

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Centro de Desenvolvimento Tecnológico**

**Curso de Graduação em Biotecnologia**



**Trabalho de Conclusão de Curso**

**A ação da lectina nativa de *Bauhinia variegata* na regeneração tecidual**

**Amanda Sigal Soares**

**Pelotas, agosto de 2017**

**Amanda Sigal Soares**

**A ação da lectina nativa de *Bauhinia variegata* na regeneração tecidual**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de  
Bacharelado em Biotecnologia da  
Universidade Federal de Pelotas,  
como requisito parcial à obtenção do  
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof, Dr. Luciano da Silva Pinto

**Pelotas, 2017**

**Amanda Sigal Soares**

**A ação da lectina nativa de *Bauhinia variegata* na regeneração tecidual**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 14 de agosto de 2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Caroline Rizzi

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Me. Elita Silveira

Mestre em Bioquímica e Bioprospecção pela Universidade Federal de Pelotas

Doutorado em andamento em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal do Rio Grande.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

S676a Soares, Amanda Sigal

A ação da lectina nativa de Bauhinia variegata na regeneração tecidual / Amanda Sigal Soares ; Luciano da Silva Pinto, orientador. — Pelotas, 2017.

48 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Lectinas. 2. Fibroblastos. 3. Lectina bvl. 4. Cicatrização tecidual. 5. Cultivo celular. I. Pinto, Luciano da Silva, orient. II. Título.

CDD : 574.87

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

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

## **Agradecimentos**

A Universidade Federal de Pelotas que me permitiu vivenciar um novo mundo de possibilidades, conhecimentos e diferenças, 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 admiráveis professores da graduação do curso de Biotecnologia por me mostrar os infinitos fascínios do mundo científico. 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 na vida acadêmica. A Carol por me encantar pelo universo do cultivo celular, por ouvir minhas diversas angústias, aconselhar e me fazer enxergar os problemas de forma mais leve. E também a Mara, pela ajuda e companhia na maioria dos passos.

Meu muito obrigada a Diretoria - Mariana, Maurício, Júlia, Carlos, Martin, Daniel, Roberta, Vitória, Rodolfo, Bruno, Ana, Marina, Pedro e Priscila – pela amizade, parceria e cumplicidade. A faculdade não seria tão boa e inesquecível sem vocês. Amigos esses que gostaria de levar para a vida e que sempre vão ter um lugar especial no meu coração. Principalmente a Mariana, que segue presente nos meus dias, pela nossa conexão e sintonia que sempre foi natural desde o início, e me faltam palavras para descrever o quão importante és para mim. Ao Érico, por me acompanhar nos estudos e escrita, me ajudando 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. **A ação da lectina nativa de *Bauhinia variegata* na regeneração tecidual**. 2017. Trabalho de conclusão de curso - Graduação de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Lectinas são um grupo de proteínas com diversas características particulares, sendo uma delas a capacidade de estimular a proliferação celular. A partir de sementes de *Bauhinia variegata*, foi isolada a lectina denominada BvL, através de etapas de trituração da semente, delipidação com hexano, extração, purificação por cromatografia de afinidade seguido por diálise e, finalmente, liofilização do material. A capacidade de proliferação celular da lectina foi avaliada em cultivos celulares 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. No ensaio de MTT, o tratamento *in vitro* estimulou a proliferação de fibroblastos humanos (0,1 mg/mL de BvL após 72 horas de tratamento;  $p \leq 0,01$ ) e fibroblastos murinos (0,1 mg/mL de BvL após 48 horas de tratamento;  $p \leq 0,001$ ), e a lectina não se mostrou citotóxica em nenhuma concentração ou tempo. No mesmo ensaio, a proliferação celular de queratinócitos não foi significativa em relação aos grupos controles; e a lectina também não induziu ao crescimento em células de melanoma. No ensaio de EdU, o qual mede o percentual de células que se proliferaram na presença do tratamento, as concentrações de lectina 0,1 mg/mL e 0,05 mg/mL em fibroblastos murinos resultaram em um percentual de proliferação de 55% e 74%, respectivamente. O tempo de tratamento foi importante para a observação da proliferação em todos os experimentos e ensaios. A BvL inibida com D-lactose não apresentou proliferação celular em fibroblastos murinos no ensaio de MTT, o que sugere que o sítio ativo da proteína está relacionado com a proliferação da linhagem. No ensaio de *western blot* não foi possível verificar uma relação entre a ativação da transcrição da proteína AKT e a indução da proliferação celular. A partir dos resultados é possível afirmar que a lectina BvL é promissora para aplicações farmacológicas na cicatrização tecidual de feridas cutâneas. Ensaios posteriores para o ajuste da dose e tempo de tratamento, bem como análises dos ciclos de proliferação celular, *western blot* e análises em qRT-PCR de proteínas reguladoras da multiplicação celular podem elucidar o mecanismo de proliferação.

