



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

RAYSSA PERLA MARTINS FRANÇA

EFEITO DA LECTINA DE FOLHAS DE SCHINUS TEREBINTHIFOLIA SOBRE A  
FORMAÇÃO DE VASOS DO SACO VITELÍNICO E MORFOLOGIA DE EMBRIÕES  
DE COTURNIX JAPONICA

Recife, PE  
2019

RAYSSA PERLA MARTINS FRANÇA

EFEITO DA LECTINA DE FOLHAS DE SCHINUS TEREBINTHIFOLIA SOBRE A  
FORMAÇÃO DE VASOS DO SACO VITELÍNICO E MORFOLOGIA DE EMBRIÕES  
DE COTURNIX JAPONICA

Monografia apresentada ao Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

Orientador: Emmanuel Viana Pontual

Recife, PE  
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

F814e

França, Rayssa Perla Martins França  
EFEITO DA LECTINA DE FOLHAS DE SCHINUS TEREBINTHIFOLIA SOBRE A FORMAÇÃO DE  
VASOS DO SACO VITELÍNICO E MORFOLOGIA DE EMBRIÕES DE COTURNIX JAPONICA / Rayssa  
Perla Martins França França. - 2019.  
44 f. : il.

Orientador: Emmanuel Vianna Pontual.  
Inclui referências e apêndice(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2020.

1. Angiogêneses. 2. Aroeira da Praia. 3. Câncer. 4. Lectina. 5. Dimensão Fractal. I. Pontual, Emmanuel  
Vianna, orient. II. Título

CDD 574

---

RAYSSA PERLA MARTINS FRANÇA

EFEITO DA LECTINA DE FOLHAS DE SCHINUS TEREBINTHIFOLIA SOBRE A  
FORMAÇÃO DE VASOS DO SACO VITELÍNICO E MORFOLOGIA DE EMBRIÕES  
DE COTURNIX JAPONICA

Monografia apresentada ao Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

---

Profº Drº Emmanuel Vianna Pontual (Presidente)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / UFRPE

---

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Primeiro Titular)  
Departamento de Bioquímica / UFPE

---

MSC. Welton Aaron de Almeida (Segundo Titular)  
Programa de pós-Graduação em Biociência Animal / UFRPE

---

Msc. Hanna Gracie Inez de Freitas Lima (Terceiro Titular)  
Programa de pós-Graduação em Biociência Animal / UFRPE

---

Msc. Eva Luana Almeida da Silva (Suplente)  
Programa de pós-Graduação em Biociência Animal / UFRPE

Dedico este trabalho aos meus pais e aos meus irmãos, pois eles são o motivo pelo qual cheguei onde estou.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço aos meus pais, Marcos e Patrícia, por me apoiarem a alcançar meus sonhos e me ajudarem nessa jornada de todas as formas possíveis. Pelo amor incondicional, por sempre tentar me mostrar o caminho e por sempre segurar minha mão ao longo da caminhada. Obrigada por tudo, eu não seria nada sem vocês em minha vida. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Rayanne e Renato, que mesmo ocupados com seus próprios afazeres nunca faltou tempo pra mim. Pelos conselhos, pelas dicas, pelas ajudas e especialmente por toda confiança em mim depositada. Por insistirem para que eu seguisse meu sonho sem medo ou vergonha. Eu sempre vou ser eternamente grata a vocês. Obrigada por serem meu alicerce!

Às amigadas de curso, por todo o conhecimento compartilhado e por todas as horas de estudos juntos. Por todas as brincadeiras, as reuniões, os risos e pela amizade. Nunca tive uma turma tão unida quanto a SB1, onde todos estamos focados em buscar um lugar, às vezes o mesmo, no mundo profissional, e mesmo assim, nunca faltava tempo para ajudarmos uns aos outros. Quero agradecer em especial, a Vitor, um presente que a Universidade me deu. Um companheiro de estudo, minha eterna dupla em todos os trabalhos, um amigo. Aos amigos do colégio, de Olinda e de Garanhuns, vocês são muito importantes para mim! Em especial a Bruna, Natan e Pedro, os irmãos que a vida me deu. Eu sou muito grata por ter cada um de vocês em minha vida! Eu sei que sou distante, desculpem-me, mas eu amo cada um de vocês!!

Ao professor Emmanuel, por todo o ensinamento, por ter me aceito e dado um projeto. Por ser um exemplo de pessoa e profissional. O senhor quem abriu a porta que me trouxe até aqui. Serei eternamente grata, professor. Obrigada pelo suporte, desculpa o incômodo. Ao professor Thiago, que me acolheu no BIOPROT e esteve sempre a disposição. A Ardilles e Felipe pelas inúmeras ajudas em meio a correrias de experimentos e prazos, obrigada por todo o apoio!

A todos os laboratórios das federais da RMR, por disponibilizarem equipamentos, conhecimentos e tempo. A todos os integrantes dos Laboratórios de Biofísica Teórica e Experimental Computacional da UFRPE e dos Laboratórios de Bioquímica de Proteínas da UFPE, professores, funcionários e colegas.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pela concessão de suporte financeiro.

A todos que contribuíram, direto ou indiretamente, na construção desse trabalho, na minha formação acadêmica e na minha construção pessoal como pessoa e profissional.

## RESUMO

A angiogênese corresponde ao surgimento de novos vasos a partir de outros preexistentes. Este processo é de grande importância para o desenvolvimento de células tumorais. Folhas de *Schinus terebinthifolia* (aroeira vermelha) expressam uma lectina termoestável e antimicrobiana (SteLL). Este trabalho relata o efeito de SteLL no processo de angiogênese usando como modelo in vivo a membrana do saco vitelínico de embriões de *Coturnix japonica* (codorna japonesa). Análise fractal por contagem por caixas e dimensão de informação indicaram que SteLL a 1,35 mg/mL reduziu a angiogênese na membrana do saco vitelínico de *C. japonica*. A inibição da formação da rede vascular na membrana do saco vitelínico resultou na diminuição do suprimento sanguíneo para os embriões e, conseqüentemente, a área, o perímetro e a porcentagem do comprimento cefálico dos embriões foram significativamente reduzidos no grupo tratado com SteLL, corroborando com a atividade antiangiogênica. Em conclusão, SteLL é um agente antiangiogênico e este resultado estimula investigações futuras sobre a atividade antitumoral desta proteína.

**Palavras-chave:** Angiogênese, aroeira vermelha, cancer, lectina, dimensão fractal.

## ABSTRACT

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

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



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 — Representação esquemática da ligação de uma lectina a carboidratos (A) e superfícies celulares..... 13
- Figura 2 — *Schinus terebenthifolius*. Aspecto geral da planta (A). Infrutescência (B). Inflorescência (C). .... 16
- Figura 3 — Classificação estrutural de lectinas. Representação esquemática de merolectinas (Heveína; PDB: 1Q9B), hololectinas (lectina de *Camptosema pedicelatum* CPL; PDB: 3U4X), quimerolectinas (Ricina; PDB: 2R2X) e superlectinas, (lectina da bactéria *Burkholderia cenocepacia* BC2L-C PDB: 2XR4). .... 18
- Figura 4 — Ilustração da vasculogênese (A; B) e angiogênese (C; D) durante o desenvolvimento inicial. A) A vasculogênese começa na parede do saco vitelínico a medida que as células precursoras mesenquimais se agregam em nós de células (blood islands) por toda a parede do saco vitelínico. As células localizadas na periferia dão origem aos tubos capilares, enquanto as células localizadas no interior se diferenciam em hemangioblastos e finalmente em glóbulos primitivos. Durante a vasculogênese dentro do embrião B) células mesodérmicas adequadas sofrem um processo semelhante de agregação, com diferenciação de células em tubos capilares, mas o processo não envolve a formação de glóbulos primitivos. Com o crescimento contínuo, os tubos capilares se fundem, formando uma rede. As redes de vasos existentes podem crescer através da angiogênese. C) O crescimento por brotação endotelial é retratado. Uma das células endoteliais se torna uma tip cell (célula da ponta) que começa a mirar para o mesênquima circundante. Uma tip cell é selecionada para conduzir/guiar a ponta do vaso em formação na presença de fatores angiogênicos. As células endoteliais adjacentes seguem a tip cell; As células conduzidas mantêm um lúmen de tal forma que um novo vaso brota em outro local do vaso já existente. D) Um modo alternativo de angiogênese é retratado. Isso ocorre em áreas onde pode haver necessidade de um vaso paralelo. Neste caso, o vaso inicial se divide longitudinalmente. As alterações no perfil de uma seção transversal do vaso são representadas na série de imagens em que os recuos na parte superior e inferior do lúmen se tornam progressivamente mais pronunciados, resultando na divisão do vaso original com um único lúmen em 2 vasos, cada um . 21

com seu próprio lúmen. Esse processo é conhecido como  
angiogênese intussusceptiva..... 21

