

PATRICK FERNANDES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DA LECTINA EXTRAÍDA DE
Brassica oleracea SOBRE NEUTRÓFILOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586a
2017 Silva, Patrick Fernandes da, 1994-
 Avaliação do efeito imunomodulador da lectina extraída de
 Brassica oleracea sobre neutrófilos / Patrick Fernandes da Silva.
 – Viçosa, MG, 2017.
 35 : il. ; 29 cm.

Orientador: Leandro Licursi de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Migração. 2. Fagocitose. 3. CD62L . 4. Neutrófilos.
5. L-selectina. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Biologia Geral. Mestrado em Biologia Celular e Estrutural.
II. Título.

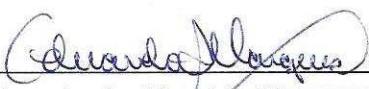
CDD 22. ed. 571.96

PATRICK FERNANDES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DA LECTINA EXTRAÍDA DE
Brassica oleracea SOBRE NEUTRÓFILOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2017.


Eduardo de Almeida Marques da
Silva


Sílvia Almeida Cardoso


Leandro Licursi de Oliveira
(Orientador)

Dedico
À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus toda honra e toda glória por todo trabalho realizado. Agradeço por ter me capacitado para cumprir o meu dever.

Aos meus pais, Eliana da Silva e Silva e Altair Fernandes da Silva por sempre me apoiarem e prezarem tanto por mim. Sem vocês jamais chegaria onde cheguei.

A Universidade Federal de Viçosa pelo suporte técnico, científico e pelo ensino de excelsa qualidade.

Ao meu orientador e grande amigo, professor Leandro Licursi, que foi sempre muito solícito e por sucessivamente, incontáveis vezes me passar cordialmente todo seu conhecimento sempre interessado em fazer de mim bom profissional.

Aos meus amigos, Christiane Eliza Motta Duarte e Wendeo Ferreira da Silveira por toda ajuda e pelas dicas.

Ao núcleo de microscopia e microanálises pela estrutura e seus profissionais por me receberem quase diariamente nos últimos dias do meu trabalho com muito profissionalismo e bom humor.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia e do Laboratório de Imunoparasitologia pelo companheirismo, profissionalismo e apoio.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Glico código	1
1.2 Lectinas.....	1
1.3 Brassica oleracea.....	4
1.4 Neutrófilos	4
2. OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo Geral	8
2.2 Objetivos específicos	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 Animais de experimentação	8
3.2 Obtenção do extrato de Brássica oleracea (BOL)	9
3.3 Eritrócitos	9
3.4 Purificação da lectina de Brassica oleracea (BOL)	9
3.5 Obtenção de neutrófilos humanos	10
3.6 Obtenção de neutrófilos de camundongo.....	11
3.7 Ensaio de migração de neutrófilos para cavidade peritoneal	11
3.8 Quantificação da expressão de CD62L em neutrófilos isolados da cavidade peritoneal e da circulação sanguínea	11
3.9 Dosagem da produção de Espécies reativas de oxigênio por neutrófilos estimulados com BOL.....	12
3.10 Marcação de bactérias com FITC	12
3.11 Ensaio de fagocitose por neutrófilos	13
3.12 Análise estatística	13
4. RESULTADOS	14
4.1 Purificação da lectina	14
16	
4.2 Migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos Balb/c.....	16
4.3 Dosagem de CD62L na superfície de neutrófilos.....	17
4.4 Dosagem da produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos estimulados com BOL.....	20
4.5 Avaliação da taxa de fagocitose.....	21

4.6 Avaliação da taxa de fagocitose em duas populações de neutrófilos CD62L “high” e “low”	22
5. DISCUSSÃO	25
5.1 Efeito de BOL sobre migração de neutrófilos	25
5.2 Efeito de BOL sobre a Fagocitose de neutrófilos	26
6. CONCLUSÕES	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

RESUMO

SILVA, Patrick Fernandes da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Avaliação do efeito imunomodulador da lectina extraída de *Brassica oleracea* sobre neutrófilos.** Orientador: Leandro Licursi de Oliveira.

Neutrófilos são as primeiras células do sistema imune a migrarem para o tecido inflamado e exercem a importante função de fagocitose e eliminação imediata de patógenos invasores. A ativação de neutrófilos é um processo de múltiplos passos e de alta complexidade. A busca por agentes biológicos capazes de modular o processo de ativação, migração, fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é importante pois aumentam a gama de opções para utilização na pesquisa. Nesse trabalho utilizamos a lectina extraída de *Brassica oleracea* (BOL) a fim de avaliar a sua capacidade na modulação da resposta de neutrófilos. Para os ensaios nós purificamos neutrófilos de camundongo tanto do sangue periférico quanto da cavidade peritoneal buscando avaliar sua capacidade migratória, o índice de CD62L na superfície e o índice fagocítico de neutrófilos pré-incubados com BOL. A lectina apresentou diversos efeitos de acordo com a dose utilizada, sendo possível observar o efeito de indução de migração para cavidade peritoneal de camundongos quando utilizada em doses intermediárias (1 µg/mL e 2,5 µg/mL) tanto quanto o efeito de redução de migração quando observada em doses altas (5 µg/mL e 10 µg/mL). O índice de fagocitose também foi avaliado e houve alteração de acordo também com a dose utilizada. As doses mais altas apresentaram efeito de redução na taxa de fagocitose (5 µg/mL e 10 µg/mL) enquanto as outras doses não apresentavam diferença estatística. Com esse trabalho conseguimos observar os efeitos imunomodulatórios sobre neutrófilos de uma lectina ainda muito pouco estudada e que demonstrou ter efeitos sobre a fisiologia de neutrófilos de acordo com a dose escolhida, alterando sua capacidade de migração e fagocitose.

ABSTRACT

SILVA, Patrick Fernandes da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Evaluation of the immunomodulatory effect of lectin extracted from *Brassica oleracea* on neutrophils.** Adviser: Leandro Licursi de Oliveira.

Neutrophils are the first cells of the immune system to migrate into inflamed tissue and they develop the important function of phagocytosis and immediate elimination of invading pathogens. Neutrophil activation is a multi-step and highly complex process. Research on biological agents able to modulate the activation, migration, phagocytosis and production of reactive oxygen species (ROS) are important because they increase the range of options for use in the research. In this work we used the lectin extracted from *Brassica oleracea* (BOL) aiming to evaluate its ability to modulate the neutrophil response. For the tests, we purified mouse neutrophils from the peripheral blood and the peritoneal cavity with the objective to evaluate their migratory capacity, the surface CD62L index and the phagocytic index of neutrophils pre-incubated with BOL. The lectin presented several effects according to the dose used, being possible to observe the effect of induction of migration to peritoneal cavity when it was used in intermediate doses (1 µg/mL and 2.5 µg/mL) as well as the effect of reduction of migration as observed at high doses (5 µg/ mL and 10 µg/mL). The phagocytosis index was also evaluated and there was also an alteration according to the dose used. Higher doses showed a smaller phagocytosis rate (5 µg/mL and 10 µg/mL), unlike the other doses. In this work we were able to observe the immunomodulatory effects on neutrophils of a lectin that has not yet been studied and has shown to have effects on neutrophil physiology according to the chosen dose, altering its migration capacity and phagocytosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Glico código

Os carboidratos constituem uma das mais abundantes classes de biomoléculas da Terra (ARNAUD *et al.*, 2013). Quando combinadas, as unidades de carboidratos podem originar uma ampla variedade de glicanas (ZENG *et al.*, 2012). Ao conjunto de glicanas de um organismo, sejam elas na forma de mono ou polissacarídeos, livres ou ligados a proteínas ou lipídeos, atribui-se o termo glicoma (CUMMINGS, 2009). Tem-se estimado que aproximadamente 70% das proteínas celulares e, mais especificamente, 80% das proteínas presentes na superfície celular são glicosiladas. Portanto, a glicosilação é considerada uma das mais comuns e relevantes modificações pós-traducionais já descritas (AURNAUD *et al.* 2013), a qual é responsável pela abundância de glicanas existentes.

As glicanas interagem com diferentes proteínas (anticorpos, toxinas, moléculas de adesão) e estas “interpretam” o que atualmente tem sido denominado “glico código”. Exemplo disso, é que quando formam os glicoconjugados, presentes na membrana celular, os carboidratos codificam diversas informações biológicas (FEIZI e MULLOY, 2003; MARIÑO *et al.*, 2010) que são decodificadas em muitos processos fisiológicos vitais: fertilização, defesa imune; diferenciação, crescimento e sinalização celular; interação célula-matriz extracelular, reconhecimento célula-célula, tráfego celular e sinalização transmembrana (PAULSON *et al.*, 2006; AURNAUD *et al.*, 2013)

1.2 Lectinas

Tais informações biológicas podem ser transmitidas mediante interações específicas e reversíveis de carboidratos com um grupo distinto de proteínas, as lectinas (GHAZARIAN *et al.*, 2011). Todavia, é importante salientar que essas interações não causam modificações catalíticas sobre a sequência de glicanas, como o que ocorre em decorrência da ação de glicosidases e glicosiltransferases (CUMMINGS, 2009). O termo lectina (do latim *legere*, que significa selecionar) foi inicialmente utilizado em referência à capacidade de

algumas proteínas se ligarem a carboidratos e aglutinar seletivamente eritrócitos humanos de um grupo particular.

Assim como as glicanas, as lectinas também podem ser encontradas em vírus, bactérias, fungos, animais e plantas e, dentre as funções que exercem, destacam-se o favorecimento da adsorção e invasão de patógenos em hospedeiros (NGUNDI *et al.*, 2006; SWANSON *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012), defesa contra insetos, micro-organismos e parasitas (COELHO *et al.*, 2007; ERDMANN *et al.*, 2009; KUROI *et al.*, 2012; BRINKMANN *et al.* 2013) e reconhecimento de sítios de ligação específicos para estabelecimento de simbiose entre organismos (PEUMANS e VAN DAMME, 1995).

Com base em sua estrutura, as lectinas são classificadas em: merolectinas as que possuem um único domínio de ligação a carboidrato (CRD), sendo, portanto, incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células; hololectinas as que apresentam dois ou mais CRDs idênticos ou homólogos, sendo capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados e; quimerolectinas que possuem um CRD e outro domínio com atividade catalítica ou atividade biológica que atua de forma independente ao CRD (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). Em seu estudo, Oliveira (2002) citou uma quarta classe de lectina, denominadas superlectinas, a qual possui dois ou mais CRDs com especificidade para açúcares diferentes.

