntamente com a amostra de BvL, para posterior comparação visual da amostra a cinco diluições de BSA, que formam uma curva de base.

4.1.3 Teste hemaglutinação

Para determinação da atividade de ligação a carboidratos da proteína purificada foi realizado o ensaio de hemaglutinação. Sangue de coelho heparinizado foi obtido e os eritrócitos foram coletados por centrifugação a 3500 xg por 5 minutos a 4°C. Após cinco lavagens com tampão PBS os eritrócitos foram suspendidos a 2% em PBS. A BvL após liofilização foi diluída em PBS e 50 µl dessa diluição foi adicionados a 50 µl da solução de eritrócitos. A reação foi incubada a 37°C por 40 minutos considerando-se positiva a reação pela visualização da aglutinação macroscópica.

4.2 Cultivo celular

Para os experimentos foram utilizadas quatro linhagens celulares, sendo duas de fibroblasto, uma de queratinócito e uma de melanócitos. As células de fibroblastos utilizadas foram a HFF-1, fibroblasto humano, e a NIH/3T3, fibroblastos embrionários de ratos. Além disso, foram utilizados o queratinócito humano, chamado de HaCaT, e a linhagem tumoral A-375 de melanoma maligno humano. As linhagens HFF-1, A-375 e NIH/3T3 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A linhagem de queratinócitos foi gentilmente cedida pela pesquisadora Elizandra Braganhol (UFCSPA – Porto Alegre, RS). Essas linhagens foram armazenadas em estoques em nitrogênio líquido e

descongeladas adicionando meio modificado Dulbecco Eagle (DMEM) alta glicose suplementado com 15% soro fetal bovino (SFB). Após a adesão celular na garrafa de cultivo, as células foram cultivadas em meio DMEM (A-375) ou DMEM alta glicose (HaCaT e HFF-1 e NIH/3T3, para estas últimas também foi acrescido de piruvato 1%) suplementadas com 10% de SFB. As células foram mantidas durante todos os experimentos na estufa à 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

As garrafas foram observadas diariamente com microscópio invertido e assim foi acompanhado o crescimento celular, a necessidade de troca de meio, a necessidade de expandir para novas e maiores garrafas de cultivo, até finalmente obtermos uma confluência de 80% de crescimento celular para semear as células em placas de cultivo para os ensaios empregando as lectinas. Para o preparo das placas de cultivo, as células foram lavadas com CMF e após incubadas a 37 °C por 5 minutos com tripsina que vai fazer com que as células se descolem do fundo da garrafa. A ação da tripsina foi inativada por meio de cultivo contendo SFB e a quantidade de células foi determinada através da contagem em câmara de Neubauer em microscópio invertido. As células foram então semeadas nas placas de 96, 12 e 6 poços (TTP- Techno Plastic Products AG) e incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Os experimentos foram realizados com as células em fase logarítmica de crescimento.

4.3 Ensaios de viabilidade celular (MTT)

A ação biológica da lectina foi realizada através do teste MTT (3- (4,5-dimetiltiazol 2- il) -2,5 brometo difeniltetrazólico) que avalia viabilidade celular através da sua redução à formazam, com as linhagens 3T3 e HACAT foram tratadas com nBvL em diferentes concentrações (0,1; 0,05; 0,025; 0,0125 e 0,006 mg/mL) e nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Como controles de proliferação, foram utilizados albumina de soro bovino (BSA) e meio de cultivo. As linhagens HFF-1 e A-375 foram tratadas com nBvL em diferentes concentrações (0,1; 0,05; 0,025; 0,0125 e 0,006 mg/mL) e nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A linhagem HFF-1 foi tratada com rBvL em diferentes

concentrações (0,5/1,0 e 1,5 mg/ml) no tempo de 72 horas. Como controles de proliferação, foram utilizados albumina de soro bovino (BSA), Concanavalina A (ConA) e meio de cultivo. Os fibroblastos também receberam como controle o tratamento com a lectina NBvL previamente incubada com 200 mM de D-lactose. As células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 7×10^3 (NIH/3T3 e A-375) e 1×10^4 (HFF-1 e HaCaT) por cavidade.

Para os experimentos, as células foram mantidas em meio DMEM ou DMEM alta glicose suplementados com 10% de SFB à 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Após os períodos de incubação, as células foram tratadas por duas horas com meio contendo 5 mg/mL de MTT. Então, as células foram lavadas e o formazam foi solubilizado com 50 µL de DMSO em *shaker* por 15 min. A leitura das absorbâncias foi feita em leitor de ELISA a 492 nm. O percentual de proliferação foi determinado como segue (ZHENG et al., 2011):

Proliferação (%) = $(\text{Abs}_{492\text{nm}} \text{ células tratadas} / \text{Abs}_{492\text{nm}} \text{ células controle meio}) \times 100$

O ensaio de MTT foi realizado em triplicata e validados ao menos por 3 experimentos independentes e os dados gerados foram analisados empregando o programa GraphPad e o teste estatístico ANOVA, seguidos pelo teste de Benferroni para comparações múltiplas, sendo considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

4.4 Ensaio de proliferação celular (EdU)

Para a avaliação da proliferação celular foi realizado o ensaio empregando o kit Click-iT Plus EdU Flow Cytometry Assay (Life Technologies). As células NIH/3T3 e HFF-1 foram semeadas e mantidas como descrito anteriormente na presença de nBvL por 48 horas e 72 horas, respectivamente. As células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 7×10^3 (NIH/3T3) e 1×10^4 (HFF-1) por cavidade. Após esse período, as células foram incubadas por duas horas na presença de 10 µM de EdU. Alternativamente, as células NIH/3T3 também foram semeadas em placas de 6 cavidades na densidade de 2×10^5 e

5×10^5 e incubadas na presença de BvL por 30 horas e então, incubadas mais 18 horas na presença de $2 \mu\text{M}$. Posteriormente às incubações com EdU, as células foram tripsinizadas e lavadas com PBS contendo 1% de BSA e em seguida, fixadas com tampão contendo paraformaldeído por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas com PBS contendo BSA 1% e permeabilizadas empregando tampão contendo saponinas, seguidas de uma nova lavagem. As células foram então marcadas com o corante fluorescente picolil azida por 30 minutos, lavadas com tampão de permeabilização, centrifugadas a 4.000 rpm por 5 min e suspendidas em tampão PBS. As células também foram tratadas com $2 \mu\text{g/mL}$ pelo corante nuclear Hoechst 33342 (BD) por 30 minutos imediatamente antes das análises.

Para as análises por citometria de fluxo, foi empregado o equipamento Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems). As amostras foram excitadas a 405 nm (Hoescht 33342) e 488 nm (Alexa Fluor 488 *picolyl azide*) e as fluorescências emitidas pelas amostras foram detectadas respectivamente pelo detector vl1(450/40nm) e vl1 (530/30 nm). Foram lidas 20.000 células Hoescht 33342 positivas. Os dados foram gerados pelo programa Attune® Cytometric Software v2.1. Os resultados foram então analisados empregando o programa GraphPad e o teste estatístico ANOVA, teste de Benferroni para comparações múltiplas, sendo considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

4.5 Ensaio de viabilidade celular utilizando citometria de fluxo com nBvL

Para os experimentos, as células da linhagem HFF-1 foram mantidas em meio DMEM alta glicose suplementados com 15% de SFB a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 . As células foram semeadas em placas de 12 poços na densidade de 2×10^4 de células por cavidade. No dia seguinte, as células foram tratadas com nBvL nas concentrações 1,0 e 1,5 mg/ml, e como controle o meio de cultivo celular. Logo após o período de 72 horas, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e coradas utilizando o reagente Guava® ViaCount™ de acordo com as instruções do fabricante. As células

coradas foram então analisadas no Muse TM Cell Analyzer (Merck Millipore Corporation®).

4.6 Microscopia confocal

Para os experimentos, as células da linhagem HFF-1 foram mantidas em meio DMEM alta glicose suplementados com 15% de SFB a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 5 x 10³ de células por cavidade.

4.6.1 Ensaio de viabilidade celular usando a técnica de dupla coloração

Este ensaio de viabilidade é um ensaio de dupla coloração que permite distinguir entre células vivas que metabolizam calceína (fluorescência verde) e células mortas que incorporam homodímero de etídio (fluorescência vermelha) em seu DNA. As células da linhagem HFF-1 foram plaqueadas em placas de cultivo de 96 poços e tratadas com a BvL nativa e recombinante em duas concentrações (1,0 e 1,5 mg/ml) e o controle de proliferação utilizando o meio de cultivo DMEM acrescido de 15% SFB. Após o período de 72 horas com os tratamentos, o meio foi retirado e os poços foram lavados duas vezes com PBS. E, então, as células foram coradas com o kit Live/Dead Cell Viability assay (ThermoFisher Scientific®). As células vivas metabolizam a calceína e emitem coloração verdes, e as células mortas tem a membrana não integra e por isso permeável ao homodímero de etídio, que emite coloração vermelha. Foram colocados 100 ul do composto por poço e deixado corando por 30 minutos na estufa. Após esse tempo, foi lavado duas vezes com PBS e as imagens foram adquiridas no Leica Confocal Microscope (Leica Microsystems ©). Ampliação: 200x. Para cada tratamento, três campos distintos do poço foram analisados. A contagem de células em cada campo foi feita utilizando o software ImageJ, e, posteriormente, o resultado foi colocado no software Graph Pad para ser avaliado estatisticamente.

4.6.2 Ensaio de viabilidade celular utilizando o corante DAPI (4'6'-diamino-2-fenil-indol)

DAPI é um corante caracterizado por marcar o núcleo das células (fluorescência azul) e utilizado para analisar células em apoptose, uma vez que as células apoptóticas exibem uma maior fluorescência devido ao seu DNA compactado e maior permeabilidade da membrana. As células da linhagem HFF-1 foram plaqueadas em placas de cultivo de 96 poços e tratadas com a BvL nativa e recombinante em duas concentrações (1,0 e 1,5 mg/ml) e o controle de proliferação utilizando o meio de cultivo DMEM acrescido de 15% SFB. Após o período do tratamento, as células foram lavadas com PBS, permeabilizadas utilizando solução de metanol e acetona (1:1) por 5 minutos, lavadas com PBS e posteriormente coradas com DAPI por 5 minutos no escuro (ThermoFisher Scientific®), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, novas lavagens foram realizadas antes da aquisição das imagens no Leica Confocal Microscope (Leica Microsystems ©). Ampliação: 200x. Para cada tratamento, três campos distintos do poço foram adquiridos. A contagem de células em cada campo foi feita utilizando o software ImageJ e, posteriormente, o resultado foi colocado no software Graph Pad para ser avaliado estatisticamente.

4.7 Western blot

Células NIH/3T3 foram semeadas na densidade de $1,5 \times 10^5$ em placas de 6 cavidades. Após os tratamentos empregando 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL de BvL, 0,1 mg/mL de BSA e 0,05 mg/mL de ConA no tempo de 48 horas, o meio de cultivo foi retirado e as células lavadas com PBS-CMF três vezes e suspendidas em tampão RIPA (150mM Cl; 50mM Tris HCl; 5mM EGTA; Triton; SDS 10%; pH 7,4) acrescido de inibidores de proteases (DTT 1mM, PMSF 0,2 mM) com auxílio de *scraper* e congelado no ultrafreezer a -80°C. As amostras foram descongeladas e lisadas. As amostras foram incubadas por 20 minutos à 4°C, centrifugadas a 12000 x g durante 20 minutos à 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi recolhido e a concentração das proteínas totais foi

determinada pelo método BSA conforme descrito no item 2. A concentração final das amostras foi então ajustada para 580 pg/uL e cerca de 12 ug de cada amostra foram submetidas a eletroforese em géis de SDS-PAGE 8%. Após a separação, as proteínas foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose (70V por 1 hora ou 35V por 2 horas) empregando sistema úmido BIO-RAD. As membranas foram lavada três vezes com TBS-T e incubadas 1 hora a temperatura ambiente com TBS acrescido de leite desnatado 5% e lavadas novamente com TBS-T. As membranas foram incubadas então O/N a 4 °C com os anticorpos primários (Tabela 1) nas diluições descritas em tampão TBS-T adicionado de 5% de BSA (Sigma). Após a incubação, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas por 1 hora com anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase. As membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas por 5 minutos com a solução de quimioluminescência Pierce ECL Western Blotting Substrate, expostas a filmes de revelação (Thermo Scientific CL-X Posure™ film) por 10 s para Pan Actin e 15 minutos para Pan Akt.