Figura 5 — Codorna adulta.....	22
Figura 6 — Ovos de codorna.....	24
Imagem 1 — “Phytomedicine” .....	26
Tabela 1 — .....	36
Tabela 2 — .....	36

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
MCA	Membrana Corioalantóide
MSV	Membrana do Saco Vitelínico
NaCl	Cloreto de Sódio

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	13
3 OBJETIVOS .....	25
4 ARTIGO .....	26
5 CONCLUSÃO .....	38
6 REFERÊNCIAS .....	39

## 1 INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas que reconhecem carboidratos, amplamente encontradas na natureza, sendo descritas em microrganismos, plantas e animais. A ligação dessas proteínas a glicoconjugados presentes em superfícies celulares resulta em uma gama de propriedades biológicas (DIAS et al., 2015). Lectinas vegetais têm apresentado atividade antitumoral in vivo e in vitro (YAU et al., 2015) e podem atuar de forma seletiva sobre as células cancerosas, sem afetar a viabilidade de células normais (ALBUQUERQUE et al., 2014).

Essa seletividade está relacionada com diferenças nos glicoconjugados de superfície entre células malignamente transformadas e células normais. A atividade antitumoral de lectinas pode estar relacionada com a ação tóxica sobre as células cancerosas via diferentes mecanismos, bem como interferência em condições que favorecem o crescimento do tumor. O potencial anti-câncer da lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* tem sido relacionado com a indução de apoptose e autofagia, bem como efeito anti-angiogênico (LI et al., 2011).

A angiogênese consiste em um processo de neovascularização que tem sido considerado um importante alvo de estratégias farmacológicas anticâncer. Lectinas isoladas de frutos de *Benincasa hispida* e sementes de *Datura innoxia* apresentaram efeito anti-angiogênico por interferir na tubulogênese endotelial em modelo utilizando células de veia umbilical humana (SINGH et al., 2016). A lectina recombinante de *Viscum album* inibiu a formação de tumor, afetando o processo de angiogênese, em ensaio utilizando camundongos que foram inoculados com células de melanoma B16-BL6 (PARK et al., 2001). Exemplos de modelos que permitem avaliar o efeito de moléculas no processo de vascularização são o ensaio de angiogênese utilizando a membrana corioalantóide (MCA) de embriões de galinha e o ensaio de vasculogênese e angiogênese da membrana do saco vitelínico (MSV) de embriões de codorna japonesa (*Coturnix japonica*) (RUGGIERO et al., 2004; SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2014).

*S. terebinthifolius* é uma planta mais conhecida como aroeira da praia encontrada desde Pernambuco até Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul. Essa árvore pertence à família Anacardiaceae e, de acordo com a proposta de 2003 do Grupo de Filogenia das Angiospermas II (APG II), pertence à ordem Sapindales, subclado Eurosídeas II, dentro das Eudicotiledôneas (SOUZA & LORENZI, 2008). Nos dias atuais, a aroeira da praia faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais do SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Não apenas suas folhas, mas também suas cascas e frutos são utilizados na medicina popular como analgésico, antiinflamatório, cicatrizantes e antitérmico (AMORIM & SANTOS, 2003; RIBAS et

al., 2006).

As folhas de *S. terebinthifolius* contêm uma lectina denominada SteLL, capaz de se ligar a quitina e com atividades antibacteriana e antifúngica (GOMES et al., 2013), bem como ação antineoplásica in vitro sobre células de Sarcoma 180 (RAMOS, 2017). Assim, foi feita a avaliação da citotoxicidade in vitro de SteLL contra células cancerosas. Paralelamente, foram feitos estudos que indiquem um potencial antiangiogênico, os quais são relevantes para embasar uma avaliação futura da atividade antitumoral in vivo. Nesse sentido, torna-se necessário uma avaliação do efeito de SteLL na vasculogênese e angiogênese de embriões de *C. japonica*.

Este trabalho realizou uma análise in vivo para observar e determinar o efeito do extrato e de SteLL na vasculogênese e angiogênese na membrana de embriões de *C. japonica*.

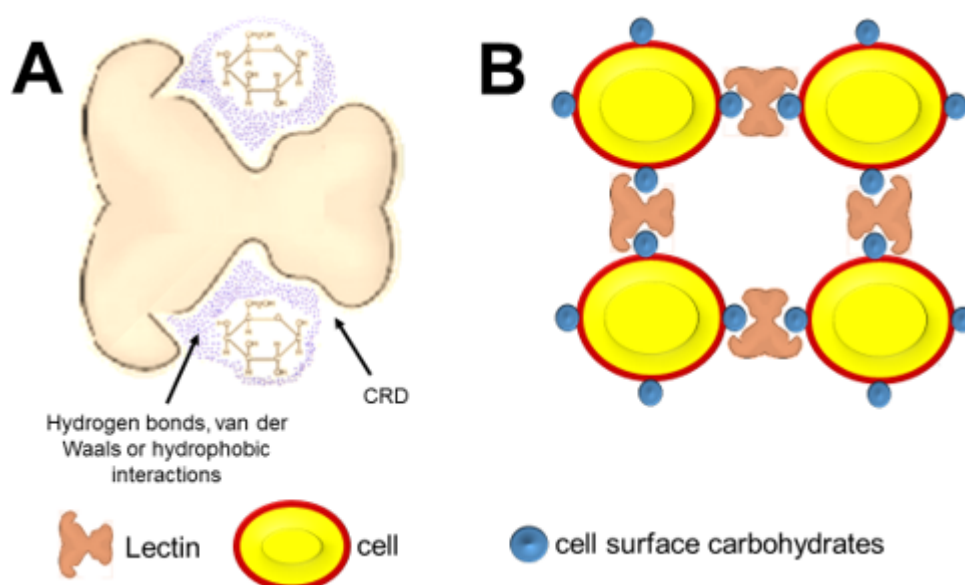
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LECTINA

As lectinas são proteínas que possuem a habilidade de ligar-se seletivamente a glicoconjugados, o que permite que sejam consideradas como ferramentas ótimas para a realização de pesquisas de tipo experimental ou clínico, devido às suas atividades biológicas, tais como reconhecimento de patógenos, citoaglutinação, atividade mitogênica, citotoxicidade, bem como a sua ação antibacteriana, antiproliferativa e indutora da apoptose (LAM; NG, 2010).

Dentro desta mesma perspectiva, Rüdiger e Gabius (2001) apontam que as lectinas de plantas têm sido importantes ferramentas nas áreas de Glicobiologia e Glicobioquímica, pois há uma multiplicidade de eventos que podem ser conhecidos a partir da habilidade destas proteínas de ligar-se a carboidratos, dentre os quais destacam as mudanças que decorrem dos processos fisiológicos e patológicos dados na superfície celular, e a potencialidade destas proteínas como inseticidas, antifúngicos e antinutricionais.

Figura 1 — Representação esquemática da ligação de uma lectina a carboidratos (A) e superfícies celulares.



Fonte: Procópio et al (2017)

Conforme Pereira et al. (2018) o termo 'Lectina' (também conhecido como 'aglutinina', conceito que se refere à habilidade de aglutinar eritrócitos ou outras células) significa escolhido ou selecionado, e foi empregado pela primeira vez pelos pesquisadores William Boyd e Elizabeth Shapleigh em 1954, para designar o grupo

de proteínas com características de seletividade na interação com carboidratos.