**Palavras-chave:** Lectinas; Lectina BvL; cultivo celular; proliferação celular; fibroblastos; cicatrização tecidual.

## Abstract

SOARES, Amanda Sigal. **The action of *Bauhinia variegata* native lectin on tissue regeneration.** 2017. Graduation tesis - Graduação de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Lectin is a protein group with many particular features. One of them, it is the ability to stimulate the proliferation of cellular growth. The first step is to extract and purify the protein from *Bauhinia variegata* plant, which it is called BvL lectin, through steps of seed crushing, hexane delipidation, extraction, purification by affinity chromatography followed by dialysis and finally lyophilization of the material. The ability to induce cellular proliferation of this lectin was evaluate in culture of regenerative cells, such as human fibroblast (HFF-1), human keratinocytes (HaCaT) and murine fibroblasts (NIH/3T3). The lectin was also tested in cancer cell of human malign melanoma (A-375), aiming to verify a possible action on these cells. In the MTT assay, *in vitro* treatment demonstrated proliferation of human fibroblasts (0,1 mg / mL BvL after 72 hours of treatment;  $p \leq 0,01$ ) and murine (0,1 mg / mL BvL after 48 hours of treatment;  $p \leq 0,001$ ), and the lectin was not cytotoxic at any concentration or time. In the same assay, keratinocytes proliferation was not significant related to control groups, and also, the lectin did not induced melanoma growth. In the EdU assay which it is measured by percent through cell proliferation in the presence of the treatment, 0,1 mg/mL and 0,05 mg/mL lectin concentration in murine fibroblast showed proliferation result of 55% and 74%, respective. Time was important to observe proliferation in all treatments and assays. BvL inhibited with D-lactose did not showed proliferation in NIH/3T3 in MTT assay, which suggests that the active site of the protein is related to the proliferation of the lineage. *Western blot* assay also did not showed relation between the activation of the transcription of the AKT protein and the induction of proliferation. These results become BvL a promising protein to pharmacological applications to tissue healing in cutaneous wounds. Subsequent assays for dose adjustment and treatment time, as well as analyzes of cycles of cell proliferation, western blot, and qRT-PCR analyzes of cell multiplication regulatory proteins may elucidate the mechanism of proliferation.

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

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Gel SDS-PAGE 15% confirmando a purificação da BvL nativa, empregando o marcador proteico de massa molecular <i>full range rainbow</i> (G&E).....	21
<b>Figuras 2:</b> Ensaio de MTT em fibroblastos NIH/3T3 após o tratamento com BvL.....	22
<b>Figuras 3:</b> Ensaio de MTT em fibroblastos NIH/3T3 após o tratamento com BvL inibida.....	23
<b>Figura 4:</b> Ensaio de EdU em fibroblastos NIH/3T3 após o tratamento de 48 horas com BvL.....	24
<b>Figura 5:</b> <i>Western blot</i> empregando anticorpo anti $\beta$ -actina nos cultivos celulares de fibroblastos NIH/3T3 tratadas por 48 horas com BvL.....	26
<b>Figura 6:</b> <i>Western blot</i> empregando anticorpo anti-AkT total nos cultivos celulares de fibroblastos NIH/3T3 tratadas por 48 horas com BvL.....	26
<b>Figura 7:</b> Ensaio de MTT em fibroblastos HFF-1 após o tratamento com BvL. ....	27
<b>Figura 8:</b> Ensaio de EdU em fibroblastos HFF-1 após o tratamento de 72 horas com BvL.....	28
<b>Figura 9:</b> Ensaio de MTT em queratinócitos HaCaT após o tratamento com BvL.....	29
<b>Figura 10:</b> Ensaio de MTT em células de melanoma A-375 após o tratamento com BvL. ....	30

## Lista de tabelas

**Tabela 1:** Anticorpos usados no ensaio de *Western blot*. .....20

**Tabela 2:** 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.....25

## 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

BvL Lectina da planta *Bauhinia variegata*

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

CO<sub>2</sub> Gás carbônico

ConA Concanavalina A

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

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

NIH/3T3 Linhagem celular de fibroblastos embrionários de ratos

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 fosfoinositídeo 3-quinase do inglês *phosphoinositide 3-kinase*

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

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

SFB Soro fetal bovino

TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  fator de crescimento de transformação do inglês *transforming growth factor  $\alpha$  e  $\beta$*