Evidências atuais indicam que os CRD das lectinas podem acomodar determinantes glicana constituídos de 2 a 6 monossacarídeos lineares, juntamente com suas cadeias laterais contendo outros açúcares e, ou modificações como sulfatação, fosforilação e acetilação. Isso se deve ao fato de proteína e carboidrato necessitarem de múltiplas interações para alcançarem o efeito biológico (PAULSON *et al.*, 2006). A importância das pesquisas voltadas à descoberta de determinantes glicana, que compõem o glicoma dos organismos, é justificada pela necessidade de compreender mecanismos fisiológicos e patológicos, bem como obter potenciais alvos para ação de novas drogas (CUMMINGS, 2009).

Apesar de haverem muitas possibilidades de reconhecimento, lectinas de plantas tem estruturas incrivelmente parecidas (SHARMA; SUROLIA, 1997). A estrutura e a especificidade de ligação de algumas lectinas de origem vegetal vem sendo identificadas, por exemplo, a lectina SBA (presente na soja) interage

com α -1-N-acetilgalactosamina-3-Galactose; jacalina (encontrada na semente da jaca) com β -1-Galactos-N-acetilgalactosamina; Con A (presente no feijão) e LCH (encontrada na lentilha) com Manose, Glicose e oligossacarídeos N-ligados (WU *et al.*, 2009).

Sabidamente, as lectinas possuem ação imunoestimuladora. Algumas induzem a linfoproliferação, como a concanavalina A, atuando como agente mitogênico útil para o estudo da interação da lectina com células linfocitárias *in vitro* (KILPATRICK, 1999). Outras são capazes de estimular a resposta imune inata, em que fazem parte lectinas solúveis capazes de direcionar a eliminação do agente estranho ao organismo e auxiliar a fagocitose por macrófagos e células dendríticas (CD). Isso ocorre por meio da opsonização, culminando com a ativação da resposta imune adaptativa, como é o caso da lectina endógena ligante de manose presente em humanos (GHAZARIAN *et al.*, 2011). Ainda, lectinas, presentes na superfície celular de CD e macrófagos, estão envolvidas no processo de vigilância imunológica, como receptores endocíticos e de sinalização celular. Como exemplo, lectinas tipo C, podem atuar como receptores de manose, galactose ou N-acetilgalactose, os quais estão envolvidos na internalização de antígenos, processamento e subsequente apresentação de glicopeptídeos a linfócitos T, via MHC classe II (AARNOUDSE *et al.*, 2006; DENDA-NAGAI *et al.*, 2010).

Outro mecanismo de ação das lectinas como agonistas do sistema imune foi proposto por Coltri *et al.* (2008). Ele ocorre via receptores Toll-like 2 (TLR2), presentes na superfície de macrófagos e CD. Essas células quando tratadas com ArtinM, lectina extraída das sementes de jaca, passam a secretar interleucina 12 (IL-12), promovendo a diferenciação de células T CD4⁺ para o padrão de resposta Th1, com consequente produção de IFN γ . Coltri *et al.* (2008) sugerem que a imunomodulação desencadeada por esta lectina é dependente de carboidratos, em que ArtinM interage diretamente com N-glicanas do TLR2. Após essa interação, proteínas adaptadoras, como a proteína de resposta a diferenciação mieloide primária 88 (MyD88), são recrutadas e uma cascata de sinalização ativada, a qual contribui para a translocação do fator de transcrição nuclear (NF κ B) para o núcleo, e este, por sua vez, estimula a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas.

Corroborando com esses achados, Park *et al.* (2010) observaram que quando macrófagos peritoneais de camundongos foram tratados com KML-C (lectina de *Viscum album*), ambos os processos de transcrição e tradução de TLR4 foram estimulados, bem como eventos posteriores, como o aumento da expressão da quinase 1 associada ao receptor de IL-1 (IRAK1), resultando na ativação de macrófagos e produção de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). A interação entre KML-C e TLR4 foi confirmada pela coprecipitação dessas moléculas, indicando que as mesmas podem ser associadas.

1.3 *Brassica oleracea*

Brassicaceae is one of the major groups of the plant kingdom, composed of 348 genera and more than 3,700 species, distributed worldwide [1]. *Brassica oleracea* is a very morphologically diverse species, including the common heading cabbage (*B. oleracea* ssp. *capitata* L.), cauliflower (*B. oleracea* ssp. *botrytis* L.), broccoli (*B. oleracea* ssp. *italica* L.), kale and collards (*B. oleracea* ssp. *acephala*), kohlrabi (*B. oleracea* ssp. *gongylodes* L.), Chinese kale (*B. oleracea* ssp. *alboglabra*), and Brussels sprouts (*B. oleracea* ssp. *gemmifera* DC) [2]. *Brassica* species form an important human food crop plant with great economic value as vegetables and as sources of edible and industrial oil, animal fodder, and green manure [3].

Brassicaceae é um dos maiores grupos do reino vegetal, suas mais de 3700 espécies e seus 348 gêneros estão amplamente distribuídos por todo o mundo (WARWICK et al., 2010). As espécies de *Brassica* são vegetais de importante valor econômico como fonte alimentar, adubo, ração animal, óleo comestível e industrial (RAKOW, 2004). No gênero *Brassica oleracea* existem diversas espécies com morfologia muito diversa, entre elas o repolho (*B. oleracea* ssp. *Capitata* L.), couve-flor (*B. oleracea* ssp. *Botrytis* L.), brócolis (*B. oleracea* ssp. *Itálica* L.) couve (*B. oleracea* ssp. *Alboglabra*) e a couve de Bruxelas (*B. oleracea* ssp. *Gemmifera* DC) (YU et al., 2013).

1.4 Neutrófilos

Neutrófilos são células fagocíticas da imunidade inata de alta motilidade e de suma importância para o processo inflamatório, eles são as primeiras células a migrarem para o tecido e realizam diversas funções como a de fagocitose, formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), secreção de

grânulos, secreção de peptídeos antimicrobianos, secreção de citocinas, quimiocinas e eliminação de patógenos e restos celulares (SEGAL, 2005; VOISIN; NOURSHARGH, 2013)

Neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação sanguínea humana, correspondendo a 2.5 a 7.5×10^9 células por litro de sangue constituindo de 50 a 70% do número total de leucócitos circulantes (COWBURN et al., 2010). Apesar de serem os leucócitos mais abundantes, são os de vida mais curta na circulação, com a vida média de 6 a 8 horas (SUMMERS et al., 2010), podendo se estender em alguns casos na circulação humana para 5 dias e na de camundongos para até 90 horas (PILLAY et al., 2017). Após esse tempo na circulação sanguínea eles chegam ao fim da vida e entram em estado de senescência/apoptose e são eliminados no fígado, baço e na própria medula óssea por macrófagos especializados, capazes de reconhecer e fagocitar células senescentes (FURZE; RANKIN, 2008). Para compensar sua vida curta os neutrófilos são produzidos por dia pela medula numa quantidade de 5×10^{10} a 10^{11} células em condições de homeostase e sua produção pode ser aumentada caso haja necessidade (COWBURN et al., 2010; MAUER et al., 1960). A diminuição de neutrófilos na circulação sanguínea (neutropenia) tem consequências graves e por isso sua presença na circulação e sítios inflamatórios é indispensável para defesa do organismo (MACKAY; ROSEN, 2000).

Na circulação sanguínea os neutrófilos ficam em estado de vigilância, preparados para migrarem ao tecido que esteja sofrendo invasão por patógenos ou injúria. Para isso os primeiros estímulos indutores de migração para os neutrófilos são os componentes dos patógenos invasores, conhecidos como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP) e/ou os constituintes celulares liberados pelo próprio tecido, quando acometido por algum tipo de lesão estéril (queimadura, hipóxia, dano químico ou lesão física sem rompimento das barreiras epiteliais) que não necessariamente está sendo invadido por patógenos, conhecidos como padrões moleculares associados ao dano (DAMP) (BIANCHI, 2007).

Para irem aos sítios inflamatórios os neutrófilos dependem de uma série de eventos que vão possibilitar sua migração do interior dos vasos sanguíneos para

o tecido alvo. O sinal desencadeado por interação com PAMP, DAMP ou mediadores secretados por mastócitos e macrófagos teciduais altera a afinidade dos receptores dos neutrófilos por moléculas de adesão do endotélio vascular e modificam o citoesqueleto para facilitar a migração (SALLUSTO; BAGGIOLINI, 2008). Os PAMPs, DAMPs ou os mediadores supracitados terão um efeito no endotélio próximo ao tecido alvo que irá induzir a apresentação das selectinas e integrinas. Nesse estado o endotélio é conhecido como ativado ou inflamado (SALLUSTO; BAGGIOLINI, 2008). Os estímulos também vão induzir o endotélio a permitir a transmigração dos leucócitos e a produzir a citocina mais importante para atrair a migração de neutrófilos, a IL-8 (MIDDLETON et al., 1997).

As selectinas são lectinas expressas tanto por leucócitos como por células endoteliais com a função de criar adesão tanto para que leucócitos interajam entre si como também para que haja interação com a parede vascular (MCEVER, 2002). A interação das selectinas dos leucócitos com o endotélio faz com que haja uma frenagem, fazendo com que os neutrófilos deixem de serem levados pelo fluxo e comecem a rolar sobre as células endoteliais e a cada vez mais diminuir sua velocidade dentro do vaso, vencendo a força que o fluxo sanguíneo exerce. (ALLON; HAMMER; SPRINGER, 1995; CHEN; SPRINGER, 1999). Os neutrófilos ativados pelas quimiocinas modificam a estrutura tridimensional das suas integrinas para aumentar sua afinidade e é então que elas atuam como as proteínas que vão frear o processo de rolagem e fazerem o ancoramento dos neutrófilos no endotélio (LAUDANNA et al., 2002; LUO; CARMAN; SPRINGER, 2007).

Após se fixarem no endotélio os neutrófilos começam o que é conhecido como diapedese, que é a transmigração dos leucócitos da luz do vaso sanguíneo para o tecido alvo passando pela barreira epitelial do vaso (FENG et al., 1998; MULLER, 1995). A transmigração pode ser feita de duas maneiras, eles podem atravessar a barreira passando entre a junção de uma célula epitelial e outra (paracelular) ou passar de forma transcelular, ou seja, passando por dentro da célula epitelial (CARMAN; SPRINGER, 2004).