Além da especificidade e sua capacidade de ligar-se de forma reversível e não-catalítica a carboidratos, foi observado que a hemaglutinação de uma lectina, a concavalina A, era inibida por carboidratos que possuíam um peso molecular baixo, por consequência, foi sugerido que na hemaglutinação envolvendo lectinas ocorre a ligação destas proteínas com carboidratos presentes na superfície das hemácias (SUMMER, HOWELL, 1936). Nesse sentido, entende-se que as lectinas têm a característica de permitir sua ligação (reversível) a carboidratos, de forma não-catalítica, além de serem de origem não imunológica e de encontrar-se distribuídas na natureza presente em todos os organismos vivos, desde plantas e animais (LAM; NG, 2010), a bactérias e fungos (AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005).

Segundo Lima et al. (2018) os ensaios de hemaglutinação com eritrócitos de animais e humanos são frequentemente utilizados para detectar a presença de lectinas em uma amostra, pois permitem visualizar a capacidade de aglutinação de eritrócitos por lectinas. A respeito dos ensaios de hemaglutinação, Rodrigues et al. (2014) apontam que são realizados a partir de uma diluição seriada de lectina, antes da incubação com os eritrócitos humanos ou de outros animais, tratados enzimaticamente ou quimicamente, com a finalidade de aumentar a sensibilidade das células às moléculas de lectina.

Lima et al. (2018) ainda descreve que a aglutinação de eritrócitos não é suficiente para determinar a presença de lectina, devido a que outros agentes, como no caso dos taninos, lipídeos ou cátions divalentes (quando presentes em altas concentrações) podem também aglutinar eritrócitos, o que exige a realização de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante (AH) com carboidratos. A especificidade dessa proteína é estabelecida em função do monossacarídeo, que em menor concentração, possui uma eficiência maior para inibir sua AH. Contudo, algumas lectinas não têm um monossacarídeo inibidor e são inibidas por oligossacarídeos, glicoproteínas e/ou polissacarídeos.

Finalmente, Lima et al. (2018) referem-se aos métodos de purificação das lectinas, sendo os cromatográficos os mais comuns, tais como cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade, sendo o mais utilizado pertencente a este último grupo, a saber: a cromatografia de afinidade em colunas contendo suportes polissacarídeos ou glicoproteínas.

- *Schinus terebenthifolius Raddi*

*S. terebenthifolius Raddi* é uma árvore nativa da América do Sul (sudeste do Brasil, norte da Argentina e Paraguai) e possui uma ampla distribuição nas regiões



Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil. conhecida por diversos nomes, como aroeira da praia, aroeira pimenteira, aroeira vermelha e aroeira do sertão, dentre outras denominações.

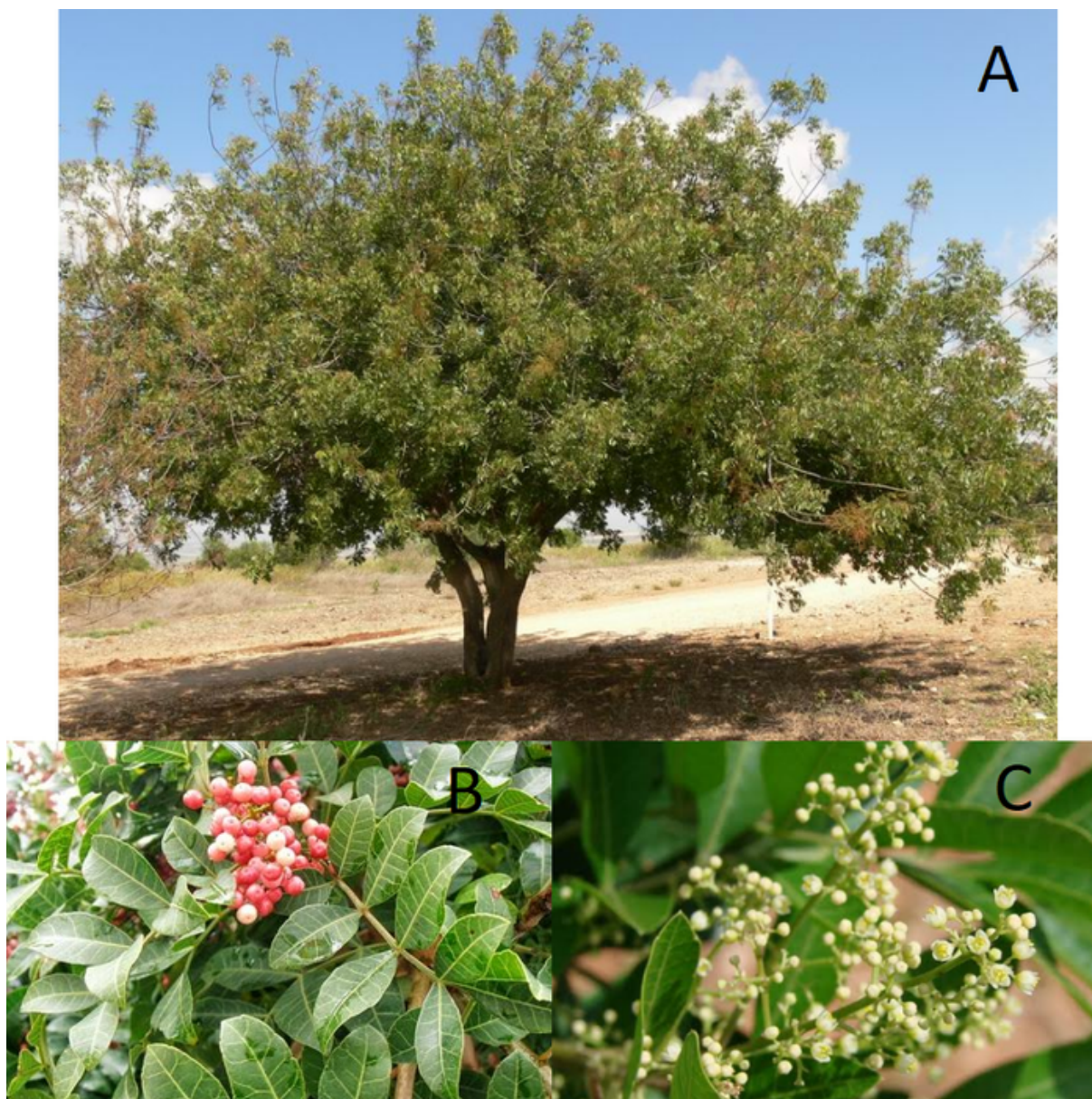
A aroeira da praia pertence a família Anacardiaceae e à ordem Sapindales, subclado Eurosidae II, dentro das Eudicotiledôneas (SOUZA & LORENZI, 2008). De acordo com o Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais (IPEF) essa planta possui um porte de pequeno a médio, podendo atingir de 5 a 10m de altur, com tronco de 30 a 60cm de diâmetro, revestido por uma casca grossa. Sua casca internamente é avermelhada, de textura fibrosa com exudação de terebentina.

Suas folhas apresentam de 9 a 11 foliólos membranáceos, com uma coloração de verde a verde escuro, de ápice agudo e base obtusa. As primeiras três folhas são trifolioladas e apresentam como principal característica para identificação a ráquis com ala estreita entre os pares de folíolos. São fortemente aromáticas, alternadas espiraladas, compostas e imparipinadas.

Suas flores são pequenas, actnomorfas e pentâmeras, com sépalas de formato triangular verde e pétalas brancas e ovais, as quais possuem inflorescência composta do tipo panícula racemosa. Seu fruto é do tipo drupa, de estrutura carnosa e cor avermelhado, as drupas são esféricas, medindo de 4 a 5,5mm de diâmetro, levemente achatada no comprimento. Em cada fruto pode existir uma ou várias sementes reniformes, de polpa oleosa.

Atualmente, a aroeira da praia está listada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesses ao SUS (RENISUS). Sua casca, folhas e frutos são utilizados na medicina popular como analgésico, antitérmico, antisséptico, anti-inflamatório e no tratamento cicatrizante ou como medicação caseira para tratamento de doenças do sistema urinário e do aparelho respiratório e como reparador tecidual de feridas cutâneas. Casca e folhas secas são utilizadas contra febre, cistite, uretrite, diarreia, tosse, bronquite, gripes e inflamações em geral. Sua resina é usada para tratar reumatismo e ínguas, e também serve como purgativo para combater doenças respiratórias (LORENZI, H, 1998; CORSI et al., 1994; CORRÊA, M. P., 1991; RIBAS et al., 2006).