O anticorpo Pan Akt é um IgG monoclonal de coelho que detecta os níveis endógenos da proteína AKT total. O Pan Actin é um anticorpo IgG monoclonal de coelho que detecta resíduos C-terminais da proteína β -actina. O anticorpo Anti Rabbit é um igG monoclonal de cabra anti IgG de coelho conjugado com *Horseradish Peroxidase* (HRP). Os três anticorpos são do fornecedor Cell Signaling Technology®.

5. RESULTADOS

5.1 Extração da lectina da *Bauhinia variegata* nativa

Após as etapas de purificação, a BvL nativa foi obtida de forma homogênea na massa molecular esperada (Figura 1). Após a liofilização, a atividade biológica da mesma foi verificada no teste de aglutinação de sangue de coelho. A determinação do rendimento da purificação foi feita através do ensaio de quantificação proteína pelo método de BCA. Cerca de 40 gramas de pó de semente descascada de *B. variegata* renderam cerca de 25 mg de lectina liofilizada.

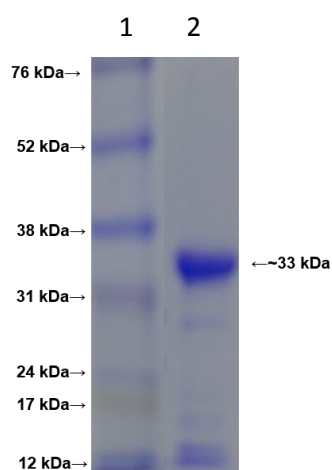


Figura 1: Gel SDS-PAGE 15%. 1- nBvL. 2- Marcador proteico de massa molecular *full range rainbow* (G&E).

5.1.1 Obtenção da lectina *Bauhinia variegata* recombinante

Quantidades elevadas de proteína foram expressas em células de *E. coli* após o período de indução com IPTG. A proteína recombinante foi recuperada de corpos de inclusão usando 6 M de uréia apresentando elevado grau de pureza após purificação em coluna de cromatografia de afinidade com níquel imobilizado. A proteína recombinante foi dialisada e liofilizada recuperando-se aproximadamente 40 mg.L⁻¹. A purificação das lectinas de corpos de inclusão e seu rendimento são compatíveis com o conseguido para outras lectinas (Stancombe et al, 2003; Kusui et al, 1991). A proteína após diálise foi submetida à atividade hemaglutinante e sua atividade só foi recuperada em tampão contendo íons metálicos.

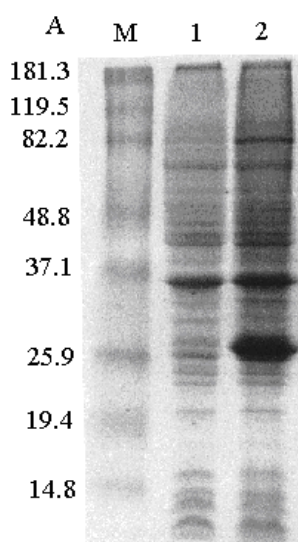
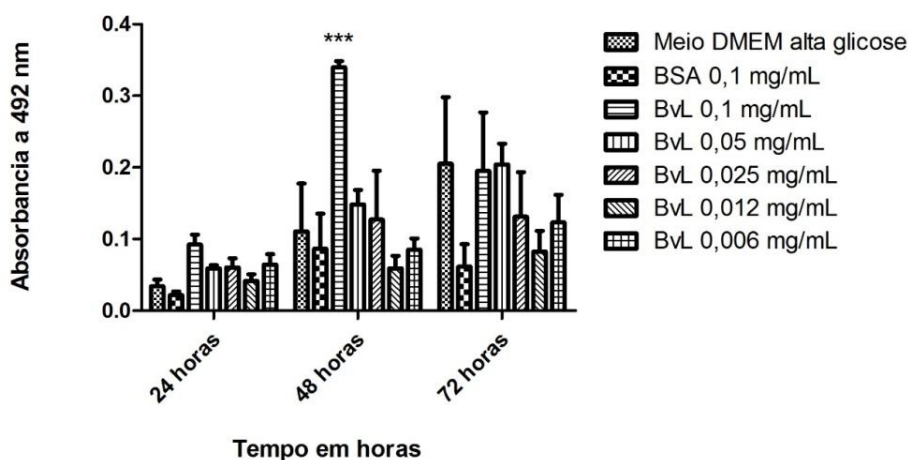


Figura 2: Expressão de rBvL em *E. coli* BL21 (DE3). M, Marcador de massa molecular; linha 1, *E. coli* BL21(DE3)/pAE-*bvl* não induzida com IPTG; linha 2, *E. coli* BL21(DE3)/pAE-*bvII* induzida com IPTG.

5.2 Ensaios empregando a linhagem celular NIH/3T3 (fibroblasto embrionário de rato)

O ensaio de MTT é um teste preliminar comumente empregado para avaliar a citotoxicidade e viabilidade celular de agentes externos em células, avaliando a capacidade das enzimas mitocondriais (desidrogenases) em redução do reagente de MTT. A redução MTT ocorre em células metabolicamente ativas, sendo assim, este ensaio também é amplamente aceito para avaliação da viabilidade celular (American Type Culture Collection, 2011). A linhagem celular NIH/3T3 foi tratada nos períodos de 24, 48 e 72 horas com as concentrações de nBvL de 0,1; 0,05; 0,025; 0,012 e 0,006 mg/mL e com BSA 0,1 mg/mL para mimetizar um ambiente altamente proteico que poderia fornecer nutrientes para proliferação celular. O tratamento por 48 horas com nBvL 0,1 mg/mL foi significativamente maior ($p \leq 0,001$) que os controles (meio DMEM *alta glicose* e BSA 0,1 mg/ml) (Figuras 2 e 3). Além disso, a variável tempo possui o mesmo efeito para todos os tratamentos ($p \leq 0,01$) e afeta os resultados obtidos ($p \leq 0,001$).

Fibroblastos NIH/3T3 versus BvL

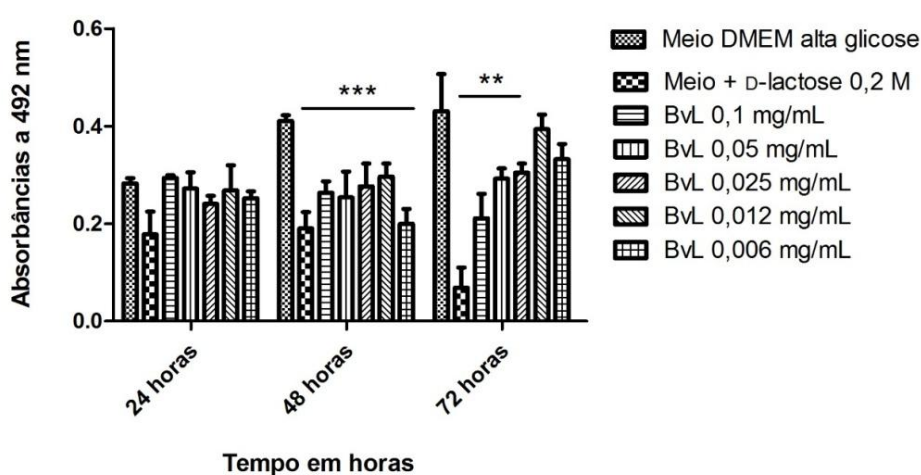


Figuras 3: Ensaio de MTT em fibroblastos NIH/3T3 após o tratamento com nBvL. Os resultados são expressos em intensidade de absorbância a 492 nm e percentual de proliferação celular, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 10% SFB e BSA 0,1 mg/mL como controles negativos (*two way ANOVA*, *** $p \leq 0,001$).

A BvL apresenta alta especificidade para a D-lactose (1.15 mM), D-galactose (2,3 mM) e D-GalNAc (0,58 mM), especificidades as quais foram determinadas pela inibição da atividade biológica de aglutinação de eritrócitos pela lectina (PINTO et al., 2008). Para verificar se o sítio de ligação ao carboidrato é responsável pela proliferação celular dos fibroblastos, este sítio da nBvL foi bloqueado na presença de D-lactose 0,2 M e o ensaio de MTT foi repetido para as duas linhagens. Nestes casos, os tratamentos com a nBvL não foram significativos em relação ao grupo controle, demonstrando uma taxa de proliferação inferior ao controle em todas as concentrações e sugerindo que o sítio de ligação ao carboidrato é responsável pela atividade proliferativa da nBvL. As lectinas ligam-se reversivamente a carboidratos da superfície celular e seguido disso, há a aglomeração e indução da proliferação celular, com a secreção de várias citocinas, interferons e fatores de crescimento (REIS et al., 2015; KILPATRIK et al., 1988). O crescimento de fibroblastos é regulado pela extensão dos seus contatos celulares, e os resíduos presentes em glicoproteínas plasmáticas responsáveis por este contato são de β -galactose (REIS et al., 2015; WIESER & OESCH et al., 1988).

Como o sítio ativo de ligação a carboidratos da BvL pode ser bloqueado na presença de D-lactose, foi então realizado um ensaio de MTT nas mesmas condições anteriores, empregando-se a BvL previamente inibida com 0,2 M de D-lactose. O ensaio demonstrou diferença significativa entre o controle (Meio) e as amostras tratadas com nBvL inibida nos tempos de 48 horas ($p \leq 0,001$) e 72 horas ($p \leq 0,01$) (Figuras 4 e 5). O tempo afetou também os resultados das amostras tratadas ($p \leq 0,05$).

Fibroblastos NIH/3T3 versus BvL + D-lactose



Figuras 4: Ensaio de MTT em fibroblastos NIH/3T3 após o tratamento com nBvL inibida. Os resultados são expressos em intensidade de absorbância a 492 nm e percentual de proliferação celular, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 10% SFB e D-lactose 0,2 M como controles negativos (*two way ANOVA*, $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$).

5.2.1 Ensaio EdU

O ensaio Click-iT™ foi desenvolvido pela Invitrogen e é baseado na incorporação de um análogo à deoxi-uridina, o 5-etinil-2'-deoxi-uridina (EdU) ao DNA recentemente sintetizado e é reconhecido por corantes azida. Acoplado à citometria de fluxo, o ensaio permite identificar células em síntese de DNA (HAMELIK & KRISHAN, 2009), ou seja, permite marcar a replicação do DNA na

proliferação celular de tecidos vivos. Os resultados são então expressos em percentuais de células proliferadas no conjunto de todas as células analisadas. Primeiramente, realizamos o ensaio conforme proposto pelo fabricante, incubando 10 μ M de EdU por 2 horas após 48 horas de tratamento com a BvL, nas concentrações que apresentaram uma maior proliferação no ensaio de MTT (0,1 mg/mL e 0,05 mg/mL). Um controle positivo de proliferação também foi empregado (lectina ConA). Entretanto, os grupos tratados com BvL não apresentaram diferença significativa em relação aos controles.

Proliferação celular NIH/3T3 versus BvL ensaio EdU

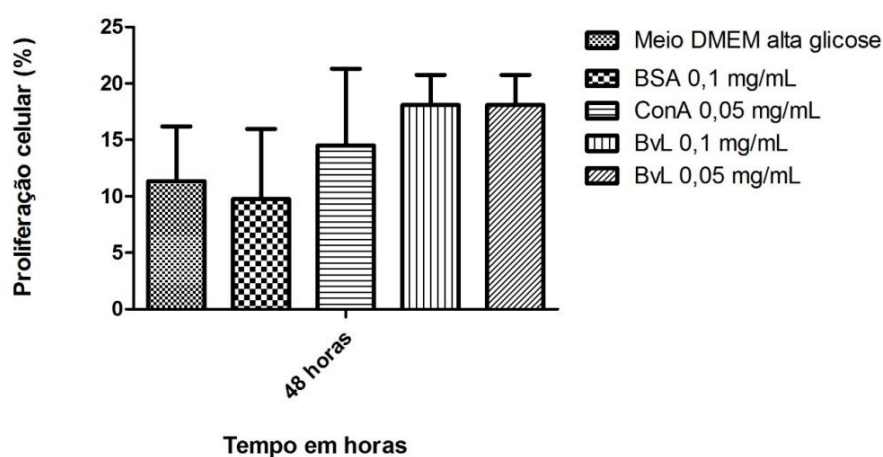


Figura 5: Ensaio de EdU em fibroblastos NIH/3T3 após o tratamento de 48 horas com BvL. Os resultados são expressos em percentual de proliferação celular, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 10% SFB e BSA 0,1 mg/mL como controles negativos e ConA 0,05 mg/mL como controle positivo (*one way* ANOVA, consideraram-se significativos os valores de $p \leq 0,05$).