ug microgramas

$\mu$ l microlitros

UV Ultravioleta

## Sumário

<b>1. Introdução geral</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Revisão bibliográfica</b> .....	<b>3</b>
2.1 Geral sobre lectinas .....	3
2.2 <i>Bauhinia spp.</i> .....	5
2.3 <i>Bauhinia variegata</i> .....	6
2.4 A lectina da <i>Bauhinia variegata</i> .....	7
2.5 Geral sobre o tecido epitelial .....	7
2.5.1 A cicatrização do tecido epitelial .....	8
2.6 Causas de problemas e doenças de pele .....	11
2.7 Extratos vegetais utilizados na regeneração tecidual .....	12
2.8 Lectinas oriundas de plantas utilizadas na regeneração tecidual .....	12
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>14</b>
3.1 Objetivos gerais .....	14
3.2 Objetivos específicos .....	14
<b>4. Metodologia</b> .....	<b>15</b>
4.1 Purificação da lectina de BvL nativa .....	15
4.1.1 Quantificação da lectina BvL liofilizada .....	15
4.1.2 Teste de hemaglutinação .....	16
4.2 Cultivo celular .....	16
4.3 Ensaio de viabilidade celular (MTT) .....	17
4.4 Ensaio de proliferação celular (EdU) .....	18
4.5 <i>Western blot</i> .....	19
<b>5. Resultados</b> .....	<b>21</b>
5.1 Extração da lectina da <i>Bauhinia variegata</i> .....	21

5.2 Ensaio empregando a linhagem celular NIH/3T3 (fibroblasto embrionário de rato) .....	21
5.2.1 Ensaio EdU .....	24
5.2.2 <i>Western blot</i> para a detecção da expressão da proteína Akt .....	25
5.3 Ensaio empregando a linhagem celular HFF-1 (fibroblasto humano) .....	27
5.3.1 Ensaio de MTT .....	27
5.3.4 Ensaio de EdU .....	28
5.4 Teste de atividade biológica em linhagem celular HaCaT (queratinócito humano) usando o ensaio de MTT .....	29
5.5 Teste de atividade biológica em linhagem celular A-375 (melanoma maligno humano) usando o ensaio de MTT .....	31
<b>6. Discussão dos resultados.....</b>	<b>33</b>
<b>7. Conclusões e perspectivas.....</b>	<b>38</b>
<b>8. Referências bibliográficas.....</b>	<b>39</b>

## 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 anti-oxidante, anticâncer (FIGUEIRÔA et al., 2017; POIROUX et al., 2017; ESTRADA-MARTINEZ et al., 2017), 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; ESTRADA-MARTINEZ et al., 2017; ZHU 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 (INGALE & HIVRALE, 2013; FIGUEIRÔA et al., 2017; ZHU et al., 2017). Devido a essas características, a *B. variegata* tem sido estudada por diversos grupos de pesquisa (MISHRA, A. & SHARMA. 2013; NASCIMENTO-NETO et al., 2011; REIS et al., 2013; FIGUEIRÔA et al., 2017; 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. Por isso, é de extrema importância mantê-la saudável (DAWID-PAC et al., 2013; TABASSUM & HAMDANI, 2014).

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 diversos fatores de crescimento que estimulam a proliferação celular e, conseqüentemente, o tecido lesado é regenerado (CARVALHO et al., 2002; THOMAS et al., 2007; DAWID-PAC et al., 2013; ANTHONY et al., 2016; 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 em cultivos celulares de linhagens de fibroblastos murinos (NIH/3T3), fibroblastos humanos (HFF-1), queratinócitos humanos (HaCaT) e melanócitos humanos (A-375).

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1 Geral sobre 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 grupo sanguíneos ABO. Contudo, desde 1954, suas características seguiram sendo exploradas e hoje há uma infinita gama de funções e aplicações destas proteínas (TEIXEIRA et al., 2012). 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, comunicação celular, defesa de invasores, fertilização, desenvolvimento celular, infecções de parasitas, metástases de tumores, inflamações, entre outras (TEIXEIRA et al., 2012; INGALE & HIVRALE, 2013; FIGUEIRÔA et al., 2017).

Lectinas são universalmente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em todos os organismos eucarióticos, e em diversas espécies de bactérias e vírus. 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 (LAM, 2011). Essa ligação resulta principalmente na aglutinação de células e na precipitação dos glicoconjugados. 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). 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 contem um ou mais domínio de ligação a carboidratos e esses domínios não são necessariamente relacionados (JIANG et al., 2010; SHARON & LIS, 2003).

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). 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). 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 (JIANG et al., 2010).

A maioria das lectinas contém dois ou mais sítios de ligação a carboidratos. Conseqüentemente, 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 citado 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; LAGARDA-DIAZ et al., 2017), 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 (FIGUEIRÔA et al., 2017; POIROUX et al., 2017; ESTRADA-MARTINEZ et al., 2017) 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).

## **2.2 *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).

### **2.3 *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). 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 contem 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; também tem atividade em muitas doenças inflamatórias, é antibacteriana, antioxidante, e tem atividade anticancerígena (INGALE & HIVRALE, 2013; FIGUEIRÔA et al., 2017; ZHU et al., 2017). 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).

#### **2.4 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 (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).

Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa tem demonstrado a capacidade da BvL de induzir a cicatrização de feridas *in vivo* e também *in vitro* com o cultivo 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.

#### **2.5 Geral sobre 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 colagenases, 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).

### **2.5.1 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 (TGF- $\beta$ ), 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- $\beta$  pelos queratinócitos promove a diferenciação dos fibroblastos, por exemplo, em miofibroblastos através da proliferação da  $\alpha$ -SMA (alpha-smooth muscle actin) que induz essa diferenciação (SHEPHARD et al., 2004). 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 (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- $\alpha$  e 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 rearranjando 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. Alguns exemplos são 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). 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 conseqüentemente 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.).