Figura 2 — *Schinus terebenthifolius*. Aspecto geral da planta (A). Infrutescência (B). Inflorescência (C).



Fonte: rioMoros e Pavel Buršík

#### ■ Classificação das lectinas

Ao respeito da classificação das lectinas, Rüdiger e Gabius (2001) sugerem que para que uma proteína seja classificada dentro do grupo das lectinas, deve satisfazer as seguintes exigências: se ligar a um carboidrato; não enquadrar-se na categoria de imunoglobulina; não modificar bioquimicamente os carboidratos aos quais está ligada.

Essa proteína também podem ser classificadas de acordo ao lugar em que

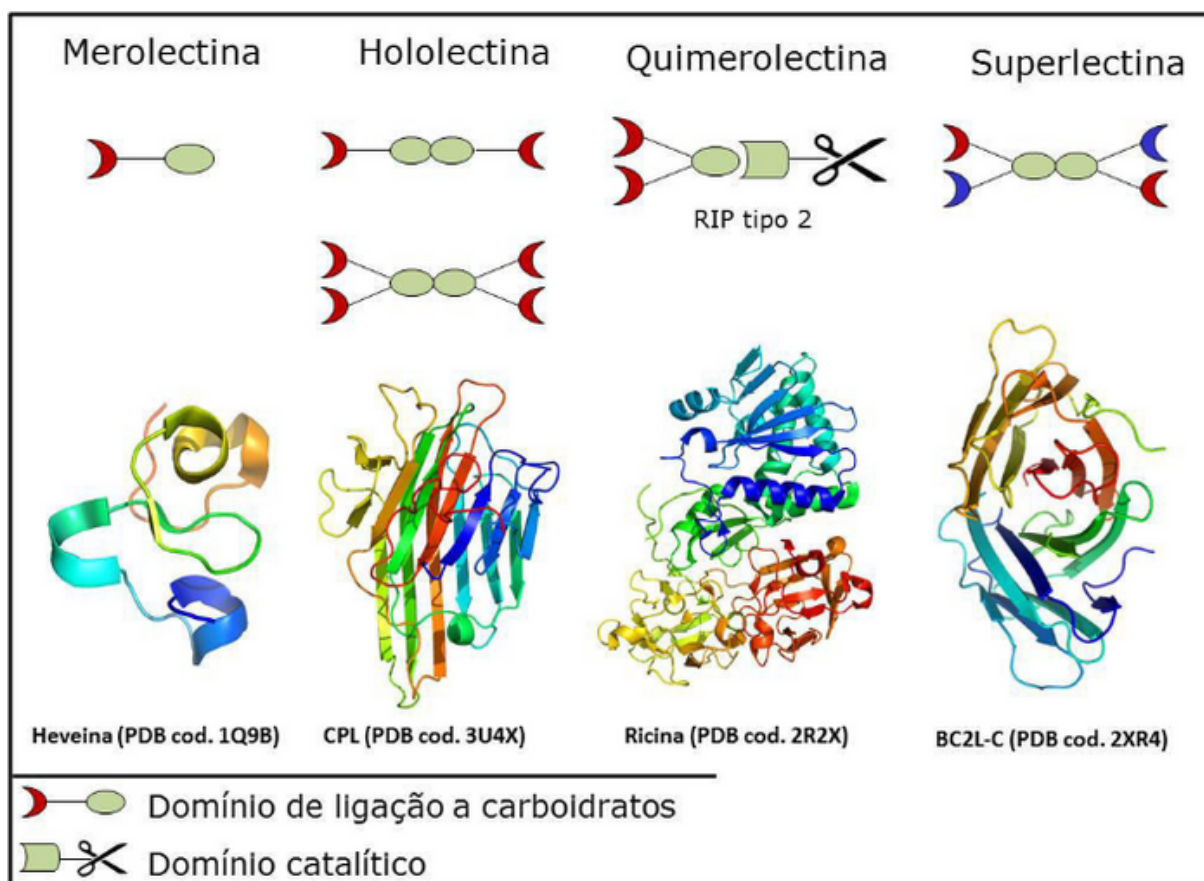
são descritas, a saber: lectinas de microrganismos, lectinas de plantas e lectinas animais. As lectinas de plantas são consideradas heterogêneas quanto às propriedades bioquímicas e físico-químicas, bem como à relação evolucionária, à estrutura molecular e às atividades biológicas (PEREIRA et al., 2018).

Uma das classificações mais comuns das lectinas de plantas é baseada no número de domínios de ligação, sendo de quatro tipos, conforme Maranhão et al. (2014), a saber:

- Merolectinas, formadas por um domínio de ligação a carboidrato (monovalentes);
- Hololectinas, formadas por dois ou mais domínios idênticos ou muito semelhantes;
- Quimerolectinas, formadas por um domínio de ligação a carboidrato e um domínio não relacionado; e
- Superlectinas, formadas por dois sítios de ligação a carboidratos diferentes, que reconhecem carboidratos distintos.

No que se refere às lectinas animais, Sharon e Lis (2004) apontam que de acordo à estrutura molecular elas podem ser classificadas em cinco grupos, a saber: tipo-C (classificadas dentro de dezessete subgrupos), tipo-S ou galectinas, tipo-I ou siglecs, tipo-P ou receptoras de manose-6P e tipo-N.

Figura 3 — Classificação estrutural de lectinas. Representação esquemática de merolectinas (Heveína; PDB: 1Q9B), hololectinas (lectina de *Camptosema pedicelatum* CPL; PDB: 3U4X), quimerolectinas (Ricina; PDB: 2R2X) e superlectinas, (lectina da bactéria *Burkholderia cenocepacia* BC2L-C PDB: 2XR4).



Fonte: C, S Texeira. Determinação da Estrutura Tridimensional de uma Lectina de Sementes de *Canavalia maritima* (Aublet) Complexada Com o Polifenol Antioxidante Resveratrol, 2015, 26 p

## 2.2 VASCULOGÊNESE

A neovascularização é entendida como o processo de crescimento de novos vasos sanguíneos, que pode ocorrer a partir de diversos processos, nos quais estão envolvidos diversos mecanismos celulares, a saber: a proliferação, a migração e a diferenciação (RISAU, 1997).

Esses processos são conforme Tirziu e Simons (2005):

- A vasculogênese, entendida como a formação dos vasos sanguíneos primordiais;
- A angiogênese, entendida como o crescimento de novos capilares, a partir de vasos sanguíneos já existentes; e
- A arteriogênese, entendida como o processo de remodelamento de uma artéria existente.

A autora ainda aponta que esses dois primeiros processos, isto é, vasculogênese e a angiogênese, são os responsáveis pelo desenvolvimento da rede vascular, definida por Kleinman Blei e Gurtner (2005) como uma complexa rede de canais do tipo linfovascular.

Especificamente a vasculogênese é o processo que origina os vasos de grande calibre, a partir dos angioblastos, entendidos como precursores mesodérmicos, esse processo é iniciado precocemente na vida embrionária e desempenha um papel fundamental na organogênese (OLIVEIRA et al., 2010).

Dentro desta mesma perspectiva, Semenza (2007) sugere que durante o processo de vasculogênese os hemangioblastos, células progenitoras endoteliais e hematopoiéticas, migram para os sítios de vascularização. Desta forma, entende-se que os vasos sanguíneos desenvolvem-se a partir da diferenciação *in situ* de células mesodérmicas progenitoras, recrutadas de áreas de mesoderma, sejam adjacentes ao embrião ou originadas por divisão celular local, assim as células endoteliais, isto é, os angioblastos e os hemangioblastos, completam o processo de vascularização (RISAU, 1997).

No entanto, outros estudos demonstraram que a vasculogênese também ocorre em indivíduos adultos, principalmente quando ocorrem processos associados a crescimento tumoral ou cicatrização (SATA; NAGAI, 2004).