A partir dos resultados anteriores, decidiu-se então empregar um tempo maior de exposição do EdU ao cultivo celular, sendo que este tempo maior permitiria a medição da proliferação em células com tempo de divisão celular lento. Desta maneira, incubou-se 2 μ M de EdU por 18 horas após 30 horas de tratamento com a BvL, em duas diferentes concentrações iniciais de fibroblastos (5×10^5 e 2×10^5) para a padronização do protocolo. Estas novas condições de ensaio nos permitiram observar uma diferença de proliferação

celular entre as células tratadas com BvL 0,05 mg/mL (73,8%) em relação aos controles (38% e 54%).

Tabela 1 - Ensaio de EdU na linhagem NIH/3T3 em diferentes concentrações celulares iniciais e em incubação de 18 horas com EdU e 48 horas de tratamento.

Células/poço*	Tratamento	Percentual de proliferação (%)
5 x 10 ⁵	Meio DMEM alta glicose	31,5
	BSA 0,1 mg/ml	44,7
	ConA 0,05 mg/ml	47,2
	nBvL 0,1 mg/ml	48,4
	nBvL 0,05 mg/ml	45,2
2 x 10 ⁵	Meio DMEM alta glicose	38,1
	BSA 0,1 mg/ml	54,2
	ConA 0,05 mg/ml	55,1
	nBvL 0,1 mg/ml	55
	nBvL 0,05 mg/ml	73,8

* placas de 6 poços.

5.3 Western blot para a detecção da expressão da proteína Akt

As células NIH/3T3 foram incubadas por um período de tratamento de 48 horas com BvL (0,1 e 0,05 mg/mL) e os controles BSA 0,1 mg/mL e ConA 0,05 mg/mL. Também como controle foram usados os cultivos apenas em meio DMEM alta glicose. As células foram recolhidas em tampão RIPA, lisadas e o conteúdo proteico ajustado para todas as amostras anteriormente à separação em gel de acrilamida e transferência para a membrana de nitrocelulose. Foram feitos dois ensaios de *Western blot* com diferentes anticorpos. Na primeira transferência foi utilizado o anticorpo β -actina (MW: 40 kDa) para demonstrar que todas as amostras continham a mesma concentração de proteína (Figura 7). Uma vez que obtivemos os resultados esperados com quantificação da β -actina, seguimos os testes com os anticorpos anti-AKT. O gel com o anticorpo anti-AKT demonstrou uma banda de aproximadamente 56 kDa para todas amostras conforme esperado (Figura 8), e observou-se um aumento na

expressão desta proteína nas células tratadas com ConA em relação aos controles, mas não houve aumento da expressão das células tratadas com BvL em relação aos controles.



Figura 6: *Western blot* empregando anticorpo Pan-actina nos cultivos celulares de fibroblastos NIH/3T3 tratadas por 48 horas com BvL. Coluna 1: BvL 0,1 mg/ml; coluna 2: BvL 0,05 mg/ml; coluna 3: Meio DMEM alta glicose; coluna 4: ConA 0,05 mg/ml; coluna 5: BSA 0,1 mg/ml.

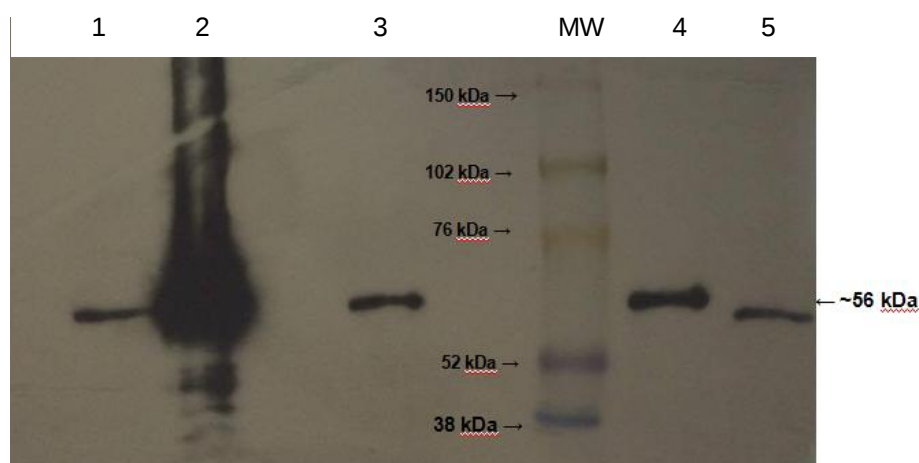


Figura 7: *Western blot* empregando anticorpo Pan-AkT total nos cultivos celulares de fibroblastos NIH/3T3 tratadas por 48 horas com BvL. Coluna 1: BSA 0,1 mg/ml; coluna 2: ConA 0,05 mg/ml; coluna 3: Meio DMEM alta glicose; coluna 4: BvL 0,05 mg/ml; coluna 5: BvL 0,1 mg/ml; MW: marcador proteico de massa molecular *full range rainbow* (G&E).

5.4 Linhagem celular HFF-1 (fibroblasto humano)

5.4.1 Ensaio de MTT utilizando nBvL

A linhagem celular HFF-1 foi tratada nos períodos de 24, 48 e 72 horas com as concentrações de BvL de 0,1; 0,05; 0,025; 0,012 e 0,006 mg/mL e com BSA 0,1 mg/mL e com a lectina ConA como controles. O tratamento de 72

horas com BvL nativa na concentração 0,1 mg/mL teve crescimento superior ($p \leq 0,01$) que os grupos controles (meio DMEM alta glicose, BSA e ConA) (Figura 9 e 10). Além disso, a variável tempo possui o mesmo efeito para todos os tratamentos ($p < 0,05$) e afeta os resultados obtidos ($p < 0,001$). A BvL 0,1 mg/mL inibida com lactose (0,2 M) também foi testada nestas células, mas não foi encontrada indução de crescimento nesta condição (dados não mostrados).

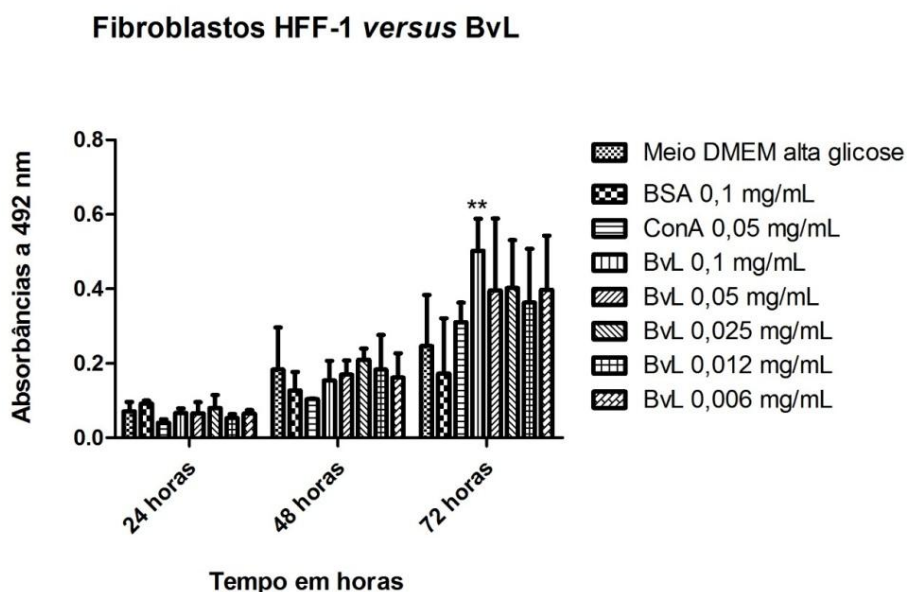


Figura 8: Ensaio de MTT em fibroblastos HFF-1 após o tratamento com BvL. Os resultados são expressos em intensidade de absorbância a 492 nm e percentual de proliferação celular, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 10% SFB e BSA 0,1 mg/mL e ConA 0,05 mg/mL como controles (*two way ANOVA*, $**p \leq 0,01$).

5.4.2 Ensaio MTT utilizando rBvL

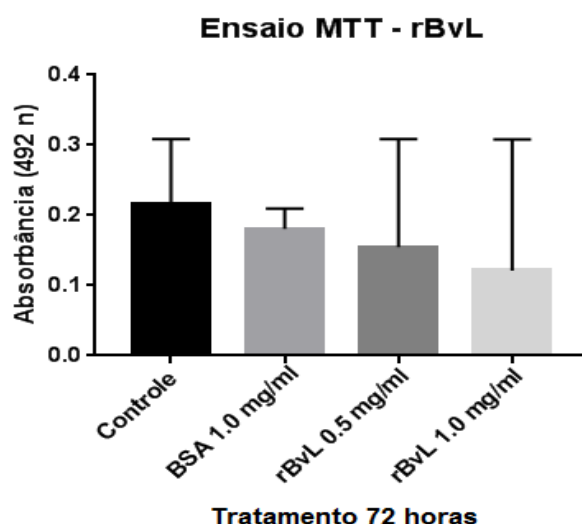


Figura 9: Ensaio MTT em fibroblastos HFF-1 após o tratamento de 72 horas com rBvL. Os resultados são expressos em intensidade de absorbância a 492 nm e percentual de proliferação celular, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 15% SFB e BSA 1,0 mg/mL como controles negativos, n=5 (*one way* ANOVA, consideraram-se significativos os valores de $p \leq 0,05$).

5.4.3 Ensaio EdU

Uma análise mais apurada da proliferação celular foi realizada utilizando citometria de fluxo empregando o ensaio de EdU para as linhagens de HFF-1 e NIH/3T3, o qual avalia o percentual de células que proliferaram em um determinado período de tempo (HAMELIK & KRISHAN, 2009).

No ensaio de EdU para a linhagem celular HFF-1, foi feito o tratamento das células por 72 horas e o EdU foi incubado por apenas 2 horas junto as células, e os resultados não foram significativos apesar de os tratamentos da BvL nas concentrações 0,05mg/mL e 0,006 mg/mL terem sido cerca de 5% maior que no grupo controle. Como os fibroblastos possuem um tempo de geração lento, elas necessitam de um tempo maior de incorporação do EdU no núcleo, principalmente a HFF-1 (BERKER et al., 2004). Característica essa que faz com que seja necessário repetir os experimentos, fazendo o protocolo com o tempo de incubação do EdU por mais horas.

Proliferação celular HFF-1 versus BvL ensaio EdU

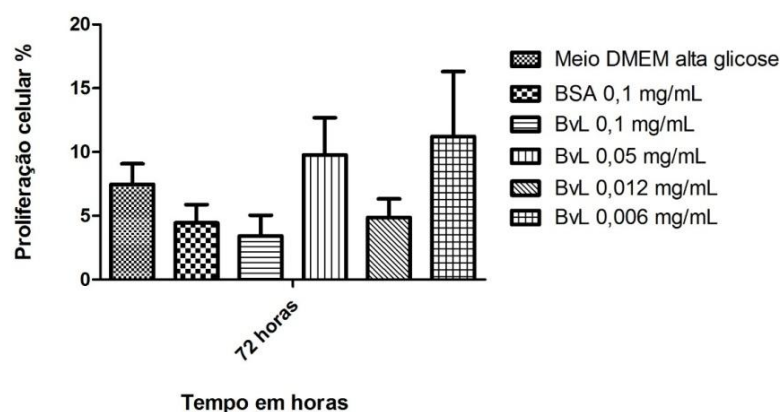


Figura 10: Ensaio de EdU em fibroblastos HFF-1 após o tratamento de 72 horas com BvL. Os resultados são expressos em percentual de proliferação celular, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 10% SFB e BSA 0,1 mg/mL como controles negativos, n=5 (one way ANOVA, consideraram-se significativos os valores de $p \leq 0,05$).

