



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ/RO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA CELULAR APLICADA À SAÚDE**



**PAPEL DA BJCUL, UMA LECTINA ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE,
Bothrops jararacussu, NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA MEDIADA POR
LINFÓCITOS T**

WEVERSON LUCIANO PIRES

Porto Velho – RO

Dezembro/2017

WEVERSON LUCIANO PIRES

**PAPEL DA BJCUL, UMA LECTINA ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE,
Bothrops jararacussu, NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA MEDIADA POR
LINFÓCITOS T**

Defesa de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE - secretaria estadual na Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ/RO, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Pavan Zuliani

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P667p Pires, Weverson Luciano Pires
Papel da BjcUL, uma lectina isolada do veneno da serpente
Bothrops jararacussu, na resposta imunológica mediada por
linfócitos T / Weverson Luciano Pires Pires. 2017
217 f.: 31 cm.

Orientadora: Dra Juliana Pavan Zuliani
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Lectina. 2. BjcUL. 3. PBMCs. 4. Proliferação. 5. Linfócitos T. I.
Zuliani, Dra Juliana Pavan II. Universidade Federal do Amazonas
III. Título

WEVERSON LUCIANO PIRES

**PAPEL DA BJCUL, UMA LECTINA ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE,
Bothrops jararacussu, NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA MEDIADA POR
LINFÓCITOS T**

Defesa de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE - secretaria estadual na Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ/RO, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Banca examinadora

Nome – Prof^a Dr^a: Juliana Pavan Zuliani - Presidente

Nome – Dr(a): Andreimar Martins Soares

Nome – Dr(a): Gabriel Eduardo Melim Ferreira

Nome – Dr(a): João Santana da Silva

Nome – Dr(a): Soraya Santos Pereira

**Porto Velho-RO
Dezembro/2017**

Força de vontade é tudo.

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha família, minha mãe Cida, minha mãe Jandira, meu tio Aparecido, meu tio Ailton, minha tia Marlene, e também aos meus cachorros Isis e Buddy.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a minha orientadora, Dr^a Juliana Zuliani por aceitar me orientar nesse trabalho, pelo apoio dado ao longo desses anos, e principalmente por acreditar em mim e em nosso trabalho.

À minha amiga Cinara da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/SP – FAMERP, e a Lea do Hemocentro de São José do Rio Preto/SP pela oportunidade de estagiar e conhecer o citômetro de fluxo.

Ao João Paulo e ao Allysson do HEMOAR – Manaus/AM, pela ajuda de sempre com as dúvidas com relação aos ensaios no citômetro de fluxo.

A Dr^a Lis e ao Pedro da Fiocruz/MG pela ajuda com as análises de dados obtidos a partir da leitura no citômetro de fluxo.

Ao Dr Andreimar Martins Soares por ceder a toxina de trabalho.

Ao Dr Anderson Makoto Kayano pela ajuda com as dúvidas e principalmente com os experimentos realizados no CEBio.

Ao Jorge Alexandre, pela ajuda com o manuseio do FACScan.

A Juliana Sobrinho e ao Rodrigo Simões que me acompanharam no período em que fiquei no CEBio, obrigado pela ajuda e pela amizade construída.

A todos os meus colegas do Laboratório de Imunologia Celular Aplicada à Saúde, Sulamita, Adriana, Carol, Fabi, Onassis, Néry, Kayena, Jéssica, Mauro, Charles e Cristina, pela convivência ao longo desses anos, pela ajuda com experimentos e dúvidas que sempre existiram.

Aos meus colegas de turma de doutorado, Marília, Stela, Leidiane, Saymon, Diego e João.

Aos meus colegas de república, principalmente a Carla Silveira pela convivência ao longo desses anos. A todos os funcionários da Fiocruz/RO, desde os guardas, pessoal da limpeza, motoristas e administrativo. Aos colegas dos demais laboratórios da Fiocruz/RO.

À Dr^a Soraya Pereira dos Santos pela colaboração com os ensaios moleculares.

Ao Dr Gustavo Menezes e a Dr^a Maisa da UFMG pela colaboração com os testes de imunofluorescência.

À FAPERÓ pelo apoio financeiro e outras agências de fomento.

Aos meus amigos Elessandra e Rubens, por estenderem as mãos no momento em que mais precisei.

Àqueles que mais amo nessa vida, minha família. A Deus pela vida e por permitir esse momento.

RESUMO

Pires, W. L. Papel da B_{jcu}L, uma lectina isolada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*, na resposta imunológica mediada por linfócitos T. 2017. 217p (Defesa) Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RO, Porto Velho, 2017.

A B_{jcu}L é uma lectina do tipo C que depende de íons cálcio para desenvolver suas atividades biológicas. Essa proteína é composta por duas subunidades idênticas que constituem a estrutura molecular de homodímero. A B_{jcu}L tem especificidade para ligação a carboidratos por meio de sua região CDR, apresenta atividade hemaglutinante, inibe a proliferação de células tumorais, e a formação de biofilmes bacterianos. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da B_{jcu}L sob a resposta imunológica mediada por linfócitos T humanos e suas diferentes subpopulações. Os resultados mostraram que a B_{jcu}L não é tóxica para os PBMCs e também não exerce atividade mitogênica sobre essas células, nas concentrações de 5 e 10 µg/mL, os quais podem ser regulados pela produção de espécies reativas do oxigênio (EROS). Os dados evidenciaram que os linfócitos T são as células responsáveis pela produção de EROS induzidas por B_{jcu}L, contribuindo para a atividade não mitogênica dessa lectina. A B_{jcu}L acoplada ao FITC interagiu com monócitos, linfócitos B, células Natural *Killer* e também com subpopulações de linfócitos T. O resultado dessa interação foi a ativação celular que induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α , e anti-inflamatórias como IL-10. Além disso, os dados mostraram que as células responsáveis pela produção de TNF- α são as células Natural *Killer* e os monócitos. A IL-10 é produzida pelas células T CD4⁺ e pelos linfócitos Treg, quando estimuladas pela B_{jcu}L. O perfil de citocinas produzidas pelas células quando estimuladas por essa lectina permite afirmar que a B_{jcu}L desenvolve atividade imunomoduladora. Os resultados obtidos poderão servir de base para o desenvolvimento de novos fármacos com interesse clínico e como ferramentas de prospecção biotecnológica.

Palavras-chave: Lectina. B_{jcu}L. PBMCs. Proliferação. Linfócitos T. Citocinas. Imunoregulação.

ABSTRACT

Pires, W. L. Role of BjuL, a lectin from the venom of *Bothrops jararacussu* snake, the immune response mediated by T lymphocytes (Doctor) Thesis. 2017. 217p. Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RO, Porto Velho, 2017.

BjuL is a type C lectin that depends on calcium ions to develop its biological activities. This protein is composed of two identical subunits that constitute the homodimer molecular structure. BjuL has specificity for carbohydrate binding through its CDR region and exhibits hemagglutinating activity, inhibits proliferation of tumor cells, as well as the formation of bacterial biofilms. The purpose of this study was to investigate the effect of BjuL under the human T lymphocyte mediated immune response and its different subpopulations. Results showed that BjuL is not toxic to PBMCs and also does not exert mitogenic activity on these cells at concentrations of 5 and 10 µg/mL which can be regulated by the reactive oxygen species (ROS). The data evidenced that T lymphocytes are the cells responsible for ROS production induced by BjuL, which contributes to the non-mitogenic activity for this lectin. BjuL-FITC interacted with monocytes, B lymphocytes, Natural *Killer* cells and with subpopulations of T lymphocytes. The result of this interaction was the cellular activation that induced the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α , and anti-inflammatory cytokine such as IL-10. In addition, the data showed that the cells responsible for TNF- α production are mainly Natural *Killer* cells and monocytes, whereas IL-10 is produced by CD4⁺ T cells and Treg lymphocytes when stimulated by BjuL. The cytokine profile produced by the cells when stimulated by this lectin allows us to confirm that BjuL develops immunomodulatory activity. The results obtained may serve as a basis for the development of new drugs of clinical interest and as tools for biotechnological prospecting.

Keywords: Lectin. BjuL. PBMCs. Proliferation. Lymphocytes T. Cytokines. Immunoregulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura cristalográfica de lectinas de veneno de serpentes.....	22
Figura 2 – Estrutura cristalográfica da lectina do veneno da serpente <i>Bothrops jaracussu</i>	24
Figura 3 – Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo de PBMCs incubados com a BjuL.....	42
Figura 4 – Efeito da BjuL sobre a viabilidade celular de PBMCs humanos.....	44
Figura 5 – Proliferação Celular e Imunofenotipagem de células marcadas por CFSE. Grupo controle negativo (monócitos e linfócitos incubados com RPMI).....	46
Figura 6 - Proliferação Celular e Imunofenotipagem de células marcadas por CFSE. Grupo controle positivo (con-A 5 µg/mL).....	47
Figura 7 – Proliferação Celular e Imunofenotipagem de células marcadas por CFSE. Grupo experimental (BjuL 5 µg/mL).....	49
Figura 8 – Proliferação Celular e Imunofenotipagem de células marcadas por CFSE. Grupo experimental (BjuL 10 µg/mL).....	50
Figura 9 – Determinação da produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) intracelulares.....	52
Figura 10 – Imunofenotipagem de PBMCs Humanos.....	57
Figura 11 – Efeito da BjuL sobre a imunofenotipagem de PBMCs.....	59
Figura 12 – Imunofluorescência de PBMCs.....	63
Figura 13 – Efeito da BjuL na produção de IL-2 pelos PBMCs.....	66
Figura 14 – Efeito da BjuL na produção de IL-10 pelos PBMCs.....	67
Figura 15 – Efeito da BjuL na produção de IFN- γ pelos PBMCs.....	68
Figura 16 – Efeito da BjuL na produção de IL-6 pelos PBMCs.....	69
Figura 17 – Efeito da BjuL na produção de TNF- α pelos PBMCs.....	70
Figura 18 – Efeito da BjuL na produção de IL-17 pelos PBMCs.....	71
Figura 19 – Efeito da BjuL na produção de IL-4 pelos PBMCs.....	72
Figura 20 – Mapa da produção de citocinas ao longo do tempo - <i>Heatmap</i>	73
Figura 21 – Marcação intracelular de interleucina 10 – IL-10.....	75
Figura 22 – Marcação intracelular do fator de transcrição FoxP3 e IL-10.....	76
Figura 23 – Marcação intracelular do Fator de Necrose Tumoral- α – TNF- α	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das Lectinas	20
Tabela 2 – Marcadores de Superfície Celular	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ANOVA:** Análise de Variância
- BjuL:** Lectina do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*
- BSA:** Albumina de Soro Bovino
- CD:** Grupo de diferenciação (*Cluster of Diferenciation*)
- CDR:** Domínio de Reconhecimento de Carboidratos
- CFSE:** Carboxifluoresceína
- Con-A:** Concanavalina
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- EROS:** Espécies reativas do oxigênio
- FACS:** Classificação de Células Ativas por Fluorescência (*Fluorescence Activated Cell Sorter*)
- FITC:** Isotiocianato de Fluoresceína
- FL1:** Fluorescência 1
- FSC:** Dispersão Frontal (*Forward Scatter*)
- HPLC:** Cromatografia Líquida de alta Performance
- IL-2:** Interleucina 2
- IL-10:** Interleucina 10
- IL-6:** Interleucina 6
- IL-17:** Interleucina 17
- IL-4:** Interleucina 4
- IFN- γ :** Interferon gama
- LPS:** Lipopolissacarídeo
- MFI:** Intensidade Média de Fluorescência
- PBMCs:** Mononucleares do Sangue Periférico
- PBS:** Tampão Fosfato-Salino
- PE:** Ficoeritrina
- PerCP:** Proteína Clorofila Peridina
- PI:** Iodeto de Propídeo
- PLA₂:** Fosfolipases A₂
- RPM:** Rotações por Minuto
- RPMI:** Meio Roswell Park Memorial Instituto
- SDS-PAGE:** Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (Dodecil Sulfato de Sódio)
- SFB:** Soro Fetal Bovino
- SSC:** Dispersão Lateral (*Side Scatter*)

TCR: Receptor de Célula T

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

TO: Laranja de Tiazol

UV: Ultravioleta

xg: Força Gravitacional

SUMÁRIO

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xi
1. Introdução.....	16
1.1 – Lectinas.....	17
1.2 -Lectinas do Veneno da Serpente <i>Bothrops jararacussu</i>	23
1.3- Considerações gerais sobre os linfócitos e sua contribuição no sistema imune.....	26
2. Objetivos.....	29
2.1- Objetivos Geral:.....	30
2.2- Objetivos Específicos:.....	30
3. Material e Métodos.....	31
3.1- Materiais.....	32
3.2- Comissão de Ética.....	32
3.3- Isolamento de PBMC humano.....	32
3.4 - Ensaio de Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo.....	34
3.5 - Ensaio de Proliferação Celular por Citometria de Fluxo.....	34
3.6 – Determinação da produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) intracelulares.....	35
3.7 – Ensaio de Acoplamento de BjuL ao Isotiocianato de Fluoresceína – FITC.....	35
3.8 - Imunofenotipagem das subpopulações de PBMCs.....	35
3.9 – Preparo de lâminas para imunofluorescência.....	36
3.10 – Quantificação de citocinas por <i>cytometric beads array</i> (CBA).....	36
3.11 – Marcação de citocinas intracelulares.....	37
3.12 – Análise Estatística.....	38
4. Resultados.....	39
4.1- Ensaio de Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo.....	40
4.2- Ensaio de Proliferação Celular por Citometria de Fluxo.....	--

4.3 – Determinação da produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) intracelular.....	51
4.4 – Ensaio de Acoplamento de BjuL ao Isotiocianato de Fluoresceína.....	56
4.5 - Imunofenotipagem de PBMCs Humanos.....	56
4.6 - Efeito da BjuL sobre a imunofenotipagem de PBMCs.....	58
4.7- Imunofluorescência.....	63
4.8 – Efeito da BjuL na produção de citocinas pelos PBMCs.....	64
4.9 – Marcação de citocinas intracelulares.....	74
4.9.1 – Marcação intracelular de IL-10.....	74
4.9.2 – Marcação intracelular de TNF- α	77
5. Discussão.....	79
6. Conclusões	91
Referências	93
Apêndice	104

1- Introdução

1- Introdução

1.1- Lectinas

As proteínas que têm a capacidade de promover hemaglutinação ou causar precipitação de glicoproteínas devido a ligação específica e reversível à carboidratos são conhecidas como lectinas (SHARON, 1972). Kilpatrick (2002) descreveu que as lectinas animais foram descobertas antes das lectinas de plantas embora muitas ainda não fossem reconhecidas como ligantes de carboidratos.

As lectinas geralmente são consideradas proteínas não enzimáticas e não imunes que se ligam de forma seletiva e não covalente a carboidratos. Essas proteínas são de origem principalmente animal e vegetal, sendo que as lectinas animais podem determinar a organização de estruturas complexas de carboidratos, enquanto as lectinas de plantas têm inclusive a capacidade de distinguir diferenças sutis nessas estruturas (ZELENSKY; GREADY, 2005).

Grande parte das lectinas não tem atividade mitogênica, a aglutinina do germen de trigo e a lectina do tomate não induz mitose em linfócitos T humanos, por exemplo. As lectinas se ligam a diferentes glicoproteínas de superfície celular, a aglutinina do germen de trigo tem interação com muitos receptores, enquanto a lectina do tomate se liga a três tipos principais. Essa natureza não mitogênica para essas duas lectinas pode ser explicada pelo bloqueio do antígeno CD45, comum entre os leucócitos e essencial no papel de ativação das células T (KILPATRICK, 1999).

Um tipo de glicoproteína a qual a lectina do tomate se liga é a asialoglicoproteína presentes em linfócitos T, também relacionada a sua ativação. Portanto, é possível que as lectinas não mitogênicas liguem-se a receptores e regulem a ativação de sinais na célula. Um modelo simples seria que lectinas mitogênicas ligam-se ao complexo do receptor de células T, enquanto que lectinas não mitogênicas não se ligam a esse complexo ou se ligam a outras moléculas essenciais para a transdução de sinais de ativação. As lectinas mitogênicas vão determinar a expressão do receptor de IL-2R, e da própria IL-2, as lectinas não mitogênicas não o fazem, sendo esses eventos essenciais no processo de ativação de divisão celular (CHILSON; KELL-CHILSON, 1989; KILPATRICK, 1999).

A concanavalina (Con-A) é uma lectina encontrada no feijão (*Canavalia ensiformis*), que tem especificidade de ligação aos carboidratos glicose e manose. Essa lectina desempenha diversas atividades biológicas, como hemaglutinação, e principalmente a capacidade de induzir

proliferação em linfócitos T. A atividade mitogênica ocorre pelo fato dessa lectina estimular os linfócitos T via TCR (receptor de célula T) e também o receptor co-estimulador CD28, levando a produção de IL-2 que promove expansão clonal das células T. No entanto, não está claro se outros receptores co-estimulantes estão envolvidos nesse mecanismo desenvolvido pelo Con-A (SALEEMUDDIN; HUSAIN, 1991; BALLERSTADT et al., 2006; ANDO et al., 2013).

O que ocorre é que há um grande número de lectinas animais, e com as informações estruturais obtidas foi possível organizar essas proteínas em pelo menos duas categorias diferentes, as lectinas do tipo C, dependentes do íon cálcio e estruturalmente relacionadas ao receptor de hepatócitos asioglicoproteína. Segundo Wijeyewickrema e colaboradores (2005), as lectinas tipo C podem interagir com receptores que agem na agregação plaquetária (SARTIM; SAMPAIO, 2015). O bloqueio desses ligantes sugere a capacidade de inibição de agregação de plaquetas pelas lectinas tipo C (ANDREWS; BERNDT, 2000). As lectinas do tipo S, dependentes de ligações dissulfeto formam um grupo distinto (DRICKAMER, 1988; ZELENSKY; GREARY, 2005).

Cada uma dessas proteínas contém um domínio conhecido como domínio de reconhecimento de carboidrato (CDR) que tem a capacidade de se ligar aos hidratos de carbono (DRICKAMER, 1988). O CDR é representado por três resíduos de aminoácidos considerados determinantes, Gln-Pro-Asp (SARTIM; SAMPAIO, 2015) e conservado na maioria das lectinas (GUIMARÃES-GOMES et al., 2004).

De acordo com seus ligantes, estrutura molecular, comparação das sequências dos CDRs, ou atividades biológicas as lectinas animais podem ser classificadas em uma série de famílias estruturalmente distintas. Dos oito grupos bem estabelecidos, quatro contêm lectinas predominantemente intracelulares e quatro contêm lectinas que geralmente funcionam fora da célula. As lectinas intracelulares são exemplificadas pela calnexina (direcionam proteínas no retículo endoplasmático), lectina tipo M (degradam proteínas associadas ao retículo endoplasmático), lectina tipo L (direcionam proteínas no retículo endoplasmático, se relacionam em sequência com lectinas de leguminosas) (DRICKAMER, 1988; CARVALHO et al., 2002) e lectina tipo P (direcionam proteínas pós-Golgi, promovendo tráfico de glicoproteínas, degradação de glicoproteínas associada ao retículo endoplasmático, e segmentação enzimática). As lectinas extracelulares conhecidas são as do tipo C ((envolvidas na adesão celular (selectinas), *clearance* de glicoproteínas, imunidade inata (colectinas)) (ZELENSKY; GREARY, 2005) e, são

dependentes de cálcio para sua atividade (DRICKAMER; TAYLOR, 2015), lectinas tipo R (direcionamento de enzimas, *turnover* de hormônios glicoproteicos), lectinas do tipo I (adesão celular) e galectinas (ligações cruzadas na matriz extracelular). As descobertas recentes apontam para a existência de novos grupos adicionais de lectinas de animais tais como, lectinas *F-box* (degradação de glicoproteínas não encaminhadas) ficolins (imunidade inata), lectinas tipo quitinase (metabolismo de colágeno), lectinas do tipo F (imunidade inata) e intelectinas (imunidade inata, fertilização e embriogênese) (TAYLOR, 1997; GOKUDAN et al., 1999; SWAMINATHAN et al., 1999; LEE et al., 2004; THOMPSON; WILLIAMS, 2005; NITCKE, 2005; YOSHIDA et al., 2005; HIRAO et al., 2006; SATOH et al., 2006; CRUCIAT et al., 2006; BIGG et al., 2006; BORASTON et al., 2006; JAYAWARDENA et al.; 2013) (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação das lectinas

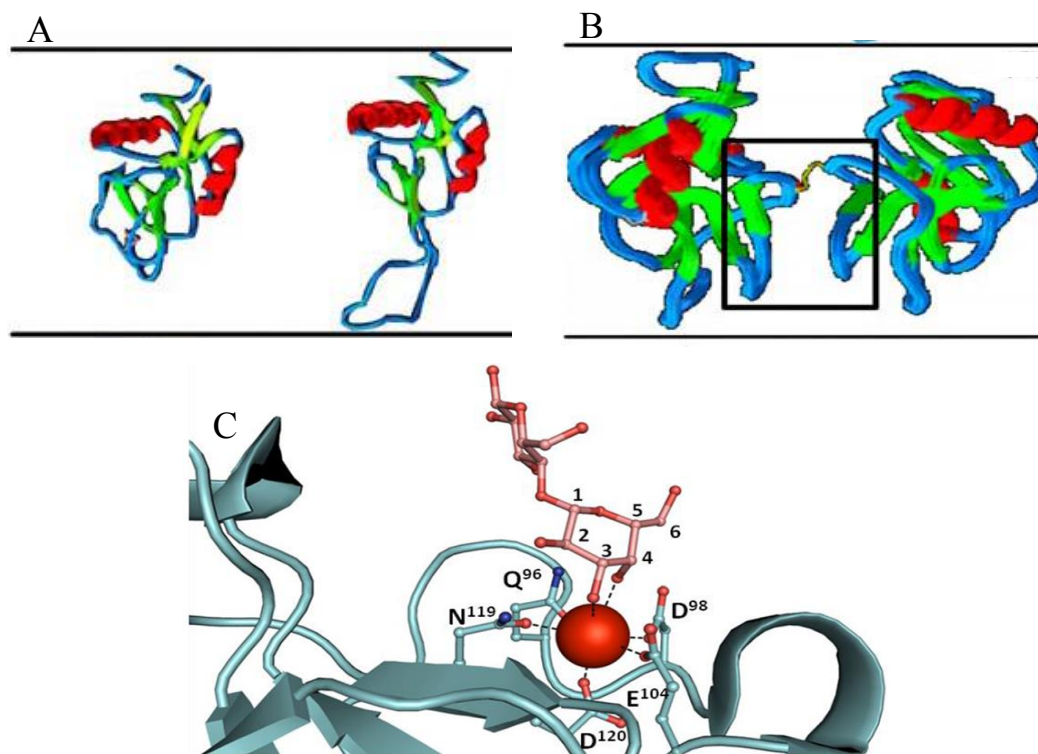
Família de Lectinas	Ligantes	Localização	Funções Biológicas
Calnexina	Glc ₁ Man ₉	Retículo endoplasmático	Direcionam proteínas no retículo endoplasmático
Lectina do tipo M	Man ₈	Retículo endoplasmático	Degradam proteínas associadas ao retículo endoplasmático
Lectina do tipo L	Vários	Retículo endoplasmático, Complexo de Golgi	Direcionam proteínas no retículo endoplasmático
Lectina do tipo P	Man 6-phosphate, outros	Via secretora	Direcionam proteínas pós-Golgi, promovendo tráfico de glicoproteínas, degradação de glicoproteínas associada ao retículo endoplasmático, e segmentação enzimática
Lectina do tipo C	Vários	Membrana celular, extracelular	Envolvidas na adesão celular (selectinas), <i>clearance</i> de glicoproteínas, imunidade inata (colectinas), são dependentes de cálcio para sua atividade
Galectinas	b-Galactosídeos	Citoplasma, extracelular	Ligações cruzadas na matriz extracelular.
Lectina do tipo I	Ácido siálico	Membrana celular	Adesão celular
Lectina do tipo R	Vários	Complexo de Golgi, Membrana celular	Direcionamento de enzimas, <i>turnover</i> de hormônios glicoproteicos
Lectina F- <i>box</i>	GlcNAc ₂	Citoplasma	Degradação de glicoproteínas não encaminhadas
Ficolins	GlcNAc, GalNAc	Membrana celular, extracelular	Imunidade inata
Lectinas <i>Quitinase Like</i>	Oligossacarídeos	Extracelular	Metabolismo de colágeno
Lectinas tipo F	Oligossacarídeos	Extracelular	Imunidade inata.
Intelectinas	Gal, galactofuranose, pentoses	Extracelular, Membrana celular	Imunidade inata, fertilização e embriogênese

Fonte: JAYAWARDENA, H. S. N.; WANG, X.; YAN, M, 2013.

Baseado em suas características estruturais, as lectinas do tipo C podem ser classificadas em sete grupos (I a VII). O grupo I que também é conhecido como lectinas contém um único domínio de lectina tipo C, o grupo II possui domínio transmembrânico e tem como seus maiores exemplos as proteínas que funcionam como receptores de asialoglicoproteínas hepáticas. O grupo III é representado pelas colectinas que participam da ativação do sistema complemento, incluindo as proteínas ligantes de manose, encontradas no soro e surfactante pulmonar. O grupo IV é o grupo das selectinas que participam dos mecanismos de adesão leucocitária ao endotélio, incluindo as L-selectinas presentes nos leucócitos, as E-selectinas nas células endoteliais e as P-selectinas nas plaquetas. No grupo V estão as proteínas que participam da transdução de sinais, tendo como exemplo os receptores de células Natural *Killer*. O grupo VI contém um domínio de reconhecimento de carboidratos, e incluem os receptores de manose, presentes na membrana de macrófagos e ainda receptores de células dendríticas que participam dos processos de endocitose. Por fim, o grupo VII representa as lectinas presentes no pâncreas e em venenos de serpentes, sendo constituídas de um único CDR, apresentando o subgrupo das lectinas tipo C verdadeiras, que se ligam a domínios de carboidratos, e as lectinas tipo C *like* que não se ligam a carboidratos (DRICKAMER, 1999; DODD; DRICKAMER, 2001; KILPATRICK, 2002; ZELENSKY; GREASY, 2005) (Figura 1).