## **2.6 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 *Staphylococci* e *Streptococi*, podem infectar diversas camadas da pele chegando até nas mais profundas e podem se espalhar pelo corpo. Infecções fúngicas são invasões superficiais na pele. Já as infecções por parasitas, que podem ocorrer após a exposição do organismo em questão, para o indivíduo, como é o caso dos piolhos (TABASSUM & HAMDANI, 2014).

Ainda 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. Tumores e cânceres crescem na pele quando ela começa a se multiplicar mais do que o normal, e a maior parte dos casos é devido à exposição ao sol e aos raios ultravioletas. 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).

## **2.7 Extratos naturais utilizados na regeneração tecidual**

As medicações convencionais mais utilizadas para tratar estes problemas são os antibacterianos, antralina, agentes antifúngicos, agentes virais, peróxido de benzoíla, corticoides, retinóides, ácido salicílico e imunossupressores (TABASSUM & HAMDANI, 2014). Entretanto, drogas naturais podem ser muito mais benéficas no tratamento destas enfermidades por diversos motivos. Elas têm sido utilizadas desde o primórdio no tratamento de diversas doenças, inclusive as de pele, pois são uma fonte natural e possuem infinitas propriedades biológicas. Algumas dessas razões são porque elas vêm apresentando menos efeitos colaterais nos pacientes tratados e mais tolerância por seus organismos, além de ser mais acessível para toda a população. É um composto natural, e muitas vezes mais barato de obter a matéria prima para medicamentos e tratamentos ao invés de produzir moléculas e produtos sintéticos (TABASSUM & HAMDANI, 2014).

Antigamente, essas fontes naturais de medicamentos eram majoritariamente utilizados na forma de chás, inalados, ou colocados em atrito com a região do corpo que estivesse precisando de cura. Atualmente, muitas dessas fontes naturais estão sendo produzidas em larga escala por empresas, como comprimidos, líquidos, injeções e até mesmo chás. Os extratos vegetais is comuns encontrados na literatura com maior aplicação em problema de pele são os seguintes: *Achyranthes aspera*, *Allium cepa*, *Allium sativum*, *Aloe vera*, a flor da *Calendula officinalis*, *Camellia sinensis*, *Echinacea angustifolia* e *Echinaceae purpúrea*, *Matricaria chamomile* (TABASSUM & HAMDANI, 2014).

## **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 vulgare*, 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 em cultivos celulares de linhagens de fibroblastos murinos (NIH/3T3), fibroblastos humanos (HFF-1), 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* em diversas linhagens celulares envolvidas na proliferação celular epidérmica.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Avaliar a atividade da lectina de *B. variegata* na indução de proliferação celular em linhagens de fibroblastos (HFF-1 e NIH/3T3) e queratinócitos (HaCaT).

Avaliar a indução da lectina BvL na proliferação em células de melanoma maligno (A-375).

Avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular pelo ensaio de MTT.

Avaliação da proliferação celular pelo ensaio de EdU .

Investigação do mecanismo de ação dessa proteína nas células empregadas pela técnica de *Western Blot*.

## 4. Metodologia

### 4.1 Purificação da lectina de BvL nativa

Sementes de *B. variegata* foram descascadas, trituradas para a obtenção da lectina denominada 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 Quantificação da lectina BvL 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 BSA (PIERCE™ 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 BSA, os padrões foram diluídos para a obtenção das seguintes concentrações de proteínas (5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg) 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.

#### **4.1.2 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 suspensos 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 compradas 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 CO<sub>2</sub>.

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 a BvL. 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 e 6 poços (TTP- Techno Plastic Products AG) e incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. 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 BvL 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 BvL 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), Concanavalina A (ConA) e meio de cultivo. Os fibroblastos também receberam como controle o tratamento com as lectinas previamente incubadas com 200 mM de D-lactose. As células foram semeadas em placas

de 96 poços na densidade de  $7 \times 10^3$  (NIH/3T3 e A-375) e  $1 \times 10^4$  (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 CO<sub>2</sub>. 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 BvL por 48 horas e 72 horas, respectivamente. As células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de  $7 \times 10^3$  (NIH/3T3) e  $1 \times 10^4$  (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  $2 \times 10^5$  e  $5 \times 10^5$  e incubadas na presença de BvL por 30 horas e então, incubadas mais 18 horas na presença de 2 µM. 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 µg/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 v11(450/40nm) e v11 (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 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 µg 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.

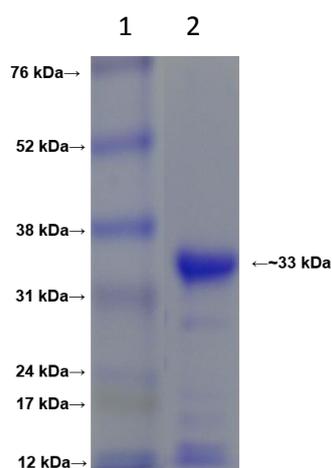
Tabela 1 - Anticorpos usados no ensaio de *Western blot*.