### 2.3 ANGIOGÊNESE

A angiogênese é o mecanismo de proliferação de células endoteliais e musculares lisas para a formação de novos vasos sanguíneos, isto é, o processo que segue à vasculogênese permitindo a ramificação e distribuição dos vasos para formar uma rede vascular complexa; este processo mantém-se durante toda a vida do indivíduo (OLIVEIRA et al., 2010).

Em outras palavras, Lebrin et al. (2005) definem a angiogênese como o segundo estágio do desenvolvimento vascular, que envolve a remodelação da rede endotelial primária no sistema circulatório, também primário, onde o Fator de Crescimento Transformante-beta (TGF- $\beta$ ), uma proteína multifuncional envolvida em diversos processos biológicos, modula vários processos em células endoteliais, dentre eles a migração, a proliferação, a adesão, a organização e a composição da matriz extracelular.

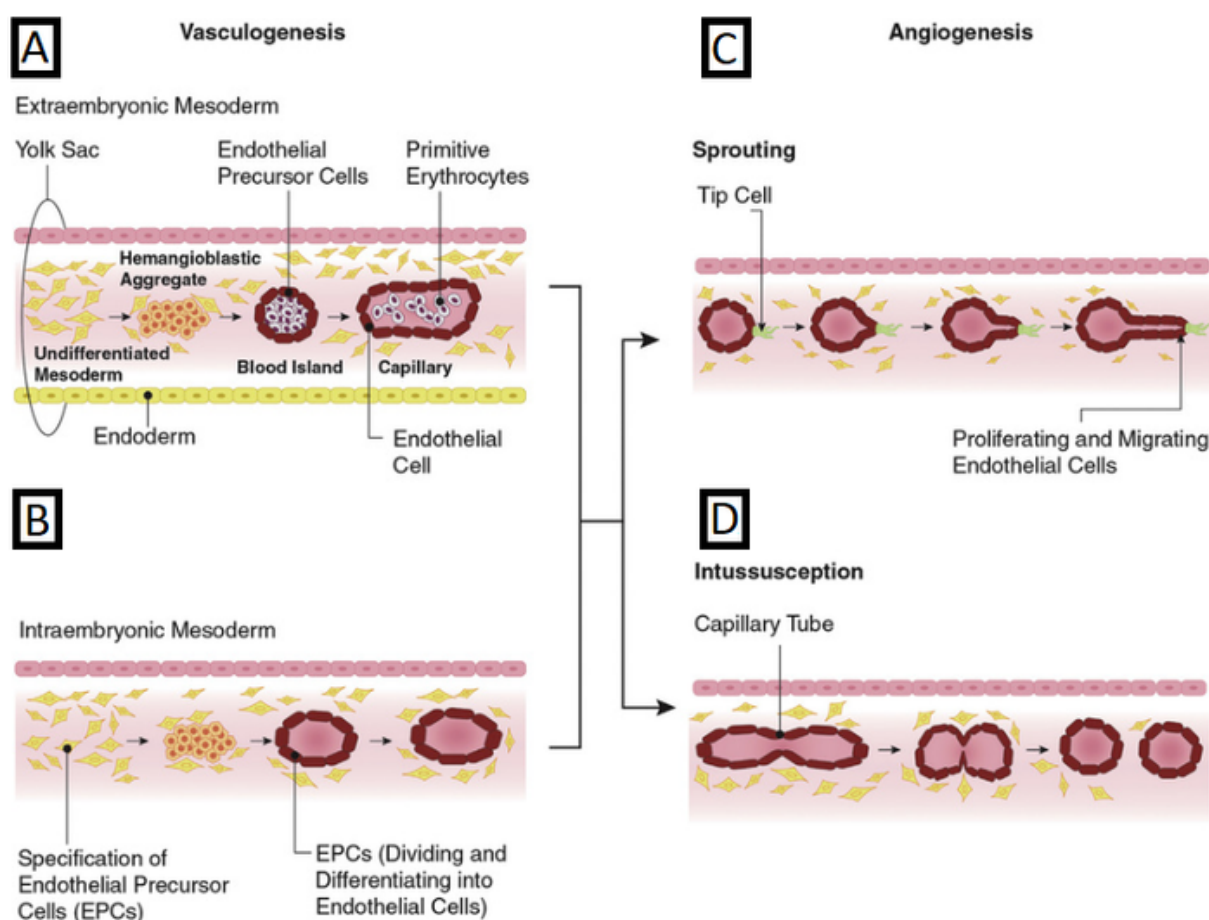
Conforme Ulloa e Domínguez (2005) o termo 'angiogênese' é utilizado pela primeira vez pelo cirurgião britânico John Hunter em 1787, no intuito de descrever o crescimento de novos vasos sanguíneos; posteriormente, em 1935, o processo foi descrito pelo pesquisador Arthur Tremain Hertig.

A angiogênese pode ser descrita a partir de dois mecanismos, a saber: a angiogênese por brotamento e a angiogênese por intussuscepção; a primeira consiste na degradação proteolítica da matriz extracelular, que permite a posterior atração quimiotática e a proliferação dos progenitores endoteliais e de células endoteliais circulantes e a segunda consiste na divisão longitudinal de um único capilar em dois, a partir da formação de um septo (OLIVEIRA et al., 2010).

Neste sentido, Mendonça e Coutinho-Netto (2009) sugerem que na angiogênese a rede vascular primária sofre uma remodelagem que reúne processos de regressão e morte vascular, onde sobrevivem e se ramificam capilares, através de vasos já existentes, que proliferam para viabilizar o crescimento corporal.

Assim, entende-se que durante a formação do embrião de seres humanos esses dois processos de formação vascular, a saber: a vasculogênese e a angiogênese, coexistem, isto é, que existem de forma paralela, posteriormente à formação dos primeiros vasos sanguíneos. (Risau et al., 1988)

Figura 4 — Ilustração da vasculogênese (A; B) e angiogênese (C; D) durante o desenvolvimento inicial. A) A vasculogênese começa na parede do saco vitelínico a medida que as células precursoras mesenquimais se agregam em nós de células (blood islands) por toda a parede do saco vitelínico. As células localizadas na periferia dão origem aos tubos capilares, enquanto as células localizadas no interior se diferenciam em hemangioblastos e finalmente em glóbulos primitivos. Durante a vasculogênese dentro do embrião B) células mesodérmicas adequadas sofrem um processo semelhante de agregação, com diferenciação de células em tubos capilares, mas o processo não envolve a formação de glóbulos primitivos. Com o crescimento contínuo, os tubos capilares se fundem, formando uma rede. As redes de vasos existentes podem crescer através da angiogênese. C) O crescimento por brotação endotelial é retratado. Uma das células endoteliais se torna uma tip cell (célula da ponta) que começa a mirar para o mesênquima circundante. Uma tip cell é selecionada para conduzir/guiar a ponta do vaso em formação na presença de fatores angiogênicos. As células endoteliais adjacentes seguem a tip cell; As células conduzidas mantêm um lúmen de tal forma que um novo vaso brota em outro local do vaso já existente. D) Um modo alternativo de angiogênese é retratado. Isso ocorre em áreas onde pode haver necessidade de um vaso paralelo. Neste caso, o vaso inicial se divide longitudinalmente. As alterações no perfil de uma seção transversal do vaso são representadas na série de imagens em que os recuos na parte superior e inferior do lúmen se tornam progressivamente mais pronunciados, resultando na divisão do vaso original com um único lúmen em 2 vasos, cada um com seu próprio lúmen. Esse processo é conhecido como angiogênese intussusceptiva.



Fonte: DeSesso, John. (2016). Vascular Ontogeny within Selected Thoracoabdominal Organs and the Limbs. *Reproductive Toxicology*. 70. 10.1016/j.reprotox.2016.10.007.

## ■ COTURNIX JAPONICA

*C. japonica*, popularmente conhecido como Codorna, foi trazido ao Brasil na década de 50 por imigrantes italianos e japoneses. É uma ave originária do Japão e parte do Sudeste Asiático. O macho dessa espécie possui uma coloração da cabeça e do pescoço mais contrastante em relação a fêmea. Possuem geralmente uma faixa bege na lateral de sua cabeça. Sua plumagem varia entre tons de bege, marrom e cinza-azulado. Quando adulta, pode chegar a pesar de 120 a 180g e alcançar 15cm a 16cm de tamanho. São animais pertencentes a classe Aves, da família Phasianidae, subfamília Perdicinae e gênero *Coturnix* (Temminck & Schlegel, 1849).