As lectinas do tipo C e as lectinas do tipo C *like* presentes no veneno das serpentes, fazem parte de uma família de proteínas homólogas e funcionalmente distintas. Estas proteínas são compostas por subunidades idênticas – homodímeros, ligadas por pontes dissulfeto (Figura 1B), são altamente conservadas e tem 96% de homologia (GUIMARÃES-GOMES et al., 2004; KASSAB et al., 2004).

Figura 1 – Estrutura cristalográfica de lectinas de venenos de serpentes.



(A) Comparação da forma monomérica da lectina da serpente *Bothrops jararacussu* – BjcuL, lectina do tipo C que se liga a carboidratos (lado esquerdo) com a lectina da serpente *Trimeresurus flavoviridis* – Flavocetin, lectina do tipo C que não se liga a carboidratos – lectina C like (lado direito). (B) Interação da região dimérica das lectinas dos venenos de Viperídeos e Elapídeos. (C) Lactose ligada a região CDR.

Fonte: Abreu et al., 2006; Sartim; Sampaio, 2015

Cerca de 80 membros da família de lectinas tipo C foram isolados e caracterizados bioquimicamente a partir do veneno de serpentes (OGAWA et al., 2005), porém apenas algumas tem sua estrutura primária disponível, como por exemplo as lectinas de *Agkistrodon p. piscivorus* (ApL) (KOMORI et al., 1999), *Bitis arietans* (BaL) (NIKAI et al., 1995), *Bothrops jararacussu* (BjcuL) (CARVALHO et al., 2002), *B. jararaca* (BjL) (OZEKI et al., 1994), *B. pirajai* (BpL) (HAVT et al., 2005), *B. insularis* (BiL) (GUIMARÃES-GOMES et al., 2004), as lectinas 1 e 2 de *Bungarus fasciatus* (BfL-1 e BfL-2) (ZHA et al., 2001), *Crotalus atrox* (CaL) (HIRABAYASHI et al., 1991), *Lachesis muta stenophyrs* (LmsL) (ARAGON-ORTIZ et al., 1996) e *Trimeresurus Stejnegeri* (TsL) (ZENG et al., 1999).

As lectinas de veneno de serpentes que não se ligam a carboidratos, conhecidas como lectinas do tipo *C like*, são encontradas na forma de heterodímeros (LU et al., 2005; MORITA et al., 2005), e apesar de suas características particulares desenvolvem ações fisiopatológicas como inibição da agregação plaquetária e inibição da coagulação ao se ligar ao fator IX (ABREU et al., 2006).

As diferenças na estrutura molecular e consequentes diversidades nas atividades biológicas dessas lectinas são resultantes da troca de resíduos de aminoácidos presentes nessas proteínas (CASTRO, 2013).

Estudos têm mostrado nos últimos trinta e cinco anos que o veneno das serpentes representa uma fonte importante de lectinas, que têm a capacidade de reconhecer uma ampla variedade de glicoconjugados, levando assim, a potenciais abordagens aplicadas em pesquisa básica, diagnóstico clínico, terapêutico e farmacológico. Os estudos sobre as lectinas de serpentes são extremamente importantes para a elucidação do envolvimento das lectinas na fisiopatologia do envenenamento causado por serpentes, e também para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas (SARTIM; SAMPAIO, 2015).

As lectinas de veneno de serpente compreendem uma classe de proteínas que se ligam de forma não covalente, porém com alta especificidade, aos resíduos de galactosídeos terminais de glicanos. O reconhecimento de glicanos específicos por lectinas é um evento chave para a variedade de atividades biológicas desenvolvidas (KISHORE, U.; EGGELETON, P.; REID, K. B, 1997).

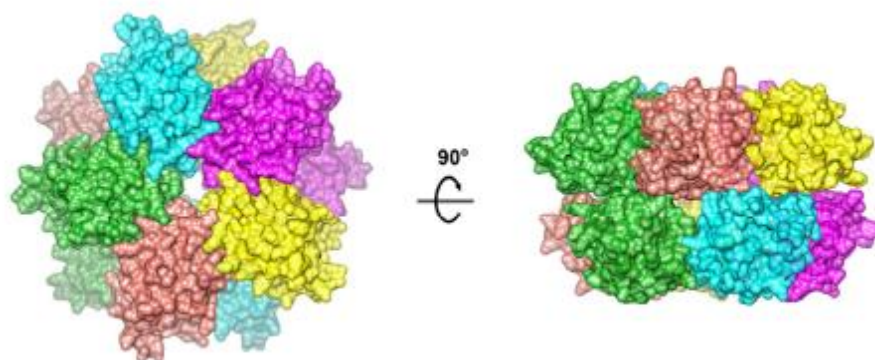
1.2- Lectina do Veneno da Serpente *Bothrops jararacussu* – BjcuL

A lectina presente no veneno da serpente *Bothrops jararacussu*, denominada de BjcuL, é uma lectina do tipo C, que pertence ao grupo VII, e que depende de íons cálcio para desenvolver suas atividades biológicas (DRICKAMER, 1988; CARVALHO et al., 1998; KILPATRICK, 2002; ZELENSKY; GREARY, 2005).

Essa proteína é obtida a partir do veneno da serpente *B. jararacussu* por meio do método de isolamento por cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna imobilizada com D-galactose, associado à cromatografia líquida de fase reversa em alta performance (HPLC), com uso de coluna C-18, tendo alto grau de pureza no isolamento (CARVALHO et al., 1998; PIRES et al., 2017).

O método de eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE 12,5%, permite observar uma única banda correspondente ao peso molecular de 15 kDa para essa lectina, que em condições não reduzidas mostra uma banda principal de peso molecular de 30 kDa, indicando para a BjuL a característica bioquímica de homodímero, ou seja, composta por duas subunidades idênticas ligadas por pontes dissulfeto (Figura 1) (CARVALHO et al., 1998; LOMONTE et al., 1990; CARVALHO et al., 2002; ELÍFIO-ESPOSITO et al., 2007; SILVA Jr et al., 2008; PIRES et al., 2017). A análise por MALDI-TOF revela que a BjuL tem peso molecular de 32.028 kDa para os dímeros (ELÍFIO-ESPOSITO et al., 2007; PIRES et al., 2017).

Figura 2 – Estrutura cristalográfica da lectina do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* - BjuL.



A figura mostra os domínios em α hélice e o predomínio de β -folha.

Fonte: Sartim et al., 2017

A BjuL possui homologia com outras lectinas de venenos de serpentes, tais como *Crotalus atrox*, *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, *Bitis arietans*, *Crotalus ruber*, *Bothrops insularis*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops pauloensis*, *Bothrops pirajai*, *Lachesis muta stenophrys*, *Trimeresurus okinavensis* e *Trimeresurus stejnegeri* (DRICKAMER, 1988; DRICKAMER; DODD, 1999; CARVALHO et al., 2002; KASSAB et al., 2004; SARTIM; SAMPAIO, 2015).

Sartim e colaboradores (2017) mostraram em seu trabalho que o grupo gentamicina de antibióticos aminoglicosídeos é um ligante para a BjuL, porém se liga em um sítio diferente da região CDR, altamente conservado e localizado próximo a região intermolecular de dois monômeros. Além disso, mostraram que essa lectina apresenta termoestabilidade quando ligada a galactose ou lactose, evento não observado quando os glicosídeos são glicose, frutose ou manose.

A B_{ju}L apresenta atividade hemaglutinante em eritrócitos humanos (SHARON; LIS, 1972; CARVALHO et al., 1998; KILPATRICK, 2002; PANUNTO et al., 2006), com afinidade aos glicosídeos presentes em hemácias de indivíduos de sangue tipo B em relação ao tipo A (ELÍFIO-ESPOSITO et al., 2007), bem como interação (SHARON; LIS, 1972) e inibição de proliferação de várias linhagens de células tumorais (CARVALHO et al., 2001; NOTE et al., 2012).

Essa lectina não apresenta efeito na agregação de plaquetas humanas quando a em concentração até 200 µg/mL. Em camundongos, de acordo com a dose utilizada, pode ocorrer efeitos locais, tais como edema e leve hipotensão transitória sem nenhum sinal hemorrágico, diferente do que ocorre com o veneno. A ação biológica da B_{ju}L para esses eventos ainda permanece obscura, sugerindo que tais ações são mais locais do que sistêmicas (PANUNTO et al., 2006).

Pereira-Bittencourt e colaboradores (1999) demonstraram que a B_{ju}L inibiu o crescimento de várias linhagens de células tumorais humanas. Essa lectina se liga as células tumorais, mas não inibe a adesão dessas a matriz extracelular, há supressão das células tumorais e de células endoteliais. O efeito citotóxico é observado após 96 horas de incubação da lectina com as células em cultura, na presença de 5 % de soro fetal bovino (SFB). As culturas suplementadas com 10% de SFB não são afetadas pela ação citotóxica da lectina. Isso foi atribuído ao fato de que o SFB, em baixas concentrações, pode agir na célula e lentamente em seu ciclo celular, alterando o metabolismo e expondo receptores celulares para B_{ju}L. O carcinoma de mama humano, o carcinoma de ovário, o glioblastoma e o crescimento de células endoteliais cerebrais bovinas foram inibidos pela lectina. Quanto ao carcinoma de bexiga, e leucemia (K-562), não houve inibição e nem estímulo de crescimento pela B_{ju}L, o que pode ser justificado pela ausência de co-receptores para lectina. Porém, novos estudos sobre os mecanismos intracelulares de ação da B_{ju}L são necessários para explorar o possível efeito apoptótico e/ou anti-angiogênico desta lectina (CARVALHO et al., 2001; STRATHMANN, M.; WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C., 2002).

De acordo com Nolte e colaboradores (2012), a B_{ju}L promove apoptose em células de câncer gástrico humano e interage com proteínas da matriz extracelular, evitando assim, a adesão dessas células a matriz. Esses dados são de relevância, já que a transformação oncogênica frequentemente está associada a alterações na organização do citoesqueleto que podem

influenciar na migração, adesão, capacidade de invasão celular, bem como ativação de sinais intracelulares capazes de inibir a proliferação celular, levando a apoptose.

As paredes dos vasos sanguíneos de camundongos tratados com BjuL apresentaram numerosos leucócitos interagindo com o endotélio, o que mostra que essa lectina age diretamente sobre as células endoteliais, criando uma superfície adesiva para a diapedese de um grande número de leucócitos. É possível considerar que as lectinas podem ser as moléculas envolvidas nas interações lectina-hidratos de carbono para o recrutamento de leucócitos aos locais inflamatórios (ELÍFIO-ESPOSITO et al., 2007; SARTIM; SAMPAIO, 2015).

Damasio e colaboradores (2014) demonstraram em seu trabalho que a BjuL interage com glicoproteínas presentes na superfície de células de uma linhagem HT29 de adenocarcinoma de cólon humano, induzindo apoptose. Estes resultados implicam que essa lectina serve como uma ferramenta potencial para inibir a proliferação de células tumorais.

Outro importante efeito biológico da BjuL foi demonstrado no trabalho de Klain e colaboradores (2015). Por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura os autores observaram que essa lectina inibiu biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus epidermidis* envolvidos em processos inflamatórios de mastite bovina, sem afetar a viabilidade bacteriana, evitando assim, pressão seletiva. A mastite bovina é uma grande ameaça para a saúde animal e da indústria de laticínios, e a formação de biofilme é um aspecto relevante para desencadear outras infecções.

A caracterização bioquímica da BjuL é útil para entender melhor os efeitos do veneno e ainda para futuras investigações de estratégias terapêuticas. Estudos biológicos do nosso grupo de pesquisa demonstraram o mecanismo molecular relacionado à inibição da proliferação no que se refere ao perfil da expressão gênica e de produção de citocinas, assim como os mediadores inflamatórios envolvidos na função de PBMCs humanos induzida pela BjuL (CASTRO, 2013 (Dados não publicados do Laboratório de Imunologia Celular Aplicado à Saúde – FIOCRUZ/RO; PIRES et al., 2017).

Com base nesses relatos o objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos da BjuL sob a resposta imunológica mediada por linfócitos T humanos e suas diferentes subpopulações. Os resultados obtidos poderão servir de base para o desenvolvimento de novos fármacos com interesse clínico e como ferramentas de prospecção biotecnológica.

1.3- Considerações gerais sobre os linfócitos e sua contribuição no sistema imune

A resposta imune a antígenos não próprios resulta em rápida expansão de linfócitos efetores com especificidade para o antígeno indutor. Os linfócitos podem ser divididos em duas populações principais, que são os linfócitos T e os linfócitos B. Os primeiros se originam de precursores da medula óssea e são dependentes do timo para que sua maturação ocorra. Os linfócitos B se originam de precursores da medula óssea e sua maturação parece ocorrer na própria medula óssea em mamíferos. Ambas as células apresentam grande heterogeneidade de funções e especificidade antigênica. A função predominante das células B é a produção de anticorpos específicos. Os receptores para antígenos nas células B são constituídos pelas duas cadeias leves e duas pesadas das imunoglobulinas, que são divididas em regiões variáveis e constantes. Nas regiões variáveis das imunoglobulinas aparecem sítios para ligação de antígenos. Após interação da imunoglobulina de superfície celular com seu específico antígeno, na presença de células T, as células B diferenciam em plasmócitos, que são responsáveis pela produção de anticorpos circulantes (MESQUITA Jr et al., 2010; LEBIEN; TEDDER, 2008).

A principal função das células T é de auxiliar as células B entre outras células por meio de interações celulares diretas e da secreção de citocinas. As células T com estas funções são chamadas de T auxiliares e expressam na sua superfície as moléculas CD4. Algumas células T são também capazes de matar outras células que expressam antígenos não próprios e são então denominadas de células T citotóxicas. A maioria das células T citotóxicas expressa a molécula CD8 na sua superfície (GASTEIGER; RUDENSKY, 2014).

A expressão de moléculas CD4 ou CD8 está geralmente correlacionada com a especificidade do receptor da célula T. Células T CD4⁺ reconhecem antígenos em associação a proteínas classe-II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), enquanto que células T CD8⁺ reconhecem antígenos em associação a proteínas de classe-I do MHC. Os receptores para os antígenos presentes nas células T (TCR) constituem um complexo molecular formado por várias cadeias constantes, coletivamente denominadas de complexo CD3, associadas não covalentemente a duas cadeias polimórficas que formam um heterodímero (TCR). Cada cadeia do heterodímero é dividida em regiões constantes e variáveis, as regiões variáveis formam um sítio para ligação de antígenos. A principal diferença entre os receptores de antígenos nas células T e B é que as células B podem interagir com antígenos livres em solução, enquanto as células T somente reconhecem os antígenos apresentados em associação a glicoproteínas do MHC expresso

por células apresentadoras de antígenos (APCs). Essas células possuem como funções processar e apresentar os antígenos para as células T, bem como secretar fatores de crescimento e diferenciação durante o desenvolvimento da resposta imune (MESQUITA Jr et al., 2010; GASTEIGER; RUDENSKY, 2014)

Vários tipos de células podem funcionar como células acessórias incluindo macrófagos (CD14⁺, CD11b⁺), monócitos (CD14⁺), células dendríticas (CD11c⁺, CD1a, CD40, HLA-DR), células B (CD19⁺), células endoteliais e fibroblastos. Portanto, o funcionamento do sistema imune depende de interações entre várias populações e sub-populações de células linfóides (CLAMAN, 1987; GASTEIGER; RUDENSKY, 2014) via moléculas de superfície celular e de moléculas solúveis como as citocinas que são liberadas por populações distintas de células imunes. Dentre as citocinas produzidas pelos linfócitos T, destaca-se a IL-2 que funciona como um fator de crescimento e diferenciação destas células. Assim sendo, ao mesmo tempo em que os linfócitos T secretam IL-2 ocorre o aumento da expressão dos receptores de membrana para este fator de crescimento, tornando assim possível a proliferação celular. Adicionalmente, outras citocinas também são produzidas pelos linfócitos T, tais como IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13. Na verdade, o padrão de citocinas produzido pelos linfócitos T ativados é que vai distinguir o fenótipo destas células em subpopulações de linfócitos Th1 e Th2 (VIALLARD et al., 1999; YODOH et al., 2000; KIDDI, 2003).

As interações de lectinas com glicoconjugados presentes na superfície de células do sistema imune podem induzir ativação celular, e conseqüentemente alterar o padrão de secreção de citocinas (MANNEL et al., 1991).

Com base nessas informações e o conhecimento sobre as lectinas de venenos, esse estudo teve o objetivo de investigar o efeito da BjuL ao interagir com células do sistema imunológico, tais como monócitos e subpopulações de linfócitos de linfócitos T.

2- Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Avaliar o efeito da BjuL sobre a resposta imunológica mediada por linfócitos T humanos isolados, e dentre os linfócitos T, o tipo celular responsável pelo perfil de citocinas liberadas.

2.2- Objetivos Específicos:

1. Determinar a viabilidade celular dos PBMCs frente a BjuL;
2. Verificar a atividade mitogênica da BjuL em PBMCs humanos;
3. Avaliar a produção de citocinas envolvidas na regulação da ativação e proliferação leucocitária, como a IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ e IL-17 em PBMCs humanos isolados incubados com a BjuL;
4. Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e TNF- α em PBMCs humanos isolados incubados com a BjuL;
5. Analisar a interação da BjuL aos diferentes tipos celulares;
6. Analisar a fenótipo celular responsável pela liberação de IL-10 e de TNF- α incubados com a BjuL.

3- Material e Métodos

3- Material e Métodos

3.1- Veneno e Lectina

O veneno da serpente *Bothrops jararacussu* foi fornecido pelo Serpentário Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP), obtido a partir de um *pool* de vários exemplares adultos. A BjuL, uma lectina isolada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (PIRES et al., 2017) foi fornecida pelo Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde (CEBio), da FIOCRUZ Rondônia e Universidade Federal de Rondônia (CEBio/FIOCRUZ-RO e UNIR).

3.2- Comissão de Ética

O presente trabalho foi submetido à análise da comissão de ética em pesquisa do Centro de Pesquisas em Medicina Tropical (CEPEM), e aprovado para a sua execução, sob registro do CEP número: 067/08.

3.3- Isolamento de PBMC humano

A obtenção de mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi feita por meio do método de gradiente de densidade com uso de Hystopaque 1077[®] (LACOUTH-SILVA et al., 2015; XAVIER et al., 2017). Para tanto, o sangue periférico humano foi coletado a partir de doadores voluntários adultos saudáveis, com idade entre 18 e 40 anos, excluindo os doadores que apresentavam qualquer tipo de infecção ou inflamação ou em processo de tratamento medicamentoso com antibióticos e anti-inflamatórios, segundo aprovação do Comitê de Ética. Após assepsia local com algodão embebido em álcool 70%, 24 mL de sangue foi coletado em tubos à vácuo heparinizados. Em seguida, o sangue, diluído em tampão fosfato-salina (PBS, 14 mM; NaCl, 2 mM NaH₂PO₄H₂O 7mM, pH 7,4) foi dispensado em tubos de 50mL e 7mL de histopaque 1077[®] cuidadosamente adicionado, seguido de centrifugação a 400 *xg* por 30 minutos a 20°C. O plasma foi descartado e a camada de PBMC foi coletada e colocada em um novo tubo de 15 mL. A amostra foi lavada com PBS 1X por três vezes a 600 *xg* por 5 minutos a 20°C. A cada lavagem o sobrenadante foi descartado e o tubo completado com PBS 1X. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o material foi ressuspensão em 1 mL de meio de cultura RPMI suplementado com gentamicina (100 µg/mL), L-glutamina (2mM) e 10% de soro fetal

bovino (SFB). A seguir, uma alíquota de PBMCs isolados foi usada para a determinação do número de células totais em hemocítmetro de Neubauer, em microscópio de luz, após diluição (1:20, v/v) em líquido de Turk (cristal violeta 0,2% em ácido acético 30%). O grau de pureza dos PBMCs (>95%) foi confirmado por características morfológicas e de coloração, em esfregaços celulares corados com kit de coloração Panótico (*Newprov*, BR) (MANNONI et al., 1982). e por marcação com anticorpos monoclonais para detecção no citômetro de fluxo Becton Dickinson modelo FACScan (*BD Biosciences*), acoplado a um computador.

A suspensão de células foi analisada fazendo-se aquisição e análise de 30000 a 60000 eventos Os dados adquiridos foram analisados pelo software *Cell Quest* (*BD Biosciences*), com base nas propriedades físicas e químicas das células (tamanho e granulosidade ou complexidade interna), bem como a intensidade de fluorescência que é proporcional a quantidade de marcação. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

Tabela 2: Marcadores de Superfície Celular

Marcador de Superfície (CD)	Tipo Celular
CD14	Monócito
CD3	Linfócito T
CD4	Linfócito T auxiliar
CD8	Linfócito T citotóxico
CD19	Linfócito B
CD16	Célula Natural <i>Killer</i>
CD25	Receptor de IL-2
CD66b	Marcador de neutrófilo

3.4- Ensaio de Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo

Os PBMCs (1×10^6 células/poço), isolados conforme item 3.3, foram cultivados em placas para cultura celular de 96 poços, com volume final de 100 μ L de RPMI suplementado. As células foram incubadas com RPMI (grupo controle negativo) ou BjuL (5 e 10 μ g/mL) (grupo experimental) nos tempos de 1, 2, 8, 24, 48 e 96 horas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após a incubação foi adicionado 0,1 μ L de iodeto de propídio (PI) e 0,2 μ L de laranja de tiazol (TO) (*BD™ Cell Viability Kit*) e, a amostra agitada em vórtex e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi realizada aquisição e análise de 30000 a 60000 eventos no FACScan. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

3.5- Ensaio de Proliferação Celular por Citometria de Fluxo – Marcação com Carboxifluoresceína (CFSE)

O CFSE foi diluído em DMSO, seguindo instruções do fabricante, protegido da luz. A solução de uso foi preparada no momento do ensaio diluindo-se 7 μ L de CFSE em 7 mL de PBS 1X a 10% de albumina bovina séria (BSA) estéril, agitado em vórtex e ao abrigo da luz (HASBOLD et al., 1999; TESFA et al.; 2003; QUAH et al., 2007). Em seguida os PBMCs (1×10^6 células/poço), isolados conforme item 3.3, e ressuspensos em 1 mL de RPMI suplementado, foram dispensados em tubo de 15 mL seguido da adição de 1 mL de CFSE. As amostras foram agitadas em vórtex e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, protegidas da luz. Após esse período, 1 mL de RPMI (suplementado) gelado foi adicionado para bloquear a reação. A amostra foi então centrifugada a 600 xg por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado, e o material foi ressuspensão e lavado por 3 vezes em PBS 1X. Os PBMCs (1×10^6 células/poço) foram cultivados em placas para cultura celular de 96 poços, com volume final de 100 μ L de RPMI suplementado. As células foram incubadas com RPMI (grupo controle negativo), concanavalina-A (con-A: 5 μ g/mL) (grupo controle positivo) ou BjuL (5 e 10 μ g/mL) (grupo experimental) por 72 horas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após esse período, foi realizada marcação de superfície celular com anticorpos monoclonais anti-CD3-PerCP, ou anti-CD14-PE, ou anti-CD4-PE, ou anti-CD8-PE, ou anti-CD19-PE, ou anti-CD16-PE (*BD™*), seguido de incubação por 30 minutos no gelo, protegidos da luz. Após essa marcação, as amostras foram lavadas duas vezes em PBS 1X para remover os anticorpos não ligados. Em seguida, foi feita aquisição e análise de 30000 a 60000 no FACScan. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

3.6- Determinação da produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) intracelulares

Os PBMCs (2×10^6 células/poço), isolados conforme item 3.3, foram cultivados em placas para cultura celular de 96 poços, com volume final de 100 μ L de RPMI suplementado. As células foram incubadas com RPMI (grupo controle negativo), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo), ou BjuL (5 e 10 μ g/mL) (grupo experimental) por 3 horas. Após esse período de incubação, 100 μ L de uma solução contendo o fluoróforo 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) (10 μ M), diluído em PBS, foi adicionado seguido de nova incubação por 30 minutos, a 37°C, ao abrigo da luz. Em seguida as células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD3-PerCP e anti-CD14-PE, por 30 minutos no gelo, e protegido da luz. Logo após a marcação foi feita aquisição e análise no FACScan. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

3.7- Ensaio de Acoplamento de BjuL ao Isotiocianato de Fluoresceína – FITC

O ensaio de acoplamento do *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC) à BjuL foi realizado via ligação succinimidil-éster entre a proteína e o FITC. Para isso, preparou-se uma solução contendo BjuL (4 mg/mL) em tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9 e uma solução contendo FITC (1 mg/mL) em DMSO anidro. Para cada 200 μ L de solução de proteína foram adicionados 10 μ L da solução de FITC, de maneira lenta e sob agitação suave, o que resultou na razão de 1:100 (proteína: FITC (mol/mol)). A amostra foi incubada ao abrigo da luz por 8 horas a 4 °C. Para o bloqueio dos grupos reativos, foram adicionados 10 μ L de cloreto de amônio a 50 mM (NH₄Cl a 50 mM), seguida por incubação ao abrigo da luz por 2 horas a 4 °C. Posteriormente, a amostra foi diafiltrada em filtro com MCO de 3 kDa (*Amicon*), para separação do FITC não ligado à proteína. Por fim, a BjuL-FITC foi mantida em PBS 1X, ao abrigo da luz a -20 °C.