Após migrarem, os neutrófilos entram no estágio completo de ativação em que podem atuar fagocitando os patógenos ou restos celulares, produzindo

espécies reativas de oxigênio, degranulando ou formando as NETs (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

As duas formas mais utilizadas pelos neutrófilos para conterem infecções são a liberação de seus constituintes antimicrobianos e a fagocitose. O processo de fagocitose é definido pela internalização de organismo ou partícula de forma ativa, mediada por interação com receptores que levam a modificações no citoesqueleto da célula, permitindo o engolfamento do organismo ou partícula e a formação de um vacúolo fagocítico, também conhecido como fagossomo (STUART; EZEKOWITZ, 2005).

Entretanto após a formação do fagossomo, os neutrófilos diferem dos macrófagos por não terem uma via tão endossomal, mas sim a incorporação dos seus grânulos no vacúolo fagocítico diretamente, o que torna o processo de digestão muito mais rápido, porém não tão forte (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003). Existe também diferença na velocidade da fagocitose realizada por neutrófilos que é extremamente mais eficiente que em macrófagos. Normalmente um neutrófilo leva cerca de 20 segundos para fagocitar uma partícula opsonizada por IgG (SEGAL; DORLING; COADE, 1980), enquanto um macrófago leva vários minutos para fagocitar a mesma partícula nas mesmas condições (HENRY et al., 2004).

Como visto, os neutrófilos, para atuarem no tecido invadido, necessitam migrar e se ativar. Em vista disso, estímulos sintéticos e biológicos vem sendo usados frequentemente no ambiente laboratorial para induzir esses efeitos. Algumas lectinas ao se ligarem a receptores de superfície de neutrófilos podem induzi-los a diversos efeitos como ativação, transmigração, secreção de citocinas pró inflamatórias e a preparação de sua maquinaria de combate a patógenos (RICCI-AZEVEDO et al., 2016; SARTIM et al., 2014)

Recentemente foi demonstrado que neutrófilos pré-tratados com uma lectina imunomoduladora aumentaram sua capacidade de combate a *Leishmania major*. Aumentando a produção de ROS e elastase, induzindo degranulação e aumentando a sobrevivência (RICCI-AZEVEDO et al., 2016).

Diante do exposto nosso grupo de pesquisa conclui pertinente avaliar a capacidade imunomodulatória da lectina extraída de *Brassica oleracea* em

neutrófilos humanos e de camundongos Balb/c, avaliando sua capacidade na potencialização da migração, fagocitose, produção de radicais livres e clivagem de CD62L

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Neste trabalho o objetivo foi observar o efeito da lectina extraída de *Brassica oleracea*, denominada BOL, como proteína capaz de causar imunomodulação em neutrófilos humanos e murinos, buscando uma nova lectina imunomoduladora capaz de ser aplicada aos laboratórios de pesquisa.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de BOL em induzir migração de neutrófilos murinos
- Avaliar o índice de CD62L na superfície de neutrófilos tratados com BOL
- Avaliar a indução de fagocitose de neutrófilos tratados com BOL
- Avaliar a formação de espécies reativas de oxigênio de neutrófilos tratados com BOL

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Os animais utilizados no experimento foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Viçosa. Os animais BALB/c adultos de aproximadamente 20-25g foram mantidos em caixas de plástico forradas com maravalha e com tampa metálica. As condições eram a temperatura a 25° C com iluminação em ciclos de 12 horas claro 12 horas escuro e com livre acesso a comida e água. Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética e registrado com o número: 45/2013.

3.2 Obtenção do extrato de *Brássica oleracea* (BOL)

Para o preparo do extrato uma couve-flor (*Brassica oleracea ssp. botrytis*) de aproximadamente 1 quilograma foi obtida no supermercado escola da Universidade Federal de Viçosa. A couve-flor foi desfolhada e picada e então homogeneizada no liquidificador com 1L de tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4. Depois de processado o conteúdo foi mantido a 4°C por 8 horas para que houvesse a extração e então foi filtrado e centrifugado a 6300 g por 20 minutos para remoção do material insolúvel, obtendo um extrato límpido e sem grumos para que fosse levado para a purificação por cromatografia.

3.3 Eritrócitos

Os eritrócitos para o ensaio de hemaglutinação foram obtidos da veia jugular de carneiro. Em seguida, foram transferidos para tubo contendo anticoagulante heparina 1μL.mL⁻¹ de sangue coletado e lavados com solução salina até que o sobrenadante ficasse límpido (400 g, 4°C, 10 min.). O sobrenadante foi descartado e utilizamos o precipitado para preparar uma suspensão de hemácias a 2%.

3.4 Purificação da lectina de *Brassica oleracea* (BOL)

10 mL do extrato bruto foi submetido a uma coluna HiTrap Blue HP (0.7 cm x 2.5 cm, GE Healthcare. Little Chalfont, Reino unido) previamente equilibrada com 50mM de tampão TRIS-HCL (pH 7.4) ao fluxo de 1mL por minuto. As proteínas ligadas a coluna foram desligadas com 1M NaCl em tampão 50 mM TRIS-HCL (pH 7.4). O material foi submetido a dialise para eliminação total do NaCl e em seguida 1 mL do material purificado foi submetido a coluna HiTrap Capto S (0.7 cm x 2.5 cm, GE Healthcare) equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCL (pH 7.4) no fluxo de 1 mL/min. As proteínas que apresentavam atividade hemoaglutinante eram eluídas com 100mM de NaCl em tampão 50mM Tris-HCL (pH 7.4). No último passo utilizamos uma coluna Protein-Pak (7.8 mm x 300 mm, Waters) equilibrada com tampão 50mM Tris-HCL (pH 7.4) no fluxo de 1mL/min. A detecção da atividade lectinica em todas três etapas de purificação por cromatografia foi feita com o teste de hemaglutinação, para isso 100 μL de solução salina foi misturada a 100 μL do eluído das colunas de cromatografia com 100 μL de solução de hemácias

de carneiro a 2%, a mistura foi centrifugada a 400 g e então foi observado se quando as hemácias se ressuspensavam se eram observadas formação, grumos de aglutinação, que ajudaria a dizer onde estava presente a atividade lectínica

A pureza da lectina foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e também por cromatografia em coluna de gel filtração.

A quantificação da proteína purificada foi realizada pelo método de BCA (SMITH et al., 1985).

3.5 Obtenção de neutrófilos humanos

Cerca de 10mL de sangue periférico de doadores foram coletados em tubos de coleta de sangue a vácuo contendo EDTA. O protocolo de purificação é baseado nas indicações do fabricante (MP Biomedicals, Santa Ana, Califórnia, Estados Unidos da América) com modificações. O sangue foi então vertido em tubo cônico de 15mL e centrifugado uma primeira vez a 160 g por 20 minutos a temperatura ambiente para que o plasma fosse separado, o plasma foi separado e pipetado em outro tubo cônico de 15mL que foi levado a centrifugação a 1100 g por 10 minutos a temperatura ambiente para que as plaquetas sedimentem e sejam descartadas, pois atrapalham no processo de separação por gradiente. O plasma sem plaquetas é então misturado novamente com o sangue e então o sangue foi pipetado cuidadosamente sobre uma camada de 4mL de Mono-poly® resolving médium (MP Biomedicals, Santa Ana, Califórnia, EUA) cuidadosamente para que não se misturem e formem duas camadas. Então o tubo cônico de 50 mL foi levado a centrifugação por 450 g durante 50 minutos a temperatura ambiente sem aceleração e sem frenagem. Após os 50 minutos no tubo estarão formadas 2 camadas de células e as hemácias estarão no fundo do tubo. A primeira camada é a de mono nucleares e a segunda a de polimorfonucleares (PMN). A camada de PMN é então retirada e é feita uma contagem em câmara de Neubauer. O experimento com utilização de voluntários humanos foi aprovado pelo comitê de ética e registrado com o número: 108/2012/CEPH/wmt..

3.6 Obtenção de neutrófilos de camundongo

Para a purificação dos neutrófilos utilizamos um camundongo Balb/c, que foi anestesiado com 1,5 microlitros de ketamina por grama de peso e 0,5 microlitros de xilazina por grama de peso (UNIFESP, 2005). A coleta do sangue foi feita por punção cardíaca e então o animal foi eutanasiado via deslocamento cervical. O sangue coletado foi adicionado em tubo de coleta de sangue contendo EDTA, e foi submetido ao protocolo de purificação de neutrófilos segundo Henson (1971). Inicialmente o sangue foi adicionado a uma solução de gelatina 2,5% e misturado por inversão até que a solução ficasse homogênea. A solução de gelatina foi colocada em uma estufa a 37°C e ficou em repouso por 30 minutos. Após 30 minutos as hemácias e mononucleares decantaram enquanto os PMN ficaram retidos na gelatina. Cuidadosamente foi removido totalmente o sobrenadante de gelatina deixando no tubo apenas as hemácias do fundo. O sobrenadante de gelatina foi misturado a um tampão de lise de hemácias (155 mM de Cloreto de amônio e 12 mM NaHCO₃) durante 1 minuto e centrifugado a 220 g durante 10 minutos à temperatura ambiente. O precipitado de PMN foi ressuscitado em tampão Hanks balanced salt solution (HBSS) e levado para contagem em câmara de Neubauer.

3.7 Ensaio de migração de neutrófilos para cavidade peritoneal

Diversas concentrações de BOL (10, 5, 2.5, 1, 0.5 e 0.1 µg/mL), uma solução de tioglicolato 4% para controle positivo e tampão HBSS para controle negativo foram previamente preparadas e injetadas no peritônio de camundongos BALB/c no volume final de 200 µL. Após 4 horas os camundongos foram eutanasiados e foi realizado um lavado peritoneal utilizando 5mL de PBS/EDTA. Os lavados foram incubados com anticorpo anti-Gr1 por 30 minutos para marcarmos a população de neutrófilos e então os lavados foram analisados por citometria de fluxo (BD FACS Verse), a contagem de células foi padronizada por um minuto em fluxo médio.

3.8 Quantificação da expressão de CD62L em neutrófilos isolados da cavidade peritoneal e da circulação sanguínea

Utilizamos os neutrófilos obtidos no ensaio de migração para a cavidade peritoneal para avaliar a expressão de CD62L, para isso cada grupo do ensaio

de migração foi incubado com anticorpo anti-CD62L durante 30 minutos e a intensidade média de fluorescência de cada grupo foi lida no citometro de fluxo.

Para quantificar a expressão de CD62L em neutrófilos isolados do sangue periférico de camundongos, utilizamos o protocolo de isolamento de neutrófilos de camundongos e a dosagem da expressão de CD62L foi analisada concomitantemente observando a intensidade média de fluorescência por citometria de fluxo.