Exemplos de modelos que permitem avaliar o efeito de moléculas no processo de vascularização são o ensaio de angiogênese utilizando a membrana do saco vitelínico (MSV) e de vasculogênese da membrana corioalantóide (MCA) de embriões de codorna japonesa. Uma vez que o sistema vascular é uma rede complexa de estruturas tubulares ramificadas e de tamanhos diferentes, a geometria fractal é uma análise útil para mensuração de estruturas vasculares. Em embriões de aves, a dimensão fractal da rede vascular é crescente à medida que o embrião se desenvolve.

Figura 5 — Codorna adulta.



Fonte: Fotógrafo desconhecido.



O ovo é uma estrutura que possui internamente substâncias imprescindíveis para o desenvolvimento completo do embrião. Seus componentes estruturais são: casca (cutícula, casca, membrana externa da casca, câmara de ar, membrana interna da casca), clara ou albume (ligamentos de albume, calazas, câmara calazífera, clara fina interna, clara de média espessura, clara fina externa) e o óvulo, popularmente conhecido como "gema" (GILBERT, 1988).

Após a fecundação do ovo, no decorrer da formação do embrião a gastrulação é necessária, assim como o surgimento dos anexos embrionários, do qual faz parte a membrana corioalantóide (MCA). Essa membrana se forma com a fusão do epitélio ectodermal com o epitélio endodermal e é responsável pelas trocas gasosas entre os poros da casca e sua rede de capilares subjacentes (DRIMITROPOULOU et al., 1998; GABRIELLI; ACCILI, 2010).

A membrana corioalantóide de codorna têm sido utilizada em ensaios para a análise dos mecanismos da angiogênese normal e patológica, pois a MCA se mostra um ótimo modelo para experimentos na pesquisa de tumores e também para o estudo da atuação de substâncias promotoras e inibidoras da angiogênese, uma vez que além de ser mais acessível à observação e experimentação, não possuem influências hormonais e metabólicas externas (QUIGLEY, 2008; LARGER et al., 2004).

Figura 6 — Ovos de codorna.



Fonte: Kasynets Olena.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o efeito da lectina de folhas de *S. terebinthifolia* (SteLL) no processo de angiogênese utilizando como modelo embriões de *Coturnix japonica*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se SteLL é capaz de interferir no processo de angiogênese por modelo in vivo utilizando embriões de *C. japonica*.
- Realizar análise morfométrica (área, perímetro e percentual de comprimento cefálico) dos embriões de *C. japonica* tratados com SteLL.

#### 4 ARTIGO

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

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

Imagem 1 — “Phytomedicine”



Fonte: Phytomedicine

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

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

Ardilles Juan Carlos Alves dos Santosa, Victor Felipe da Silva Araújo, Rayssa Perla Martins França, Eva Luana Almeida da Silva, Patrícia Maria Guedes

Paivab, Thiago Henrique Napoleãob, Edbhergue Ventura Lola Costaa, Romildo de Albuquerque Nogueiraa, Emmanuel Viana Pontuala,\*

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

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

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

## **Abstract**

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

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

## **1. Introduction**

Malignant tumors, also referred as neoplasms or, more generically, cancers result from a rapid multiplication of abnormal cells that can then invade adjoining tissues and spread to other organs, causing the metastases. The malignant tumors represents a serious public health concern, since is estimated that 9.6 million of

people died due to the cancer complications in 2018 (WHO, 2018). The cancers with higher incidence are lung and breast tumors, from which were recorded 2.09 million cases around the world, followed by the colorectal cancer with 1.80 million cases. On the other hand, the most common causes of cancer death worldwide are lung and colorectal tumors, responding by 1.76 million and 862 000 deaths in 2018, respectively (WHO, 2018).

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

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

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

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

Embryos of *Coturnix japonica* (Fascianidae), a species popularly known as

Japanese quail, represent interesting models to evaluate antiangiogenic and antivasculogenetic activities, due to the rapid embryonic development, greater practicality of manipulation and ease of visualization of the results. In addition, the use of mathematical models such as fractal analysis may be useful to increase the accuracy of results (Costa et al., 2013). Here, the effect of SteLL on the angiogenesis process using the in vivo model of yolk sac membrane of *C. japonica* embryos is described.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Plant material and lectin isolation*

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

The hemagglutinating activity (HA) of SteLL was determined aiming to verify if its domain of carbohydrate recognition was preserved. The erythrocytes collection as approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Universidade Federal de Pernambuco, UFPE (process 23076.033782/2015-70). The HA assay was performed in microtiter plates according to Procópio et al. (2017), using a suspension (2.5%, v/v) of glutaraldehyde-treated (Bing et al., 1967) rabbit erythrocytes in 0.15 M NaCl. The HA corresponded to the reciprocal of the highest dilution of SteLL able to promote the full agglutination of erythrocytes. The specific HA was defined as the ratio between HA and the protein concentration (mg/mL).

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

The in vivo assays were performed according to Costa et al. (2013), using an incubator (Chocmaster, Paraná, Brazil) assembled at the Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional (LABTEC) of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). The apparatus was used to allow the development of the *C. japonica* embryos under controlled temperature and humidity (37.5 °C and 60%, respectively) at conditions considered proper to the development of the embryos

(Mazzonelli & Led, 1960; Marques, 1994). The temperature was controlled through a resistance monitored by a thermostat and measured through a thermometer coupled to the incubator.

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

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

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

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



### 2.2.1.1. *Box Counting dimension method*

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

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

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

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

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

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

After dissecting, the embryos of *C. japonica* were immediately weighed and the percentage of cephalic length was determined using a microscope (Stereomicroscope Optom TIM-2B) with a standard slide for calibration. The percentage of cephalic length (PCL) of each embryo served as a parameter of embryonic morphogenesis, being determined by the total body length based on the segments defined as head flexure, cervical flexure, and caudal axis (DIAS et al.,

2008). This parameter was calculated through the length of the axis of the flexure of the head up to the cervical flexure (CECbCv) divided by the same length (CECbCv) along with the length of the axis of the cervical flexure until the caudal flexure (CECvCd) multiplied by 100.

#### 2.4. *Statistical analysis*

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

### 3. Results and discussion

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

SteLL was efficiently isolated according the previously established protocol, and was able to agglutinate erythrocytes with high specific hemagglutinating activity (18,616) and a purification factor of 46.6. These data corroborate with that reported by Gomes et al. (2013) and Procópio et al. (2017). Since the lectin domain of SteLL was active, we investigated its antiangiogenic activity.

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

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

tumor, which are required for the proliferation of cancer cells and metastasis formation (Ronca et al., 2017).

The lectin from *P. fistulosus* fruit also showed a promising cytotoxic effect against multiple cancer cell lines, reduced the activity of metalloproteinases (MMP-2 & MMP-9) and inhibited in vivo the tumor growth in EAC bearing mice (Shivamadhu et al., 2017). The mannose binding lectin from *Remusatia vivipara* tuber, similarly to described here for SteLL, inhibited the development of vascularization of chorioallantoid membrane from chicken eggs, as well as reduced the density of neoformed vessels (Sindhura et al., 2017).

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

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

### **Acknowledgements**

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

### **References**

**A. C. Kunicki, L. S. Araújo, F. B. Sá, B. Stosic, C. T. F. Barbosa, R. A. Nogueira, A fractal analysis of retinal vessel patterns in ophthalmically normal dogs, *Veterinary Ophthalmology*. 11 (2008) 2-6.**

A. L. Matsuo, C. R. Figueiredo, D. C. Arruda, F. V. Pereira, J. A.B. Scutti, M. H. Massaoka, L. R. Travassos, P. Sartorelli, J. H. Lago,  $\alpha$ -Pinene isolated from *Schinus*

*terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411 (2011) 449-454.