5.4.4 Ensaio de viabilidade celular utilizando citometria de fluxo com a nBvL

Outro ensaio feito utilizando citometria de fluxo para avaliar a proliferação celular foi o ensaio via-count que quantifica o número de células totais em um solução, na linhagem celular HFF-1 com duas concentrações da nBvL, onde demonstrou um resultado semelhante ao controle, tendo uma contagem de células um pouco inferior (Figura 11).

Ensaio de viabilidade celular utilizando citometria de fluxo

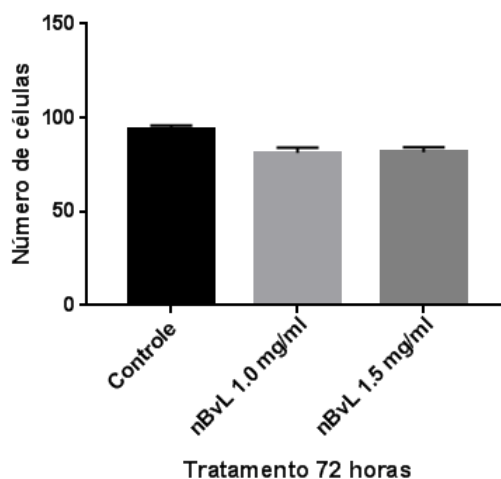


Figura 11: Ensaio Via count em fibroblastos HFF-1 após o tratamento de 72 horas com nBvL. Os resultados são expressos em percentual de proliferação celular, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 15% SFB.

5.5 Microscopia confocal

Foram realizados dois ensaios empregando a microscopia confocal, o ensaio live-dead e o ensaio DAPI, na linhagem celular HFF-1, e tratando com a nBvL e rBvL em duas concentrações. No ensaio live-dead é utilizado o corante homodímero de etídeo e o corante calceína. A calceína é absorvida pelas células vivas que metabolizam este corante e emitem uma fluorescência verde, e as células que não estão vivas tem a membrana não integra e, portanto, mais permeáveis ao homodímero de etídeo que emite uma fluorescência vermelha. Neste ensaio, foi possível observar os fibroblastos na conformação ideal, porém os tratamentos com a nBvL e rBvL não foram significativos ao controle. O segundo ensaio foi o DAPI e o corante utilizado é o DAPI, que marca o núcleo das células e emite uma fluorescência azul.

5.5.1 Ensaio de dupla coloração de viabilidade celular utilizando tratamentos com nBvL

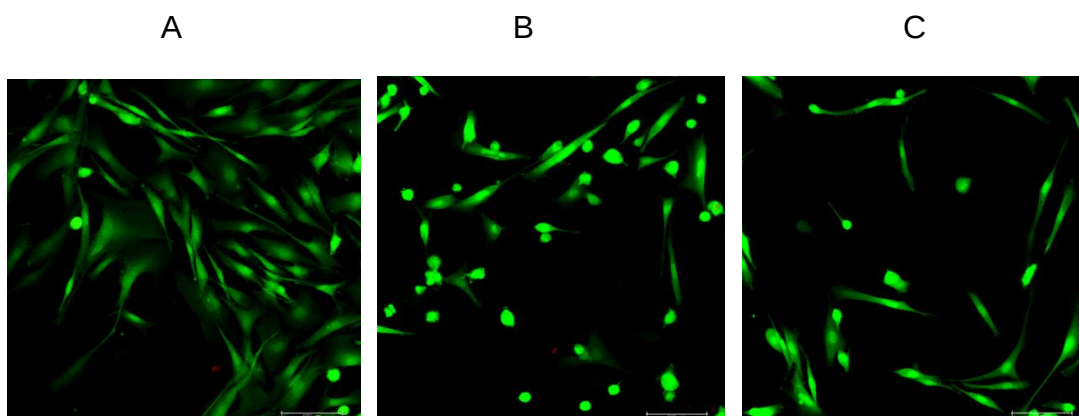


Figura 12: Ensaio de dupla coloração para avaliar viabilidade celular utilizando microscopia confocal. As células vivas apresentam coloração verde e as células mortas coloração vermelha. Células de fibroblasto humano (HFF-1) tratadas com (A) controle; (B) nBvL 1 mg/ml; (C) nBvL 1.5 mg/ml, após 72 horas.

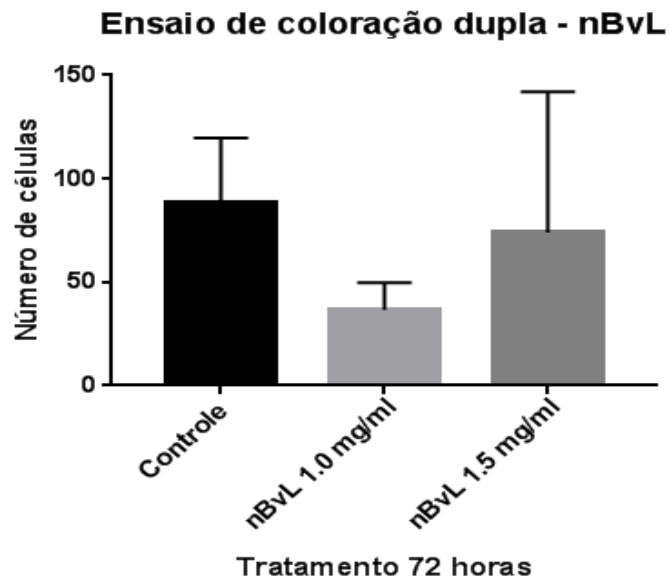


Figura 13: Ensaio de dupla coloração em fibroblastos HFF-1 após o tratamento de 72 horas com nBvL. Os resultados são expressos em número de células, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 15% SFB.

5.5.2 Ensaio de dupla coloração de viabilidade celular utilizando tratamentos com rBvL

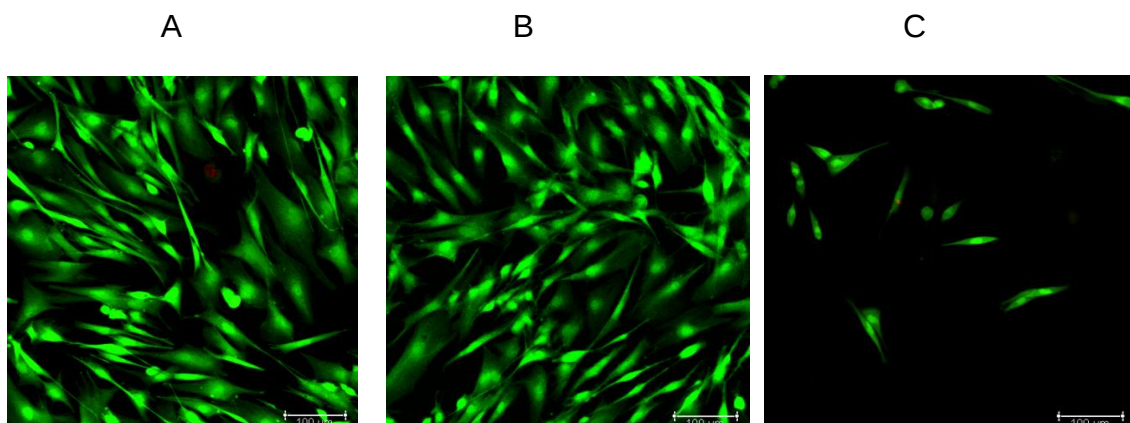


Figura 14: Ensaio de dupla coloração para avaliar viabilidade celular utilizando microscopia confocal. As células vivas apresentam coloração verde e as células mortas coloração

vermelha. Células de fibroblasto humano (HFF-1) tratadas com (A) controle; (B) rBvL 1 mg/ml; (C) rBvL 1,5 mg/ml, após 72 horas.

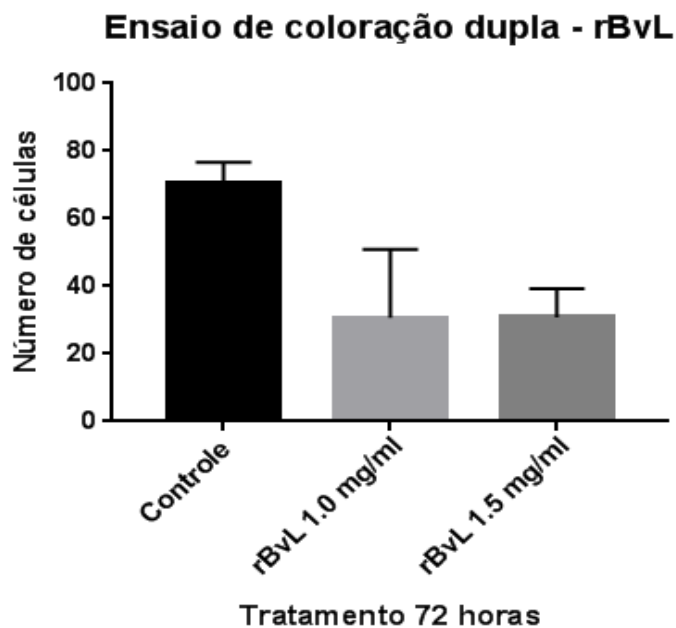


Figura 15: Ensaio de dupla coloração em fibroblastos HFF-1 após o tratamento de 72 horas com rBvL. Os resultados são expressos em número de células, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 15% SFB.

5.5.3 Ensaio de viabilidade celular utilizando o corante DAPI e tratamentos com a nBvL

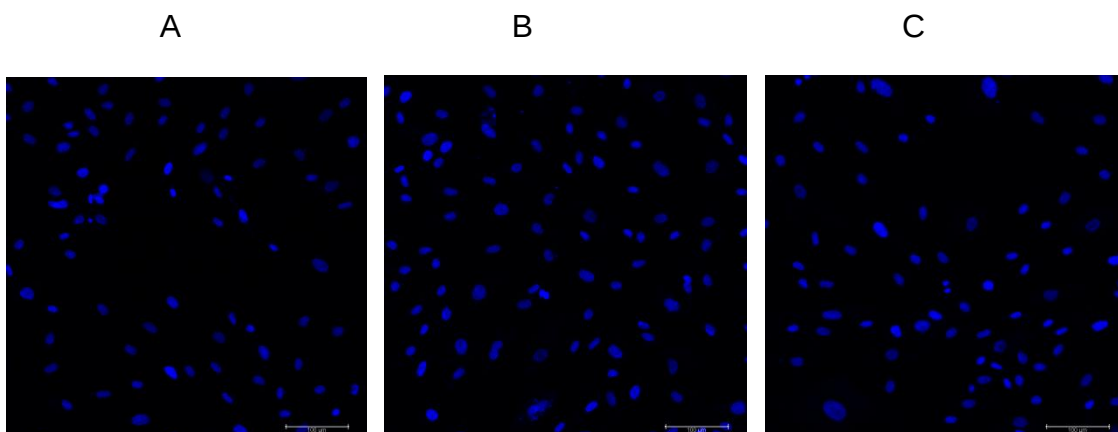


Figura 16: Ensaio de viabilidade celular utilizando corante DAPI e microscopia confocal. O corante DAPI marca de azul o núcleo de células viáveis. Células de fibroblasto humano (HFF-1) tratadas com (A) controle; (B) nBvL 1 mg/ml; (C) nBvL 1,5 mg/ml, após 72 horas.

Ensaio de viabilidade celular utilizando o corante DAPI

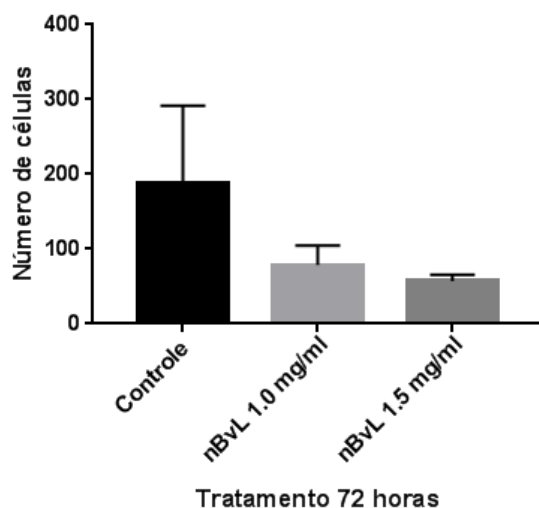


Figura 17: Ensaio de viabilidade celular utilizando o corante DAPI em fibroblastos HFF-1 após o tratamento de 72 horas com nBvL. Os resultados são expressos em número de células, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 15% SFB.