Sigla	Descrição	Diluição	Fornecedor
<b>Pan Akt</b>	Anticorpo IgG monoclonal de coelho que detecta os níveis endógenos da proteína AKT total.	1:10.000	Cell Signaling Technology®
<b>Pan Actin</b>	Anticorpo IgG monoclonal de coelho que detecta resíduos C-terminais da proteína $\beta$ -actina.	1:10.000	Cell Signaling Technology®
<b>Anti Rabbit IgG</b>	Anticorpo igG monoclonal de cabra anti IgG de coelho conjugado com <i>Horseradish Peroxidase</i> (HRP).	1:20.000	Cell Signaling Technology®

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Extração da lectina da *Bauhinia variegata*

Após as etapas de purificação, a BvL nativa foi obtida de forma homogênea na massa molecular esperada (Figura 1). Após a liofilização, o pó obtido foi pesado e a presença da lectina foi confirmada através da atividade biológica da mesma 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.

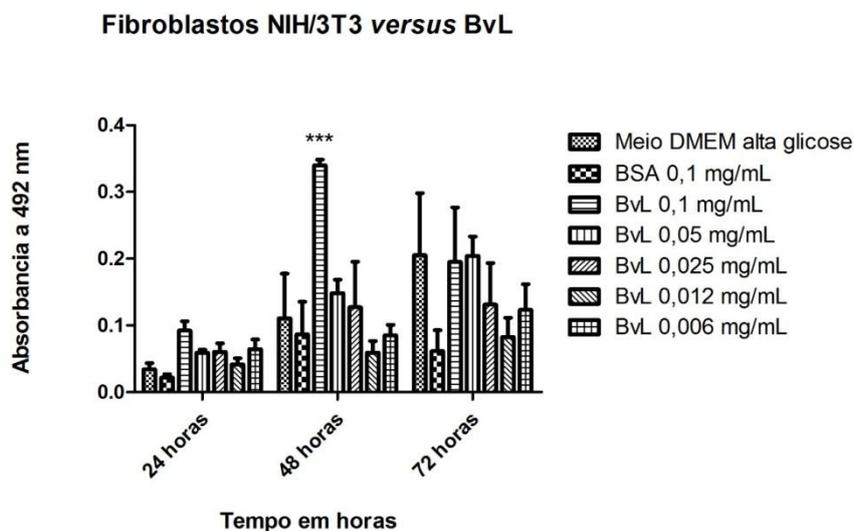


**Figura 1:** Gel SDS-PAGE 15%. 1- BvL nativa. 2- Marcador proteico de massa molecular *full range rainbow* (G&E).

### 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 BvL 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

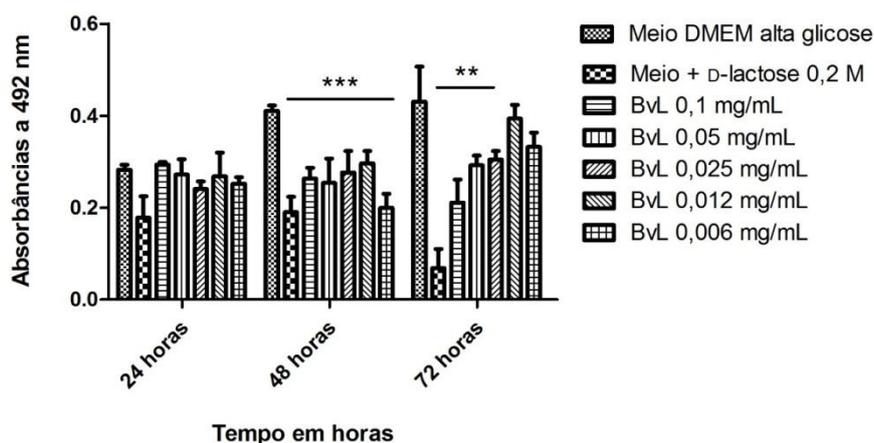
fornecer nutrientes para proliferação celular. O tratamento por 48 horas com BvL 0,1 mg/mL foi significativamente maior ( $p \leq 0,001$ ) que os controles (meio DMEM *alta glicose* e BSA 0,1 mg/ml) (Figuras 2 e 3). Além disso, a variável tempo possui o mesmo efeito para todos os tratamentos ( $p \leq 0,01$ ) e afeta os resultados obtidos ( $p \leq 0,001$ ).