B. R. Sindhura, P. Hedge, V. B. Chachadi, S. R. Inamdar, B. M. Swamy, High mannose N-glycan binding lectin from *Remusatia vivipara* (RVL) limits cell growth, motility and invasiveness of human breast cancer cells, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93 (2017) 654-665.

D. Marques, *Fundamentos básicos de incubação industrial*. 2º ed. São Paulo: Casp S/A Indústria e Comércio, (1994) 143.

D.H. Bing, J.G.M. Weyand, A. B. Stavitsky, Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124 (1967) 1166–1170.

E. G. Mejia, V. I. Prisecaru, Lectinas bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 45 (2005) 425-445.

E. V. L. Costa, G. C. Jimenez, C. T. F. Barbosa, R. A. Nogueira, Fractal analysis of extra-embryonic vascularization in japanese quail embryos exposed to extremely low frequency magnetic fields, *Bioelectromagnetics*. 34 (2013) 114-121.

F.S. Gomes, T.F. Procópio, T.H. Napoleão, L.C.B.B. Coelho, P.M.G. Paiva, Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf, *Journal of Applied Microbiology*, 114 (2013) 672-679.

J. M. Mazzone, J. E. Led. *Técnica y construcción de incubadoras*. Buenos Aires: Editora Hobby, C. E I., (1960) 139p.

L. E. Castanheira, D. S. Lopes, S. N. C. Gimenes, S. R. Deconte, B. A. Ferreira, P. T. Alves, L. R. G. Filho, T. C. Tomiosso, R. S. Rodrigues, K. A. G. Yoneyama, F. A. Araújo, V. M. Rodrigues, Angiogenic effects of BpLec, a C-type lectin isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102 (2017) 153-161.

L. M. Kirchner, S. P. Schmidt, B. S. Gruber, Quantitation of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane model using fractal analysis. *Microvascular Research*, 54 (1996) 2-14.

M. C. Shivamadhur, B. K. Srinivas, S. Jayarama, A. C. Sharada, Anti-cancer and anti-angiogenic effects of partially purified lectin from *Praecitrullus fistulosus* fruit on in vitro and in vivo model, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96 (2017) 1299-1309.

N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress, *Endocrine Reviews*, 25 (2004) 581-611.

National Cancer Institute. Cancer Fact sheet. Updated April 2, 2018. (2018).

O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin-Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.

P. F. Dias, J. M. Siqueira Junior, M. Maraschin, A. G. Ferreira, A. R. Gagliardi, R. M. Rieiro-do-valle, A polysaccharide isolated from the brown seaweed *sargassumstenophyllum* exerts antivasculogenic effects evidenced by modified morphogenesis, *Microvascular Research*, 75 (2008) 34-44.

P. J. Duarte Neto, Análise Multivariada da Forma do Otólito Sagita para Discriminação de Estoques de Dourado, *coryphaenahippurus* (pisces: coryphaenidae), no nordeste do Brasil. 2005. 42p. Tese (Mestrado em Biometria) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

R. Ronca, M. Benkheil, S. Mitola, S. Stuyf, S. Liekens, Tumor angiogenesis revisited: Regulators and clinical implications. *Medicinal Research Reviews*, 37 (2017) 1231-1274.

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

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

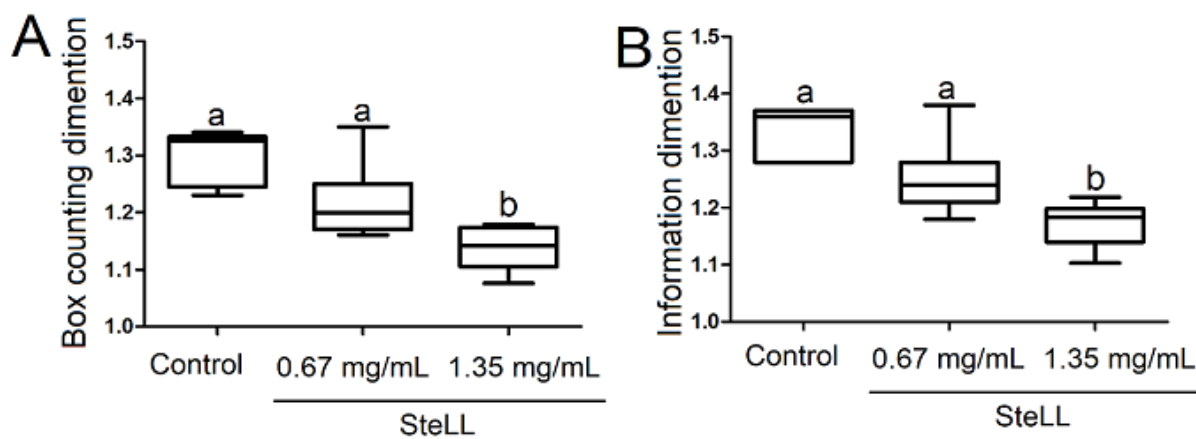
Z. Zhang, S. Ji, B. Zhang, J. Liu, Y. Qin, J. Xu, X. Yu, Role of angiogenesis in pancreatic cancer biology and therapy, *Biomedicina & Pharmacotherapy*, 108 (2018) 1135-1140.

### Figure captions

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

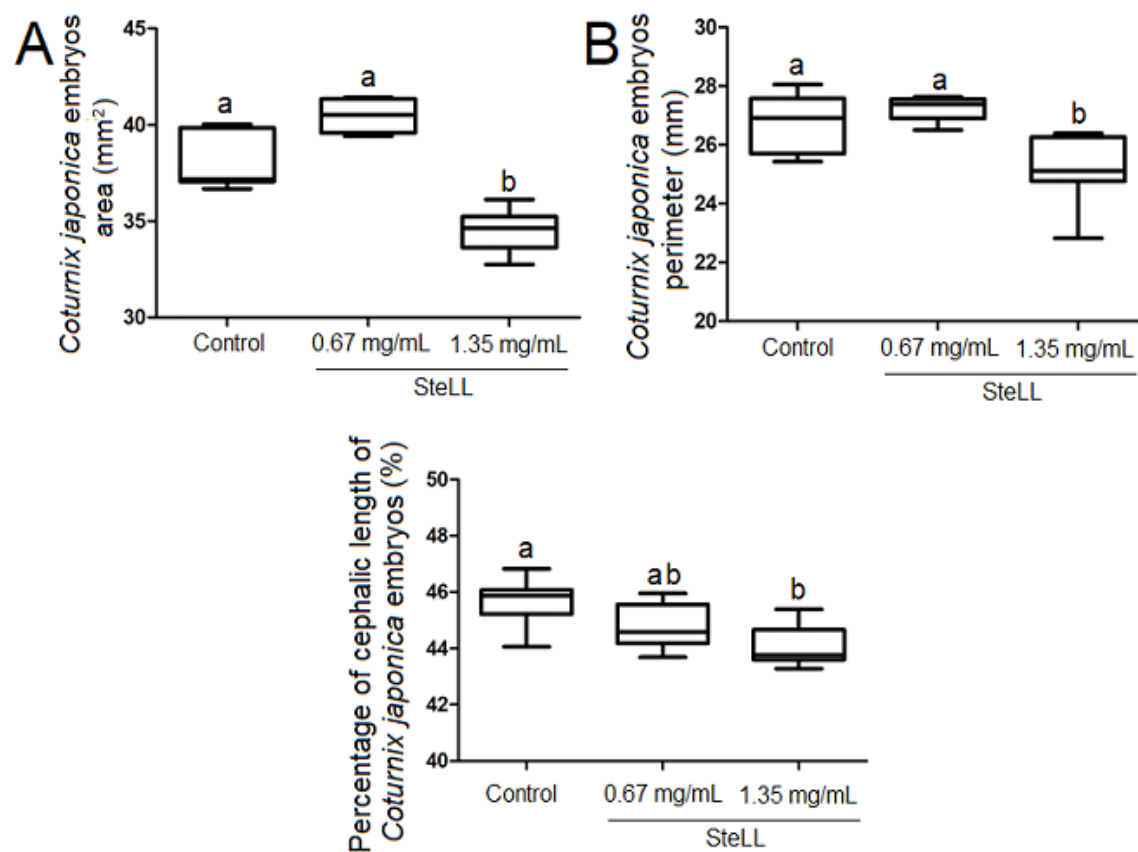
**Figure 2.** Effect of the *Schinus terebinthifolia* lectin (SteLL) on the development of *Coturnix japonica*. Embryos area (A), perimeter (B) and percentage of cephalic length (C). The statistical treatment used the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc multiple-comparison test. The significance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