Para verificar a eficiência do acoplamento, a razão das absorbâncias medidas em 280 nm e 495 nm foi determinada, considerando-se adequados os valores entre 0,3 e 1,0.

3.8- Imunofenotipagem das subpopulações de PBMCs

A imunofenotipagem foi feita com base no tamanho (FSC- *Forward Scatter*) e granulosidade (SSC- *Side Scatter*) das populações celulares, juntamente com a marcação com 3 μ L de anticorpos monoclonais anti-CD3-PerCP, anti-CD14-PE, anti-CD66b-FITC, anti-CD4-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD19-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE, ou anti-CD16-PE, para identificação de antígenos específicos expressos na superfície celular, juntamente com seus

respectivos controles negativos, não marcados. Para tanto, os PBMCs (1×10^6 células/poço), isolados conforme item 3.3, foram cultivados em placas para cultura celular de 96 poços, com volume final de 100 μ L RPMI suplementado, adicionado 5 μ L de lectina acoplada ao FITC (BjcuL-FITC), foram mantidos por 30 minutos no gelo e protegidas da luz. Após a marcação, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS 1X para remover os anticorpos não ligados. A dispersão de luz frontal (*Forward Scatter*) e lateral (*Side Scatter*) bem como a fluorescência remanescente de, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e proteína clorofila peridina (PerCP) foram utilizados para diferenciar as subpopulações celulares. Em seguida foi feita aquisição e análise no FACScan. Os dados foram expressos em porcentagem (%).

3.9- Preparo de lâminas para imunofluorescência

Os PBMCs (4×10^5 células/lamínula), isolados conforme item 3.3, foram adicionados em lamínulas tratadas com poli-L-lisina, e mantidas no gelo. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) a 2% diluído em tampão PEM (PIPES 10 mM, EGTA 5 mM, $MgCl_2$ 2 mM, PFA 2%, pH 6,8) por 15 minutos. Em seguida as lamínulas foram lavadas três vezes com tampão PB ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0,1M, $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ 0,1 M, pH 7,4, diluído em PBS 1X) por 5 minutos, pós fixadas com etanol (ETOH) a 95% por 5 minutos. As lamínulas foram lavadas novamente por três vezes com tampão PB por 5 minutos e incubadas com Faloidina-Alexa Fluor^R 546 (Invitrogen) (diluída 1:40 em PBS 1X) por 30 minutos. Após esse período, foi realizada nova lavagem com tampão PB seguida de incubação com DAPI (Sigma) (diluído 1:100 em PBS 1X) por 15 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas mais uma vez e parte delas incubadas com BjcuL-FITC por 30 minutos, e a outra parte das lamínulas não foram incubadas com a lectina para serem utilizadas como controle negativo. Por fim, as lamínulas foram lavadas uma vez com tampão PB, montadas em lâminas com *Fluoromount*TM (Sigma), armazenadas em geladeira ao abrigo da luz e, posteriormente analisadas em microscópio confocal Nikon Eclipse Ti Invertido com cabeça de escaneamento A1R.

3.10- Quantificação de citocinas por *cytometric beads array* (CBA) (Kit Th1/Th2/Th17 BDTM)

Os PBMCs (1×10^6 células/poço), isolados conforme item 3.3, foram cultivados em placas de 96 poços, com volume final de 100 μ L RPMI suplementado. As células foram incubadas com RPMI (grupo controle negativo), concanavalina-A (con-A: 5 μ g/mL), LPS (1 μ /mL), PMA (500

ng/mL) (controles positivos) ou BjuL (5 e 10 µg/mL) (grupo experimental) nos tempos de 4, 12, 24, 48, 72 e 96 horas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Em seguida, as amostras foram então centrifugadas a 600 *xg* por 5 minutos a 4°C e coletado 60 µL do sobrenadante. A quantificação de citocinas por CBA exige o preparo de curva padrão com concentrações de 20 a 5000 pg/mL. Para esse procedimento foi utilizado um tubo com padrão de citocinas conhecidas e liofilizadas, os mesmos foram transferidos para um tubo de ensaio e diluídos em 2 mL de diluente de ensaio, passando a ser denominado *top standard*, que permaneceu a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a diluição seriada a partir do *top standard* (1/2 1/4 1/8 1/16 1/32 1/64 1/128 1/256) utilizando 300 µL de diluente de ensaio nos oito tubos de diluição, mais um tubo único denominado como branco - (curva: *top standard*, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, branco) As *beads* de captura de citocinas (A1-A2) contidas em sete frascos separados foram agitadas em vórtex, dispensadas imediatamente em outro tubo de ensaio e mantidas por 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz, formando assim o *mix* de captura de *beads*. Para o ensaio de citocinas, o *mix* de captura de *beads* foi agitado em vórtex, em seguida, foi adicionado 50 µL em todos os tubos, curva padrão e amostras. Em seguida, foi adicionado 50 µL de ficoeritrina (PE) em todos os tubos (curva padrão e amostras). Os tubos de ensaio foram incubados por 3 horas a temperatura ambiente e protegidos da luz. Após esse período, foi realizada lavagem adicionando-se 1 mL de tampão em cada tubo e centrifugados a 200 *xg* por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e descartado. Foi adicionado 300 µL de tampão de lavagem em cada tubo de ensaio para ressuspender o precipitado. A leitura da fluorescência das amostras foi realizada no FACScan utilizando o *software Cell Quest (BD Biosciences)* e, os dados obtidos no *software FCAP Array 3.0*. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.11- Marcação de citocinas intracelulares

Os PBMCs (1x10⁶ células/poço), isolados conforme item 3.3, foram cultivados em placas de 96 poços, com volume final de 100 µL de RPMI suplementado. As células foram incubadas com RPMI (grupo controle negativo), concanavalina-A (Con-A: 5 µg/mL), LPS (1 µg/mL), PMA (500 ng/mL) (grupos controles positivos) ou BjuL (5 e 10 µg/mL) (grupo experimental), seguido da adição de 0,7 µL de *Stop Golgi PlugTM (Kit Cytofix/CytopermTM Fixation/Permeabilization with BD GolgiPlugTM) (BD)*. O tempo de incubação variou de acordo com o tipo de citocina a ser

marcada, sendo de 6 horas de incubação para a IL-10, 2 horas para o TNF- α e 6 horas para o fator de transcrição FoxP3. Após o período de incubação foi realizada a marcação de superfície celular com 3 μ L de anticorpos monoclonais anti-CD3-PerCP, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD19-FITC, anti-CD16-FITC, anti-CD25-APC ou anti-CD14-FITC, seguida da incubação por 30 minutos no gelo e, protegidos da luz. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes com 250 μ L de tampão *Perm/Wasch*TM 1X. As células foram ressuspensas em 250 μ L de tampão *Cytofix/Cytoperm*TM e mantidas por 20 minutos a 4°C, ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão *Perm/Wasch*TM 1X seguida de marcação intracelular com 5 μ L de anticorpos monoclonais anti-IL-10-PE, anti-TNF-PE, ou anti-FoxP3-PE, e incubadas por 30 minutos no gelo ao abrigo da luz. As amostras foram lavadas logo em seguida com tampão *Perm/Wasch*TM 1X para remover os anticorpos não ligados e a leitura realizada no FACScan e analisada no *software Flow-Jo*. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

3.12- Análise Estatística

Os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil, com pelo menos três unidades experimentais independentes por grupos (controles e tratamentos). Várias comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal Wallis seguida pelo a posteriori de Dunn utilizando o *software GraphPad Prisma 6.0* e *software livre R* (R 3.2.3). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para a análise estatística dos dados de citocinas obtidas por CBA os valores médios e seus respectivos intervalos de confiança foram estimados por meio de *bootstrap*.

4- Resultados

4- Resultados

4.1- Ensaio de Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo

O ensaio de viabilidade celular determinou as reais porcentagens de células viáveis e mortas ao detectar a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo e do laranja de tioazol. A figura 3A mostra a incubação dos PBMCs com RPMI (grupo controle negativo) por uma hora, resultando em 98,43% de células viáveis e 1,57% de células mortas. As células incubadas com a lectina (BjcuL) na concentração de 5 µg/mL (Figura 3B) e de 10 µg/mL (Figura 3C) (grupo experimental) resultaram em 97,87% de células viáveis e 2,13% de células mortas e 98,08% de células viáveis e 1,92% de células mortas, respectivamente, após 1 hora de incubação.

Após 2 horas de cultura celular, o controle apresentou 99,33% de células viáveis e 0,67% de células mortas (Figura 3D), enquanto as células incubadas com lectina de 5 µg/mL (Figura 3E) e 10 µg/mL (Figura 3F) apresentaram 97,16% e 95,68% de células viáveis e, 2,84% e 4,32% de células mortas, respectivamente.

Após 8 horas de cultura, observou-se 97,72% de células viáveis e 2,38% de células mortas no controle negativo (Figura 3G), 91,46% e 90,57% de células viáveis e 8,54% e 9,43% de células mortas para os PBMCs incubados com lectina nas concentrações de 5 e 10 µg/mL (Figura 3H e 3I), respectivamente.

No tempo de cultura de 24 horas, o controle negativo apresentou 99,25% de células viáveis e 0,75% de células mortas (Figura 3J). Já as células incubadas com lectina nas concentrações de 5 e 10µg/mL apresentaram 96,53% e 3,47% (Figura 1K), 96,71% e 3,29% (Figura 3L) de células viáveis e mortas, respectivamente.

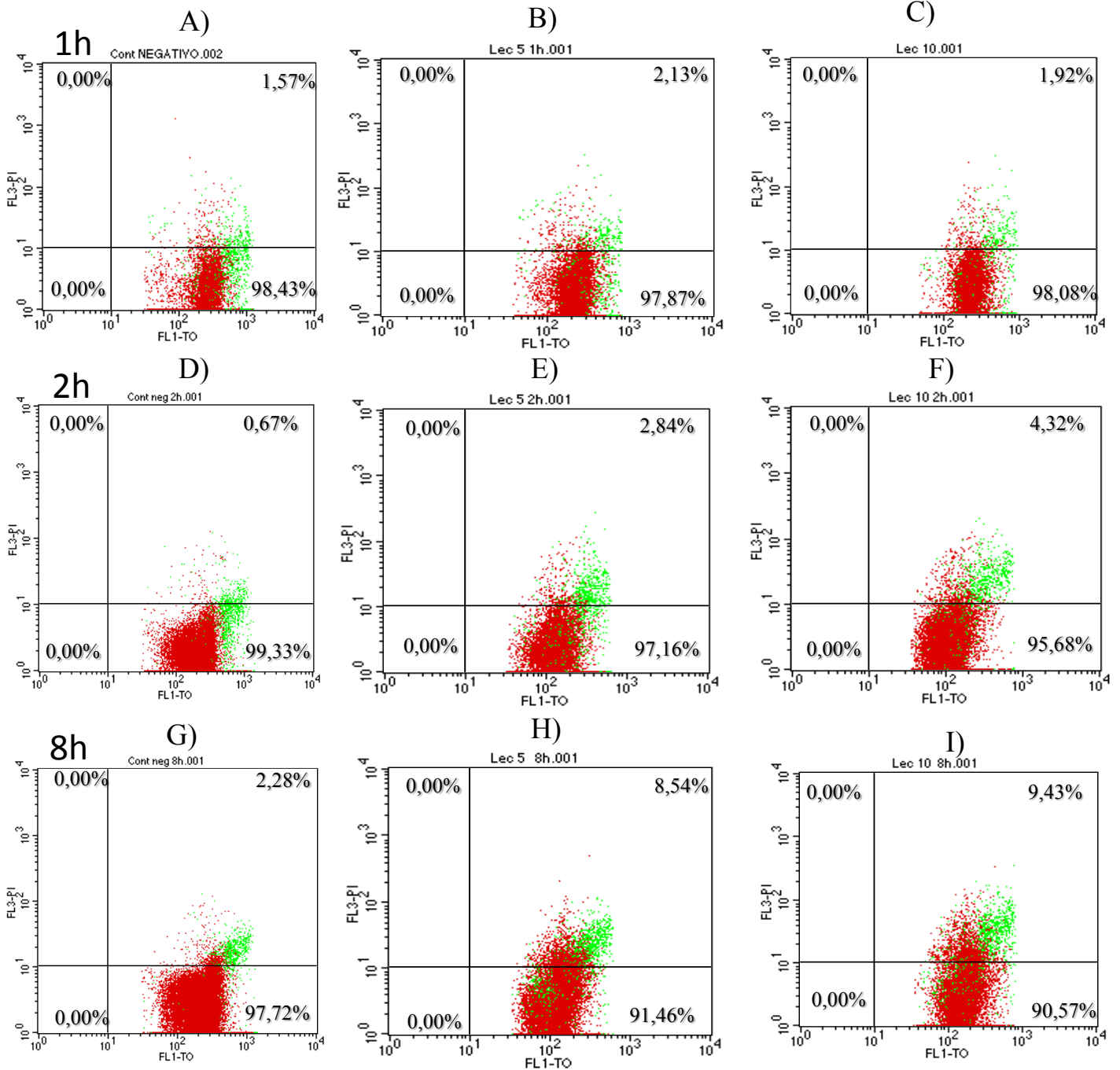
Os PBMCs, após cultura de 48horas, apresentou no controle negativo 98,43% de células viáveis e 1,57% de células mortas (Figura 3M). As células incubadas com lectina (5 e 10 µg/mL) apresentaram, 92,26% e 7,74% (Figura 3N), 93,02% e 6,68% (Figura 3O) de células viáveis e mortas, respectivamente.

Por fim, no período de inbucação de 96 horas, observou-se no controle negativo 94,05% de células viáveis e 5,95% de células mortas (Figura 3P). Nas células incubadas com lectina (5 e 10 µg/mL) os valores obtidos foram de 93,72% e 6,28% (Figura 3Q), 95,93% e 4,07% (Figura 3R) de células viáveis e mortas, respectivamente.

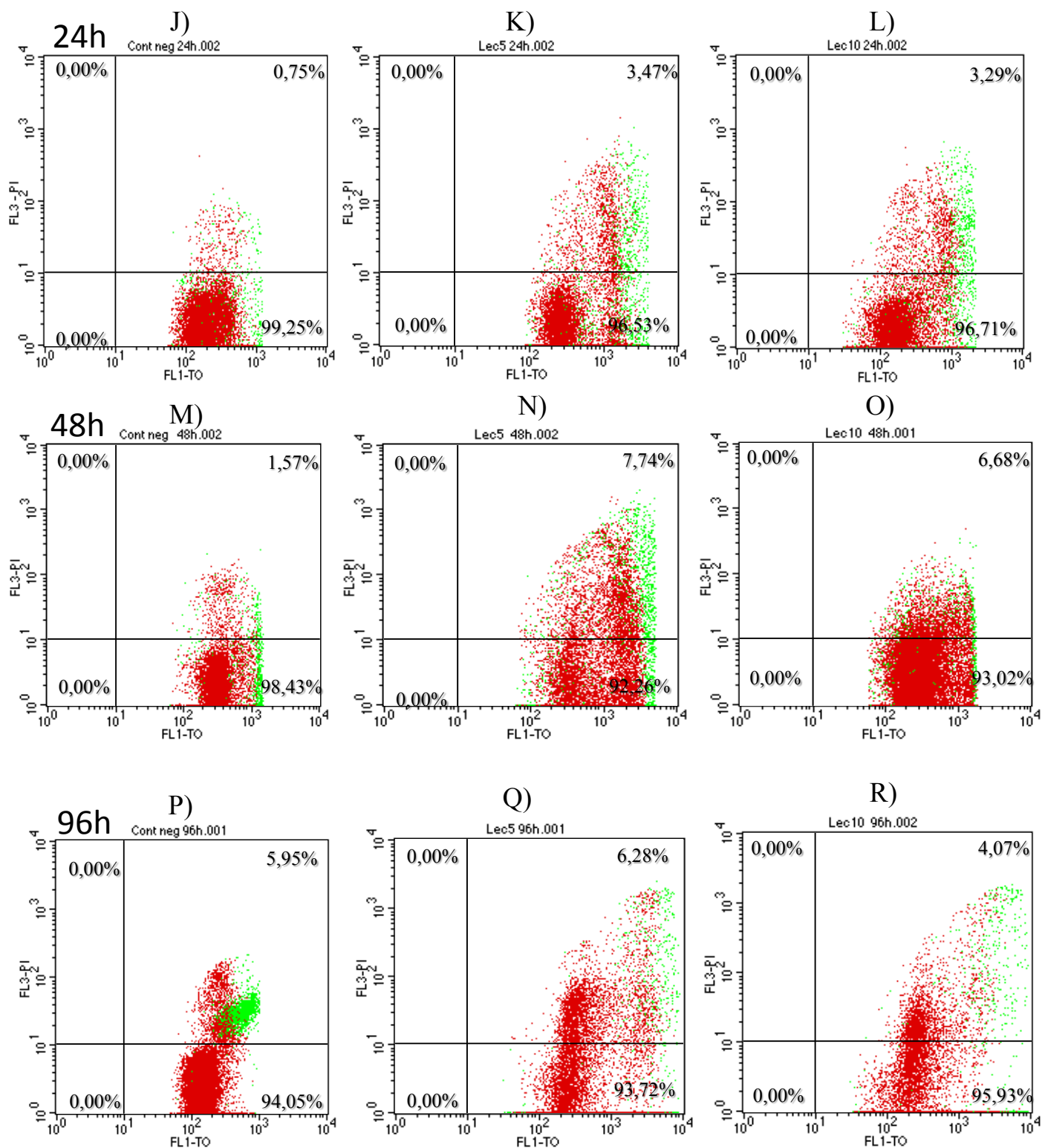
A figura 4 mostra que não houve diferença significativa com relação a viabilidade celular ao comparar os grupos experimentais, incubados a BjuL, com o grupo controle negativo (RPMI), em diferentes tempos de incubação.

Sendo assim, os dados mostraram que, mesmo com tempo longo de incubação e nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$, a BjuL não foi tóxica para os PBMCs.

Figura 3 – Viabilidade Celular por citometria de fluxo de PBMCs incubados com a BjeuL.

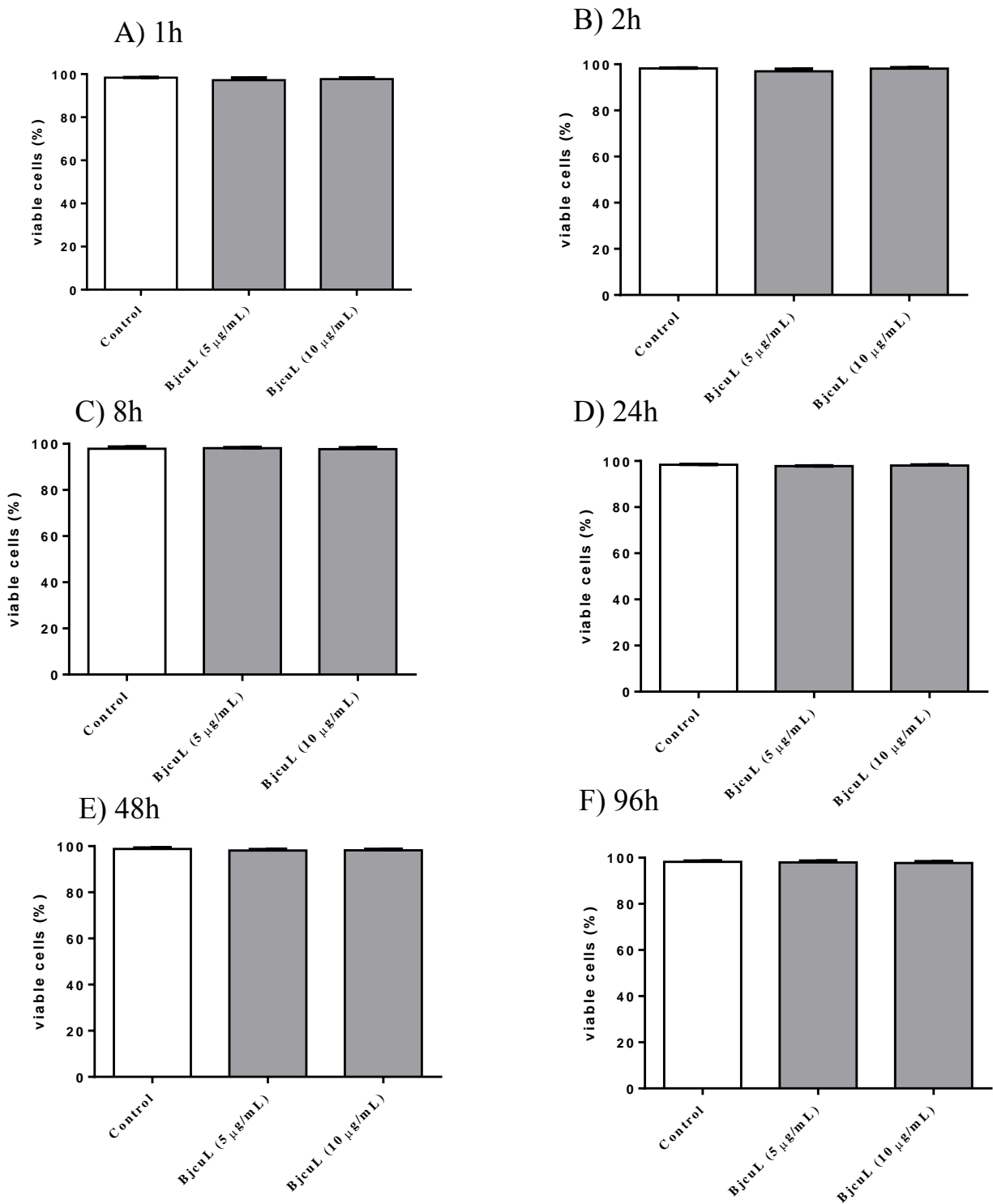


O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade com Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo) (A, D, G, J, M e P) ou lectina de 5 µg/mL (B, E, H, K, N e Q) ou 10 µg/mL (C, F, I, L, O e R) (grupo experimental) em diferentes tempos. Em seguida as células foram marcadas com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), incubados por 5 minutos à temperatura ambiente e realizada aquisição e análise de 30000 a 60000 eventos no FACSscan. Para a determinação das reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectada a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1. Dados representativos de 1 N experimental.



O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade com Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo) (A, D, G, J, M e P) ou lectina de 5 µg/mL (B, E, H, K, N e Q) ou 10 µg/mL (C, F, I, L, O e R) (grupo experimental) em diferentes tempos. Em seguida as células foram marcadas com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), incubados por 5 minutos à temperatura ambiente e realizada aquisição e análise de 30000 a 60000 eventos no FACScan. Para a determinação das reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectada a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1. Dos representativos de 1 N experimental.

Figura 4 – Efeito da BjuL sobre a viabilidade celular de PBMCs humanos



. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado e, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo) ou BjuL nas concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL (grupo experimental), em diferentes tempos. A viabilidade dos PBMCs foi avaliada pela marcação com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI) e leitura por citometria de fluxo. Os dados representam a média ± EPM de 3 voluntários independentes.

4.2- Ensaio de Proliferação Celular por Citometria de Fluxo

O ensaio de proliferação celular de PBMCs (1×10^6 células/poço) foi realizado incubando as células, marcadas com CFSE, com RPMI (grupo controle negativo), concanavalina-A (Con-A: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (grupo controle positivo), ou BjuL (5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (grupo experimental). Logo após a cultura de 72 horas adicionou-se os anticorpos monoclonais - anti-CD3-PerCP, anti-CD14-PE, anti-CD4-PE, anti-CD8-PE, para a fenotipagem celular.

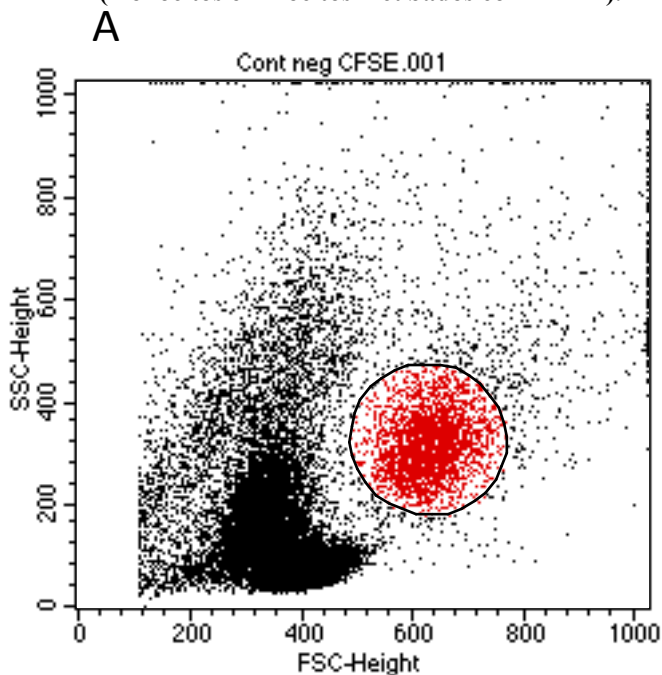
A figura 5A define o *gate* na população de monócitos, com 8,41% do total de eventos adquiridos, e no histograma a região M1 com 99,88% de células marcadas por CFSE (Figura 5B). Enquanto a figura 5C mostra o *gate* na população de linfócitos, que representa 49,86% dos eventos adquiridos, e a região M1 com um pico de 97% de células marcadas por CFSE (Figura 5D) (grupos controles negativos).

A figura 6 refere-se ao grupo controle positivo marcado com CFSE com vários picos no histograma (Figura 6B), e a imunofenotipagem. Assim, a região R2 apresenta 23,62% de linfócitos T CD8⁺ e 7,55% de linfócitos T CD8⁺ ativados (Figura 6C). A região R3 mostra 19,73% de linfócitos T CD8⁺ e 13,33% de linfócitos T CD8⁺ ativados (Figura 6D). As regiões R4 e R5 apresentam 19,06% e 9,28%, 65,14% e 90,49% de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD8⁺ ativados, respectivamente (Figura 6E e 6F). Sendo assim, foi observado que nas regiões R4 e R5, onde ocorrem os diferentes picos no histograma há maior porcentagem de linfócitos T.