3.9 Dosagem da produção de Espécies reativas de oxigênio por neutrófilos estimulados com BOL

Neutrófilos isolados de sangue periférico humano foram incubados com a concentração final de $1\mu\text{M}$ de 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFHDA) por 30 minutos de acordo com a metodologia de Wu & Yotnda (2011). Após incubação os neutrófilos foram pipetados em microtubos de 1,5 mL na concentração de 5×10^5 e incubados com diferentes concentrações de lectina (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 $\mu\text{g/mL}$) por 30 minutos e a intensidade média de fluorescência foi lida por citometria de fluxo. O ensaio para mensurar a produção de espécies reativas de oxigênio leva em conta a conversão do reagente utilizado 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFHDA) em uma forma fluorescente (DFC).

3.10 Marcação de bactérias com FITC

Para o crescimento das bactérias (E.coli ATCC) utilizamos meio TSB e utilizamos uma alíquota de 10 μL de bactéria em 10 mL de meio de cultura, após 12 horas a 37°C a concentração de bactérias foi determinada por espectrofotometria sob comprimento de onda de 600 nm. As bactérias foram centrifugadas a 6300 g por 10 minutos e o precipitado foi ressuscitado em uma solução PBS Metanol 40% para que houvesse fixação das mesmas que após 30 minutos foram novamente centrifugadas a 6300 g por 10 minutos e ressuscitadas em 1mL de tampão carbonato pH 9 e então foram incubadas com 10 μL de FITC 2 mg/mL por 1 hora. Após incubação as bactérias foram lavadas 3x com tampão PBS pH 7,4 a 6300 g por 10 minutos.

3.11 Ensaio de fagocitose por neutrófilos

Bactérias previamente fixadas em metanol e marcadas com FITC foram usadas para a quantificação do teste.

Para o ensaio com neutrófilos humanos, foram extraídos do sangue periférico de doadores e incubados por 30 minutos com diferentes concentrações de BOL (5, 2,5, 1, 0,5, 0,1 µg/ml) e em seguida um MOI=10 de bactérias marcadas com FITC foram adicionadas aos neutrófilos, após 30 minutos foi feita a leitura em citômetro de fluxo para avaliar o índice fagocítico de acordo com a intensidade média de fluorescência emitida por cada neutrófilo.

Para o ensaio com neutrófilos de camundongo, foram extraídos do sangue periférico de camundongos e foram incubados por 30 minutos com diferentes concentrações de BOL (5, 2,5, 1, 0,5, 0,1 µg/ml) e em seguida um MOI=10 de bactérias marcadas com FITC foram adicionadas aos neutrófilos, após 30 minutos foi feita a leitura em citômetro de fluxo para avaliar o índice fagocítico de acordo com a intensidade média de fluorescência emitida por cada neutrófilo.

3.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software Graphpad Prism® versão 5.0. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes. Todos experimentos foram realizados em triplicata.

4. RESULTADOS

4.1 Purificação da lectina

Os gráficos do processo de purificação da lectina divididos em 3 etapas de cromatografia, passando por três diferentes colunas, entre elas: Bluesepharose (Figura1), MonoS (Figura 2) e Gel Filtração (Figura 3). O gel de eletroforese mostra o resultado das purificações em etapas (Figura 4).

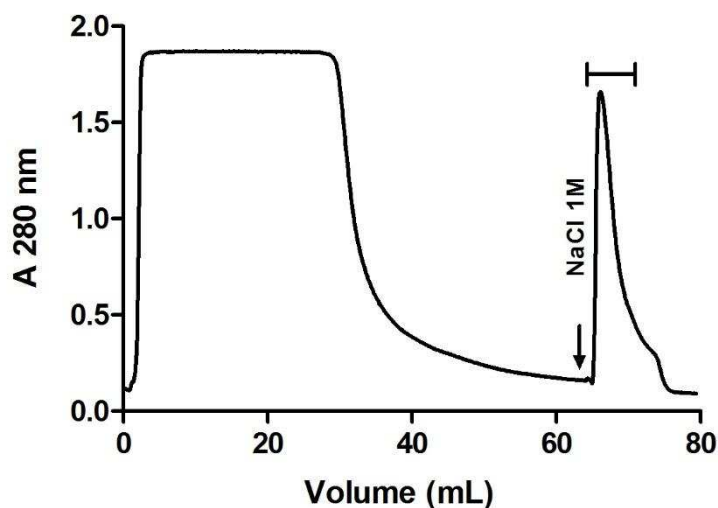


Figura 1. Purificação de BOL em coluna HiTrap Blue HP. Extrato bruto de *Brassica oleracea* foi submetido a coluna HiTrap Blue HP equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) no fluxo de 1mL por minuto e eluído com Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) NaCl 1M. A seta indica o início da eluição.

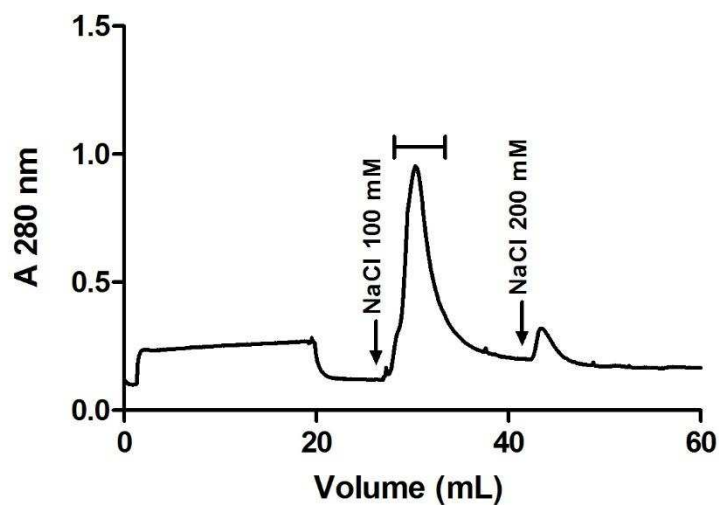


Figura 2. Purificação de BOL em coluna HiTrap Capto S. O conteúdo purificado da coluna Hitrap Blue HP foi submetido a coluna HiTrap Capto S equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,4) no fluxo de 1mL por minuto e eluído com Tris-HCl 50mM (pH7,4) NaCl 100mM.

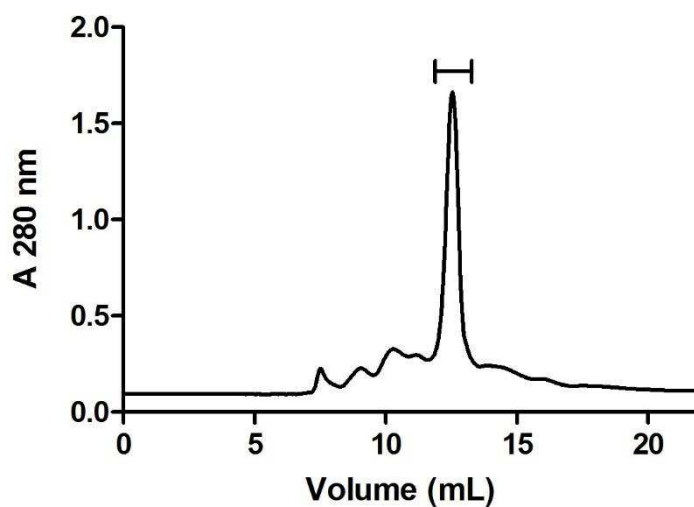


Figura 3. Purificação de BOL em coluna Protein-Pak. O conteúdo purificado da coluna HiTrap Capto S foi submetido a coluna Protein-Pak equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) no fluxo de 1mL por minuto e o pico de lectina coletado.

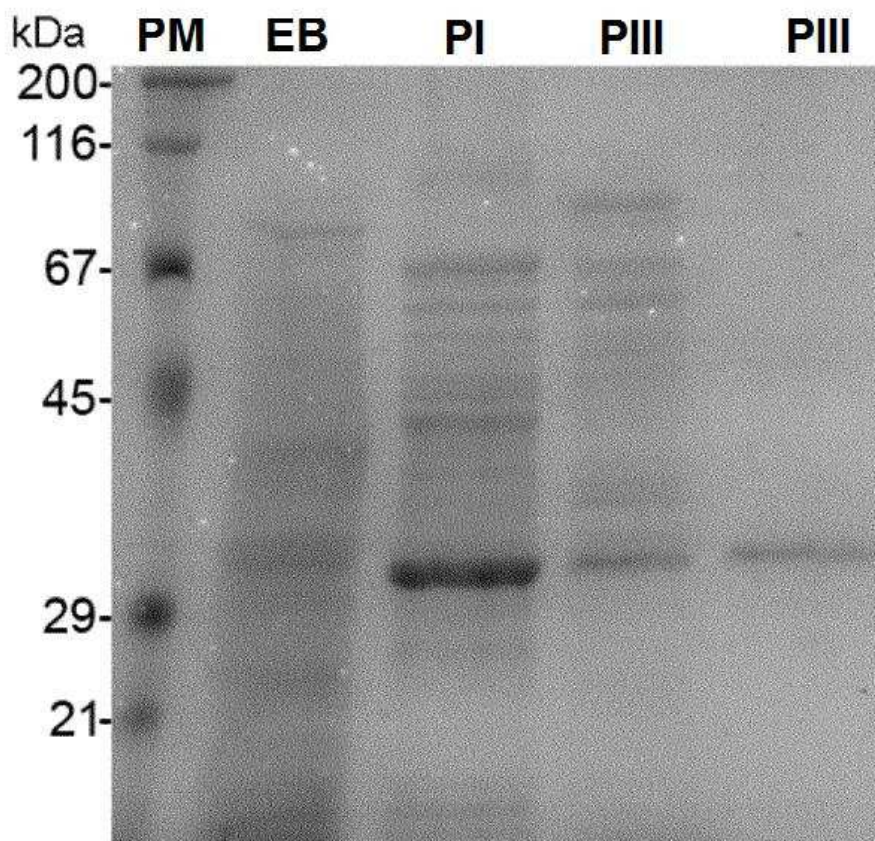


Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE). Frações obtidas após etapas de purificação por cromatografia. PM- Marcador de peso molecular, EB- Extrato bruto, PI- Fração obtida da purificação por cromatografia de afinidade, PII- Fração obtida da purificação por cromatografia de troca iônica, PIII- Fração obtida da purificação por gel filtração.