5.5.4 Ensaio DAPI utilizando tratamentos com a rBvL

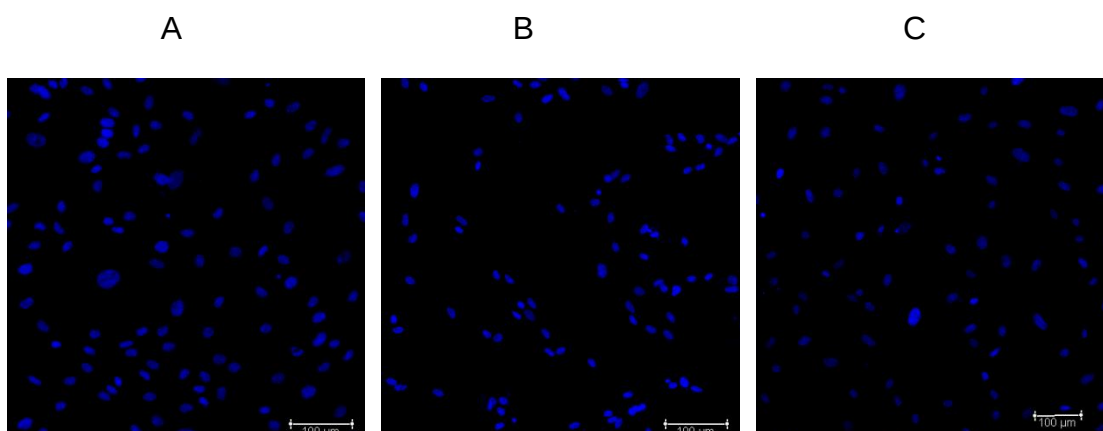


Figura 18: Ensaio de viabilidade celular utilizando corante DAPI e microscopia confocal. O corante DAPI marca de azul o núcleo de células viáveis. Células de fibroblasto humano (HFF-1) tratadas com (A) controle; (B) rBvL 1 mg/ml; (C) rBvL 1,5 mg/ml, após 72 horas.

Ensaio de viabilidade celular utilizando o corante DAPI

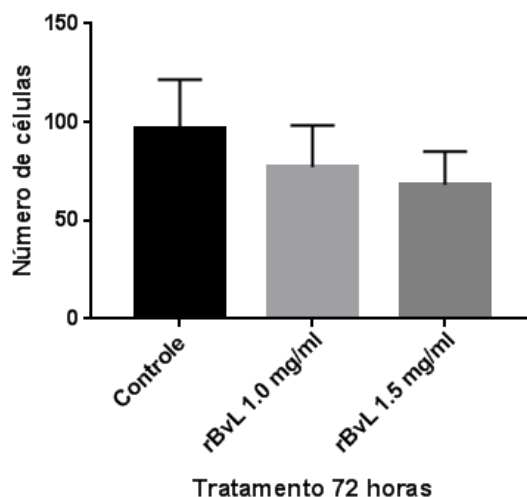


Figura 19: Ensaio de viabilidade celular utilizando o corante DAPI em fibroblastos HFF-1 após o tratamento de 72 horas com rBvL. Os resultados são expressos em número de células, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 15% SFB.

5.6 Teste de atividade biológica em linhagem celular HaCaT (queratinócito humano) usando ensaio de MTT

Quando acontece um rompimento na epiderme, os queratinócitos se tornam ativados e ocorrem a sua migração, proliferação e diferenciação. A migração destas células é responsável por preencher este espaço do ferimento, e quando a epiderme está intacta novamente a migração destas células cessa, porém, a mitose e a diferenciação continuam (MYERS et al., 2007). Junto com os queratinócitos, há a migração de fibroblastos e outras células endoteliais (MARTIN et al., 1997; SINGER, A. J. & CLARK, R. A. F., 1999). Fibroblastos são as células mais numerosas encontradas no tecido conectivo. Na fase inicial do processo de cura, essas células migram e proliferam para o local da injúria, fazendo a contração e deposição de matriz extracelular, o que vai remodelando o tecido. Essas células são essenciais durante o processo de cicatrização epitelial e participam de todas as fases de cicatrização. Os queratinócitos e os

fibroblastos estão sujeitos à regulação de diversas citocinas e fatores de crescimento que são ativados durante o processo, e estimulam imediatamente a fosforilação da tirosina de várias proteínas celulares, promovendo a proliferação e diferenciação celular (BERKER et al., 2004).

O processo de regeneração de feridas envolve outros tipo celulares além de fibroblastos, como os queratinócitos, os quais propiciam a diferenciação dos fibroblastos (DAWID-PAC, 2013; SHERPHARD et al., 2004; WANG et al., 2015; SEO et al., 2017). A linhagem celular HaCaT foi tratada nos tempos de 24, 48 e 72 horas com as concentrações de BvL de 0,1; 0,05; 0,025; 0,012 e 0,006 mg/mL e com BSA 0,1 mg/mL como controle negativo. Nenhum tratamento com BvL apresentou proliferação significativamente maior ($p \geq 0,05$) que os controles (meio DMEM alta glicose e BSA 0,1 mg/ml) (Figuras 12 e 13).

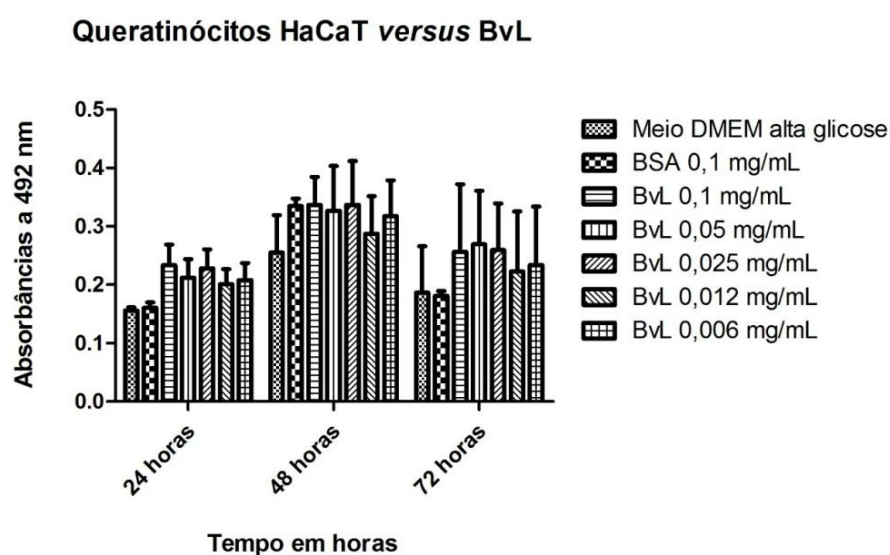


Figura 20: Ensaio de MTT em queratinócitos HaCaT após o tratamento com BvL. Os resultados são expressos em intensidade de absorbância a 492 nm e percentual de proliferação celular, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 10% SFB e BSA 0,1 mg/mL como controles (*two way ANOVA*, considerando significativos os valores de $p \leq 0,05$).

5.7 Teste de atividade biológica em linhagem A-375 (melanoma maligno humano) usando ensaio de MTT

Para avaliar se a BvL também teria atividade proliferativa em tumor de epidérmico (linhagem A-375, melanoma), o que impossibilitaria seu uso terapêutico na cicatrização de feridas na pele, foram realizados ensaios empregando a lectina em estudo nessa linhagem celular. As células de melanoma A-375 foram tratados nos períodos de 24, 48 e 72 horas com as concentrações de BvL de 0,1; 0,05; 0,025; 0,012 e 0,006 mg/mL e com ConA 0,1 mg/mL como controle positivo, pois essa lectina apresenta atividade anti proliferativa nas células A-375 (ESTRADA-MARTINEZ et al., 2017). Nenhum tratamento com BvL apresentou proliferação em relação aos controles (meio DMEM e ConA 0,1 mg/ml) (Figuras 14 e 15). Por outro lado, a proliferação das células tratadas com BVL 0,1 mg/mL é significativamente menor ($p \leq 0,05$) que o controle negativo (Meio DMEM).

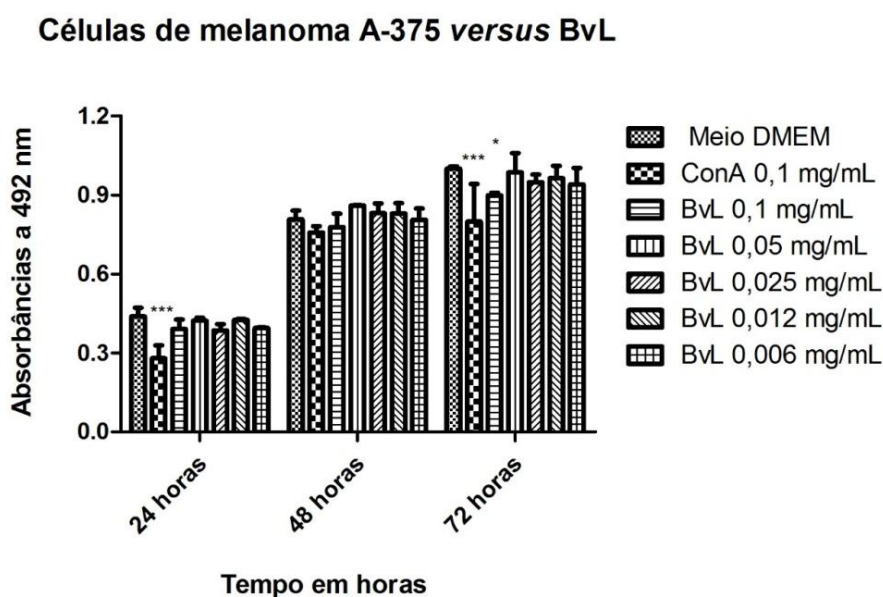


Figura 21: Ensaio de MTT em células de melanoma A-375 após o tratamento com BvL. Os resultados são expressos em intensidade de absorbância a 492 nm e percentual de proliferação celular, empregando células cultivadas em meio DMEM 10% SFB e ConA 0,1 mg/mL como controles (*two way ANOVA*, considerando significativos os valores de $p \leq 0,05$; * $p \leq 0,05$ e *** $p \leq 0,001$).

6. Discussão dos resultados

A manutenção da integridade da pele é vital para proteger os humanos e animais contra a desidratação, sangramento e invasão por micro-organismos. Desta maneira, os animais desenvolveram um sofisticado mecanismo de cura de feridas para preencher a lesão rapidamente, re-epitelizar o tecido e substituir rapidamente a derme perdida com nova matriz (CARVALHO et al., 2002; ANTHONY et al., 2016). A cicatrização aguda de feridas prossegue rapidamente e com poucos problemas na grande maioria dos casos. Às vezes, o processo de cicatrização de feridas não ocorre normalmente e resultam feridas crônicas. As formas mais comuns de feridas crônicas em seres humanos incluem úlceras venosas, úlceras diabéticas e feridas de pressão, resultantes principalmente de doenças subjacentes que conduzem a uma situação em que a resposta de cura de feridas não possa ser completada. (BERKER et al., 2004). Desta maneira, diversos esforços são dispensados para a descoberta de compostos farmacológicos para o tratamento destas feridas crônicas. As lectinas são biomoléculas que apresentam diversas atividades biológicas, consideradas como alternativa promissora no tratamento de feridas cutâneas conforme estudos de reparação de lesões em camundongos (CORIOLANO et al., 2014; NASCIMENTO-NETO et al., 2012; MELO et al., 2011). Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado a capacidade da BvL de induzir a cicatrização funcional de feridas *in vivo* (NASCIMENTO-NETO et al., 2011; REIS et al., 2013), entretanto ainda não estão descritas as atividades biológicas da lectina diretamente nas células envolvidas na cicatrização epidérmica e nem estão elucidados os mecanismos de ação induzidos pela BvL nestas células.

Este trabalho então foca-se nos estudos *in vitro* da atividade biológica da BvL nas linhagens celulares correspondentes aos principais tipos celulares encontrados na epiderme e derme. A superfície da epiderme é composta por células epiteliais estratificadas e por células de queratinócitos (cerca de 95% das células totais) (BERKER et al., 2004).