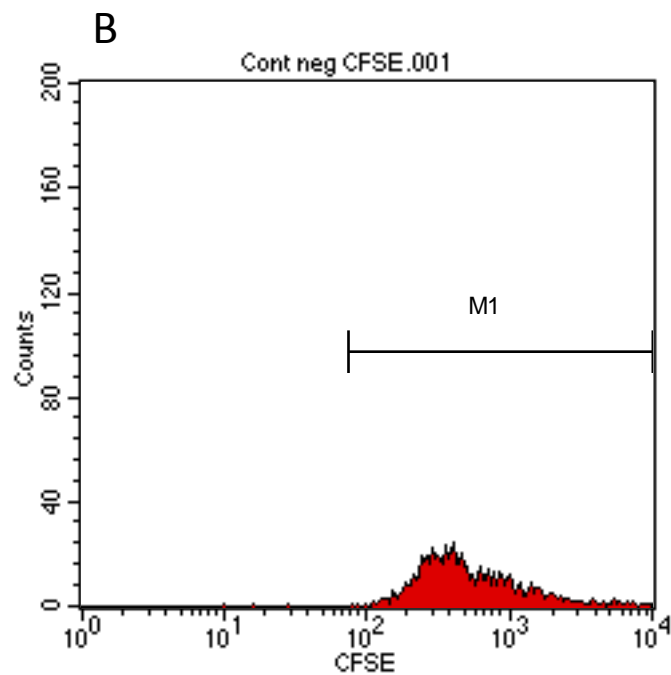
O grupo experimental incubado com lectina na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostra um único pico no histograma (Figura 7A e 7C), o que significa que não houve proliferação celular das células marcadas por CFSE. Na região R3 há 69,21% de linfócitos T CD4 – CD3⁺CD4⁺ (Figura 7B), 42,12% de linfócitos T CD8⁺ e 15,67% de linfócitos T CD8⁺ ativados (Figura 7D). No grupo experimental incubado com a lectina na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ também foi possível observar um único pico no histograma (Figura 8A e 8C), indicando que não houve proliferação celular das células marcadas por CFSE mesmo na maior concentração de lectina. A região M1 indica 66,48% de linfócitos T CD4 – CD3⁺CD4⁺ (Figura 6B), R3 apresenta 39,42% de linfócitos T CD8 e 14,89% de linfócitos T CD8 ativados (Figura 8D).

Sendo assim, os dados experimentais mostraram que a BjuL não induziu atividade mitogênica nos linfócitos quando comparada ao grupo controle positivo estimulado por Con-A, um conhecido agente indutor de proliferação de linfócitos T (ANDO et al., 2013).

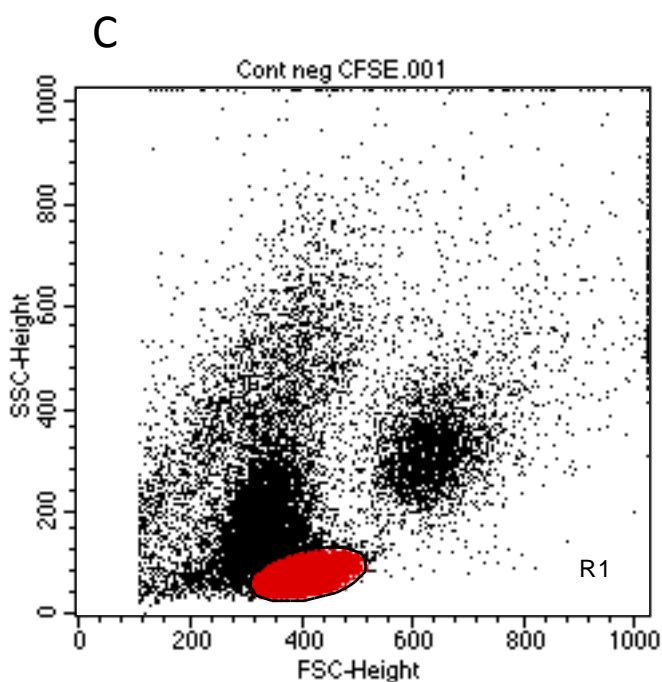
Figura 5 – Proliferação Celular e Imunofenotipagem de células marcados por CFSE. Grupo controle negativo (monócitos e linfócitos incubados com RPMI).



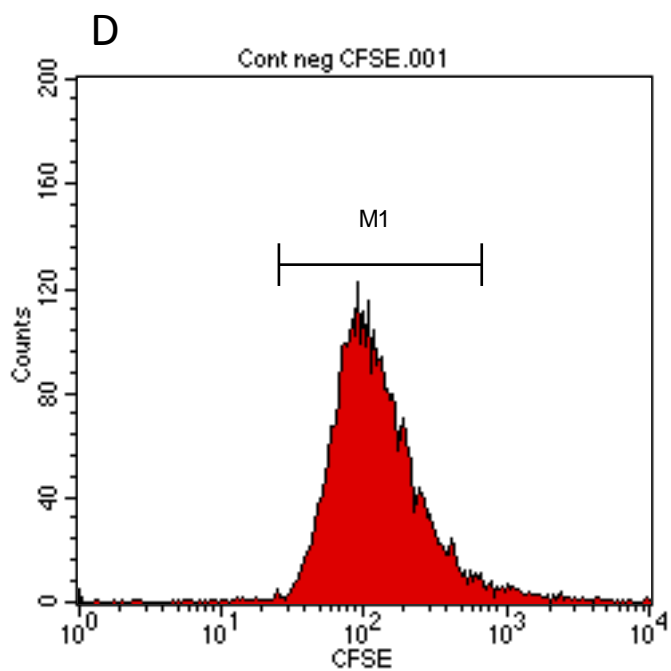
Aquisição: 30000/G1: 2522– 8,41%



Aquisição: 30000/M1: 2519– 99,88%



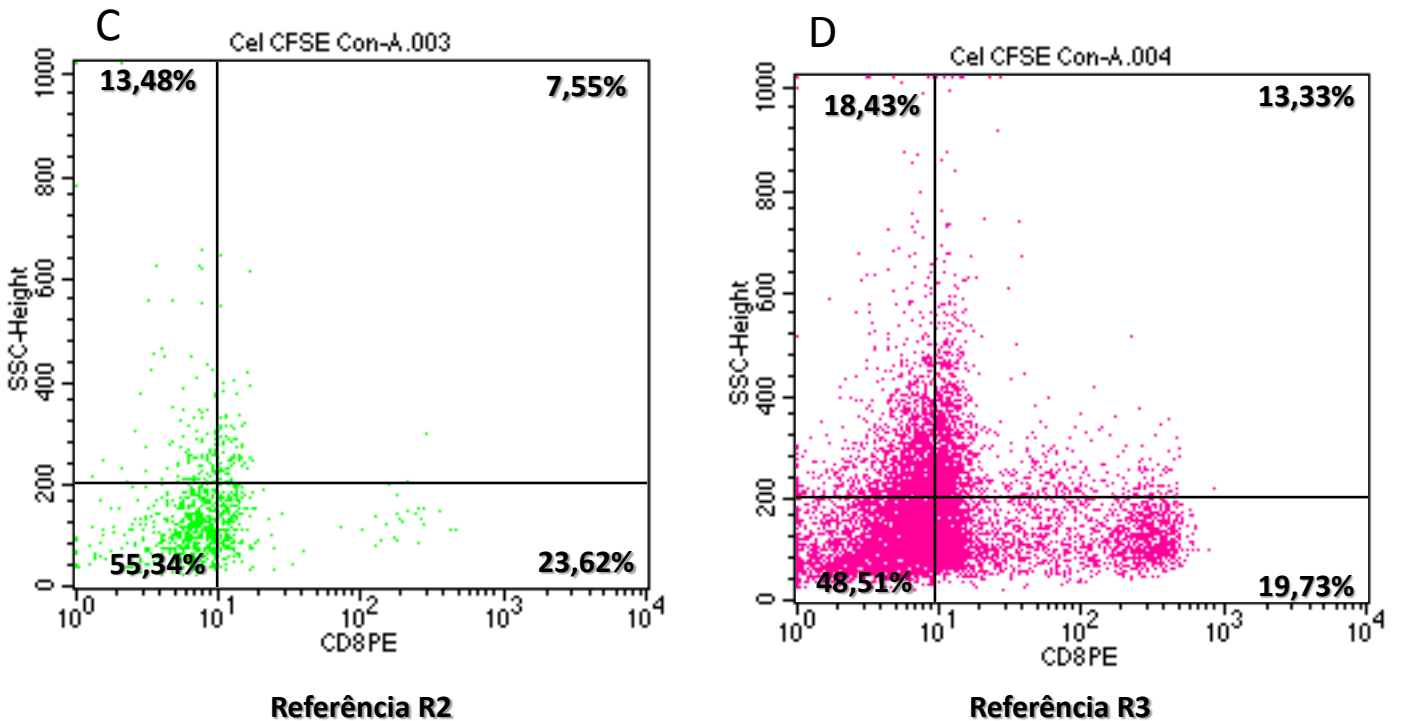
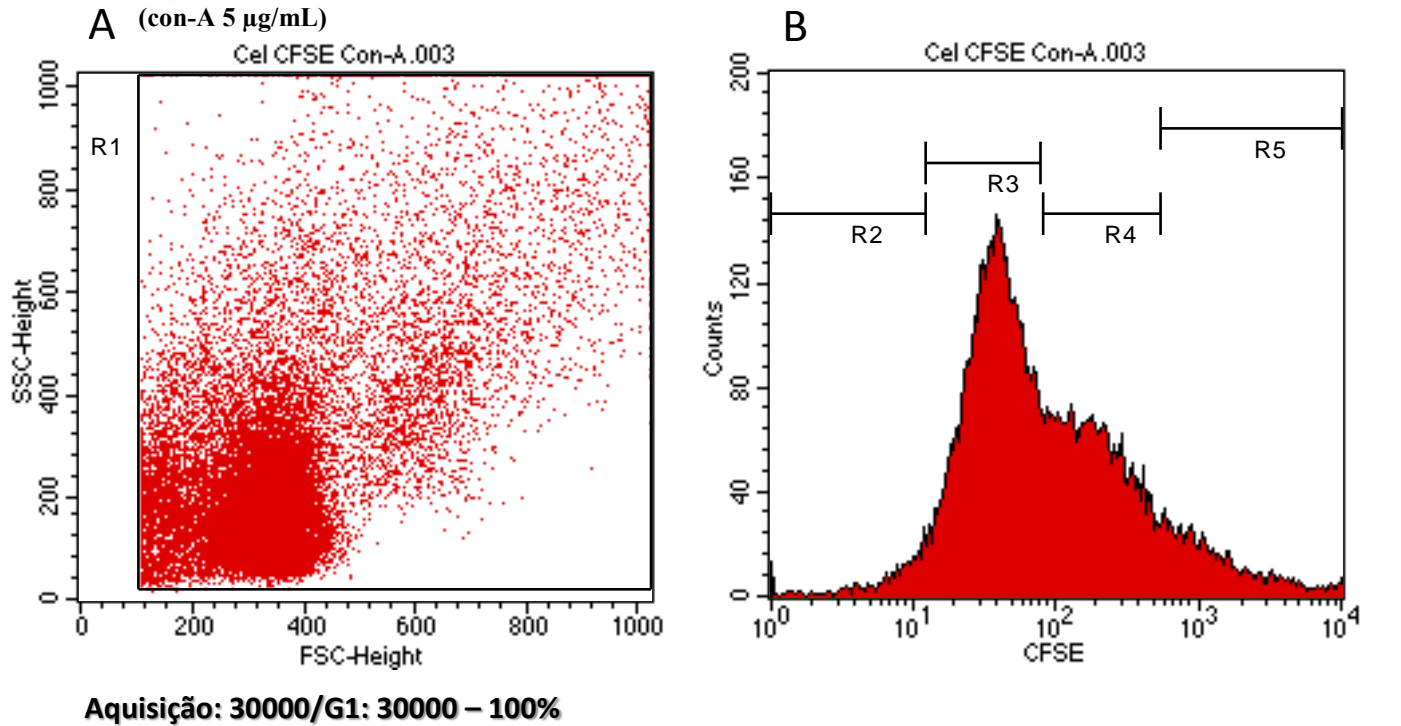
Aquisição: 30000/G1: 14959– 49,86%



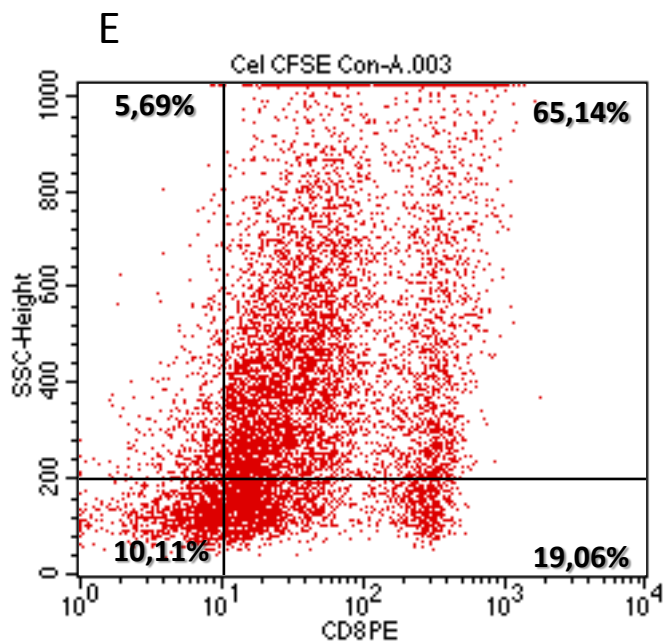
Aquisição: 30000/M1: 14510– 97,00%

O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram marcados por CFSE e incubados com RPMI (grupo controle negativo). Foi realizada a aquisição e análise de cerca de 30000 a 60000 eventos no FACScan, com a definição do *gate* em diferentes populações separadas de acordo com seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Os diferentes picos observados no histograma é o que determina a presença ou ausência de proliferação celular. A figura mostra aquisição e análise de 30000 eventos, *gate* na população de monócitos (A), e linfócitos (C), e consequente ausência de proliferação celular para monócitos (B) e linfócitos (D).

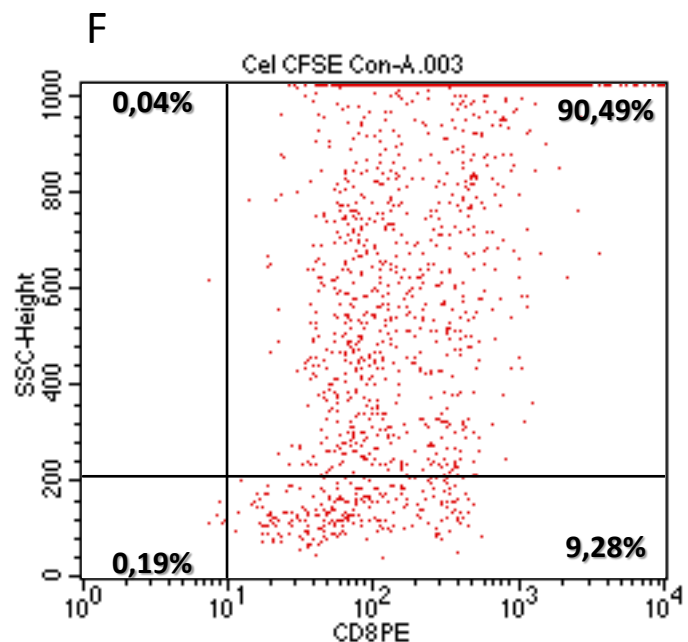
Figura 6 – Proliferação Celular e Imunofenotipagem de células marcadas por CFSE. Grupo controle positivo



O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram marcados por CFSE e incubados com Con-A (grupo controle positivo), seguido da adição de anticorpos monoclonais - anti-CD3-PerCP e anti-CD8-PE, para imunofenotipagem celular. Foi realizada a aquisição e análise de cerca de 30000 a 60000 eventos no FACScan, com a definição do *gate* em diferentes populações separadas de acordo com seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Os diferentes picos observados no histograma é que determinam a presença ou ausência proliferação celular. A figura mostra aquisição e análise de 30000 eventos, *gate* selecionando todos os eventos adquiridos (A), vários picos no histograma indicando proliferação celular (B) e a imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos T (C, D, E e F).



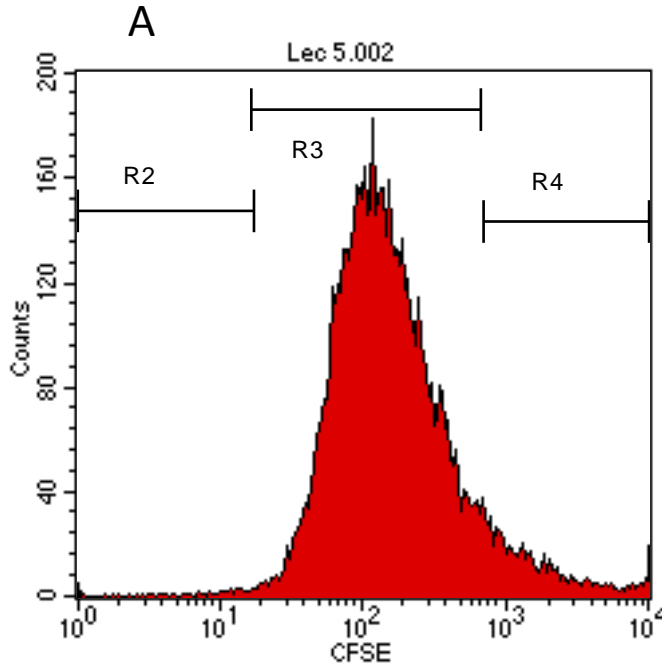
Referência R4



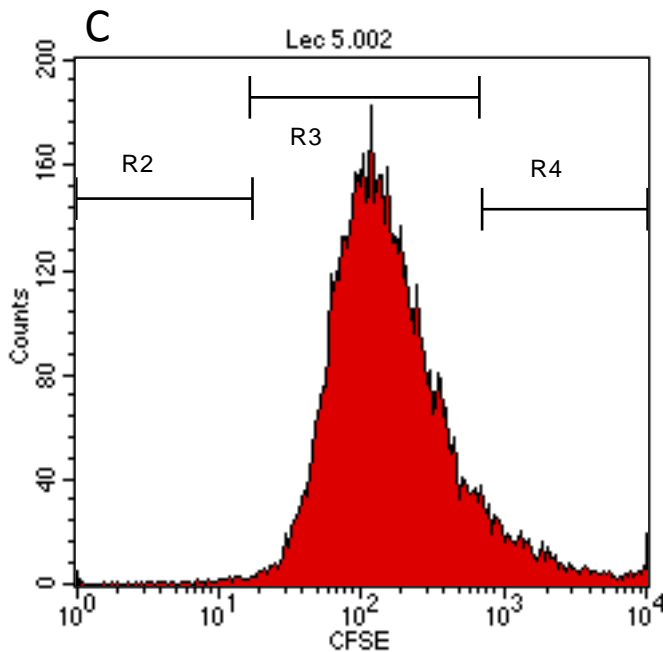
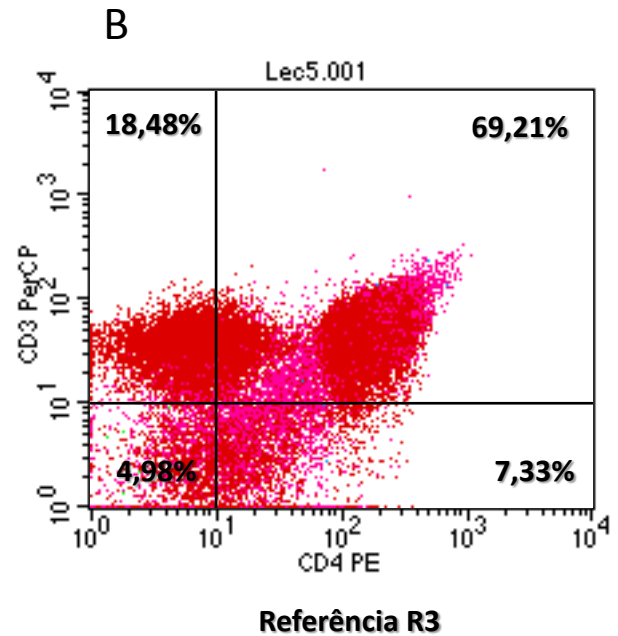
Referência R5

O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram marcados por CFSE e incubados com Con-A (grupo controle positivo), seguido da adição de anticorpos monoclonais - anti-CD3-PerCP e anti-CD8-PE, para imunofenotipagem celular. Foi realizada a aquisição e análise de cerca de 30000 a 60000 eventos no FACScan, com a definição do *gate* em diferentes populações separadas de acordo com seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Os diferentes picos observados no histograma é que determinam a presença ou ausência proliferação celular. A figura mostra aquisição e análise de 30000 eventos, *gate* selecionando todos os eventos adquiridos (A), vários picos no histograma indicando proliferação celular (B) e a imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos T (C, D, E e F).

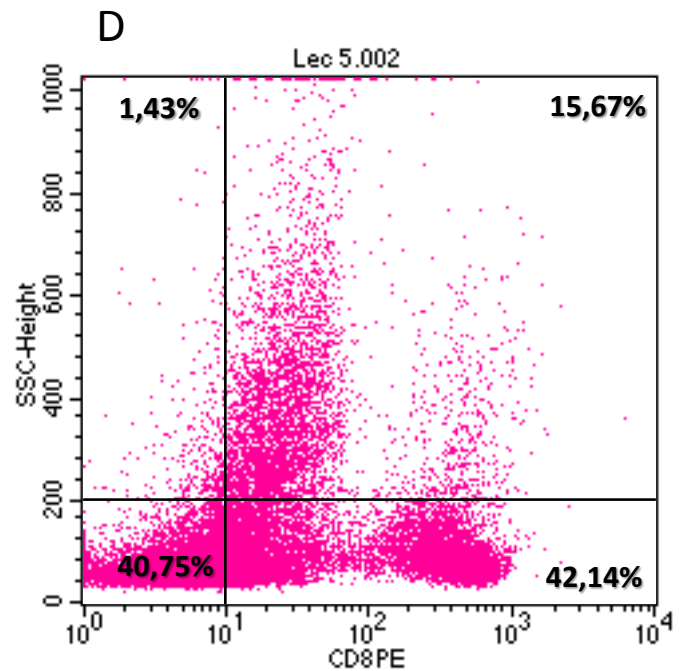
Figura 7 – Proliferação Celular e Imunofenotipagem de células marcadas por CFSE. Grupo experimental (BjcuL 5 µg/mL)



Aquisição: 30000/R2: 234 – 0,78%/R3: 27937 – 93,12%/R4: 1753 – 5,84%

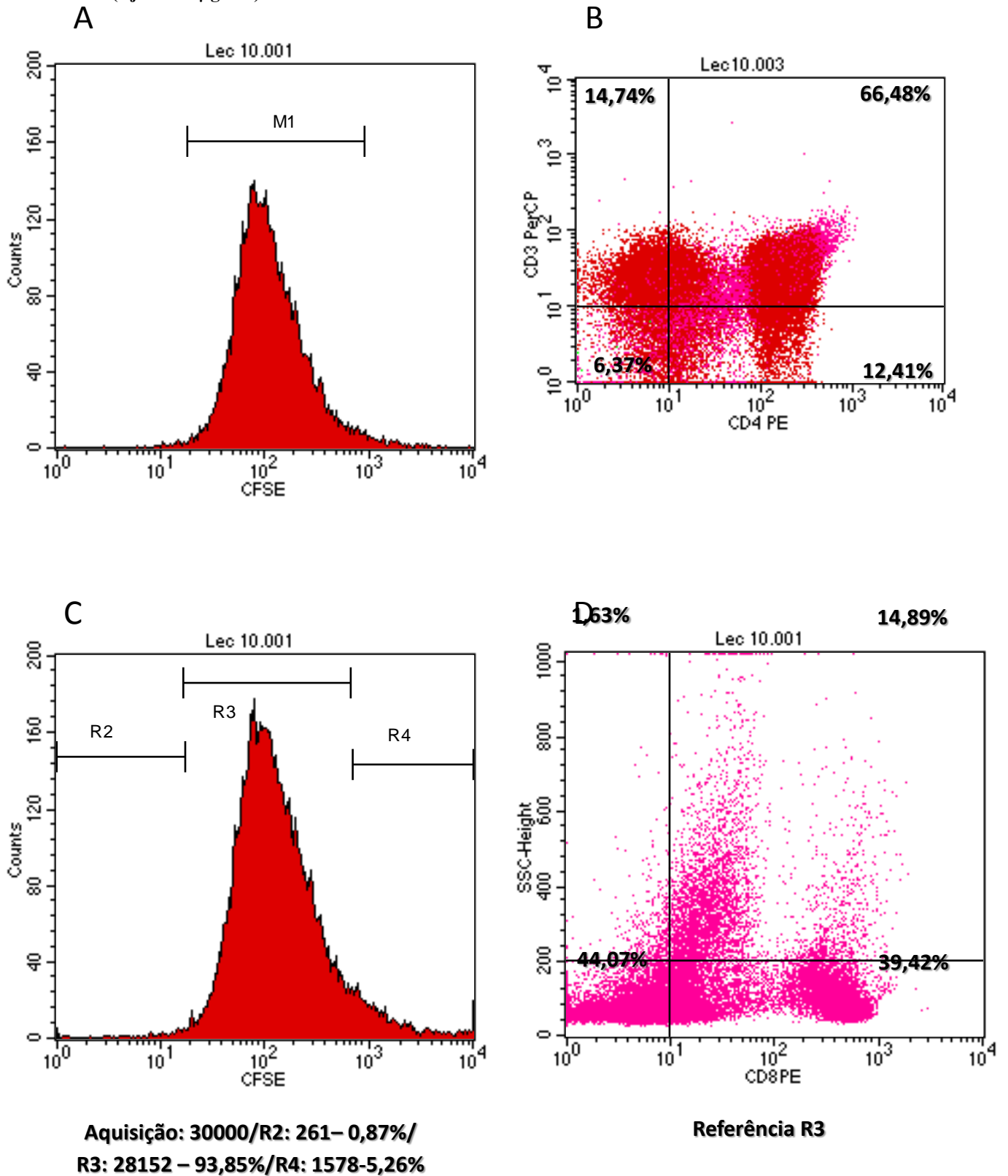


Aquisição: 30000/R2: 234 – 0,78%/R3: 27937 – 93,12%/R4: 1753 – 5,84%



O sangue de voluntários saudáveis foi coletado e separado por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram marcados por CFSE e incubados com lectina de 5µg/mL (grupo experimental) seguida da adição dos anticorpos monoclonais - anti-CD3-PerCP, anti-CD4-PE e anti-CD8-PE, para a imunofenotipagem celular. A figura mostra aquisição e análise de 30000 eventos, um único pico no gráfico de histograma mostrando que não houve proliferação celular (A e C) e imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos T (B e D).