4.2 Migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos Balb/c.

Os neutrófilos obtidos na cavidade peritoneal foram quantificados utilizando os parâmetros de contagem por 1 minuto de todas células marcadas com anticorpo anti-Gr1. As concentrações de BOL de 1 µg/mL e 2,5 µg/mL foram as únicas a apresentarem diferença significativa comparada ao controle negativo. O efeito potencializou a migração de neutrófilos, alcançando as médias de 28 e 25 mil neutrófilos em contraste a média de 3 mil do controle negativo (Figura 5).

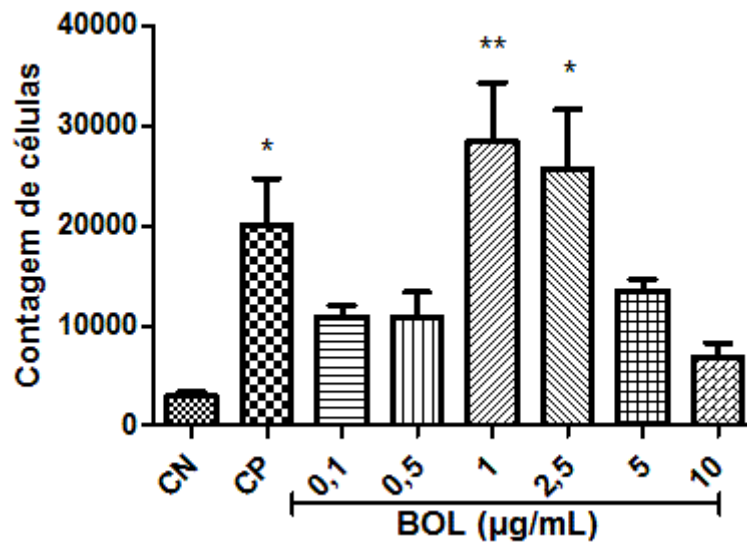


Figura 5. Contagem de neutrófilos no lavado peritoneal. 200 µL de BOL foram injetados no peritônio de camundongos Balb/c e após 4 horas os animais foram eutanasiados e o lavado peritoneal foi utilizado para a contagem do número de neutrófilos que migraram. A contagem foi realizada por um minuto no fluxo médio. Para o controle positivo usou-se tioglicolato e para o controle negativo PBS. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ contra o controle negativo.

4.3 Dosagem de CD62L na superfície de neutrófilos

Os neutrófilos que migraram para a cavidade peritoneal apresentaram uma redução expressiva nos níveis de CD62L na superfície celular quando comparados aos neutrófilos que provavelmente já estavam no tecido e não haviam acabado de migrar (Figura 6).

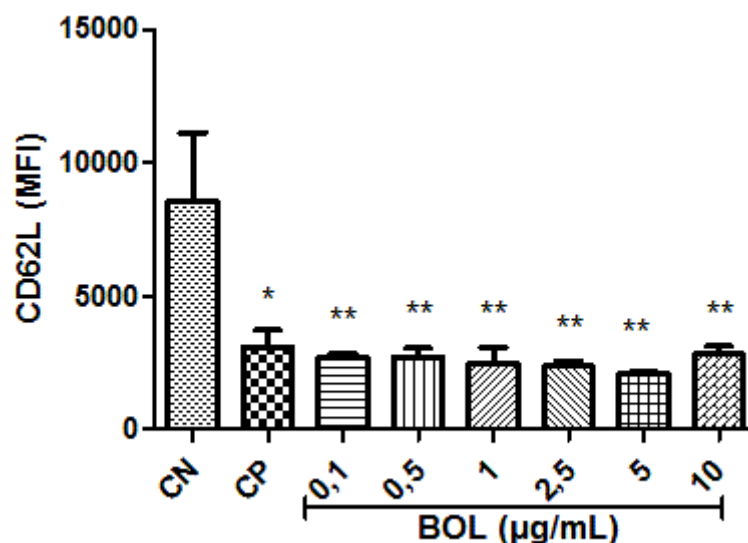


Figura 6. Índice de CD62L na superfície de neutrófilos que migraram. Neutrófilos obtidos na cavidade peritoneal de camundongos foram incubados por 30 minutos a 37°C com anticorpo anti-CD62L e a intensidade média de fluorescência foi lida por citometria de fluxo. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ contra o controle negativo.

Já os neutrófilos obtidos na circulação apresentavam um nível de expressão mais baixo de CD62L na superfície nos tratamentos de 5 µg/mL e 10 µg/mL e nos demais tratamentos apresentaram o nível convencional não exibindo diferença significativa (Figura 7).

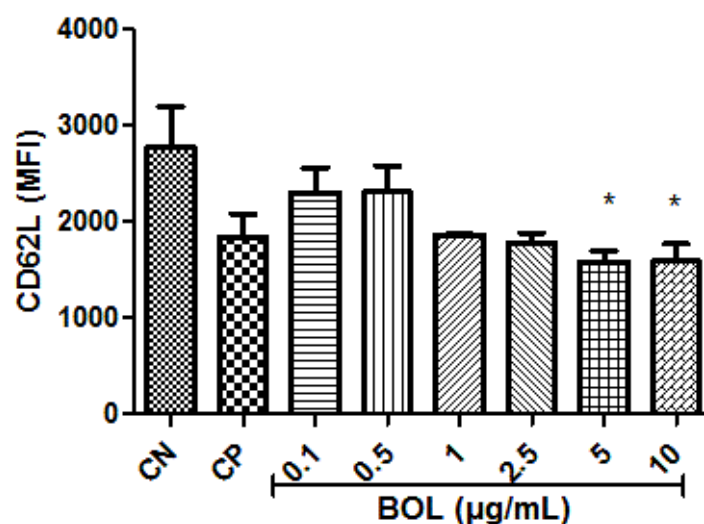


Figura 7. Expressão de CD62L na superfície de neutrófilos circulantes. Neutrófilos obtidos da circulação sanguínea de camundongos foram incubados por 30 minutos a 37°C com várias concentrações de BOL e em seguida com anticorpo anti-CD62L e a intensidade média de fluorescência foi lida por citometria de fluxo. * $p < 0,05$ contra o controle negativo.

Os neutrófilos purificados do sangue periférico e marcados com anti-Gr1 apresentavam pureza de 79,6% (Figura 8) e dentro dessa população de neutrófilos foi observado que os neutrófilos que eram tratados com doses de lectina estavam divididos em duas populações marcadas com CD62L uma high marcação e outra low (Figura 9).

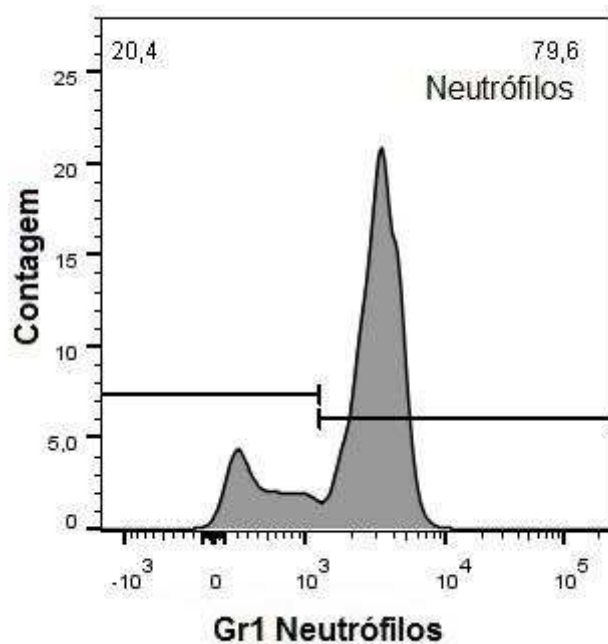


Figura 8. Marcação de neutrófilos purificados. Neutrófilos purificados de sangue periférico de camundongos são distinguidos de outras células com marcação com anticorpo Anti-Gr1.

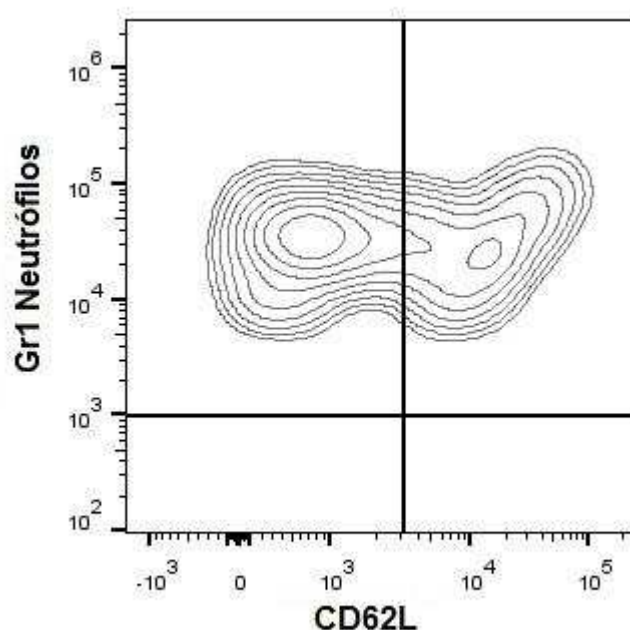


Figura 9. Marcação de CD62L em neutrófilos obtidos na circulação de camundongos. Neutrófilos tratados com lectina e marcados com anti-CD62L exibiam duas populações uma high e uma low marcação.

4.4 Dosagem da produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos estimulados com BOL

Os resultados mostraram que entre os tratamentos com BOL não houve diferença na conversão do DCFHDA na sua forma fluorescente DFC em comparação com o controle negativo, logo, não houve a indução da produção de espécies reativas de oxigênio em relação ao controle negativo (Figura 10).

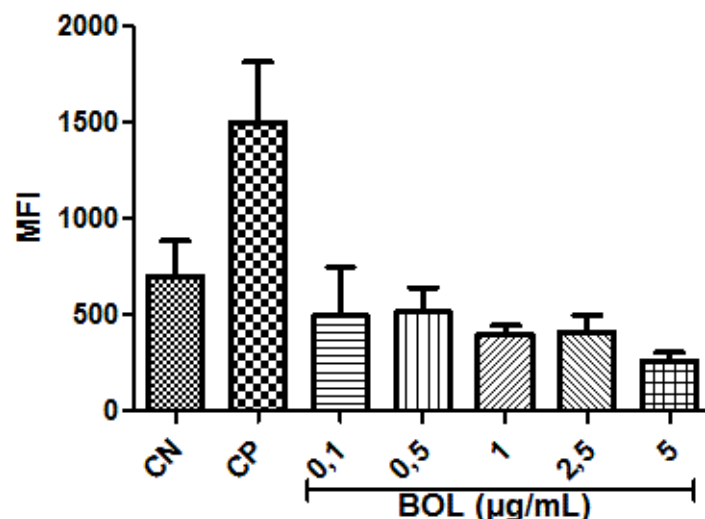


Figura 10. Produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos humanos incubados com BOL. Neutrófilos obtidos de sangue foram incubados por 30 minutos com CDFDH a 37°C e em seguida incubados com diferentes concentrações de BOL por mais 30 minutos a 37°C, a intensidade média de fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. * $p < 0,05$ contra o controle negativo.