Primeiramente, foram realizados testes para avaliar a ação proliferativa através do ensaio de MTT em linhagens celulares de fibroblastos (HFF-1 e

NIH/3T3) e queratinócitos (HaCaT). Na linhagem HFF-1, o ensaio de MTT se mostrou mais efetivo no tempo de 72 horas e na concentração 0,1 mg/mL da nBvL (Figura 8). Na linhagem NIH/3T3 o tratamento que mais foi efetivo no tempo de 48 horas com a nBvL na concentração de 1,0 mg/mL, onde obtivemos cerca de 300% a mais de proliferação em relação ao grupo controle, com um $p \leq 0,001$ (Figura 3). A concentração que mostrou mais proliferação nas duas linhagens (1,0 mg/mL) é condizente com a concentração que apresentou atividade biológica *in vivo* em experimento anterior realizado pelo nosso grupo (REIS et al., 2015). A diferença de tempo de ação da lectina entre as duas linhagens celulares (HFF-1 e NIH/3T3) se deve, pois a primeira possui um tempo de geração superior à segunda linhagem.

Embora já foi demonstrada uma atividade antiproliferativa e indutora de apoptose de lectinas em melanomas malignos humanos (ESTRADA-MARTINEZ et al., 2017), se faz necessário investigar se a BvL poderia induzir a proliferação destes tumores durante o tratamento de cicatrização do tecido da epiderme, já que a atividade antiproliferativa de lectinas está associada a lectinas específicas para glicose e manose (ESTRADA-MARTINEZ et al., 2017). O ensaio de MTT foi feito na linhagem A-375, porém nenhum tratamento com nenhuma concentração da BvL se mostrou proliferativo em relação ao grupo controle, e ainda o tratamento na concentração de 0,01 mg/mL da BvL é significativamente menor que o controle negativo (meio DMEM) (Figura 21).

A tecnologia de proteínas recombinantes é bastante utilizada hoje em dia como opção a extração de proteínas na natureza, podendo obter-se em larga escala as proteínas de forma controlada, eficaz e barata (CLARK et al., 2016; SINGH et al., 2019). Pensando nisso, foi produzido a lectina de BvL recombinante e testada na linhagem celular HFF-1, porém, os resultados não foram satisfatórios, tendo uma taxa de proliferação abaixo do grupo controle no ensaio MTT (Figura 9). Portanto, neste caso a proteína recombinante não promoveu crescimento celular como a lectina nativa.

Foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa (resultados ainda não publicados), um experimento *in vivo* utilizando ratos onde foram feitos cortes no dorso do animal e posteriormente tratados com a lectina nBvL por 48 horas, 7 e

12 dias, e neste experimento observamos que a lectina nBvL no tratamento de 48 horas não apresentam o crescimento mais significativo dos grupos, porém nos tratamentos de 7 e 12 dias foi observado e comprovado por testes histológicos uma ferida mais fechada e com uma regeneração cicatricial profunda e completa, não apenas um deposição de matriz extracelular, como observado no grupo controle. Portanto, unindo as duas informações, *in vitro* e *in vivo*, pode-se observar que a lectina BvL não induz somente uma proliferação direta nas células de fibroblastos, mas seu papel principal seria como um sinalizador, preparando uma revascularização e migração de células, promovendo uma cicatriz funcional e saudável. Nos resultados *in vitro* não obtemos esses mesmos resultados, pois as células estavam sendo observadas sozinhas e não foi possível avaliar o papel de sinalização da lectina. Este mesmo resultado é observado por trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando camundongo e rato (NASCIMENTO-NETO, PINTO et al., 2012; REIS et al., 2015).

Além disso, não é encontrado na literatura estudos *in vitro* utilizando as linhagens celulares de cicatrização epitelial, demonstrando que é um processo complexo que depende de diversas ativações de rotas e liberação de citocinas, característica essa que vem sendo observada pela lectina BvL na literatura (PHAN et al., 1998; CARVALHO et al., 2002; DAWID-PAC et al., 2013; SEO et al., 2017). Diversos trabalhos na literatura mostram experimentos de co-cultura onde queratinócitos promovem a proliferação, migração e diferenciação de fibroblastos na derme, mostrando então, as interações entre a derme e a epiderme durante o processo de cicatrização. Nesses estudos, as principais vias de migração e proliferação são a ciclina B1, fosfo-CDK1, fosfo-AKT, C-X-C recetor de quimiocinas 4 (CXCR4) e matriz de metaloproteínas (MMPs), o que vem demonstrando a importância do sinergismo e interação entre essas células (SHERPHARD et al., 2004; THOMAS et al., 2007; WANG et al., 2015; ANTHONY et al., 2016; SEO et al., 2017).

Queratinócitos e fibroblastos produzem uma grande variedade de citocinas incluindo diversos fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, e também, diferentes matrizes de polímeros e enzimas catabólicas. Se essas células puderem interagir, pode haver uma estimulação de mecanismos

parácrinos que iniciarão a produção de fatores de proliferação celular, como o fator de crescimento de transformação ($\text{TGF-}\alpha$ e $\text{TGF-}\beta$), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), que são conhecidos por ser importantes para a competência celular e nos processos de cicatrização e regeneração tecidual (DAWID-PAC, 2013; SHERPHARD et al., 2004; WANG et al., 2015; SEO et al., 2017). Na fase final, conhecida como de remodelamento, os processos de reepitelização, angiogênese e fibrose, param, e a síntese de colágeno aumenta que é depositado no ferimento e forma a cicatriz. Com o passar do tempo esse colágeno vai se reorganizando e torna a cicatriz menos espessa e o tecido epitelial vai retornando suas conformações originais (PHAN et al., 1998; CARVALHO et al., 2002; SHERPHARD et al., 2004; SEO et al., 2017).

Diversas lectinas vem sendo usadas em biomateriais para modular respostas biológicas ativando células do sistema imune (CAVADA et al., 2001; ALENCAR et al., 2003), ativando neutrófilos através de mecanismos indiretos (ASSREUY et al., 2003), promovendo efeitos pro inflamatórios em PMN induzindo a liberação de citocinas (CAVADA et al., 2001; ALENCAR et al., 2005), além de induzir a proliferação de fibroblastos (SELL & COSTA, 2003).

Para investigar os possíveis mecanismos de indução da proliferação celular, foi feito o *Western blot* para a linhagem celular NIH/3T3 com os tratamentos da nBvL na concentração em 0,1 mg/mL e 0,05 mg/mL, sendo que iniciou-se a investigação dos níveis de expressão da proteína Akt e sua fosforilação nestas células (Figura 7). A fosfoinosítideo 3-quinase (PI3-K) e Akt são proteínas quinase B que participam de rotas centrais de sinalização intracelular em resposta ao ambiente extracelular (TOKER et al., 2008). Estas quinases são induzidas por receptores na superfície da célula e produzem mensageiros secundários intracelulares (como o fosfatidilinositol(3,4,5)-trifosfato). A proteína quinase Akt é um grande efetor na maioria das células e tecidos para proliferação e sobrevivência. A ativação da ação quinase na AKT se dá através da fosforilação da proteína nos resíduos Thr-308 e Ser-473 (FRANKE et al., 1997). Uma vez que a via Akt é ativada, ela promove a sobrevivência celular através de sua fosforilação e, também, inibindo várias proteínas pro-apoptóticas (TOKER et al., 2008). Para exemplificar, a via Akt/PKB em IGF-1 promove a sobrevivência e previne a apoptose em células

neurais celulares quando é super-expressa (FRANKE et al., 1997). Além do mais, essa via é essencial no crescimento celular o qual é diretamente relacionado com a fosforilação de proteínas mTOR, as quais possuem papel fundamental no crescimento celular e homeostase (NAVÉ et al., 1999). A rota Akt na linhagem NIH/3T3 é ativada por insulina, fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), fatores de crescimento da epiderme (EGF) e fatores de crescimento básico de fibroblastos (bFGF). (BURGERING et al., 1995). A super-expressão da proteína Akt resulta em transformação oncogênica do fibroblasto NIH/3T3, (LIU et al., 2004) e a regulação da rota da Akt resulta em proliferações lentas de células NIH/3T3 (KUO et al., 2008). Além disso, alguns compostos induzem crescimento e proliferação de células NIH/3T3 pela rota PI3K-Akt (LI et al., 2010; KIM et al., 2007; LU et al., 2011). Os resultados do *Western blot* demonstraram que uma super-expressão não é responsável pela proliferação dos fibroblastos, pois não há diferença entre a concentração das bandas das amostras tratadas com BvL em relação ao controle. *Western blot* posteriores são necessários para a determinação da fosforilação e conseqüentemente, ativação da Akt e seu possível envolvimento no mecanismo de proliferação celular dos fibroblastos.

Por outro lado, outros mecanismos de indução da cicatrização pela BvL podem estar envolvidos. A primeira etapa da cicatrização é uma reação inflamatória, onde as células fagocitárias recrutadas reabsorvem o sangue extravasado e os produtos da destruição celular. A lectina de *B. variegata* possui propriedades pró-inflamatórias capaz de induzir mastócitos residentes dependentes de neutrófilos em sua migração, possuindo habilidade de ativar células imunes, além de melhorar a resposta de cicatrização *in vivo*, diferenciando fibroblastos em miofibroblastos, um evento de extrema importância durante a remodelação de tecidos (NASCIMENTO-NETO et al., 2012).

7. Conclusão

A lectina da *B. variegata* apresentou atividade biológica de indução de proliferação celular em linhagens de fibroblastos humanos e murinos, mas não em linhagem de queratinócitos humana e linhagem de células de melanoma humana.

Não foi possível verificar o mecanismo de ação das lectinas já que os ensaios foram conduzidos com doses superiores às utilizadas nos ensaios de proliferação.

8. Limitações e perspectivas

As próximas etapas envolvem a elucidação do mecanismo de ação da BvL nestas células através de análises dos ciclos de proliferação celular utilizando co-cultura de linhagens celulares, *Western blot* e análises em qRT-PCR de proteínas reguladoras da multiplicação celular.

As próximas etapas serão experimentos *in vivo* para a confirmação dos resultados e visualizar as etapas de cicatrização, bem como ensaios posteriores para o ajuste da dose e tempo de tratamento. Para futuramente, produzir um fármaco - provavelmente na forma de hidrogel ou pomada - para a indução de cicatrização de feridas.

9. Referências Bibliográficas

AL ATALAH, B.; FOUQUAERT, E.; VANDERSCHAEGHE, D.; PROOST, P.; BALZARINI, J.; SMITH, D. F.; ROUGÉ, P.; LASANAJAK, Y.; CALLEWAERT, N.; VAN DAMME, E. J. Expression analysis of the nucleocytoplasmic lectin 'Oryzata' from rice in *Pichia pastoris*. **Journal FEBS**, 278, 2064–2079, 2011.

AMBROSI, M.; CAMERON, N. R.; DAVIS, B. G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic & Biomolecular Chemistry**, n.9, 2005.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. MTT Cell Proliferation Assay Instruction Guide. **Components**, v. 6597, p. 1–6, 2011.

AMIT, M.; MARGULETS, V.; SEGEV, H.; SHARIKI, K.; LAEVSKY, I.; COLEMAN, R.; ITSKOVITZ-ELDOR, J. Human feeder layers for human embryonic stem cells. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 6, p. 2150–6, 2003.

ANDREE, C.; KULLMER, M.; WENGER, A.; SCHAEFER, D. J.; KNESER, U.; STARK, G. B.; DUNITZ, M. Gene technology and tissue engineering, 11(3), 93–99, 2002.

BELLANDE, K.; BONO, J.J.; SAVELLI, B.; JAMET, E.; CANUT, H. Plant lectins and lectin receptor-like kinases: How do they sense the outside? **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.6, Maio, 2017.

BERG, P. & MERTZ, J. E. Personal Reflections on the Origins and Emergence of Recombinant DNA Technology. **Genetics Society of America**, 2010

BERKER, D. A. R.; BARAN, R.; DAWBER, R. P. R. **Disorders of Nails. Rook's Textbook of Dermatology**, 7.ed., Blackwell Publishing, Inc., Malden, Massachusetts, 2004.

BHUTIA, S. K.; PANDA, P. K.; SINHA, N.; PRAHARAJ, P. P.; BHOL, C. S.; PANIGRAHI, D. P.; MAITI, T. K. Plant lectins in cancer therapeutics : Targeting apoptosis and autophagy- dependent cell death. **Pharmacological Research**, 144(January), 8–18, 2019.