Figura 8 – Proliferação Celular e Imunofenotipagem de células marcadas por CFSE. Grupo experimental (BjcuL 10 µg/mL)

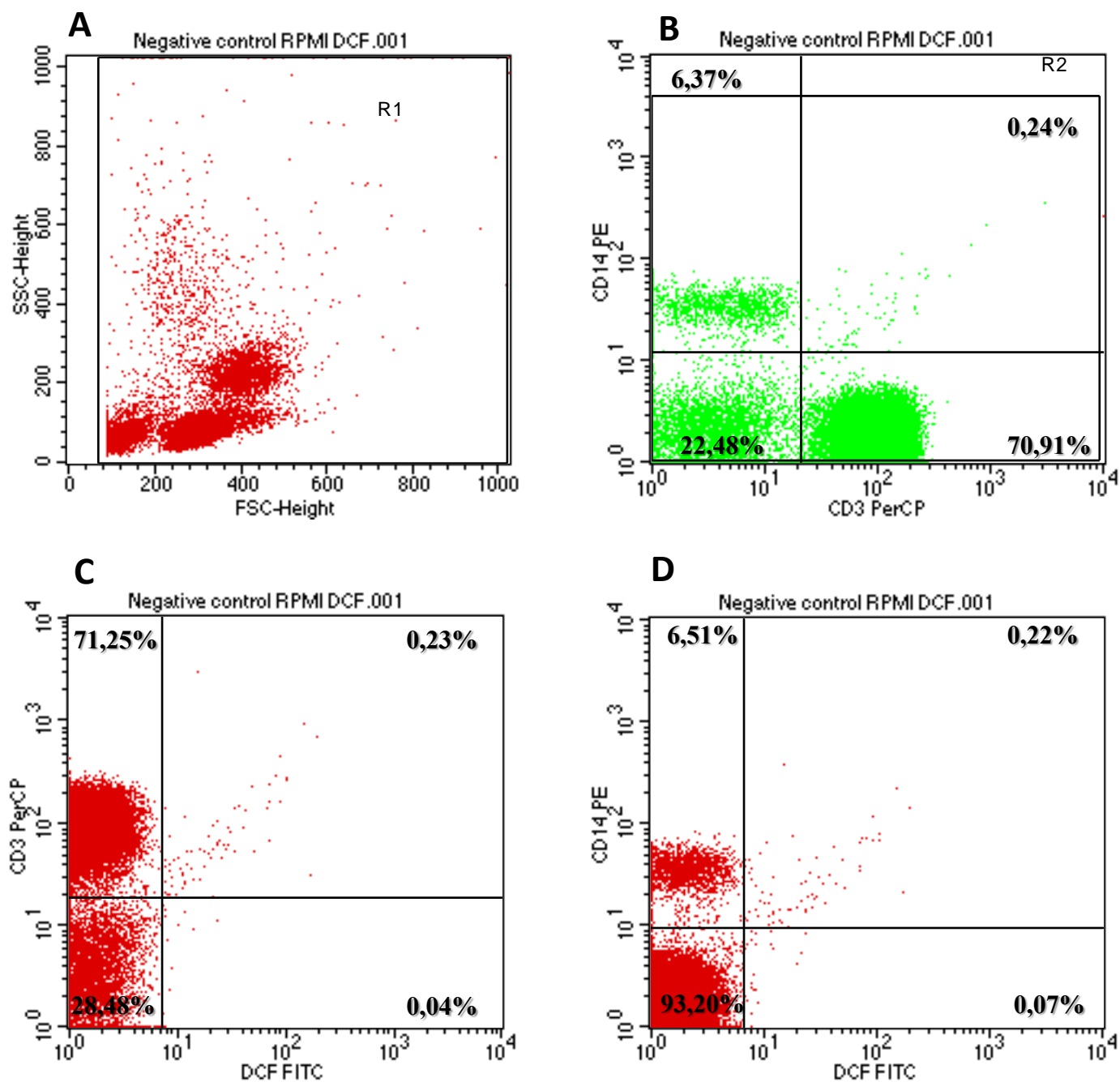


O sangue de voluntários saudáveis foi coletado e os PBMCs por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram marcados por CFSE e incubados com lectina de 10µg/mL (grupo experimental), seguida adição dos anticorpos monoclonais - anti-CD3-PerCP, anti-CD4-PE e anti-CD8-PE, para a marcação de superfície celular. A figura mostra aquisição e análise de 30000 eventos, um único pico no gráfico de histograma mostrando que não houve proliferação celular (A e C) e imunofenotipagem de subpopulações de linfócitos T (B e D).

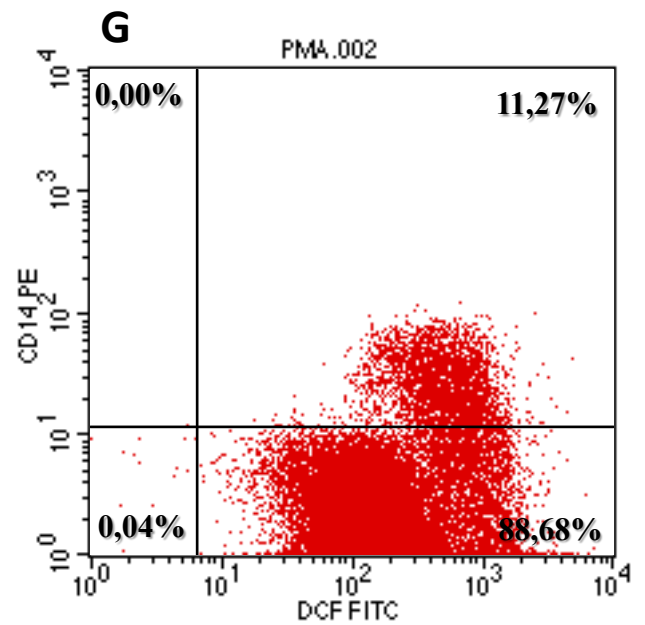
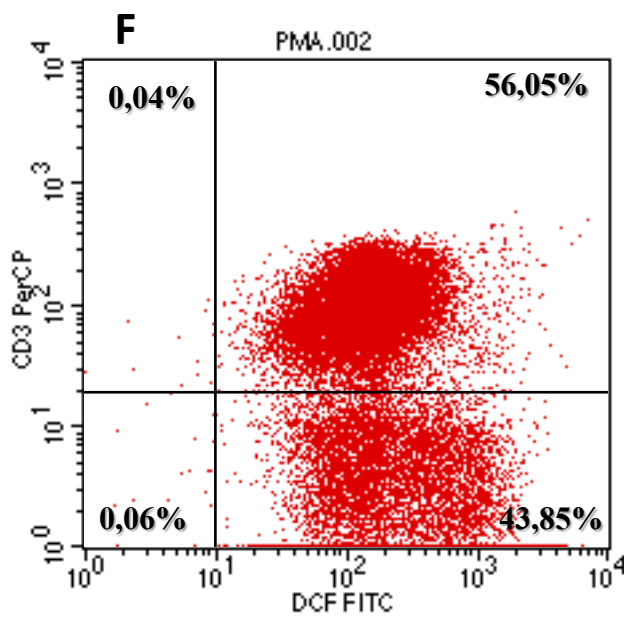
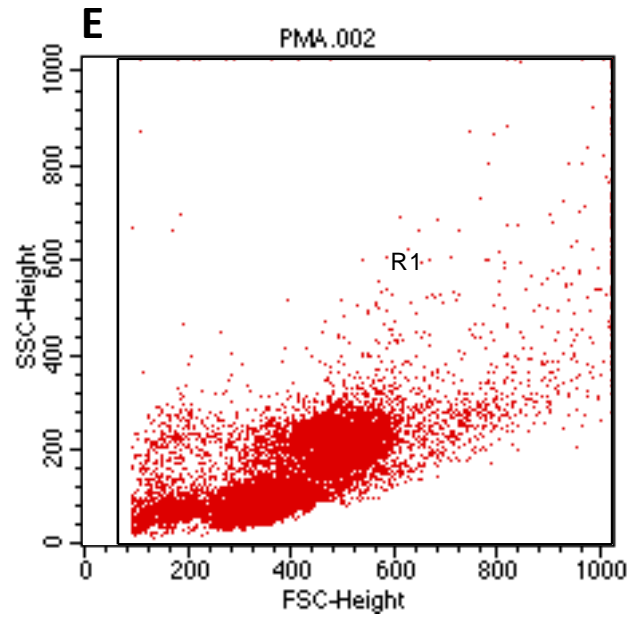
4.3- Determinação da produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) intracelulares

Os PBMCs (1×10^6 células/poço), isolados conforme item 3.3, foram cultivados em placas para cultura celular de 96 poços, com volume final de 100 μ L de RPMI suplementado. As células foram incubadas com RPMI (grupo controle negativo), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo) ou BjuL (5 e 10 μ g/mL) (grupo experimental). Para identificar as populações de células, os PBMCs foram incubados com DCF e submetidos a imunofenotipagem usando anticorpos monoclonais anti-CD3-PerCP e anti-CD14-PE, e analisados no FASCan. Como mostrado na Fig. 9 (A, B, C e D), no controle negativo 0,23% de linfócitos T CD3⁺, e 0,22% de monócitos - CD14⁺ produziram EROS. No entanto, no controle positivo, 56,05% de linfócitos T CD3⁺ e 11,27% de células CD14⁺ produziram EROS (Figura 9E, F e G). Quando os PBMCs foram incubados com a BjuL, nas concentrações de 5 e 10 μ g/mL, a produção de EROS aumentou 59,9% e 64,5%, respectivamente, nos linfócitos T CD3⁺, e 15,57% e 12,4% respectivamente para células CD14⁺. Estes resultados indicam que os linfócitos T são o tipo celular predominante responsável pela produção de EROS induzidas pela BjuL.

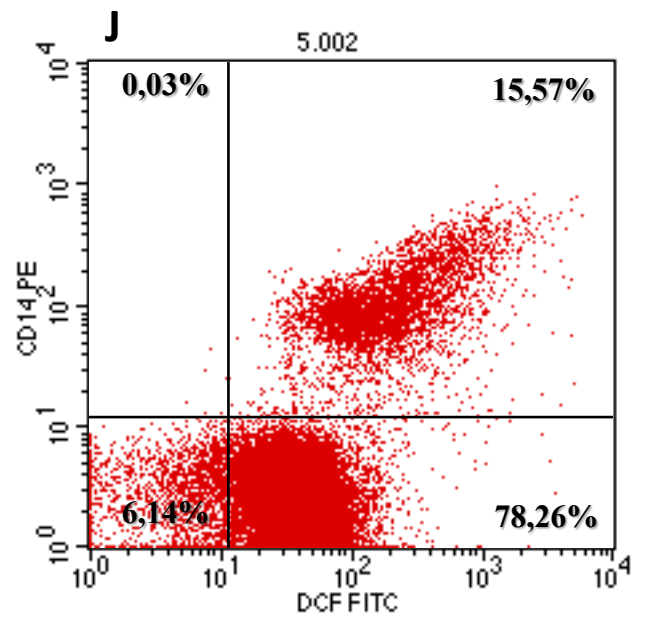
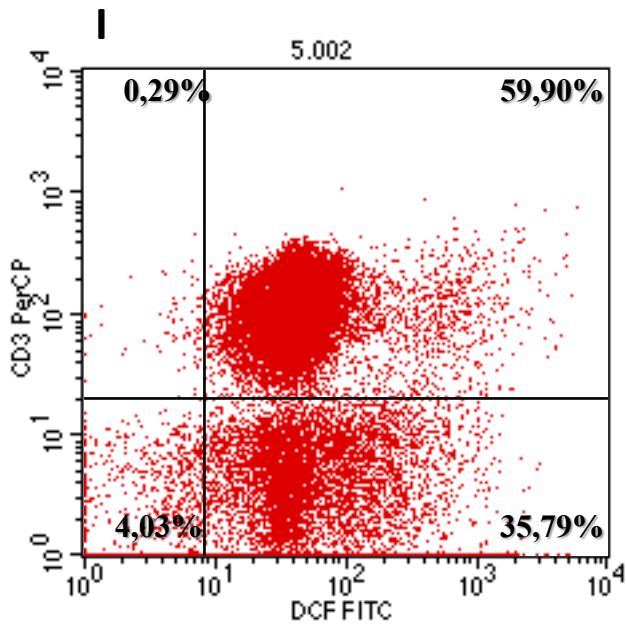
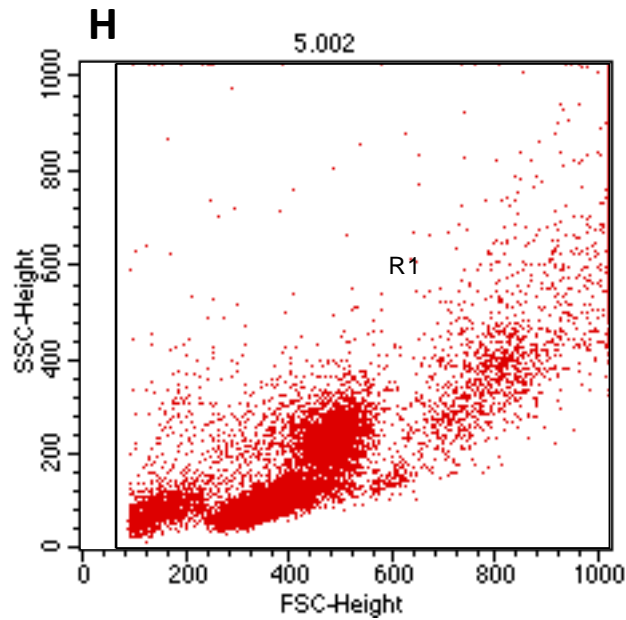
Figura 9 – Determinação da produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) intracelulares.



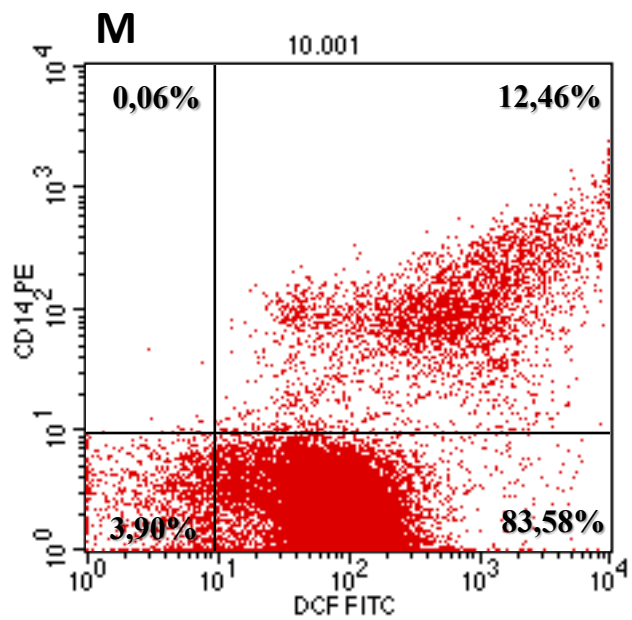
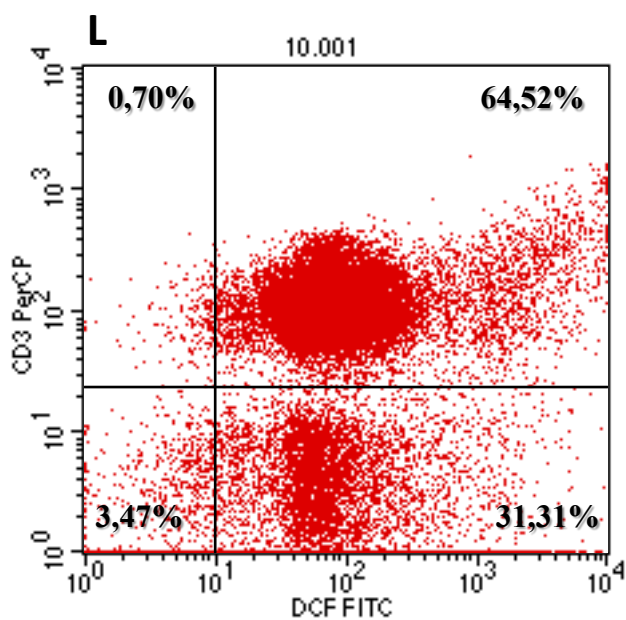
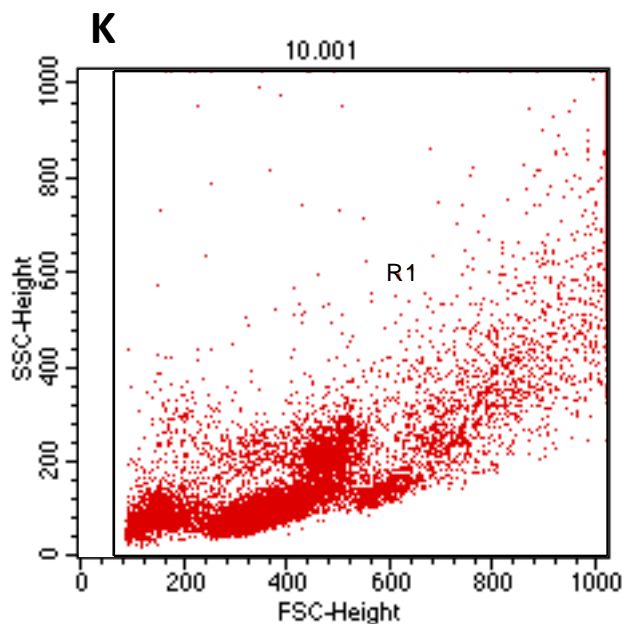
O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo) (A a D), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo) (E a G) ou BjuL (5 e 10 µg/mL) (grupo experimental) (H a J, e K a M) durante 3 horas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após a adição de DCFDA (10 µM), a fluorescência do DCF foi determinada no canal FL1 do FACScan.



O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo) (A a D), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo) (E a G) ou BjuL (5 e 10 μ g/mL) (grupo experimental) (H a J, e K a M) durante 3 horas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após a adição de DCFDA (10 μ M), a fluorescência do DCF foi determinada no canal FL1 do FACScan.



O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo) (A a D), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo) (E a G) ou BjuL (5 e 10 µg/mL) (grupo experimental) (H a J, e K a M) durante 3 horas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após a adição de DCFDA (10 µM), a fluorescência do DCF foi determinada no canal FL1 do FACScan.



O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo) (A a D), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo) (E a G) ou BjuL (5 e 10 µg/mL) (grupo experimental) (H a J, e K a M) durante 3 horas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após a adição de DCFDA (10 µM), a fluorescência do DCF foi determinada no canal FL1 do FACScan.

4.4- Ensaio de Acoplamento de BjuL ao Isotiocianato de Fluoresceína – FITC

O ensaio de acoplamento do *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC) à BjuL foi realizado via ligação succinimidil-éster entre a proteína e o FITC. A amostra foi diafiltrada em filtro com MCO de 3 kDa (*Amicon*), para separação do FITC não ligado à proteína. Por fim, a BjuL-FITC foi mantida em PBS 1X, ao abrigo da luz a -20 °C.

Para verificar a eficiência do acoplamento, a razão das absorbâncias medidas a 280 nm e 495 nm em espectrofotômetro (Biotek, Synergy HT), foi considerada adequada entre os valores de 0,3 e 1,0. O resultado da leitura da BjuL acoplada ao FITC foi de 0,3, portanto o acoplamento da BjuL ao fluorocromo foi bem sucedido.

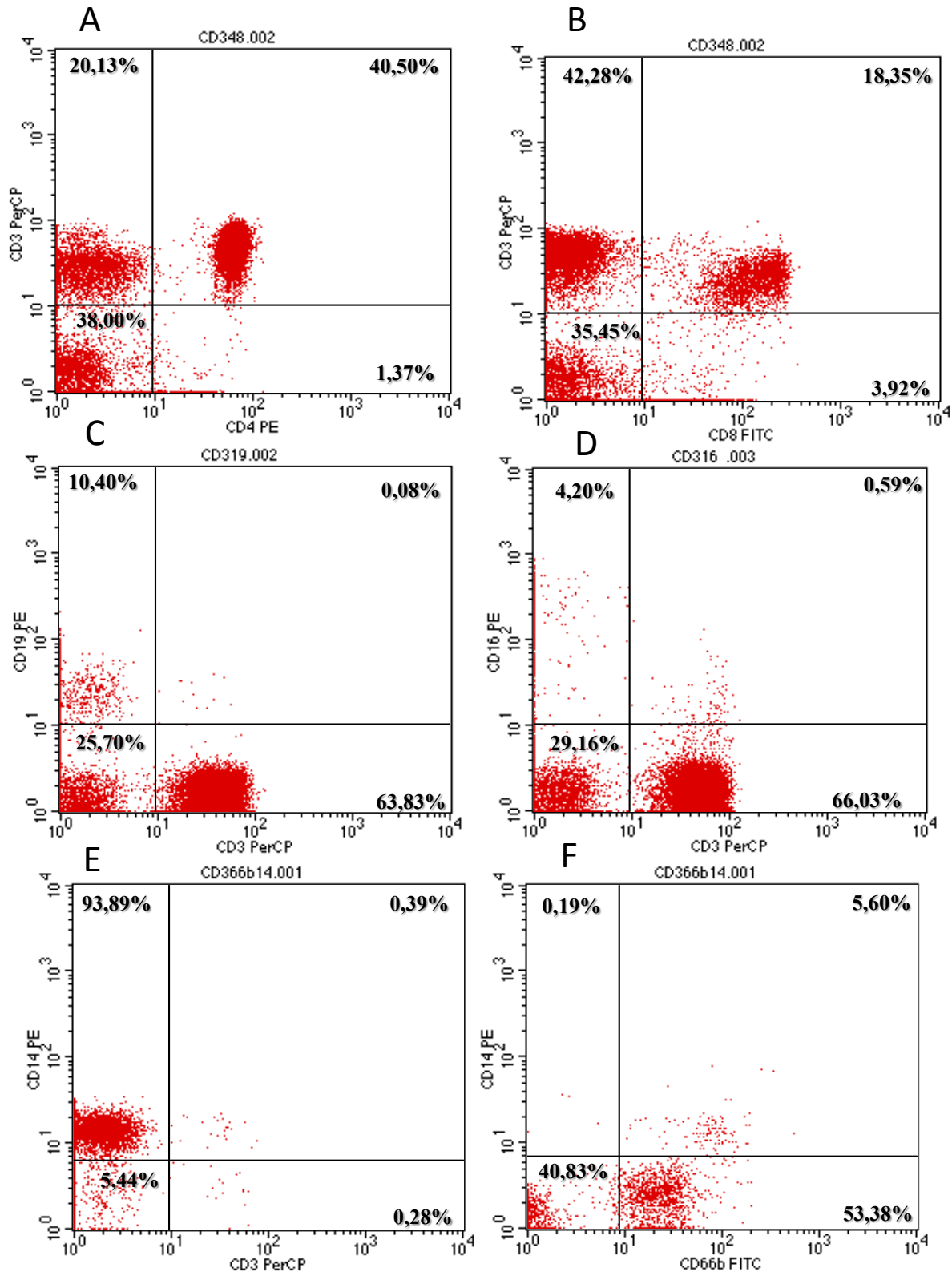
4.5- Imunofenotipagem de PBMCs Humanos

Os PBMCs humanos (1×10^6 células/poço) isolados conforme item 3.3, foram submetidos a imunofenotipagem. Na figura 10A foram observados 40,50% de linfócitos T CD4⁺ - fenótipo CD3⁺CD4⁺ e, 18,35% de linfócitos T CD8⁺ -fenótipo CD3⁺CD8⁺ (Figura 10B). Os linfócitos B - CD19⁺ representaram 10,40% (Figura 10C) e as células *Natural Killer* - CD16⁺, aproximadamente 4,2% (Figura 10D).

A figura 10E mostra a população de monócitos CD14⁺ com uma porcentagem aproximada de 93,89%. Os dados ainda mostram que mesmo com a separação celular por gradiente de densidade e, logo em seguida, o isolamento de mononucleares, ainda resta uma porcentagem de granulócitos na amostra a ser trabalhada (Figura 10F), principalmente neutrófilos CD66b⁺.

Após realizar a imunofenotipagem, é possível conhecer quais as possíveis subpopulações celulares que podem interagir com a BjuL.

Figura 10 – Imunofenotipagem de PBMCs Humanos.