4.5 Avaliação da taxa de fagocitose

Neutrófilos que foram previamente tratados com lectina foram incubados com bactérias fluorescentes e o índice de fagocitose foi determinado utilizando a intensidade média de fluorescência de mil eventos de neutrófilos lidos por citometria de fluxo.

Os neutrófilos purificados de camundongo Balb/c não apresentaram diferença estatística para o aumento na taxa de fagocitose, contudo apresentaram um aumento no desvio da média no ponto de 1 µg/mL em todas repetições do teste (Figura 11).

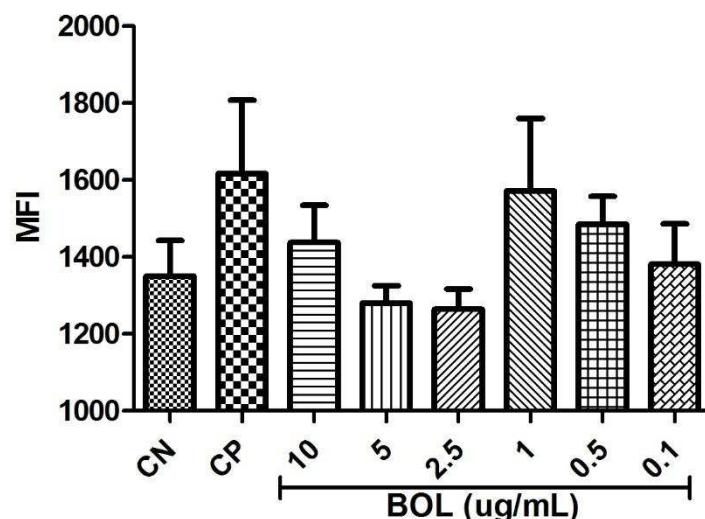


Figura 11. Ensaio de fagocitose neutrófilos de camundongo. Neutrófilos obtidos do sangue periférico foram incubados por 30 minutos com diversas doses de BOL por 30 minutos a 37°C e em seguida incubados com bactérias marcadas com FITC e após 30 minutos foi feita a leitura. * $p < 0,05$ contra o controle negativo.

4.6 Avaliação da taxa de fagocitose em duas populações de neutrófilos CD62L “high” e “low”

Dentro da população de neutrófilos foi possível observar as populações high e low marcadas para CD62L citadas anteriormente. Dentro dessas populações foi possível notar diferença na taxa de fagocitose entre essas duas populações. Quando observadas separadamente a população low não tinha diferença estatística entre seus tratamentos (Figura 12) assim como a high não

tinha diferença entre seus tratamentos (Figura 13). Contudo, apesar de não haver diferença estatística quando foram observadas entre os grupos dentro da mesma subpopulação, foi possível observar que o grupo com baixa marcação (Figura 12) tinha uma taxa de fagocitose em todos os tratamentos bem menor que o grupo com marcação alta para CD62L (Figura 13) Enquanto no grupo com baixa marcação as médias da intensidade média de fluorescência não atingia a casa das 1000 unidades, o grupo com alta marcação as médias começavam em 1200 unidades chegando a atingir as 1700 nos melhores tratamentos, como

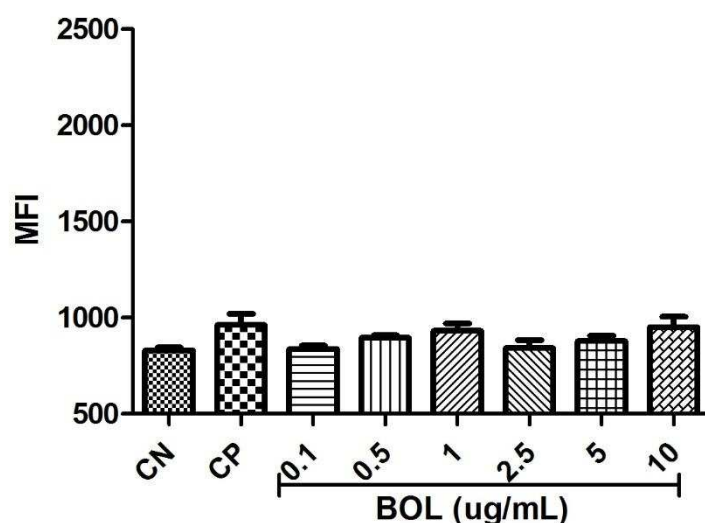


Figura 12. Ensaio de fagocitose em neutrófilos CD62L low. Neutrófilos obtidos do sangue de camundongo foram incubados por 30 minutos com diversas doses de BOL por 30 minutos a 37°C e em seguida encubados com bactérias marcadas com FITC e após 30 minutos foi feita a leitura. * $p < 0,05$ contra o controle negativo.

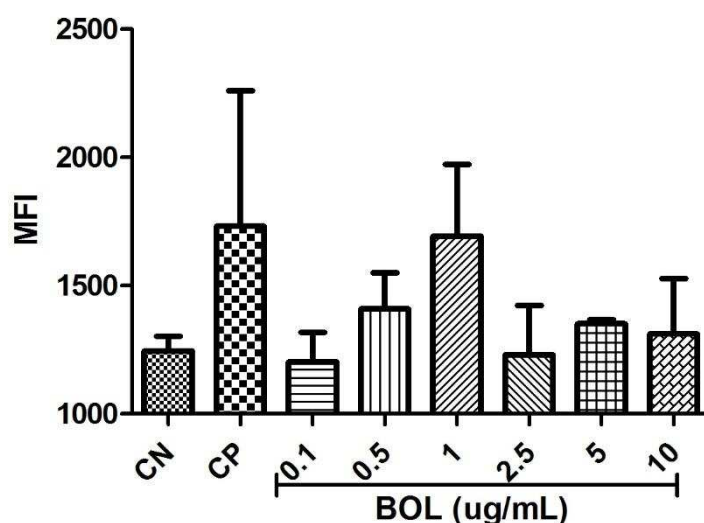


Figura 13. Ensaio de fagocitose em neutrófilos CD62L high. Neutrófilos obtidos do sangue de camundongo foram incubados por 30 minutos com diversas doses de BOL por 30 minutos a 37°C e em seguida encubados com bactérias marcadas com FITC e após 30 minutos foi feita a leitura. * $p < 0,05$ contra o controle negativo.

observado no controle positivo e na dose de 1 μ g/mL . Também observamos uma porcentagem menor de células fagocitando na subpopulação low (Figura 14) quando comparado a subpopulação high marcação para CD62L (Figura 15) que chegava a diferir entre 10 a 20% na porcentagem de células fagocitando.

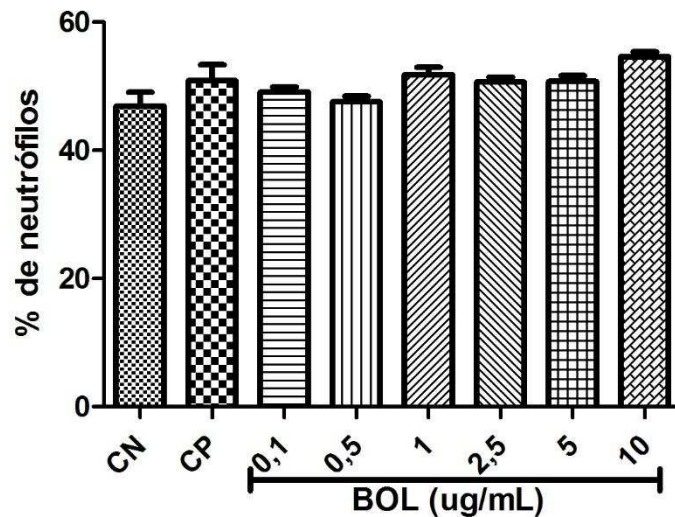


Figura 14. Porcentagem de neutrófilos fagocitando CD62L low. Neutrófilos obtidos do sangue de camundongo foram incubados por 30 minutos com diversas doses de BOL por 30 minutos a 37°C e em seguida incubados com bactérias marcadas com FITC e após 30 minutos foi feita a leitura. * $p < 0,05$ contra o controle negativo.

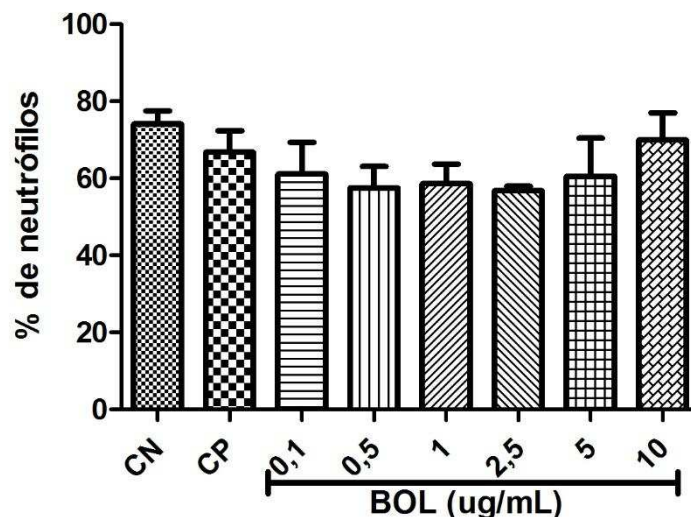


Figura 15. Porcentagem de neutrófilos fagocitando CD62L high. Neutrófilos obtidos do sangue de camundongo foram incubados por 30 minutos com diversas doses de BOL por 30 minutos a 37°C e em seguida incubados com bactérias marcadas com FITC e após 30 minutos foi feita a leitura. * $p < 0,05$ contra o controle negativo.