CARDOSO, M.; KROETZ, T.; LIMA, C.; CARLOS, F.; ELIAS, T.; FRIZON, A.; DAL-BÓ, A. G. Journal of Colloid and Interface Science Elucidating Bauhinia variegata lectin / phosphatidylcholine interactions in lectin-containing liposomes. **Journal of Colloid And Interface Science**, 519, 232–241, 2018.

CAGLIARI R.; KREMER, F. S.; PINTO, L. S.; Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 119, 811-820, 2018.

CELL LINES SERVICE. HaCaT. Disponível em
<<http://www.clsgmbh.de/artikeldet.php?sprachnrs=2&sid=2bv11t49lt2e4s5msp8t7isho1&proid=800>>

CHAHUD, F.; RAMALHO, L.N.Z.; RAMALHO, F.S.; HADDAD, A.; ROQUE-BARREIRA, M.C. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in

rabbits. **International Journal of Experimental Pathology**, v.90, n.2, p. 166-173, 2009.

CHAN, Y. S.; NG, T. B. *Bauhinia variegata* var. *variegata* Lectin: Isolation, Characterization, and Comparison. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 75–84, 2015.

CHANG, W. C.; HARTSHORN, K. L.; WHITE, M. R.; MOYO, P.; MICHELOW, I. C.; KOZIEL, H.; KINANE, B. T.; SCHMIDT, E. V.; FUJITA, T.; TAKAHASHI, K. Recombinant chimeric lectins consisting of mannose-binding lectin and L-ficolin are potent inhibitors of influenza A virus compared with mannose-binding lectin. **Biochemical Pharmacology**, 81, 388–395, 2011.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. Recombinant Proteins. **Science Direct. Biotechnology**, 2th edition, 2016.

CORIOLOANO, M. C.; MELO, C. M. L.; SILVA, F. D. O.; SCHIRATO, G. V.; PORTO, C. S.; SANTOS, P. J. P.; CORREIA, M. T. D. S.; PORTO, A. L. F.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; COELHO, L. C. B. B. *Parkia pendula* seed lectin: Potential use to treat cutaneous wounds in healthy and immunocompromised mice. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2682–2693, 2014.

DAWID-PAC, R. Medicinal plants used in treatment of inflammatory skin diseases. **Postepy Dermatol Alergol**, v.30, n3., p 170-177, Junho, 2013.

DIAS, A. S. F. **Lectina da esponja marinha *Tedania ignis*: purificação, caracterização e interação com leishmanias**. 2006. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2006.

ESTRADA-MARTÍNEZ, L.E.; MORENO-CELIS, U.; CERVANTES-JIMÉNEZ, R.; FERRIZ-MARTÍNEZ, R.A.; BLANCO-LABRA, A.; GARCÍA-GASCA, T. Plant lectins as medical tools against digestive system cancers. **Intertional Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.1403, Julho, 2017.

FIGUEIRÔA, E.D.O.; CUNHA, C.R.A.; ALBUQUERQUE, P.B.S.; PAULA, R.A.; ARANDA-SOUZA, M.A.; SILVA, M.A.; ZAGMIGNAN, A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; SILVA, L.C.N.; CORREIA, M.T.S. Lectin-carbohydrate interactions: implications for the development of new anticancer agents. **Current Medicinal Chemistry**, v.24, n.42, 2017.

FOUQUAERT, E.; SMITH, D. F.; PEUMANS, W. J.; PROOST, P.; BALZARINI, J.; SAVVIDES, S. N., DAMME. E. J. Related lectins from snowdrop and maize differ in their carbohydrate-binding specificity. **Biochemical Biophysical Research Communications**, 380, 260–265, 2009.

FRANKE, T. F.; KAPLAN, D. R.; CANTLEY, L. C. PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis. **Cell**, v. 88, n. 4, p. 435–437, 1997.

GAUTAM, A. K.; SHARMA, D.; SHARMA, J.; SAINI, K. C. Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the Cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

GIOMARELLI, B.; SCHUMACHER, K. M.; TAYLOR T. E.; SOWDER, R. C.; HARTLEY, J. L.; MCMAHON, J. B.; MORI, T. Recombinant production of anti-HIV protein, griffithsin, by auto-induction in a fermentor culture. **Protein Expression Purification**, 47, 194–202, 2006.

GIPSON, I. K.; ANDERSON, R. A. Effect of lectins on migration of the corneal epithelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 19, n. 4, p. 341–349, 1980.

HAGO, S.; MAHROUS, E. A.; MOAWAD, M.; ABDEL-WAHAB, S.; ABDEL-SATTAR, E. Evaluation of antidiabetic activity of *Morus nigra* L. and *Bauhinia variegata* L. leaves as Egyptian remedies used for the treatment of diabetes. **Natural Product Research**, 0(0), 1–7, 2019.

HAMELIK, R. M.; KRISHAN, A. Click-iT assay with improved DNA distribution histograms. **Cytometry Part A**, v. 75, n. 10, p. 862–865, 2009.

HENDRICKSON, O. D. & ZHERDEV, A. V. Analytical applications of lectins, **Institute of Chemistry**, 8347(January), 2018.

HSU, K. L.; GILDERSLEEVE, J. C.; MAHAL, L. K. A simple strategy for the creation of a recombinant lectin microarray. **Molecular Biosystems**, 4, 654–662, 2008.

ILENE, K.; ANDERSON, R.A. Effect of lectins on migration of the corneal epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.19, p 341-349, 1980.

INGALE, A. G.; HIVRALE A. U. Plant as a plenteous reserve of lectin. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 12, Dezembro, 2013.

JIANG, S.; MA, Z.; RAMACHANDRAN, S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. **BioMed Central Evolutionary Biology**, v. 10. Março, 2010.

KILPATRIK, D.C. Accessory cell paradox: Monocytes enhance or inhibit lectin mediated human T lymphocyte proliferation depending on the choice of mitogen. **Scandinavian Journal of Immunology**, 28: 247–249, 1988.

KIM, S. E.; LEE, W. J.; CHOI, K. Y. The PI3 kinase-Akt pathway mediates Wnt3a-induced proliferation. **Cellular Signalling**, v. 19, n. 3, p. 511–518, 2007.

KIM, Y. H.; WOLOSHUK, C. P.; CHO, E. H.; BAE, J. M.; SONG, Y. S.; HUH, G. H. Cloning and functional expression of the gene encoding an inhibitor against *Aspergillus flavus* alpha-amylase, a novel seed lectin from *Lablab purpureus* (*Dolichos lablab*). **Plant Cell Reproduction**, 26, 395–405, 2007.

KLAFKE, G.B.; GONÇALVES, R.A.; ARRUDA, F.V.S.; CARNEIRO, V.A.; TEIXEIRA, E.H.; SILVA, A.L.C.; CAVADA, B.S.; DELLAGOSTIN, O.A.; PINTO, L.S. Inhibition of initial adhesion of oral bacteria through a lectin from *Bauhinia variegata* L. var. *variegata* expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 115, n.5, p1222-1230. Novembro, 2013.

KLAFKE, G.B.; MOREIRA, G.M.S.G.; MONTE, L.G.; PEREIRA, J.L.; BRANDOLT, T.M.; XAVIER, M.O.; SANTI-GADELHA, T.; DELLAGOSTIN, O.A.; PINTO, L.S. Assessment of plant lectin antifungal potential against yeasts of

major importance in medical mycology. **Mycopathology**, v.175, n. 1-2, p. 147-151, 2013.

KLAFKE, G.B.; MOREIRA, G.M.S.G.; PEREIRA, J.L.; OLIVEIRA, P.D.; CONCEIÇÃO, F.R.; LUND, R.G.; GRASSMANN, A.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; PINTO, L.S. Lectin I from *Bauhinia variegata* (BvL-I) expressed by *Pichia pastoris* inhibits initial adhesion of oral bacteria in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 913–918, Setembro, 2016.

KRIEG, T.; ABRAHAM, D.; LAFYATIS, R. Fibrosis in connective tissue disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions. **Arthritis research & therapy**, v. 9 Suppl 2, p. S4, 2007.

KUCEROVA, R.; OU, J.; LAWSON, D.; LEIPER, L.J.; COLLINSON, J.M. Cell surface glycoconjugate abnormalities and corneal epithelial wound healing in the Pax6+/- mouse model of aniridia-related keratopathy. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.47, n.12, p. 5276-5282, 2006.

KUO, Y. C.; HUANG, K. Y.; YANG, C.H.; YANG, Y. S.; LEE, W. Y.; CHIANG, C. W. Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55 α regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 4, p. 1882–1892, 2008.

KUONEN, R.; WEISSENSTEIN, U.; URECH, K.; KUNZ, M.; HOSTANSKA, K.; ESTKO, M.; HEUSSER, P.; BAUMGARTNER, S. Effects of lipophilic extract of *Viscum album* L. and oleanolic acid on migratory activity of NIH/3T3 fibroblasts and on HaCat keratinocytes. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A.M.; VAZQUEZ-MORENO, L.

Legume lectins: proteins with diverse applications. **Intertional Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.1242, p. 1-18, 2017.

LAM, S. K. & NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Springer**, Applied Microbiology and Biotechnology, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.

LI, J. X.; LIU, J.C.; WANG, K.; YANG, X. G. Gadolinium-containing bioparticles as an active entity to promote cell cycle progression in mouse embryo fibroblast NIH3T3 cells. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 547–557, 2010.

LI, Y.; LIAO, X.; CHEN, G.; YAP, Y.; ZHANG, X. Cloning, expression and purification of Microcystis viridis lectin in Escherichia coli. **Molecular Biotechnology**, 47, 105–110, 2011.

LING, L. J.; YANG, Y. Z.; BI, Y. R. Expression and characterization of two domains of Pinellia ternata agglutinin (PTA), a plant agglutinin from Pinellia ternata with antifungal activity. **World Journal Microbiology Biotechnology**, 26, 545–554, 2010.

LIU, X.; POWLAS, J.; SHI, Y.; OLEKSIJEW, A. X.; SHOEMAKER, A. R.; JONG, R. D.; OLTERSDORF, T.; GIRANDA, V. L.; LUO, Y. Rapamycin inhibits Akt-mediated oncogenic transformation and tumor growth. **Anticancer Research**, v. 24, n. 5 A, p. 2697–2704, 2004.

LU, Y.; LIU, S.; ZHANG, S.; CAI, G.; JIANG, H.; SU, H.; LI, X.; HONG, Q.; ZHANG, X. CHEN, X. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes NIH3T3 fibroblast proliferation by activating p-Akt and cell cycle progression. **Molecules and Cells**, v. 31, n. 3, p. 225–230, 2011.

LUBKOWSKI, J.; DURBIN, S.V.; SILVA, M.C.C.; FARNSWORTH, D.; GILDERSLEEVE, J.C.; OLIVA, M.L.V.; WLODAWER, A. Structural analysis and unique molecular recognition properties of a *Bauhinia forficata* lectin that inhibits cancer cell growth. **The FEBS journal**, v. 284, n.3, p. 429-450, 2017.

MAENUMA, K.; YIM, M.; KOMATSU, K.; HOSHINO, M.; TAKAHASHI, Y.; BOVIN, N.; IRIMURA, T. Use of a library of mutated Maackia amurensis hemagglutinin for profiling the cell lineage and differentiation. **Proteomics**, 8, 3274–3283, 2008.

MARKIV, A.; PEIRIS, D.; CURLEY, G. P.; ODELL, M.; DWEK, M. V. Identification, cloning, and characterization of two N-acetylgalactosamine binding lectins from the albumen gland of *Helix pomatia*. **Journal Biological Chemistry**, 286, 20260–20266, 2011.

MART, D.; BLANCO-LABRA, A.; GARC, T.. Expression of Lectins in Heterologous Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018.

MARTIN, P. Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75-81, 1997.

MEIERS, J., SIEBS E.; ZAHORSKA, E.; TITZ, A. Lectin antagonists in infection immunity , and inflammation. **ScienceDirect**, 53, 51–67, 2019.

MELO, C. M. L.; PORTO, C. S.; MELO-JUNIOR, M. R.; MENDES, C. M.; CAVALCANTI, C. C. B.; COELHO, L. C. B. B.; PORTO, A. L. F.; CARNEIRO LEÃO, A. M. A.; CORREIA, M. T. S. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, n. 1–2, p. 113–119, 2011.