O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram marcados com anticorpos monoclonais, seguida de aquisição e análise no FACSscan. As porcentagens das subpopulações celulares foram determinadas após a definição do *gate* de interesse. A figura mostra aquisição e análise de 30000 eventos, população definida por tamanho e granulosidade, amostras marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD3PerCP (A), anti-CD4PE (A), anti-CD8-FITC (B), anti-CD19PE (C), anti-CD16PE (D), anti-CD14PE (E) e anti-CD66b-FITC (F) – a marcação com anti-CD66b refere-se ao *gate* da figura em apêndice.

4.6- Efeito da BjuL sobre a imunofenotipagem de PBMCs

Para avaliar o efeito da BjuL sobre a imunofenotipagem de PBMCs foi realizado o acoplamento da lectina ao FITC, que a partir de agora passa a ser chamada de BjuL-FITC.

A BjuL-FITC e os anticorpos monoclonais anti-CD3PerCP, anti-CD4PE, anti-CD8PE, anti-CD19PE, anti-CD16PE, anti-CD14PE foram incubados com os PBMCs (1×10^6 células/poço) por 30 minutos.

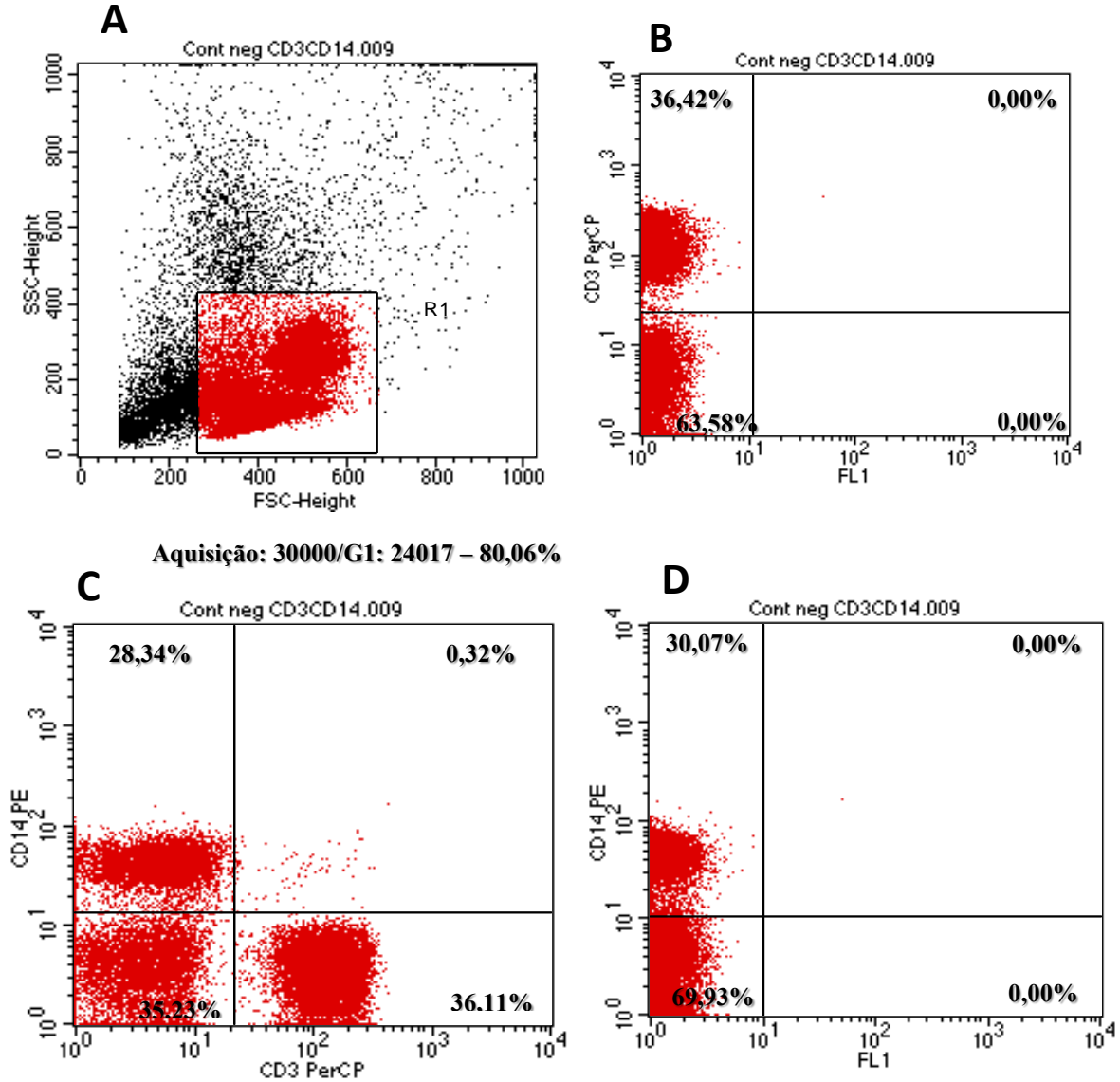
A figura 11A, B, C e D, mostram os PBMCs incubados com RPMI (grupo controle negativo) seguido da marcação com anticorpos monoclonais para a determinação de linfócitos e monócitos. Os resultados mostram o *gate* na população de linfócitos e monócitos (Figura 11A), com aproximadamente 36,42% de linfócitos T CD3⁺ (Figura 11B e 11C), 28,34% de monócitos CD14⁺ (figura 11C e 11D) e a região do canal de fluorescência FL1 onde é detectado o comprimento de onda de FITC, com 0% (Figura 11B e 11D).

Os PBMCs incubados com a BjuL-FITC mostraram que 36,41% dos linfócitos T CD4 – CD3⁺CD4⁺e, 24,71% dos linfócitos T CD8 – CD3⁺CD8⁺ interagiram com a lectina (Figura 11E, F, G, H e I). Os linfócitos B - CD19⁺, apresentaram cerca de 8,06% de células interagindo com a lectina (Figura 11J) e 10,35% de células Natural *Killer* - CD16⁺ (Figura 11K).

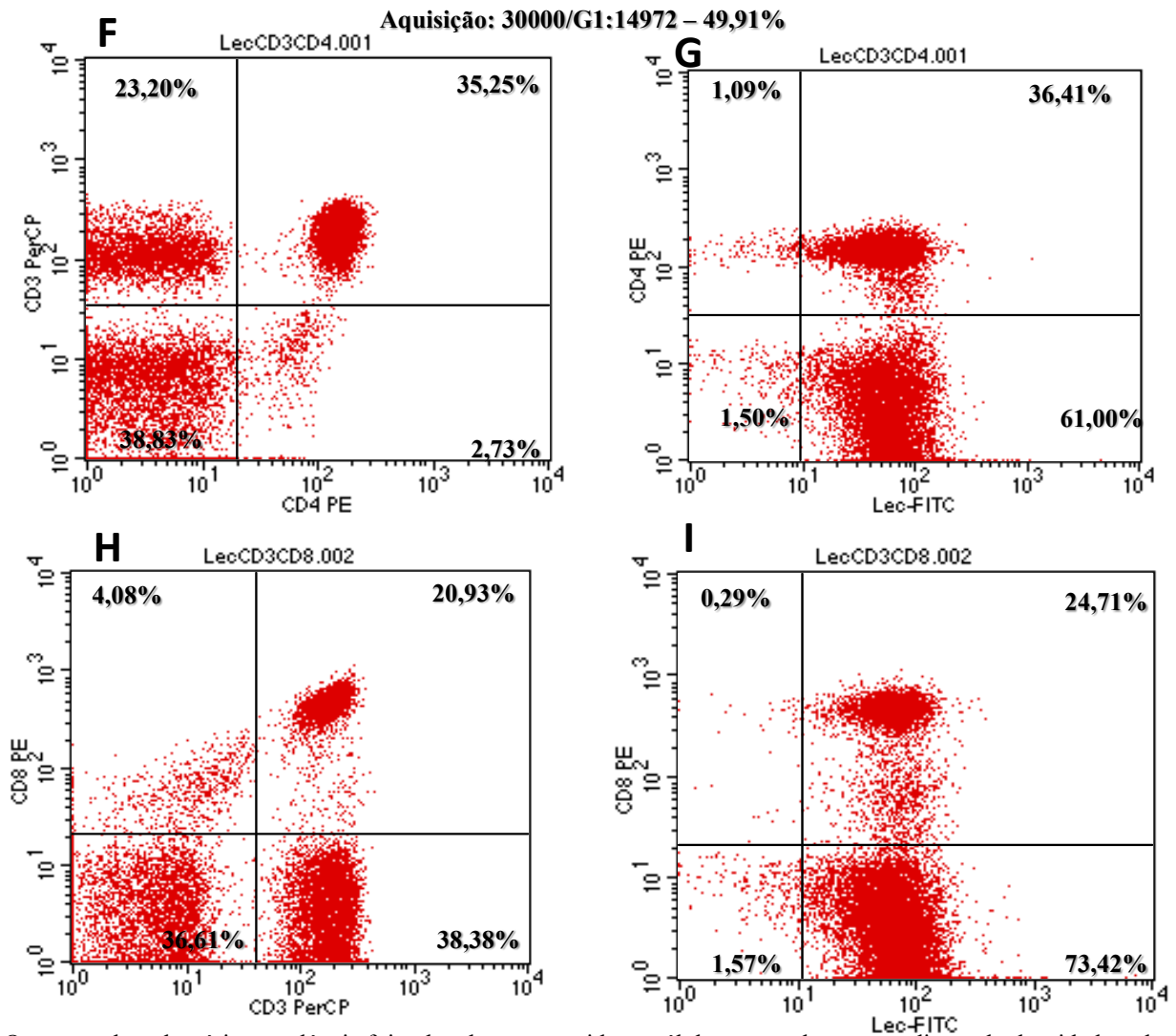
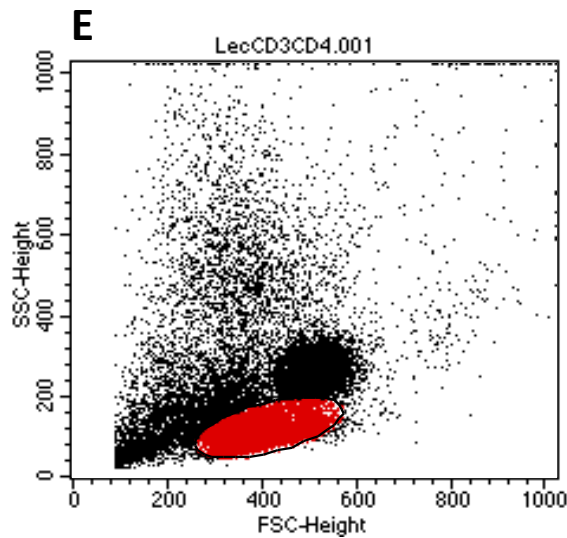
A figura 9L mostra um *gate* que seleciona a população de monócitos – CD14⁺, com interação de 98,90% dos monócitos com a lectina (Figura 11M e 11N).

Os resultados mostram que todas subpopulações de PBMCs interagiram com a lectina em diferentes porcentagens. Essas variações em porcentagens podem ser justificadas de acordo com o número de fenótipos celulares presentes no sangue periférico, ou com base ao tipo de ligação que a BjuL-FITC realiza com os PBMCs.

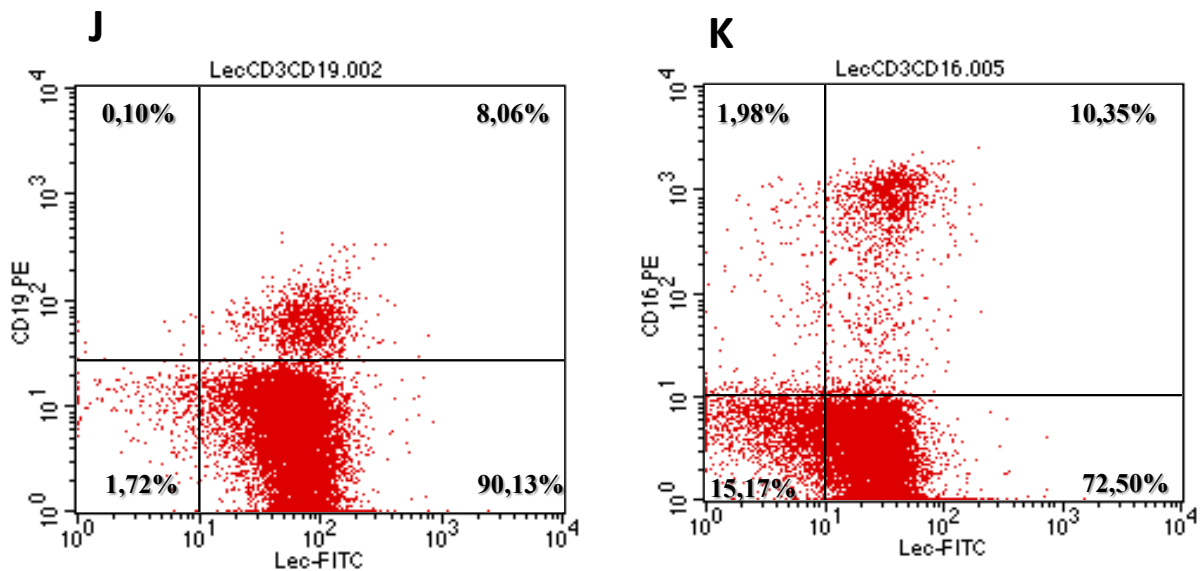
Figura 11 – Efeito da BjuL sobre a imunofenotipagem de PBMCs.



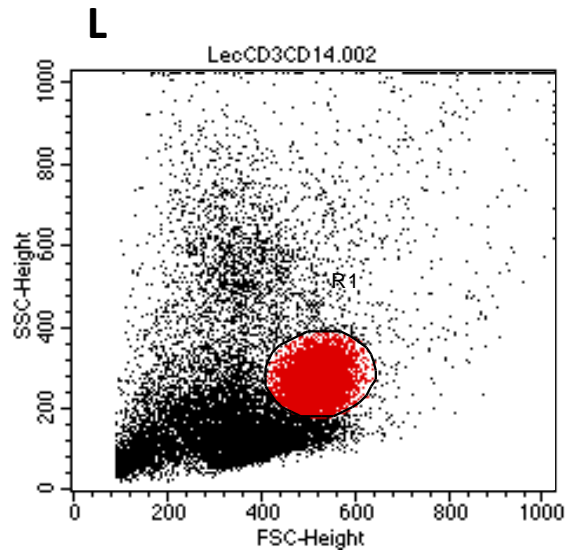
O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram marcados com anticorpos monoclonais e com a BjuL-FITC, seguida de aquisição e análise no FACScan. As porcentagens das subpopulações celulares foram determinadas após a definição do *gate* na população de interesse. A figura mostra aquisição e análise de 30000 eventos, populações definidas por tamanho e granulosidade e marcação com anticorpos monoclonais anti-CD3-PerCP e anti-CD14-PE com ausência de BjuL-FITC (A, B, C e D), anti-CD3-PerCP, anti-CD4-PE, anti-CD8-PE, anti-CD19-PE, anti-CD16-PE e BjuL-FITC (E, F, G, H, I, J e K) e anti-CD14-PE e BjuL-FITC (L, M e N).



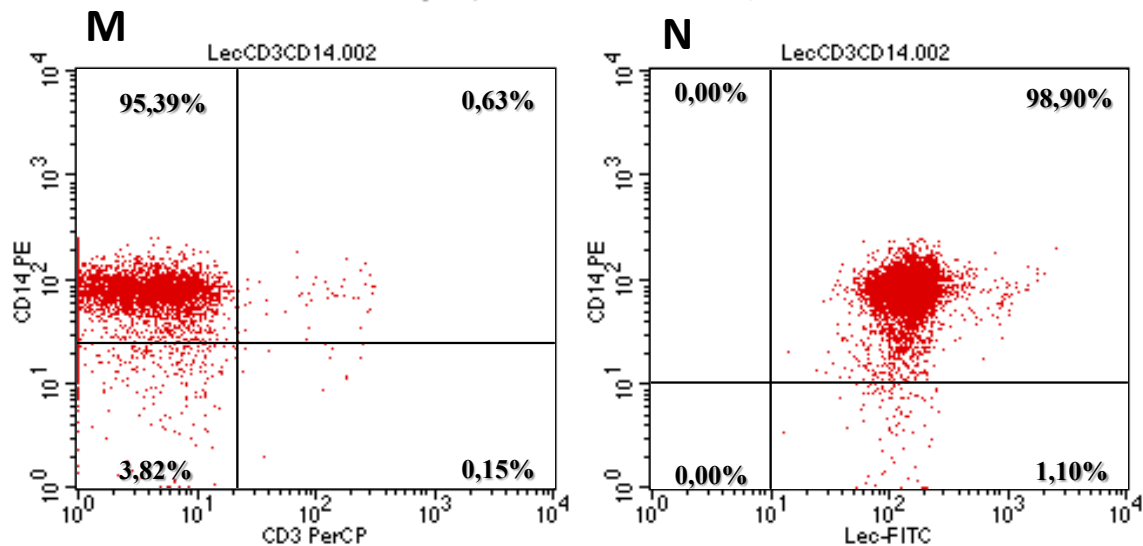
O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram marcados com anticorpos monoclonais e com a BjuL-FITC, seguida de aquisição e análise no FACScan. As porcentagens das subpopulações celulares foram determinadas após a definição do *gate* na população de interesse. A figura mostra aquisição e análise de 30000 eventos, populações definidas por tamanho e granulosidade e marcação com anticorpos monoclonais anti-CD3-PerCP e anti-CD14-PE com ausência de BjuL-FITC (A, B, C e D), anti-CD3-PerCP, anti-CD4-PE, anti-CD8-PE, anti-CD19-PE, anti-CD16-PE e BjuL-FITC (E, F, G, H, I, J e K) e anti-CD14-PE e BjuL-FITC (L, M e N).



O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram marcados com anticorpos monoclonais e com a BjuL-FITC, seguida de aquisição e análise no FACScan. As porcentagens das subpopulações celulares foram determinadas após a definição do *gate* na população de interesse. A figura mostra aquisição e análise de 30000 eventos, populações definidas por tamanho e granulosidade e marcação com anticorpos monoclonais anti-CD3-PerCP e anti-CD14-PE com ausência de BjuL-FITC (A, B, C e D), anti-CD3-PerCP, anti-CD4-PE, anti-CD8-PE, anti-CD19-PE, anti-CD16-PE e BjuL-FITC (E, F, G, H, I, J e K) e anti-CD14-PE e BjuL-FITC (L, M e N).



Aquisição: 30000/G1:7166 – 23,89%



O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram marcados com anticorpos monoclonais e com a BjuL-FITC, seguida de aquisição e análise no FACSscan. As porcentagens das subpopulações celulares foram determinadas após a definição do *gate* na população de interesse. A figura mostra aquisição e análise de 30000 eventos, populações definidas por tamanho e granulidade e marcação com anticorpos monoclonais anti-CD3-PerCP e anti-CD14-PE com ausência de BjuL-FITC (A, B, C e D), anti-CD3-PerCP, anti-CD4-PE, anti-CD8-PE, anti-CD19-PE, anti-CD16-PE e BjuL-FITC (E, F, G, H, I, J e K) e anti-CD14-PE e BjuL-FITC (L, M e N).

4.7- Imunofluorescência de PBMCs

A figura 12 mostra os PBMCs marcados com faloidina, que interage com filamentos de actina polimerizados do citoesqueleto, e DAPI que marca o núcleo celular (RPMI – A e B), e PBMCs marcados com Faloidina-Alexa Fluor^R 546, DAPI e BjuL-FITC (BjuL-FITC – C, D, em E a imagem no formato 3D). As imagens permitem concluir que a BjuL além de ter afinidade por carboidratos presentes na membrana celular também foi internalizada e a sua presença no citoplasma celular pode ser observada nas imagens (Figura 12D e 12E).

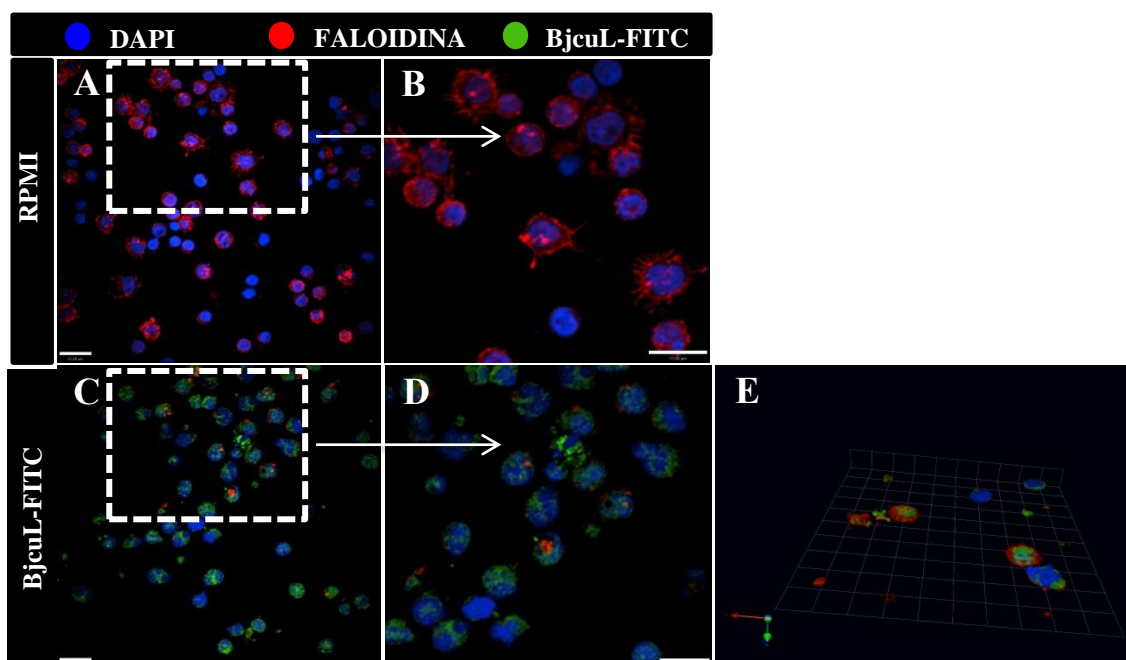


Figura 12 – Imunofluorescência de PBMCs. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs (4×10^5 células/lamínula) isolados foram adicionados em lamínulas tratadas com poli-L-lisina. Após fixação e lavagem, as células foram incubadas com Faloidina-Alexa Fluor^R 546 por 30 minutos, seguida de incubação com DAPI por 15 minutos (controle negativo – RPMI), o mesmo foi realizado com outras lamínulas porém essas também foram incubadas com BjuL-FITC por 30 minutos (lâminas experimentais). Por fim, as lamínulas foram montadas em lâminas com *Fluoromount*TM e analisadas em microscópio confocal Nikon Eclipse Ti Invertido com cabeça de escaneamento A1R. A figura mostra os PBMCs marcados com Faloidina-Alexa Fluor^R 546 e DAPI (RPMI – A e B), e PBMCs marcados com Faloidina-Alexa Fluor^R 546, DAPI e BjuL-FITC (BjuL-FITC – C, D, em E observamos a imagem no formato 3D).

4.8- Efeito da BjuL na produção de citocinas pelos PBMCs

O efeito da BjuL sobre a produção de citocinas pelos PBMCs foi realizado por meio do ensaio de dosagem de citocinas por CBA (*cytometric beads array*). Neste ensaio, as células (1×10^6 células/poço) foram incubadas com RPMI (grupo controle negativo), Con-A (5 $\mu\text{g/mL}$) (grupo controle positivo), LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) (grupo controle positivo), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo) ou BjuL (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) (grupo experimental) a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO_2 nos tempos de 4, 12, 24, 48, 72 e 96 horas.

A figura 13A mostra que houve produção de IL-2 induzida pelo Con-A nos tempos de 4, 12, 24 e 48 horas; pela BjuL (5 $\mu\text{g/mL}$) nos tempos de 4, 12 e 24 horas e BjuL (10 $\mu\text{g/mL}$) nos tempos de 12 e 24 horas, quando comparados ao controle negativo. Essa citocina teve sua produção crescente e atingiu seu pico máximo até 24 horas em células estimuladas com Con-A, com declínio ao longo do tempo. A BjuL (5 $\mu\text{g/mL}$) estimulou os PBMCs a liberar esta citocina no início da cultura celular, máximo até 24 horas, enquanto a BjuL (10 $\mu\text{g/mL}$) estimulou uma produção mais tardia, porém em ambas foi observado o declínio da produção IL-2 ao tempo final do decurso temporal (Figura 13B).

A figura 14A mostra que houve produção de IL-10 induzida pelo Con-A nos tempos de 4, 12, 24, 48, 72 e 96 horas; o LPS induziu a produção de IL-10 nos tempos de 4, 12, 24, 48, 72 e 96 horas; BjuL (5 $\mu\text{g/mL}$) nos tempos de 4, 12, 24, 48, 72 e 96 horas e BjuL (10 $\mu\text{g/mL}$) nos tempos de 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Em relação a produção da citocina IL-10, o Con-A, o LPS e a BjuL (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) induziram sua produção do início ao fim da cultura celular, apresentando picos em alguns momentos, destaque para o pico de produção de IL-10 quando o estímulo foi a BjuL (10 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 14B).

O IFN- γ (Figura 15A) teve sua produção induzida pelo Con-A nos tempos de 4, 12, 24 e 48 horas, a BjuL (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Essa citocina quando estimulado pelo Con-A atingiu seu pico máximo no início da cultura celular, porém teve declínio em sua produção a partir de 12 horas. A BjuL (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) induziu a produção de forma crescente de IFN- γ a partir de 24 horas de incubação (Figura 15B).