5. DISCUSSÃO

5.1 Efeito de BOL sobre migração de neutrófilos

Os ensaios de migração mostraram que a quantidade de lectina utilizada é capaz de gerar diversos efeitos, sendo então necessário controlar a dose para se obter o efeito desejado. A potencialização da migração para a cavidade peritoneal foi observada nas doses de 1 µg/mL e 2,5 µg/mL, sendo a dose de 1 µg/mL a que apresentou maior índice de migração comparada ao controle negativo apresentando até mesmo uma quantidade superior de indução de migração frente ao controle positivo. Apresentar um efeito de migração superior a um indutor migratório consagrado como o tioglicolato evidencia que a lectina tem um excelente papel na indução da migração. Isso demonstra que essa dose é boa o suficiente para ativar o neutrófilo para migração, e não causa o efeito de diminuição da migração observado nas doses maiores que 2,5 µg/mL (o efeito causado pelas doses de 5 µg/mL e 10 µg/mL serão discutidos a seguir).

Dentre as selectinas envolvidas no processo de migração, uma selectina muito importante é a L-selectina e ela se destaca das outras por ser clivada após a migração dos leucócitos e de ter sua expressão reduzida enquanto estão atuando no tecido (ZHAO et al., 2001). Trabalhos recentes observaram que a clivagem da L-selectina começa quando os pseudópodes da célula no processo de migração alcançam o espaço subendotelial, de forma que possam se desprender do endotélio para alcançar o tecido alvo (RZENIEWICZ et al., 2015).

A ativação observada em neutrófilos tratados com altas doses de lectina (5 µg/mL e 10 µg/mL) os levou a clivagem de CD62L antes mesmo de começarem a interagir com algum endotélio ativado para a migração como mostra a Figura 7, isso diminuiu a capacidade dos neutrófilos de interagirem com as E-selectinas o que explica a baixa migração de neutrófilos tratados com altas doses de lectina no ensaio de migração para a cavidade peritoneal como demonstrado na Figura 5. A diminuição de CD62L na superfície de neutrófilos circulantes já foi observada como causa da diminuição da capacidade migratória e isso é usado para o controle de migração, impedindo que haja migração desenfreada de células para o tecido (VENTURI et al., 2003). De forma que até

mesmo quimiocinas a partir de certa dose e tempo de ação passam a induzir a clivagem de CD62L na superfície dos neutrófilos (SMITH et al., 1991).

A clivagem de CD62L leva a formação da forma solúvel de CD62L que também é conhecida como sL-Selectin, as formas solúveis interagem com as selectinas endoteliais impedindo com que outros leucócitos interajam, desta forma bloqueando os receptores e reduzindo a adesão e migração (SCHLEIFFENBAUM; SPERTINI; TEDDER, 1992). Desta forma as doses de 5 µg/mL e 10 µg/mL exercem o efeito de clivagem de CD62L sem que haja migração dos neutrófilos para isso, atuando como doses bloqueadoras da migração, induzindo a saturação das E-selectinas. Isso pode ser utilizado formidavelmente em casos onde não se deseja que haja a migração e que os receptores endoteliais fiquem impossibilitados de interagir com neutrófilos ativados para migrarem.

Na figura 6 acreditamos que os níveis de CD62L nos neutrófilos do grupo controle negativo estão altos por serem neutrófilos que já migraram a muito tempo para o tecido e possuem papel de residentes como já foi descrito na literatura (AMSALEM et al., 2014; GAO et al., 2016; TIAN et al., 2016). Desta forma esses neutrófilos residentes voltam a expressar CD62L, contudo, apesar de terem grande quantidade de CD62L o número de neutrófilos é muito pequeno corroborando ainda mais para a nossa hipótese de neutrófilos residentes

5.2 Efeito de BOL sobre a Fagocitose de neutrófilos

Observar o efeito de lectinas na indução sobre o aumento de fagocitose já vem sido observado por outros autores em diversos tipos de lectina e muitas vezes o efeito é satisfatório (DUARTE et al., 2016; FERNÁNDEZ et al., 2005; TOLEDO et al., 2009).

Contudo, quando observando a população de neutrófilos apenas pela marcação com anti-Gr1 só foi possível observar uma tendência de desvio positivo da média. Na dose de 1 µg/mL o tratamento ficou próximo ao controle positivo, entretanto sem diferença estatística para o controle negativo.

Porém os neutrófilos utilizados nesse ensaio apresentavam uma subdivisão entre os marcados. Eles apresentavam duas subpopulações distintas

em se tratando de marcação para CD62L: Uma população com alta marcação e outra com baixa marcação.

Apesar de inicialmente não haver diferença estatística tanto quando a subpopulação high era avaliada separadamente ou quando a subpopulação low era avaliada separadamente, quando elas foram avaliadas conjuntamente comparando uma com a outra a subpopulação com alta marcação para CD62L apresentava um índice de fagocitose substancialmente maior que o da subpopulação low marcação e também era possível observar que existia um número maior de células fagocitando na subpopulação com alta marcação para CD62L, chegando próximo aos 80% enquanto a subpopulação com baixa marcação apresentava no melhor tratamento menos de 60% do total de células fagocitando. Também é possível concluir que se doses altas de BOL induziram a clivagem de CD62L da superfície dos neutrófilos, elas foram responsáveis pelo aumento da subpopulação CD62L low, desta forma é possível concluir que altas doses de BOL induziram a diminuição das taxas de fagocitose.

De acordo com estes resultados a hipótese que estabelecemos é que a BOL provavelmente interage com as glicosilações da L-selectina dos neutrófilos fazendo com que eles fiquem mais ativados para a migração o que corrobora com os resultados de aumento de índice migratório, contudo, quando a dose de BOL é alta demais ela satura as L-selectinas na superfície dos neutrófilos e os induz a clivagem delas da superfície, uma vez que eles entendem que estão ligados ao endotélio e que irão começar o processo de diapedese e como discutido anteriormente para se desprenderem do endotélio é necessário antes a clivagem das L-selectinas,

Tendo isso em vista desta forma eles estariam com todo seu citoesqueleto e constituintes preparados para o processo de migração e estariam despreparados para a fagocitose, o que corrobora com os resultados de baixo índice de fagocitose nos neutrófilos com baixa quantidade de CD62L na superfície.

6. CONCLUSÕES

- Doses intermediárias de BOL (1 e 2,5 µg/mL) potencializam o efeito migratório de neutrófilos
- Altas doses de BOL (5 e 10 µg/mL) induzem a clivagem de CD62L ainda na circulação impedindo a migração e diminuindo o índice fagocítico
- BOL induz a formação de duas subpopulações de neutrófilos, uma alta e outra baixa marcação para CD62L
- As subpopulações diferem entre si na taxa de bactérias fagocitadas e na capacidade do neutrófilo em fagocitar
- Altas doses de BOL (5 e 10 µg/mL) são capazes de diminuir a capacidade da fagocitose de neutrófilos
- BOL é capaz de modular a resposta por neutrófilos

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARNOUDSE, CA; VALLEJO, JJG; SAELAND, E; KOOYK, Y. Recognition of tumor glycans by antigen presenting cells. **Current Opinion in Immunology**, v.18, p.105-111, 2006.
- ALLON, R.; HAMMER, D. A.; SPRINGER, T. A. Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. **Nature**, v. 374, p. 539–542, 1995.
- AMSALEM, H.; KWAN, M.; HAZAN, A.; JONES, R. L.; WHITTLE, W.; JOHN, C. P.; CROY, B. A.; LYE, S. J.; DUNK, C. E. Identification of a Novel Neutrophil Population: Proangiogenic Granulocytes in Second-Trimester Human Decidua. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 6, p. 3070–3079, 2014.
- ARNAUD, J; AUDFRAY, A; IMBERTY, A. Binding sugars: from natural lectins to synthetic receptors and engineered neolectins. **Chem Soc Ver**. In press. 2013. DOI: 10.1039/C2CS35435G
- BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. January, 2007.
- BRINKMANN, CR; JENSEN, L; DAGNAES-HANSEN, F; HOLM, IE; ENDO, Y; FUJITA, T; THIEL, S; JENSENIUS, JC; DEGN, SE. Mitochondria and the lectin pathway of complement. **JBC**, In Press. 2013. DOI: 10.1074/JBC.m112.430249.
- CARMAN, C. V; SPRINGER, T. A. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. **The Journal of Cell Biology**, v. 167, n. 2, p. 377–388, 2004.
- CHEN, S.; SPRINGER, T. A. An Automatic Braking System That Stabilizes Leukocyte Rolling by an Increase in Selectin Bond Number with Shear. **The Journal of Cell Biology**, v. 144, n. 1, p. 185–200, 1999.
- COWBURN, A. S.; CONDLIFFE, A. M.; FARAH, N.; SUMMERS, C.; CHILVERS, E. R. Advances in Neutrophil Biology: Clinical Implications. **Chest**, v. 134, n. 3, p. 606–612, 2010.
- COELHO, MB; MARANGONI, S; MACEDO, MLR. Insecticidal action of Annona coriacea lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146 p. 406–414, 2007.

COLTRI, KC; OLIVEIRA, LL; PINZAN, CF; VENDRUSCOLO, PE; MARTINEZ, R; GOLDMAN, MH; PANUTO-CASTELO, A; ROQUE-BARREIRA, MC. Therapeutic administration of KM⁺ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via Interleukin-12 production in a Toll-like receptor 2-dependent mechanism. **The American Journal of Pathology**, v. 173(2) p. 423-432, 2008.

CUMMINGS, RD. The repertoire of glycan determinants in the human glycome. **Mol. BioSyst**, 2009; 5: 1087-1104.

DUARTE, C. E. M.; ABRANCHES, M. V; SILVA, P. F.; DE PAULA, S. O. P.; CARDOSO, S. A.; OLIVEIRA, L. L. A new TRAF-like protein from *B. oleracea* ssp. *botrytis* with lectin activity and its effect on macrophages. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 508–514, 2016.

ERDMANN, H; STEEG, C; KOCH-NOLTE, F; FLEISCHER, B; JACOBS, T. Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). **Cellular Microbiology**, DOI:10.1111/j.1462-5822.2009.01350.x, 2009.

FEIZI, T; MULLOY, B. Carbohydrates and glycoconjugates: glycomics: the new era of carbohydrate biology. **Current Opinion in Structural Biology** v. 13 p. 602-4, 2003.

FENG, B. D.; NAGY, J. A.; PYNE, K.; DVORAK, H. F.; DVORAK, A. M. Neutrophils Emigrate from Venues by a Transendothelial Cell Pathway in Response to FMLP. **The Journal of Experimental medicine**, v. 187, n. 6, p. 903–915, 1998.

FERNÁNDEZ, G. C.; ILARREGUI, J. M.; RUBEL, C. J.; TOSCANO, M. A.; GÓMEZ, S. A.; BOMPADRE, M. B.; ISTURIZ, M. A.; RABINOVICH, G. A.; PALERMO, M. S. Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. **Glycobiology**, v. 15, n. 5, p. 519–527, 2005.