MENG, H.H.; JACQUES, F.M.; SU, T.; HUANG, Y.J.; ZHANG, S.T.; MA, H.J.; ZHOU, Z.K. New Biogeographic insight into Bauhinias.l. (Leguminosae): integration from fossil records and molecular analyses. **BioMed Central Evolutionary Biology**, 2014.

MICHELOW, I. C.; LEAR, C.; SCULLY, C.; PRUGAR, L. I.; LONGLEY, C. B.; YANTOSCA, L. M.; JI, X.; KARPEL, M.; BRUDNER, M.; TAKAHASHI, K.; SPEAR, G. T.; EZEKOWITZ, R. A.; SCHMIDT, E. V.; OLINGER, G. G. High-dose mannose-binding lectin therapy for Ebola virus infection. **Journal Infectious Diseases**, 203, 175–179, 2011.

MISHRA, A.; SHARMA, A.K.; KUMAR, S.; SAXENA, A.K.; PANDEY, K. Bauhinia variegata Leaf Extracts Exhibit Considerable Antibacterial, Antioxidant, and Anticancer Activities. **Research article**. Hindawi. agosto 2013.

MISHRA, A.; BEHURA, A.; MAWATWAL, S.; KUMAR, A.; NAIK, L.; SUBHASHMITA, S.; MISHRA, A. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical Toxicology**, 134(September), 110827, 2019.

MOHSIN & AKHTAR. Formulation and stability evaluation of *Bauhinia variegata* extract topical emulsion, **Acta Poloniae Pharmaceutica**, 74(3), 945–954, 2017.

MORRIS, J.B. Swordbean (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.) genetic resources regenerated for potential medical, nutraceutical and agricultural traits. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 54, p 585-592. Fevereiro, 2006.

MYERS, S. R.; LEIGH, I. M.; NAVSARIA, H. Epidermal repair results from activation of follicular and epidermal progenitor keratinocytes mediated by a growth factor cascade. **Wound Repair and Regeneration**, v. 15, n. 5, p. 693–701, 2007.

NASCIMENTO-NETO, L. G. et al. Characterization of isoforms of the lectin isolated from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and its pro-healing effect. **Marine Drugs**, v. 10, n. 9, p. 1936–1954, 2012.

NASCIMENTO-NETO, L.G.; PINTO L.S.; BASTOS R.M.; EVARISTO F.F.V.; VASCONCELOS M.A.; CARNEIRO V.A.; ARRUDA F.V.S.; PORTO A.L.F.; LEAL R.B.; JUNIOR V.A.S.; CAVADA B.S.; TEIXEIRA E.H. Effect of the Lectin of *Bauhinia variegata* and Its Recombinant Isoform on Surgically Induced Skin Wounds in a Murine Model. **Molecules. Switzerland**, v. 16, p. 9298-9315. 2011.

NAVÉ, B. T.; OUWENS, D. M.; WITHERS, D. J.; ALESSI, D. R.; SHEPHERD, P. R. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B : identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. **Biochemical Journal**, v. 344, p. 427–431, 1999.

OLIVEIRA, C. Recombinant lectins : an array of tailor-made glycan interaction biosynthetic tools. **Critical Reviews in Biotechnology**, 33, 66–80 2013.

OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L.; OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Recombinant lectins : an array of tailor-made glycan-interaction biosynthetic tools Recombinant lectins : an array of tailor-made glycan-interaction biosynthetic tools, **Journal Critical Reviews in Biotechnology**, 8551, 2013.

ORWA, C.; MUTUA, K.R.; JAMNADASS, R.S.A. Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. 2009. **Agroforestry Database** . Disponível em <<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>>

PALARETI, G. et al. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 2016.

PHAN, T.T.; HUGHES, M.A.; CHERRY, G.W. Enhanced proliferation of a fibroblasts and endothelial cells treated with an extract of the leaves of *Chromolaena odorata* (Eupolin), an herbal remedy for treating wounds. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 101, n. 3. Março, 1998.

PINTO, L. S.; NAGANO, C. S.; OLIVEIRA, T. M.; MOURA, T. R.; SAMPAIO, A. H.; DEBRAY, H.; PINTO, V. P.; DELLAGOSTIN, O. A.; CAVADA, B. S. Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 3, p. 355–363, 2008.

PINTO, S.; CARDOSO, G.; SCHMITT, F.; DANELON, R.; ANTONIO, O.; FARIAS, V. International Journal of Biological Macromolecules Heterologous expression and characterization of a new galactose- binding lectin from *Bauhinia forficata* with antiproliferative activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, 128, 877–884, 2019.

POIROUX, G.; BARRE, A.; VAN 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. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

PROPHETER, D. C.; HSU, K. L.; MAHAL, L. K. Recombinant lectin microarrays for glycomic analysis. **Methods Molecular Biology**, 723, 67–77, 2011.

REIS, L. B.; RIZZI, C.; BIDONE, J.; FONSECA, A. F.; MADAINA, M.; PINTO, L. S. . Efeito da lectina de *Bauhinia variegata* incorporada ao gel de hidroxietilcelulose na cicatrização in vivo. In: **UFPel. (Org.)**. Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas. 1ed. Pelotas: Editora UFPel, 2015, v. 1, p. 234-248.

REIS, L.B.; RIZZI, C.; BIDONE, J.; FONSECA, A.F.; MAIDANA, M.; PINTO, L.S. Efeito da lectina extraída de *Bauhinia variegata* incorporada ao hidrogel natrosol na cicatrização in vivo. **Congresso de Iniciação Científica 2013**. Universidade Federal de Pelotas

ROSANO, G. L. & CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* : advances and challenges, **Frontiers in Microbiology**, 5(April), 1–17, 2014.

SAHASRABUDDHE, A. A.; AHMED, N.; KRISHNASASTRY, M. V. Stress-induced phosphorylation of caveolin-1 and p38, and down-regulation of EGFr and ERK by the dietary lectin jacalin in two human carcinoma cell lines. **Cell Stress Chaperones**, 11, 135–147, 2006.

SALQUEIRO, A.C.; FOLMER, V.; SILVA, M.P.; MENDEZ, A.S.; ZEMOLIN, A.P.; POSSER, T.; FRANCO, J.L.; PUNTEL, R.L.; PUNTEL, G.O. Effects of *Bauhinia forficata* Tea on Oxidative Stress and Liver Damage in Diabetic Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

SELL, A.M.; COSTA, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 297-303, 2000.

SEO, G.Y.; LIM, Y.; KOH, D.; HUH, J.S.; HYUN, C.; KIM, Y.M.; CHO, M. TMF and glycitin act synergistically on keratinocytes and fibroblasts to promote wound healing and anti-scarring activity. **Experimental & Molecular Medicine**, v.49, n.3, p. e302, 2017.

SHARMA, N.; SHARMA, A.; BHATIA, G.; LANDI, M.; BRESTIC, M.; SINGH, B.; BHARDWAJ, R. Isolation of Phytochemicals from Bauhinia variegata L . Bark and Their In Vitro Antioxidant and Cytotoxic Potential, **Antioxidants (Basel)**, 1–19, 2019.

SHARON, N. & LIS, H. **Lectins**, 2 ed., Kluwer Academic Publishers, Boston, 2003.

SHARON, N.; LIS, H.; GOLDSTEIN, I. J.; WINTER, H. C.; PORETZ, R. D.; VLIEGENHARDT, J. F. G.; SHARON, N.. Recombinant Plant Lectins and Their Mutants, **Science**, 363, 2003.

SHERPHARD, P.; HINZ, B.; SMOLA-HESS, S.; MEISTER, J.J.; KRIEG, T.; SMOLA, H. Dissecting the roles of endothelin, TGF-beta and GM-CSF on myofibroblast differentiation by keratinocytes. **Thrombosis and Haemostasis**. v.92, n.2, p 262-274. Agosto, 2004.

SIGMA-ALDRICH. A375 Cell Line human. Disponível em
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/88113005?lang=pt®ion=BR>>

SINGER, A. J. & CLARK R.A.F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.

SOARES, P.K.; SCARMINIO, I.S. Multivariate chromatographic fingerprint preparation and authentication of plant material from the genus Bauhinia.

Phytochemical Analysis. v.19, n.1, p 78-85. fevereiro, 2008.

TABASSUM, N.; HAMDANI, M. Plants used to treat skin diseases.

Pharmacognosy Review. v.8, p 52-60. Janeiro, 2014.

TEIXEIRA, E. H.; ARRUDA, F. V.; SILVA, B. R.; NASCIMENTO, K. S.;

CARNEIRO, V. A.; CAVADA, B. S.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.

Biological applications of plants and algae lectins: an overview. In: CHANG, C.

(Org.). Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: Carbohydrates -

Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology. **InTech**,

novembro, 2012.

THOMAS, K.; ABRAHAM, D.; LAFYATIS, R. Fibrosis in connective tissue

disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions.

Arthritis Research & Therapy, v.9, n.2, 2007.

TOKER, A. Akt signaling: a damaging interaction makes good. **Trends in**

Biochemical Sciences, v. 33, n. 8, p. 356–359, 2008.

TRACE, A.P.; ENOS, C.W.; MANTEL, A.; HARVEY, Y.M. Keloids and

Hypertrophic Scars: A Spectrum of Clinical Challenges. **American Journal of**

Clinical Dermatology, v. 17, n. 3, p. 201–223, 2016.

TREMBLAY, R.; FENG, M.; MENASSA, R.; HUNER, N. P.; JEVNIKAR, A. M.;
MA, S. High-yield expression of recombinant soybean agglutinin in plants using
transient and stable systems. **Transgenic Research**, 20, 345–356, 2011.

VAN DAMME, E.J.M. Lectins as tools to select for glycosylated proteins. **Gel-Free Proteomics**. Springer. v.753, p 289-297. Maio, 2011.

VAREJÃO, N., ALMEIDA, M. S.; DE CICCIO, N. N.; ATELLA, G. C.; COELHO, L. C.; CORREIA, M. A.; FOGUEL, D. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). **Biochimica et Biophysica Acta**, 1804, 1917–1924, 2010.

WANG, Z.; LIU, X.; ZHANG, D.; WANG, X.; ZHAO, F.; SHI, P.; PANG, X.
Co-culture with human fetal epidermal keratinocytes promotes proliferation and migration of human fetal and adult dermal fibroblasts. **Molecular Medicine Reports**. v.11, n.2, p 1105-1110. Fevereiro, 2015.

WIESER, R. J. & OESCH, F. Contact-dependent regulation of growth of diploid human fibroblasts is dependent upon the presence of terminal galactose residues on plasma membrane glycoproteins. **Experimental cell Research**, 80-86, 1988.

WU, A. M., & LIU, J. H. Lectins and ELLSA as powerful tools for glycoconjugate recognition analyses. **Research Gate**, 2019.

YANG, N.; TONG, X.; XIANG, Y.; ZHANG, Y.; LIANG, Y.; SUN, H.; WANG, D. C. Molecular character of the recombinant antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. **Journal of Biochemistry**, 138, 145–150, 2005.

ZANETTI, G.D. Lectinas dos Rizomas de *Arundo donax* L.: Purificação, Caracterização, Propriedades, Imuno-histoquímica e separação das isoformas. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Botânica)** - Programa de Pós-graduação em Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

ZHAO, J.; HU, L.; LIU, J.; GONG, N.; CHEN, L. The effects of cytokines in adipose stem cell-conditioned medium on the migration and proliferation of skin fibroblasts in vitro. **BioMedical Research International**, v. 2013, 2013.

ZHENG, D.; WANG, Y.; ZHANG, D.; LIU, Z.; DUAN, C.; JIA, L.; WANG, F. LIU, Y.; LIU, G.; HAO, L.; ZHANG, Q. *In vitro* antitumor activity of silybin nanosuspension in PC-3 cells. **Cancer Letters**. v.307, n. 2, p. 158-164. 2011.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.0, n.0, p. 1-11, 2017.

ZWIERZINA, H.; BERGMANN, L.; FIEBIG, H.; AAMDAL, S.; SCHOFFSKI, P.; WITTHOHN, K.; LENTZEN, H. The preclinical and clinical activity of aviscumine: a potential anticancer drug. **European Journal of Cancer**, 47, 1450–1457, 2011.