A figura 16A mostra que houve produção de IL-6 induzida pelo Con-A nos tempos de 4, 12, 24, 48, 72 e 96 horas; pelo LPS nos tempos de 4, 12, 24, 48, 72 e 96 horas; PMA em 24, 48, 72 e 96 horas e BjuL (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) nos tempos de 4, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. A IL-6 teve aumento na sua produção ao longo do tempo quando o estímulo foi o Con-A e o LPS, enquanto

que para o PMA o perfil de produção diferiu com relação aos níveis de produção dessa citocina, sendo menor para esse último controle positivo. A BjuL (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) induziu a produção de IL-6 do início ao fim da cultura celular atingindo o pico máximo em 96 horas (Figura 16B).

Na figura 17A foi possível observar que o TNF- α também foi produzido pelas células quando estimulado pelo Con-A nos tempos de 12, 24 e 72 horas, LPS nos tempos de 4, 12, 24 horas, PMA em 4, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, BjuL (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) nos tempos de 4, 12, 24, 48 e 72 horas. O TNF- α teve sua produção alta induzida principalmente pela BjuL de (10 $\mu\text{g/mL}$), quando comparada aos grupos controles, atingindo picos mais altos no início da cultura celular (Figura 17B).

A figura 18A mostra que houve produção de IL-17 induzida pelo Con-A nos tempos de 12, 24, 48 e 96 horas e BjuL (10 $\mu\text{g/mL}$) apenas no tempo de 96 horas. Essa citocina atingiu níveis mais altos e constantes em sua produção quando o estímulo foi o Con-A, e apresentou níveis moderados quando o estímulo foi a BjuL (10 $\mu\text{g/mL}$), porém após 96 horas de incubação (Figura 18B).

Por fim, a figura 19A mostra que a citocina IL-4 teve sua produção induzida apenas pelo Con-A nos tempos de 12 e 48 horas, não apresentou picos de produção ao longo do decurso temporal (Figura 19B).

Todos os dados foram confrontados com o grupo controle negativo, e as citocinas produzidas pelas células indicam um perfil imunológico modulador induzido pela BjuL.

A figura 20 mostra o mapa da produção de citocinas – *Heatmap*, pelos PBMcs ao longo do tempo.

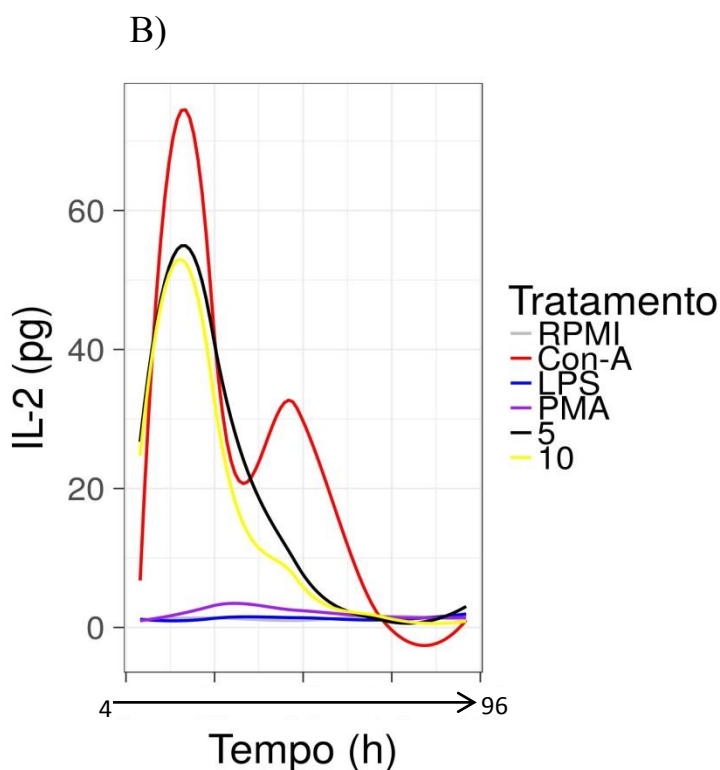
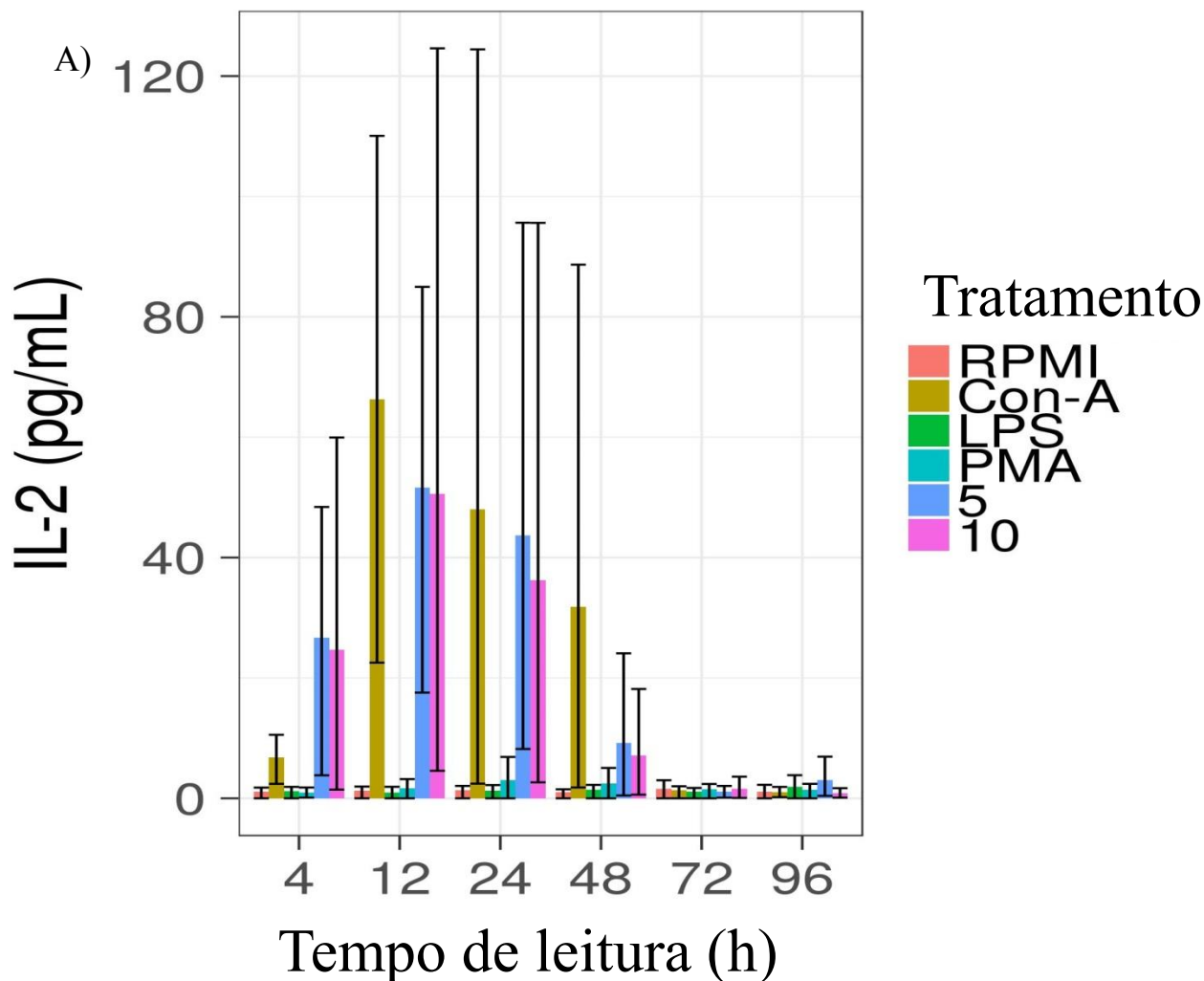


Figura 13 – Efeito da BjuL na produção de IL-2 pelos PBMCs. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo), Con-A (5µg/mL) (grupo controle positivo), LPS (1 µg/mL) (grupo controle positivo), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo) ou BjuL (5 e 10 µg/mL) (grupo experimental), em diferentes tempos, a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Em seguida foi realizado ensaio por CBA (*cytometric beads array*) e dos dados expressos em pg, sendo os valores médios de cinco voluntários independentes e seus respectivos intervalos de confiança estimados por meio de *bootstrap*. (A) Dosagem de IL-2, (B) Curva temporal representativa da produção de IL-2 pelos PBMCs.

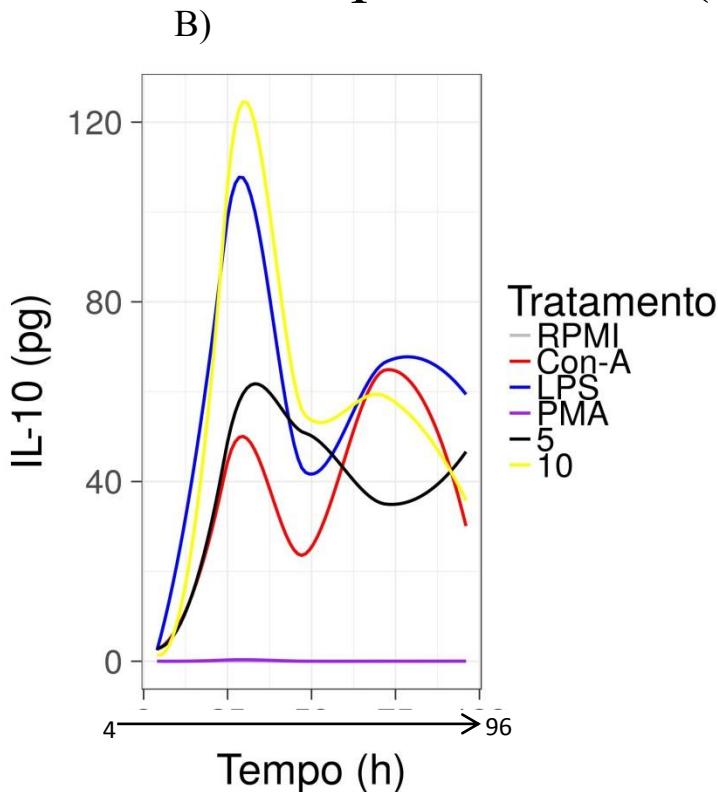
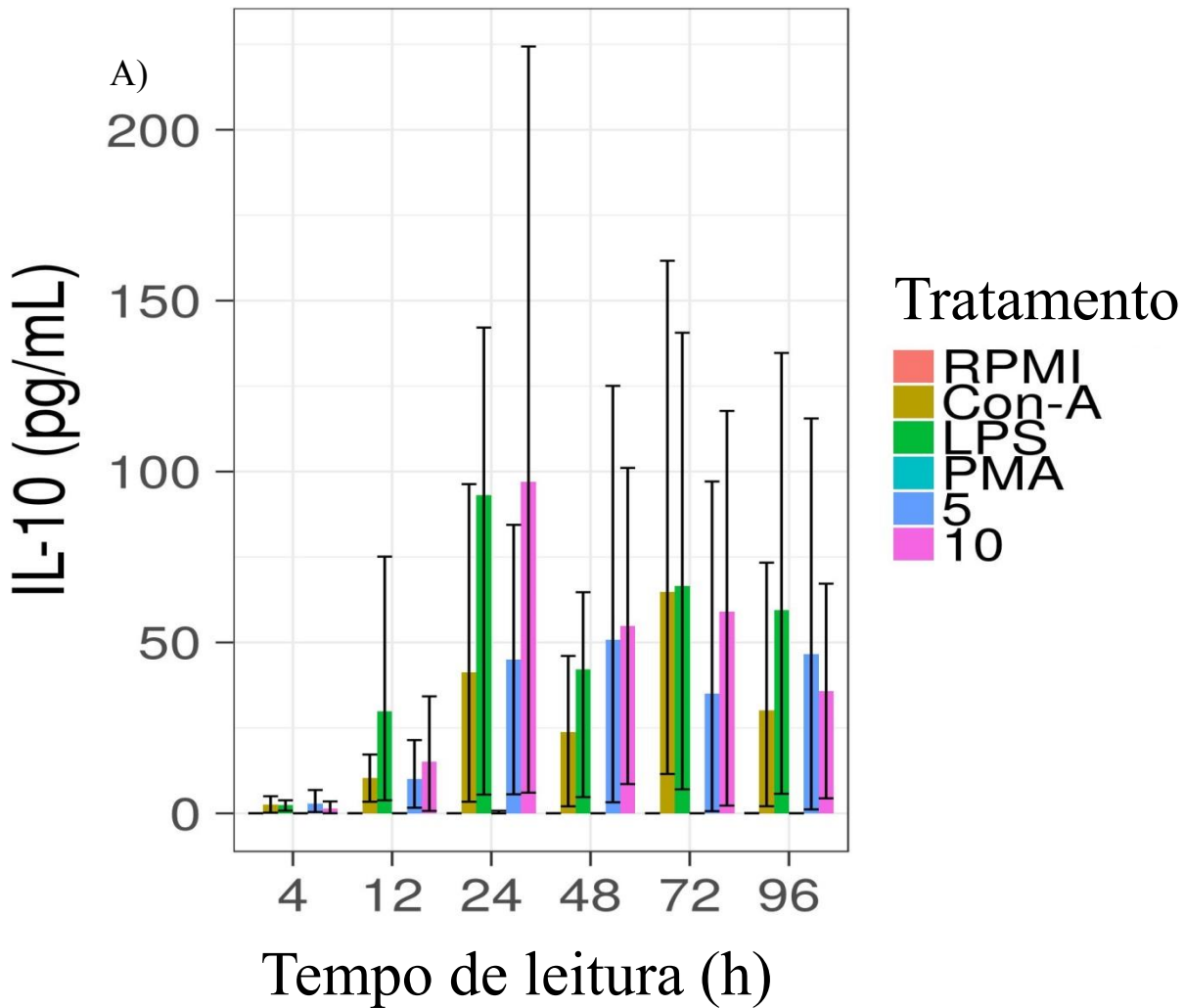


Figura 14 – Efeito da BjuL na produção de IL-10 pelos PBMCs. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo), Con-A (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (grupo controle positivo), LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (grupo controle positivo), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo), ou BjuL (5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (grupo experimental), em diferentes tempos, a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO_2 . Em seguida foi realizado ensaio por CBA (*cytometric beads array*) e os dados expressos em pg, sendo os valores médios de cinco voluntários independentes e seus respectivos intervalos de confiança estimados por meio de *bootstrap*. (A) Dosagem de IL-10, (B) Curva temporal representativa da produção de IL-10 por PBMCs.

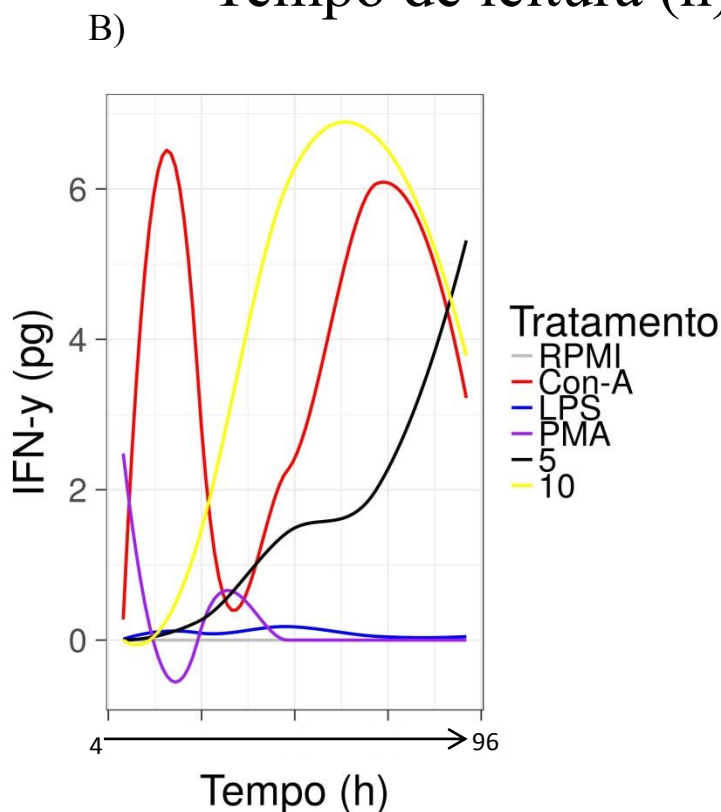
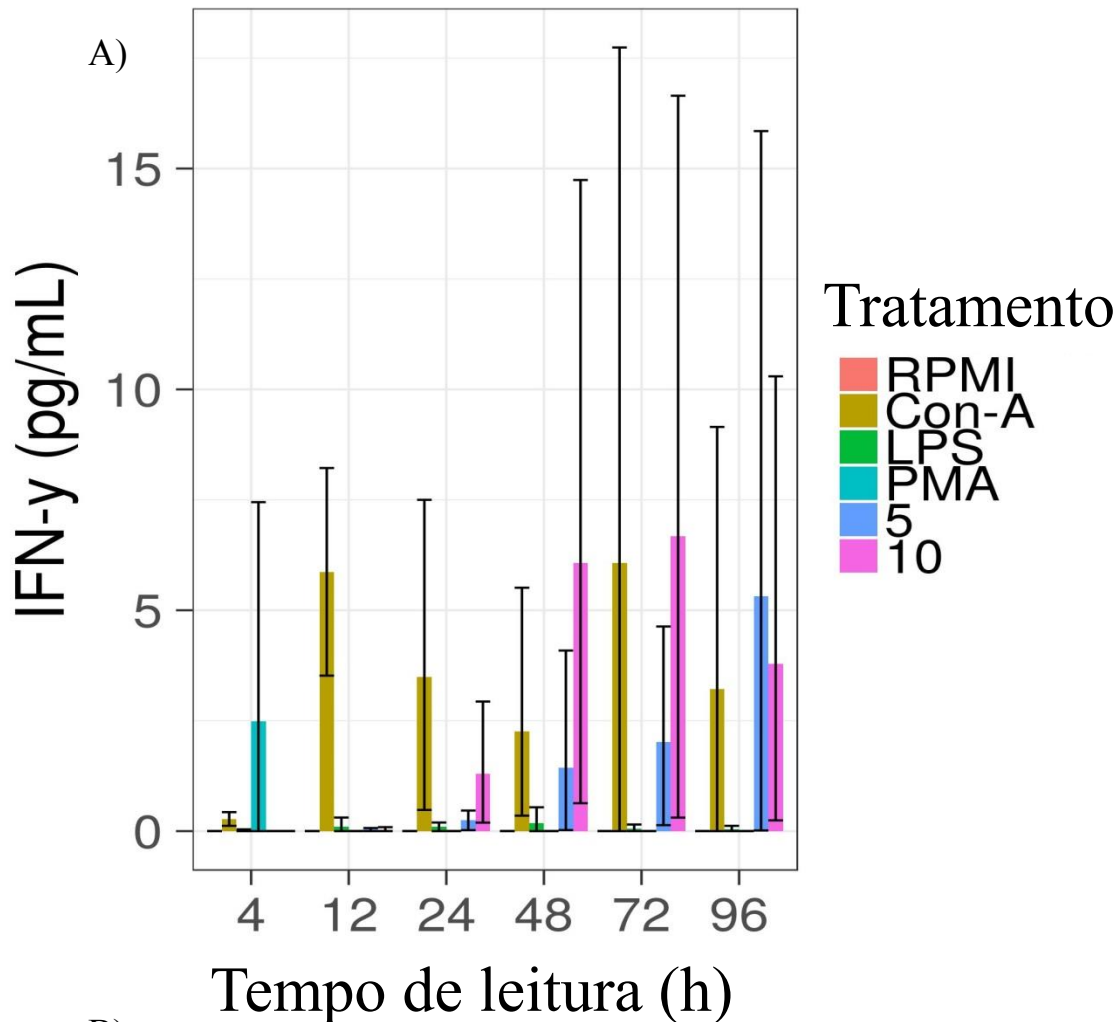


Figura 15 – Efeito da BjuL na produção de IFN- γ pelos PBMCs. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo), Con-A (5 $\mu\text{g/mL}$) (grupo controle positivo), LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) (grupo controle positivo), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo), ou BjuL (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) (grupo experimental), em diferentes tempos, a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO_2 . Em seguida foi realizado ensaio por CBA (*cytometric beads array*) e os dados expressos em pg, sendo os valores médios de cinco voluntários independentes e seus respectivos intervalos de confiança estimados por meio de *bootstrap*. (A) Dosagem de IFN γ , (B) Curva temporal representativa da produção de IFN- γ por PBMCs.

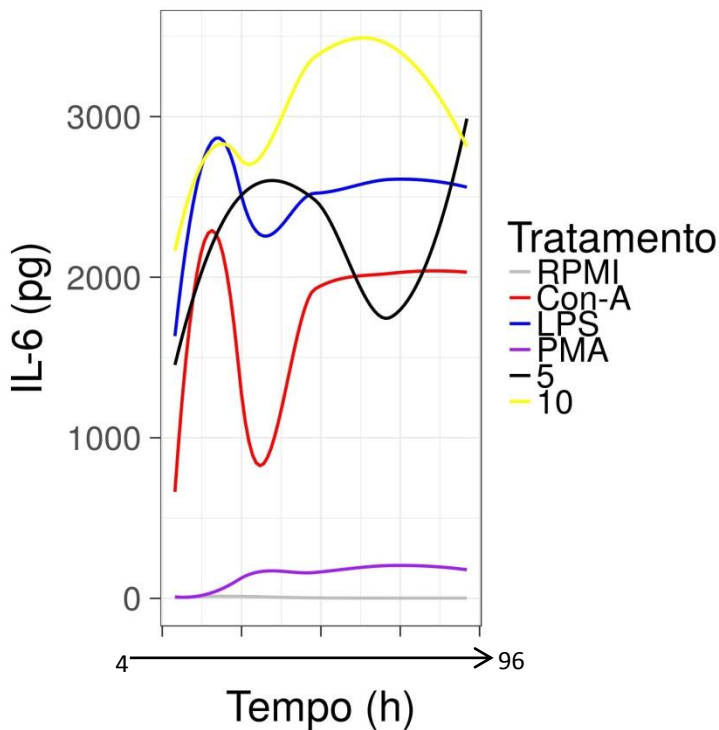
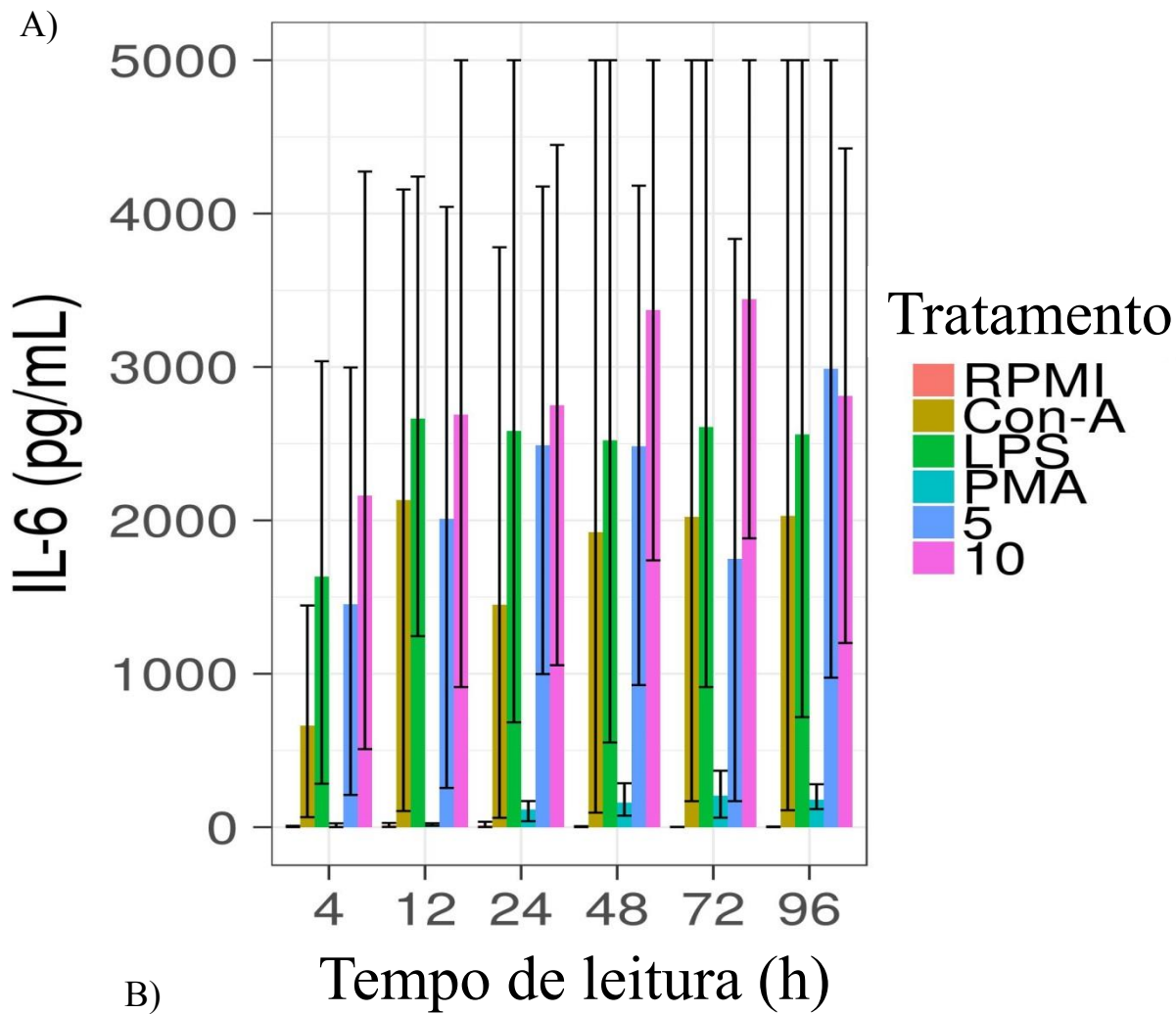


Figura 16 – Efeito da BjuL na produção de IL-6 pelos PBMCs. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo), Con-A (5 µg/mL) (grupo controle positivo), LPS (1 µg/mL) (grupo controle positivo), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo), ou BjuL (5 e 10 µg/mL) (grupo experimental), em diferentes tempos, a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Em seguida foi realizado ensaio por CBA (*cytometric beads array*) e os dados expressos em pg, sendo os valores médios de cinco voluntários independentes e seus respectivos intervalos de confiança estimados por meio de *bootstrap*. (A) Dosagem de IL-6, (B) Curva temporal representativa da produção de IL-6.