**Figuras 2:** Ensaio de MTT em fibroblastos NIH/3T3 após o tratamento com BvL. Os resultados são expressos em intensidade de absorvância 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*, \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

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 BvL 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

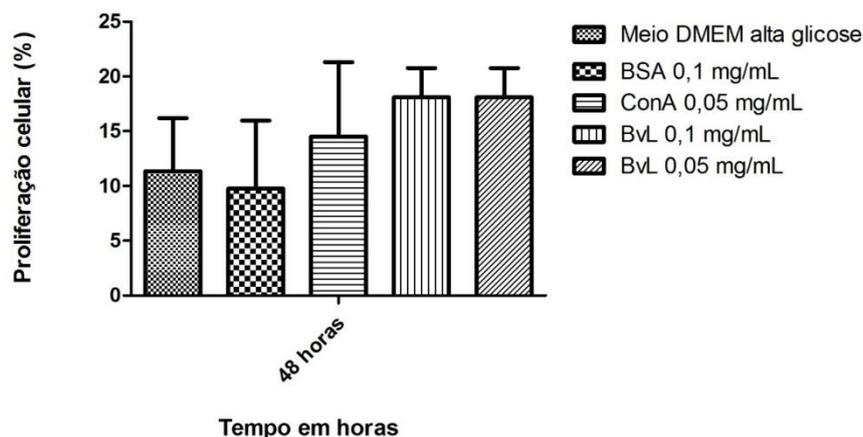


**Figuras 3:** Ensaio de MTT em fibroblastos NIH/3T3 após o tratamento com BvL inibida. Os resultados são expressos em intensidade de absorvância a 492 nm e percentual de proliferação celular, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 10% SFB e D-lactose 0,2 M como controles negativos (*two 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  $\mu\text{M}$  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 4:** 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  $\mu$ M de EdU por 18 horas após 30 horas de tratamento com a BvL, em duas diferentes concentrações iniciais de fibroblastos ( $5 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$ ) 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%).

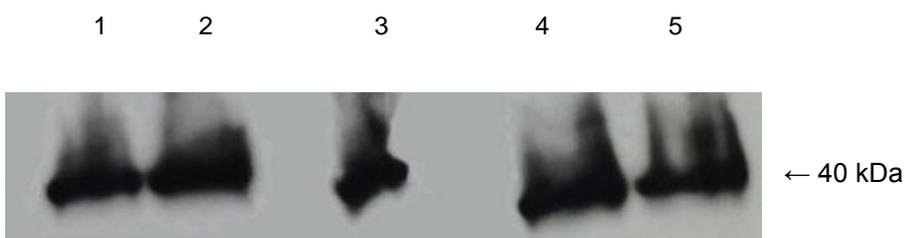
Tabela 2 - Ensaio de EdU na linhagem NIH/3T3 em diferentes concentrações celulares iniciais e em incubação de 18 horas com EdU e 48 horas de tratamento.

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

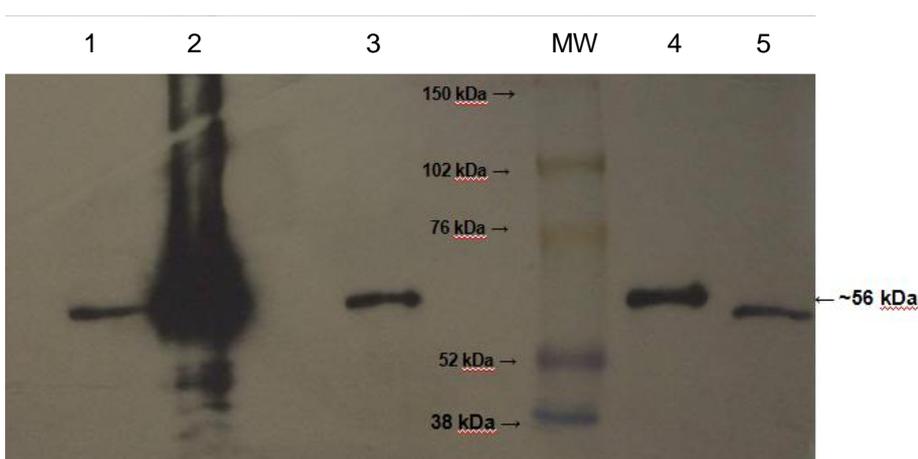
\* placas de 6 poços.

### 5.2.2 *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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 5:** *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.