Tabela 1 —



Fonte:

Tabela 2 —



Fonte:



## 5 CONCLUSÃO

- SteLL apresentou efeito antiangiogênico pelo modelo in vivo utilizando embriões de *C. japonica*.
- Houve redução de crescimento vascular da MSV, conforme constatado pela redução das dimensões fractais.
- Os resultados estimulam estudos relacionados ao potencial antitumoral da lectina, uma vez que a ação antiangiogênica foi corroborada pelo fato de que a lectina alterou os parâmetros morfométricos (área, perímetro e percentual de comprimento cefálico) dos embriões, assegurando que houve redução no suprimento de sangue, devido à diminuição na formação da rede vascular do saco vitelínico dos ovos de *C. japonica*.
- As atividades imunomoduladora e antiangiogênica de SteLL estimulam futuras investigações desta lectina como um agente terapêutico para atuar em condições patológicas que envolvam os processos de inflamação e angiogênese, tais como o câncer.



## 6 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, L.P. et al. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**, v. 138, p. 23-27, 2014.

AMBROSI, N.; CAMERON, N.R.; DAVIS, B.G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic Biomolecular Chemistry**, v. 3, p. 1593-1608, 2005.

ASSIS, A.M. **Alterações moleculares nos genes da activina (Activin receptor like kinase-1 ALK-1) e endoglina (ENG) em Telangiectasia Hemorrágica Hereditária dos tipos 1 e 2**. 2007. 92 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

BACKES, A. **Estudos de métodos de análise de complexidade em imagens**. Tese (Doutorado em Ciências de Computação e Matemática Computacional) – ICMC/USP, São Paulo, 2010.

DIAS, P.F. **Modulação da vasculogênese, angiogênese e de desenvolvimento tumoral por derivados de *Sargassum stenophyllum* (PHAEOPHYCEAE)**. 2005. 162 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

DIAS, P.F. et al. A polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* exerts antivasculogenic effects evidenced by modified morphogenesis. **Microvascular Research**. v. 75, p. 34-44, 2008.

DIAS, R.O. et al. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, p. 519-541, 2015.

DUARTE NETO, P. J. **Análise multivariada da forma do otólito sagita para discriminação de estoques de dourado, *Coryphaena hippurus* (Pisces: Coryphaenidae), no nordeste do Brasil**. Tese (Mestrado em Biometria) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.

FEDER, J. Fractal Dimension. **Fractals**. New York, 1988. Cap. 2.

FERNANDES, M.P. Purificação, caracterização e aplicação biotecnológica

da(s) lectina(s) presente(s) em Bauhinia Membranacea Benth. 2006. 50 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

FERREIRA, C.F. **Origens da vascularização da polpa dentária – estudo in vivo**. 2006. 126 f. Tese (Doutorado em Odontologia- Opção Implantodontia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

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

GOULD, D.J. et al. Multifractal and lacunarity analysis of microvascular morphology and remodeling. **Microcirculation**, v.18, n.2, p.136-151, 2011.

LAM, S.K.; NG, T.B. Lectins: Production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 45-55, 2010.

LEI, H.Y.; CHANG, C.P. Lectin of concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. **Journal of Biomedical Science**, v. 16, artigo 10, 2009.

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

MACEDO, M.; OLIVEIRA, D.; ALBUQUERQUE, M.P.; ALBUQUERQUE, M.P. **Cálculo da Dimensão Fractal - Método de BoxCounting**. Disponível em: <<http://www.cbpf.br/~maysagm/>>. Acesso em 30 de agosto de 2018.

MENEGHELLI, C. **Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico de própolis catarinense na formação de vasos sanguíneos**. 2013. 181 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

NEGRÃO, M.R.B.S. **Mecanismos de modulação da inflamação e angiogênese por polifenóis naturais**. 2011. 144 f. Tese (Doutorado em Metabolismo, Clínica e Experimentação) – Universidade do Porto, Porto, 2011.

NUNES, E.S. **Purificação, caracterização estrutural e funcional da lectina**

**do veneno de Bothrops Leucurus:** Modulação de eventos citotóxicos após a irradiação gamma. 2011. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

OLIVEIRA, L.B.O., et al. **Angiogênese e tumorigênese: onde ocorre a intersecção e as possibilidades de terapias.** VITTALLE, Rio Grande, v. 22, n. 2, p. 11-22, 2010.

OLIVEIRA, M.M. **Extração, isolamento e caracterização parcial de lectinas de folhas de Bauhinia variegata var. “candida”.** 2006. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

PARK, W.B. et al. Inhibition of tumor growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 6, p. 439-447, 2001.

PERVIN, M. et al. **Plant lectins in therapeutic and diagnostic cancer research.** **International Journal of Plant Biology & Research**, v. 3, artigo 1030, 2015.

PROCÓPIO, T.F. et al. Antibacterial lectins: Action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. In: COLLINS, E. (Ed.) **Antibacterials: Synthesis, Properties and Biological Activities.** New York, Nova Science Publishers Inc., 2017, pp. 69-89.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H.J. Plant lectins: occurrence biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, v. 18, n. 8, p. 589-613, ago. 2001.

RUGGIERO, M. et al. 0.2T Magnetic field inhibits angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane. **Bioelectromagnetics**, v. 25, p. 390-396, 2004.

SATA, M.; NAGAI, R. Inflammation, angiogenesis, and endothelial progenitor cells: how do endothelial progenitor cells find their place? **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 36, p. 459-463, 2004.

SEMENZA, G. L. Vasculogenesis, Angiogenesis and Arteriogenesis: Mechanisms of Blood Vessel Formation and Remodeling. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 102, p. 840-847, 2007.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, p. 53-62, 2004.

SILVA, J.E.S. et al. Análise fractal da vascularização da membrana corioalantóide de embriões de codornas japonesas (*Coturnix japonica*). In: ENCONTRO REGIONAL DE MATEMÁTICA APLICADA E COMPUTACIONAL, 8, 2008, Natal. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2008.

SILVA, M.M.S. et al. Crescimento vascular em membrana do saco vitelínico e desenvolvimento embrionário de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) expostas a campo magnético de baixa frequência. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, p. 1003-1009, 2014.

SINGH, R. et al. Two chitotriose-specific lectins show anti-angiogenesis, induces caspase-9-mediated apoptosis and early arrest of pancreatic tumor cell cycle. **PLoS ONE**, v. 11, artigo e0146110, 2016.

STOŠIĆ T.; STOŠIĆ B.D. Multifractal analysis of human retinal vessels. **IEEE Transactions on Medical Imaging**. v.25, p.1101-1107, 2006.

ȚĂLU, Ș. et al. Fractal and lacunarity analysis of human retinal vessel arborisation in normal and amblyopic eyes. **Human & Veterinary Medicine - Bioflux**. v. 5, p.45-51, 2012.

XIMENES, N.C.A. **Purificação e caracterização da lectina da vagem de *Caesalpinia ferrea* (CfePL): Aplicação biológica**. 2004. 53 f. (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

YAU, T. et al. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. **Molecules**, v. 20, p. 3791-3810, 2015.

COSTA, Edbjergue Ventura Lola. **Análise fractal da vascularização da membrana corioalantóide de embriões de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) submetidas ao campo eletromagnético de 60 Hz**. 2010. 101 f. Dissertação (Pós-Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

OLIVEIRA, A. **Espécies de Codorna**. Disponível em <[www.cpt.com.br](http://www.cpt.com.br)>. Acesso em 20 de dezembro de 2019.

McGowan, P.J.K. & Kirwan, G.M. (2020). Japanese Quail (*Coturnix japonica*). In: del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A. & de Juana, E. (eds.). **Handbook of the Birds of the World Alive**. Lynx Edicions, Barcelona. (retrieved from <https://www.hbw.com/node/53433> on 28 Dezembro 2019).