FURZE, R. C.; RANKIN, S. M. The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 3111–3119, 2008.

GAO, Y.; MIN, K.; ZHANG, Y.; SU, J.; GREENWOOD, M.; GRONERT, K. Female-specific down-regulation of tissue-PMN drives impaired Treg and amplified effector T cell responses in autoimmune dry eye disease. **Journal of**

Immunology, v. 195, n. 7, p. 3086–3099, 2016.

GHARZARIAN, H; IDONI, B; OPPENHEIMER, SB. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemistry**, v. 113(3) p. 236-47, 2011.

HENRY, R. M.; HOPPE, A. D.; JOSHI, N.; SWANSON, J. A. The uniformity of phagosome maturation in macrophages. **The Journal of Cell Biology**, v. 164, n. 2, p. 185–194, 2004.

KILPATRICK, D. C. Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. **Mol Biotechnol**, v. 11, p. 55-65, 1999.

KUROKI, K; FURUKAWA, A; MAENAKA, K. Molecular recognition of paired receptors in the immune system. **Frontiers in Microbiology**. v. 3 p. 3-12, 2012.

LAUDANNA, C.; KIM, J. Y.; CONSTANTIN, G.; BUTCHER, E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. **Immunological Reviews**, v. 186, p. 37–46, 2002.

LEE, W. L.; HARRISON, R. E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1299–1306, 2003.

LUO, B.; CARMAN, C. V; SPRINGER, T. A. Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling Bing-Hao. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 619–647, 2007.

MACKAY, I. R.; ROSEN, F. S. IMMUNODEFICIENCY DISEASES CAUSED BY DEFECTS IN PHAGOCYTES. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 1703–1714, 2000.

MARIÑO, K; BONES, J; KATTLA, JJ; RUDD, PM. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. **Nature Chemical Biology**, v. 6 p.713-723, 2010.

MAUER, A. M.; ATHENS, J. W.; HELEN, A.; CARTWRIGHT, G. E.; WINTROBE, M. M. LEUKOKINETIC STUDIES. II. A METHOD FOR LABELING GRANULOCYTES IN VITRO WITH RADIOACTIVE DIISOPROPYLFLUOROPHOSPHATE (DFP32). **The Journal of Clinical Investigation**, p. 1481–1486, 1960.

MAYADAS, T.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. **Annual Review of Pathology**, v. 9, p. 181–218, 2014.

MCEVER, R. P. Selectins : lectins that initiate cell adhesion under flow. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, p. 581–586, 2002.

MIDDLETON, J.; NEIL, S.; WINTLE, J.; CLARK-LEWIS, I.; MOORE, H.; LAM, C.; AUER, M.; HUB, E.; ROT, A. Transcytosis and Surface Presentation of IL-8 by Venular Endothelial Cells. **Cell**, v. 91, p. 385–395, 1997.

MULLER, A. Vascular Molecules of Leukocytes Intima and Mechanisms Across the. **Trends in Cardiovascular medicine**, v. 5, n. 1, p. 15–20, 1995.

OLIVEIRA, A.C. Valor protéico e implicações nutricionais da lectina de sementes de *Cratylia mollis* quando presente na dieta. [Dissertação de mestrado]. Universidade Federal de Pernambuco. 63p. 2002.

PARK, HJ; HONG, J; KWON, HJ; KIM, Y; LEE, KH; KIM, JB; SONG, SK. TLR4-mediated activation of mouse macrophages by Korean mistletoe lectin-C (KML-C). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396 p. 721-725, 2010.

PAULSON, JC; BLIXT, O; COLLINS, BE. Sweet spots in functional glycomics. **Nature Chemical Biology**. v. 2 p. 238-48, 2006.

PEUMANS, WJ; VAN DAMME, EJM. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109 p. 347-352, 1995.

PILLAY, J.; BRABER, I. DEN; VRISEKOO, N.; KWAST, L. M.; BOER, R. J. DE; BORGHANS, A. M.; TESSELAAR, K.; KOENDERMAN, L. Brief report In vivo labeling with $2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5 . 4 days. **BLOOD**, v. 116, n. 4, p. 625–628, 2017.

RAKOW, G. Species Origin and Economic Importance of Brassica. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 54, 2004.

RICCI-AZEVEDO, R.; OLIVEIRA, A. F.; CONRADO, M. C. A. V; CARVALHO, C.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Neutrophils Contribute to the Protection Conferred by ArtinM against Intracellular Pathogens: A Study on *Leishmania major*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, p. 1–23, 2016.

RZENIEWICZ, K.; NEWE, A.; REY, A.; DAVIES, J.; HOLT, M. R.; PATEL, A.; CHARRAS, G. T.; STRAMER, B.; MOLENAAR, C.; TEDDER, T. F.; PARSONS, M.; IVETIC, A. L-selectin shedding is activated specifically within transmigrating pseudopods of monocytes to regulate cell polarity in vitro. **Immunology and Inflammation**, v. 112, n. 12, p. 1461–1470, 2015.

SALLUSTO, F.; BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature Immunology**, v. 9, n. 9, p. 949–952, 2008.

SARTIM, M. A.; RIUL, T. B.; CISTIA-, C. DEL; STOWELL, S. R.; ARTHUR, C.

M.; SORGI, C. A.; FACCIOLI, L. H.; CUMMINGS, R. D.; DIAS-BARUF, M.; SAMPAIO, S. V. Galatrox is a C-type lectin in *Bothrops atrox* snake venom that selectively binds LacNAc-terminated glycans and can induce acute inflammation. **Glycobiology**, v. 24, n. 11, p. 1010–1021, 2014.

SCHLEIFFENBAUM, B.; SPERTINI, O.; TEDDER, T. F. Soluble L-selectin Is Present in Human Plasma at High Levels and Retains Functional Activity. **The Journal of Cell Biology**, v. 119, n. 1, p. 229–238, 1992.

SEGAL, A. W. How Neutrophils Kill Microbes. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 197–223, 2005.

SEGAL, A. W.; DORLING, J.; COADE, S. KINETICS OF FUSION OF THE CYTOPLASMIC GRANULES WITH PHAGOCYTIC VACUOLES IN HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES. **The Journal of Cell Biology**, v. 85, p. 42–59, 1980.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of Carbohydrate Recognition by Legume Lectins : Size of the Combining Site Loops and their Primary Specificity. p. 433–445, 1997.

SILVA, FL; PIMENTA, RS; SILVA JFM; CORRÊA, DAN; CORRÊA, Junior A. The influence of carbohydrates in the interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with CCL-6 cells in vitro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45(6) p. 739-744, 2012.

SMITH, C. W.; KISHIMOTO, T. K.; ABBASSO, O.; HUGHES, B.; ROTHLEIN, R.; MCINTIRE, L. V; BUTCHER, E.; ANDERSON, D. C. Chemotactic Factors Regulate Lectin Adhesion Molecule 1 (LECAM-1) - dependent Neutrophil Adhesion to Cytokine-stimulated Endothelial Cells In Vitro. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 2, p. 609–618, 1991.

SMITH, P. K.; KROHN, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76–85, 1985.

STUART, L. M.; EZEKOWITZ, R. A. B. Phagocytosis : Elegant Complexity. **Immunity**, v. 22, n. 5, p. 539–550, 2005.

SUMMERS, C.; RANKIN, S. M.; CONDLIFFE, A. M.; SINGH, N.; PETERS, A. M.; CHILVERS, E. R. Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 8, p. 318–324, 2010.

SWANSON, MD; WINTER, HC; GOLDSTEIN, IJ; MARKOVITZ, DM. A Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285(12) p. 8646–8655, 2010.

TIAN, F.; HAN, Y.; SONG, J.; LEI, J.; YAN, X.; XIE, N.; WANG, J.; ZHAO, J.; LIANG, X.; ZHONG, D.; ZHOU, Y.; WANG, X.; LI, X. Pulmonary resident neutrophils regulate the production of GM-CSF and alveolar macrophages. **The FEBS Journal**, v. 283, n. 8, p. 1465–1474, 2016.

TOLEDO, K. A.; SCWARTZ, C.; OLIVEIRA, A. F.; CONRADO, M. C. A. V; BERNARDES, E. S.; FERNANDES, L. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; PEREIRA-DA-SILVA, G.; MORENO, A. N. Neutrophil activation induced by ArtinM: Release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. **Immunology Letters**, v. 123, n. 1, p. 14–20, 2009.

Universidade Federal de São Paulo- UNIFESP Princípios Éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação.2005.

VENTURI, G. M.; TU, L.; KADONO, T.; KHAN, A. I.; FUJIMOTO, Y.; OSHEL, P.; BOCK, C. B.; MILLER, A. S.; ALBRECHT, R. M.; KUBES, P.; STEEBER, D. A.; TEDDER, T. F. Leukocyte Migration Is Regulated by L-Selectin Endoproteolytic Release. **Immunity**, v. 19, n. 5, p. 713–724, 2003.

VOISIN, M.; NOURSHARGH, S. Neutrophil Transmigration : Emergence of an Adhesive Cascade within Venular Walls. **Journal of Innate Immunity**, v. 5, p. 336–347, 2013.

WARWICK, S. I.; MUMMENHOFF, K.; SAUDER, C. A.; KOCH, M. A.; AL-SHEHBAZ, I. A. Closing the gaps : phylogenetic relationships in the Brassicaceae based on DNA sequence data of nuclear ribosomal ITS region. **Plant Systematics and Evolution**, v. 285, n. 3, p. 209–232, 2010.

WU, AM; LISOWSKA, E; DUK, M; YANG, Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. **Glycoconjugate Journal**, v. 26 n. 8 p. 899-913, 2009.

WU, D.; YOTNDA, P. Production and Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cancers. **Journal of Visualized Experiments**, v. 57, p. 2–5, 2011.

YU, J.; ZHAO, M.; WANG, X.; TONG, C.; HUANG, S.; TEHRIM, S.; LIU, Y.; HUA, W.; LIU, S. Bolbase: a comprehensive genomics database for Brassica oleracea. **Biomed Central Genomics**, v. 14, n. 664, 2013.

ZENG, X; ANDRADE, CAS; OLIVEIRA, MDL; SUN, XL. Carbohydrate-protein interactions and their biosensing applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402 p. 3161-3176, 2012.

ZHAO, L.; SHEY, M.; FARNSWORTH, M.; DAILEY, M. O. Regulation of Membrane Metalloproteolytic Cleavage of L-selectin (CD62L) by the Epidermal Growth Factor Domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 30631–30640, 2001.