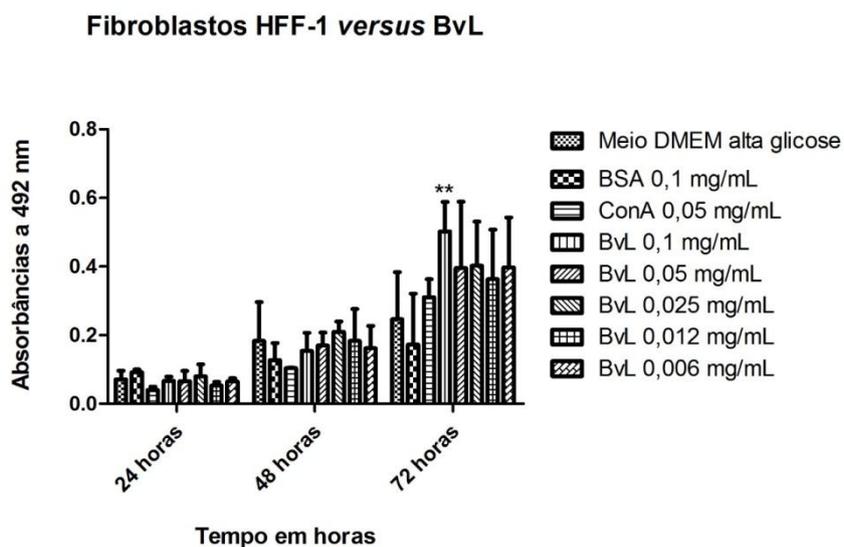
**Figura 6:** *Western blot* empregando anticorpo Pan-AkT total nos cultivos celulares de fibroblastos NIH/3T3 tratadas por 48 horas com BvL. Coluna 1: BSA 0,1 mg/ml; coluna 2: ConA 0,05 mg/ml; coluna 3: Meio DMEM alta glicose; coluna 4: BVL 0,05 mg/ml; coluna 5: BVL 0,1 mg/ml; MW: marcador proteico de massa molecular *full range rainbow* (G&E).

### 5.3 Linhagem celular HFF-1 (fibroblasto humano)

#### 5.3.1 Ensaio de MTT

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 0,1 mg/mL foi significativamente maior ( $p \leq 0,01$ ) que os 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).

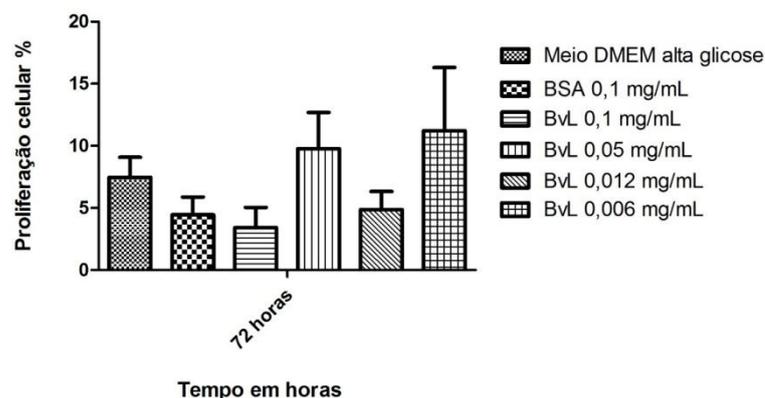


**Figura 7:** Ensaio de MTT em fibroblastos HFF-1 após o tratamento com BvL. Os resultados são expressos em intensidade de absorvância a 492 nm e percentual de proliferação celular, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 10% SFB e BSA 0,1 mg/mL e ConA 0,05 mg/mL como controles (*two way ANOVA*,  $**p \leq 0,01$ ).

### 5.3.2 Ensaio EdU

Realizamos o ensaio incubando 10  $\mu$ M de EdU por 2 horas após 72 horas de tratamento com a BvL, em todas as concentrações utilizadas no ensaio de MTT (Figura 11). Entretanto, os grupos tratados com BvL não apresentaram diferença significativa em relação aos controles.

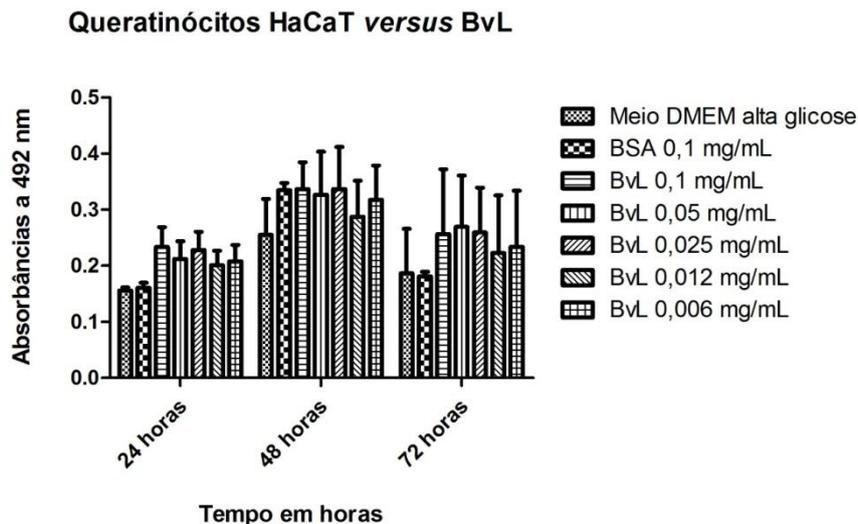
### Proliferação celular HFF-1 versus BvL ensaio EdU



**Figura 8:** 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 Teste de atividade biológica em linhagem celular HaCaT (queratinócito humano) usando ensaio de MTT

O processo de regeneração de feridas envolve outros tipos 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 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 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).

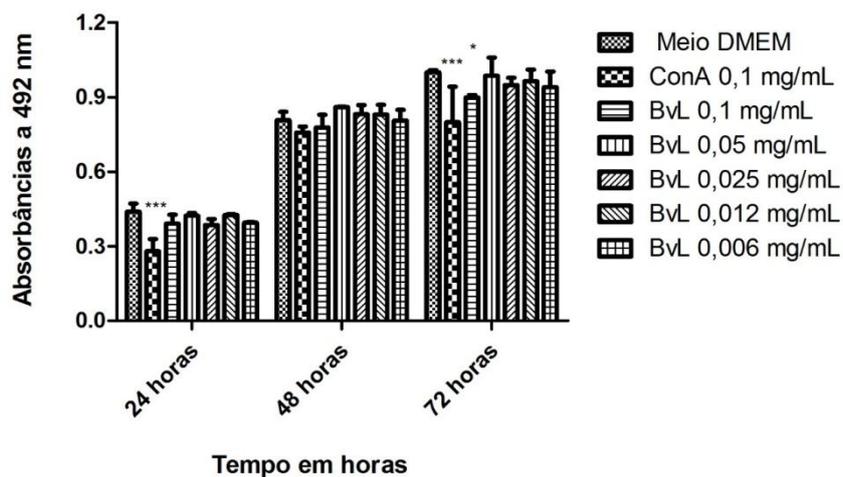


**Figura 9:** Ensaio de MTT em queratinócitos HaCaT após o tratamento com BvL. Os resultados são expressos em intensidade de absorbância a 492 nm e percentual de proliferação celular, empregando células cultivadas em meio DMEM alta glicose 10% SFB e BSA 0,1 mg/mL como controles (*two way ANOVA*, considerando significativos os valores de  $p \leq 0,05$ ).

### 5.5 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 tratadas 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).

### Células de melanoma A-375 versus BvL



**Figura 10:** 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). Quando acontece um rompimento na epiderme, os queratinócitos se tornam ativados e ocorre 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)

Primeiramente, foram realizados testes para avaliar a ação proliferativa através do ensaio de MTT em linhagens celulares de fibroblastos (NIH/3T3 e HFF-1) e queratinócitos (HaCaT). Na linhagem NIH/3T3 o tratamento que mais foi efetivo no tempo de 48 horas com a BvL na concentração de 0,1 mg/mL, onde obtivemos cerca de 300% a mais de proliferação em relação ao grupo controle, com um  $p \leq 0,001$  (Figura 2 e 3). 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 BvL (Figura 9 e 10). A concentração que mostrou mais proliferação nas duas linhagens (0,1 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 (NIH/3T3 e HFF-1) se deve, pois a primeira possui um tempo de geração inferior à segunda linhagem. Na linhagem de queratinócitos (HaCaT) entretanto, não se observou proliferação significativamente maior que os controles (Figura 12 e 13).

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 BvL 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 BvL 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 BvL (Figura 4 e 5). 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  $\beta$ -galactose (REIS et al., 2015; WIESER & OESCH et al., 1988).

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 14 e 15).

Uma análise mais apurada da proliferação celular foi realizada empregando o ensaio de EdU para as linhagens de NIH/3T3 e HFF-1, o qual avalia o percentual de células que proliferaram em um determinado período de tempo (HAMELIK & KRISHAN, 2009). Com a linhagem NIH/3T3 foi realizado duas vezes o experimento, o primeiro incubando as células com EdU por apenas 2 horas e o segundo, incubando as células com EdU por 18 horas, porém ambos os tratamentos com BvL num período de 48 horas. No tempo de contato menor, os níveis de incorporação do EdU no núcleo celular foram baixos, o que poderia significar um período curto de incubação para se observar a proliferação celular e obter-se um resultado significativo. Contudo, é

possível observar que os tratamentos com a BvL nas duas concentrações utilizadas, tem proliferação superior aos controles, entre 10% a 15% mais proliferação que o controle negativo (Figura 6). Por outro lado, no segundo ensaio com o a incubação de EdU estando por 18 horas com a célula, a BvL 0,05 mg/mL mostrou quase o dobro de proliferação em relação ao controle do meio DMEM alta glicose (73,8% e 38,1%, respectivamente) (Tabela 2).

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 muito 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 (Figura 11). 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.

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 BvL 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 8). 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 capazes 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 miofibroblatos, um evento de extrema importância durante a remodelação de tecidos (NASCIMENTO-NETO et al., 2012).

## 7. Conclusão e perspectivas

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

As próximas etapas envolvem a elucidação do mecanismo de ação da BvL nestas células através de análises dos ciclos de proliferação celular, *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.

## 8. Referências Bibliográficas

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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

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.

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<sup>+/-</sup> 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 $\alpha$  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.

LIU, X.; POWLAS, J.; SHI, Y.; OLEKSIJEW, A. X.; SHOEMAKER, A. R.; JONG, R. D.; OLTERS DORF, 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.

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

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.I. (Leguminosae): integration from fossil records and molecular analyses. **BioMed Central Evolutionary Biology**, 2014.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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

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

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.

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.