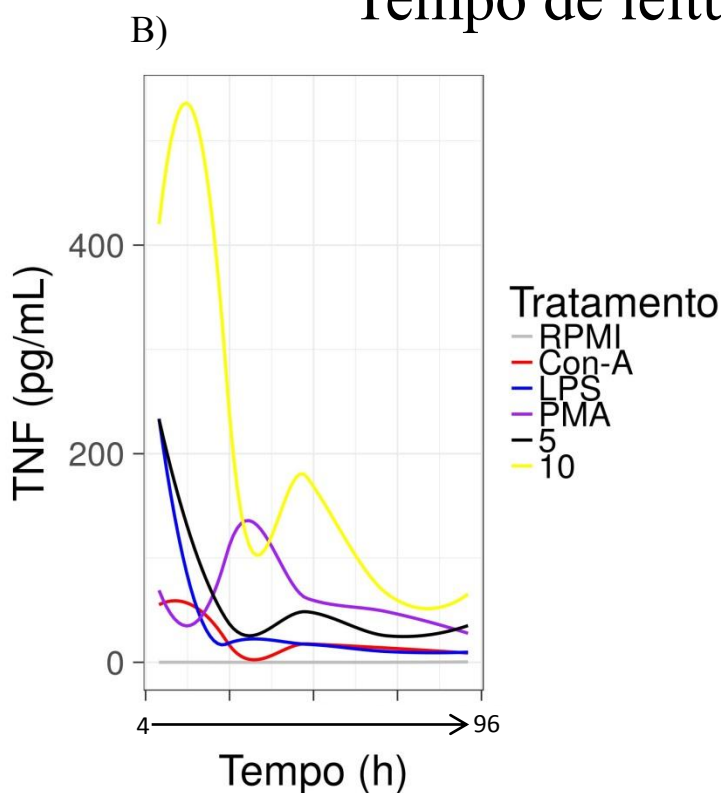
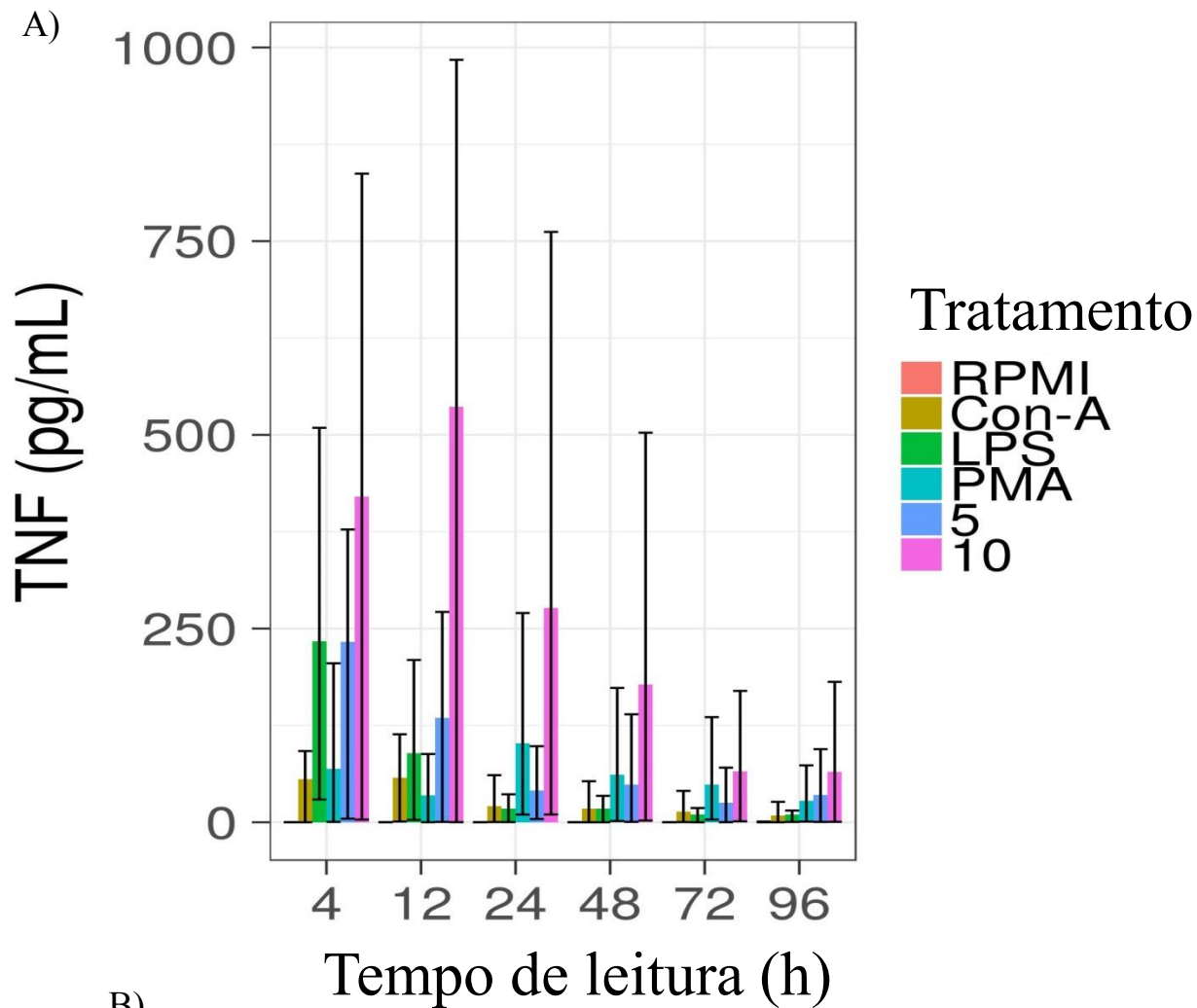


Figura 17 – Efeito da BjuL na produção de TNF- α pelos PBMCs. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo), Con-A (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (grupo controle positivo), LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (grupo controle positivo), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo), ou BjuL (5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (grupo experimental), em diferentes tempos, a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO_2 . Em seguida foi realizado ensaio por CBA (*cytometric beads array*) e os dados expressos em pg, sendo os valores médios de cinco voluntários independentes e seus respectivos intervalos de confiança estimados por meio de *bootstrap*. (A) Dosagem de TNF- α , (B) Curva temporal representativa da produção de TNF- α por PBMCs.

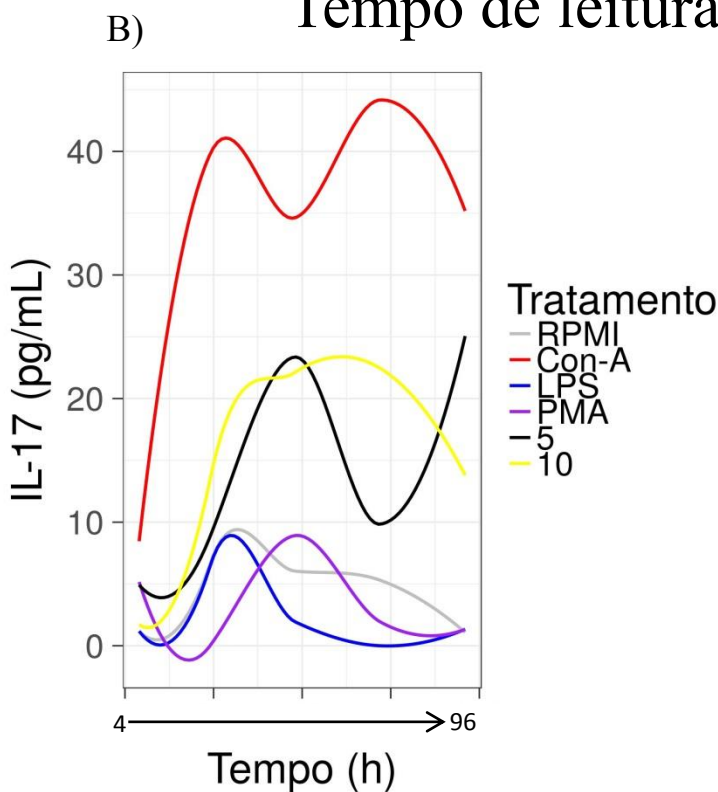
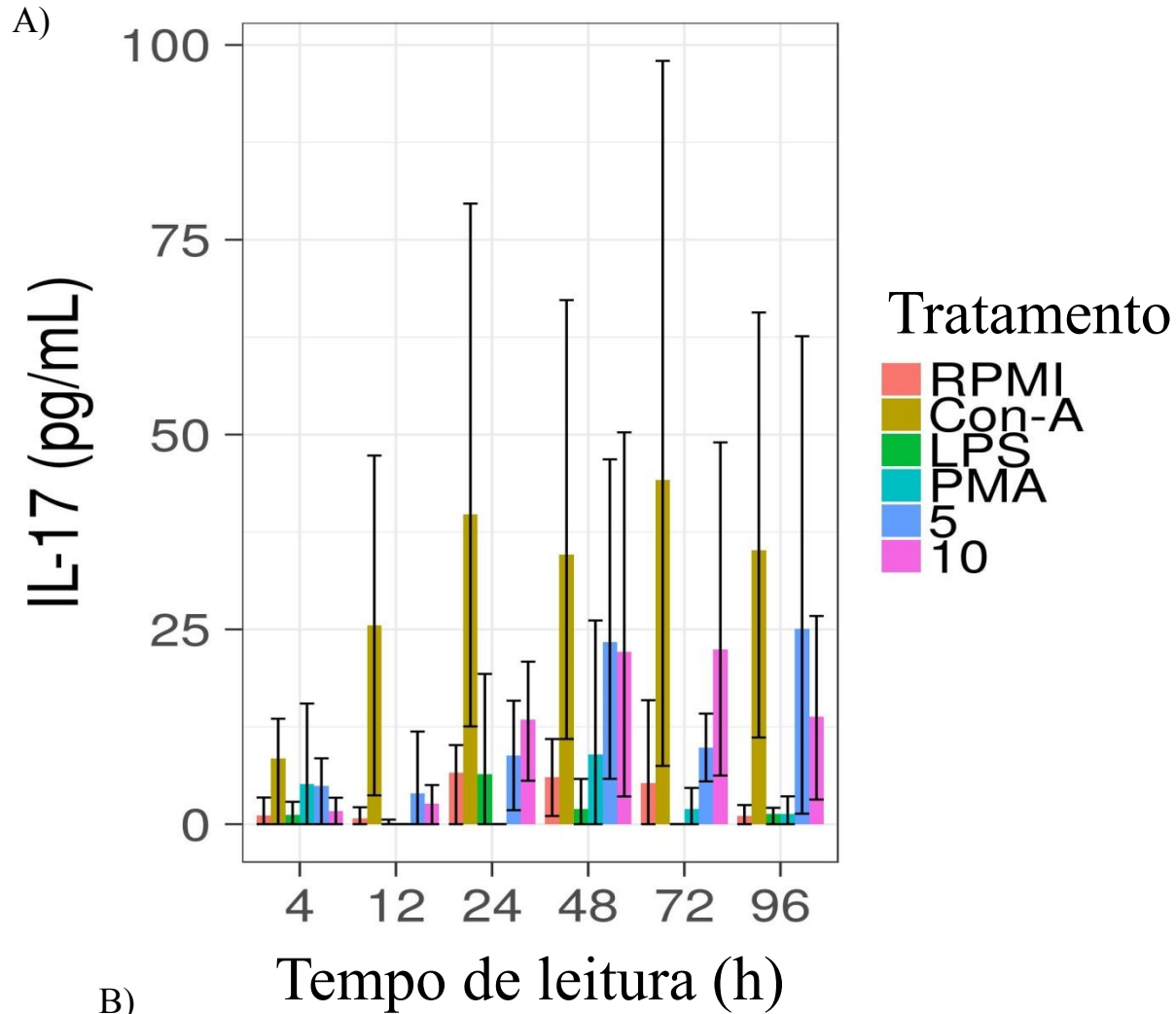


Figura 18 – Efeito da BjuL na produção de IL-17 pelos PBMCs. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo), Con-A (5 $\mu\text{g/mL}$) (grupo controle positivo), LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) (grupo controle positivo), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo), ou BjuL (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) (grupo experimental), em diferentes tempos, a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO_2 . Em seguida foi realizado ensaio por CBA (*cytometric beads array*) e os dados expressos em pg, sendo os valores médios de cinco voluntários independentes e seus respectivos intervalos de confiança estimados por meio de *bootstrap*. (A) Dosagem de IL-17, (B) Curva temporal representativa da produção de IL-17 por PBMCs.

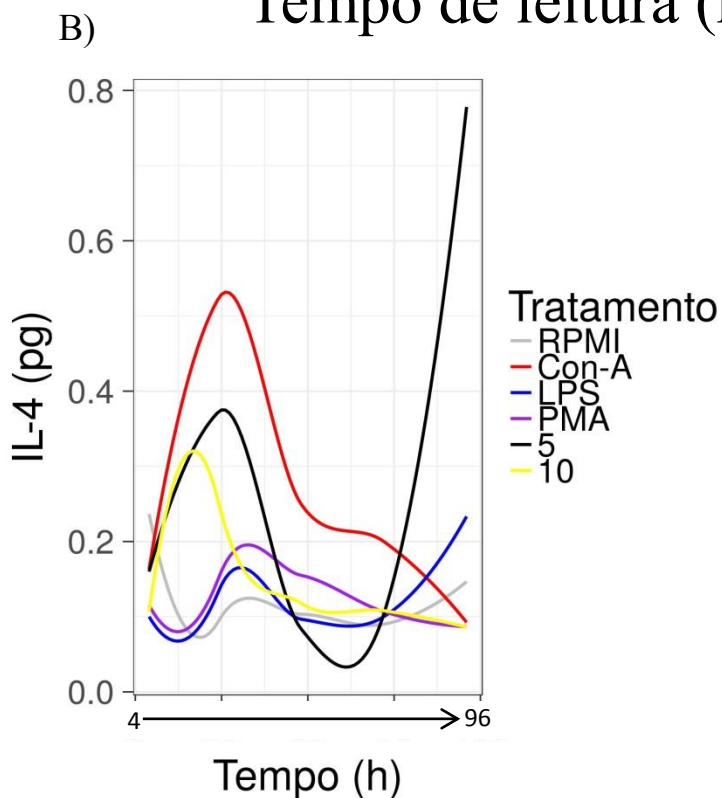
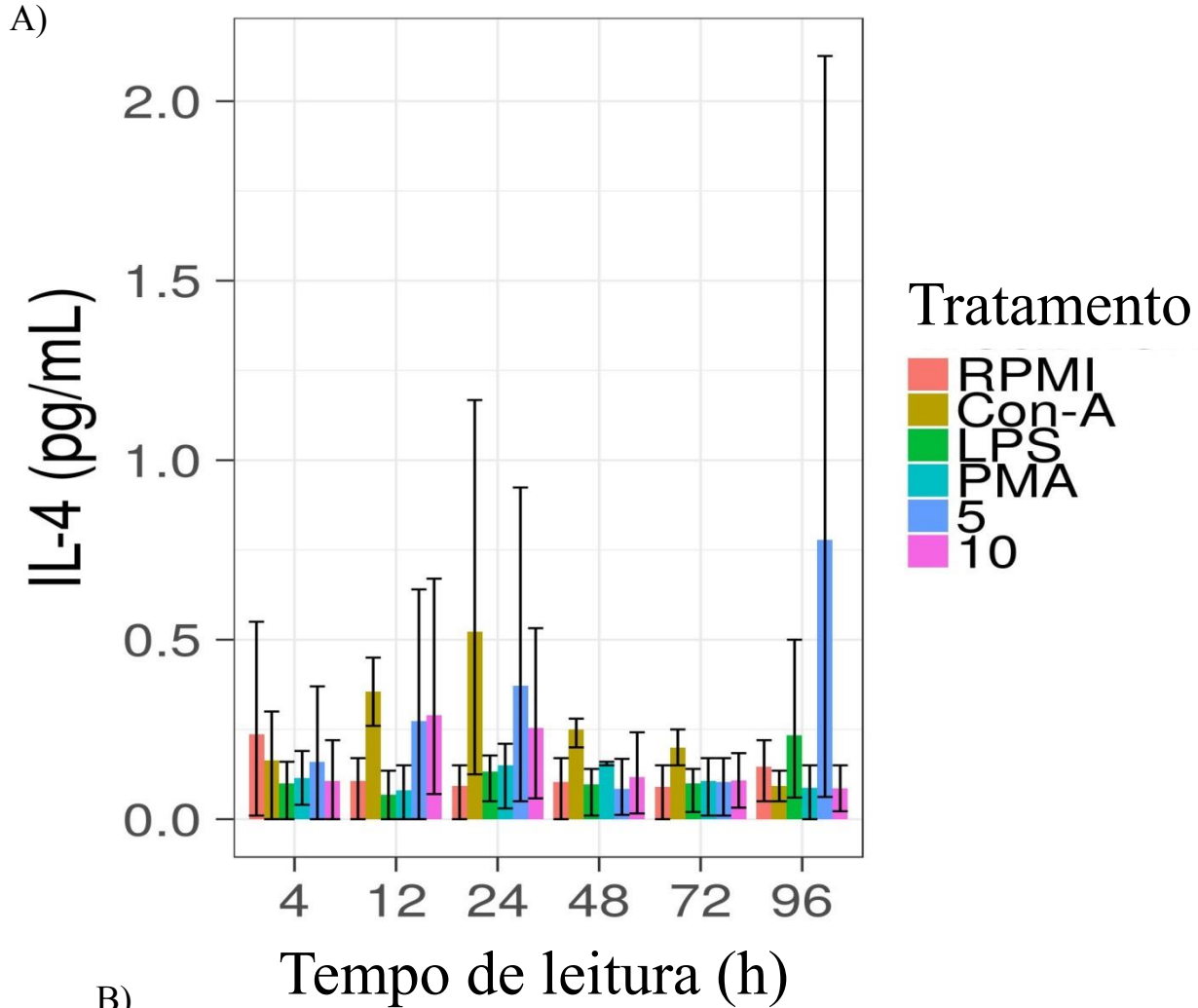
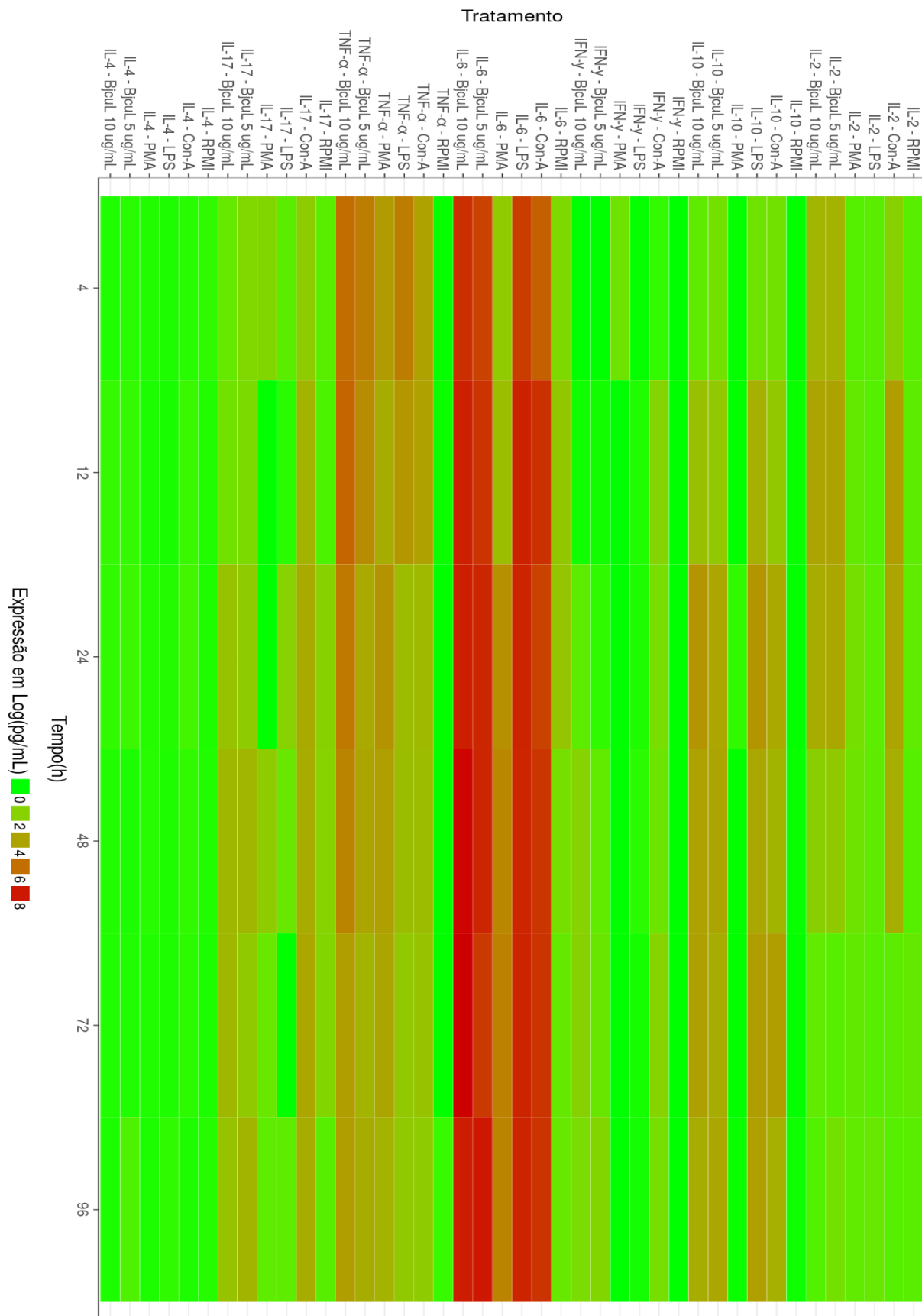


Figura 19 – Efeito da BjuL na produção de IL-4 pelos PBMCs. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo), Con-A (5 µg/mL) (grupo controle positivo), LPS (1 µg/mL) (grupo controle positivo), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo), ou BjuL (5 e 10 µg/mL) (grupo experimental), em diferentes tempos, a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Em seguida foi realizado ensaio por CBA (*cytometric beads array*) e os dados expressos em pg, sendo os valores médios de cinco voluntários independentes e seus respectivos intervalos de confiança estimados por meio de *bootstrap*. (A) Dosagem de IL-4, (B) Curva temporal representativa da produção de IL-4 por PBMCs.

Figura 18 – Mapa da produção de citocinas ao longo do tempo - *Heatmap*.



A densidade das cores no sentido verde para o vermelho significa o aumento crescente das citocinas ao longo do tempo, partindo de zero pg/mL (verde) até o pico máximo de 5000 pg/mL (vermelho mais intenso). 73

4.9- Marcação de citocinas intracelulares

4.9.1- Marcação intracelular de IL-10

A marcação de citocinas intracelulares foi baseada no decurso temporal da produção de citocinas por CBA que evidenciou uma grande produção de IL-10 e TNF- α , sendo assim, foi necessário avaliar qual o tipo celular responsável pela liberação dessas citocinas.

Os PBMCs (1×10^6 células/poço), isolados conforme item 3.3, foram cultivados em placas de 96 poços com volume final de 100 μ L de RPMI suplementado, a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂. As células foram incubadas com RPMI (grupo controle negativo), Con-A (5 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL), PMA (500 ng/mL) (controles positivos) ou BjuL (5 e 10 μ g/mL) (grupo experimental). Após o período de incubação as células foram marcadas com anticorpos monoclonais e, a leitura realizada no FACScan seguida de análise no *software Flow-Jo*.

A figura 21 mostra que as células responsáveis por produzirem IL-10 quando incubadas com a BjuL foram os linfócitos T CD4⁺ - fenótipo CD3⁺CD4⁺. Nessa figura é possível observar que o Con-A, o LPS, e a BjuL (5 μ g/mL) induziram os linfócitos T CD4⁺, em porcentagens significativas, a produzirem essa citocina quando comparado ao controle negativo (Figura 21A). A porcentagem significativa de linfócitos T CD8⁺ - fenótipo CD3⁺CD8, que produziram IL-10 ocorreu apenas com o estímulo de PMA (Figura 21B), o mesmo ocorreu com os linfócitos B - CD19⁺ (Figura 21C) e as células Natural Killer - CD16⁺ (Figura 21D), sendo todos os dados comparados ao controle negativo. Os monócitos - CD14⁺, não induziram a produção de IL-10.

A figura 22 mostra a marcação de células Treg, fenótipo CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Figura 22A) evidenciando que o PMA estimulou a expressão do fator de transcrição – FoxP3, a níveis significantes quando comparado ao controle negativo, enquanto a BjuL (5 e 10 μ g/mL) manteve esse marcador a níveis basais de expressão celular (Figura 22C). As células com fenótipo CD4⁺CD25⁺ (Figura 22B) também estão envolvidas na produção de IL-10, na figura 22D é possível observar que o PMA e a BjuL (10 μ g/mL) induziram uma porcentagem significativa dessas células a produzirem IL-10.

Os dados mostram que a BjuL induziu os linfócitos T CD4⁺ a produzirem IL-10, porém também sugerem a participação das células Treg na secreção dessa citocina, confirmando o papel modulador para essa lectina.

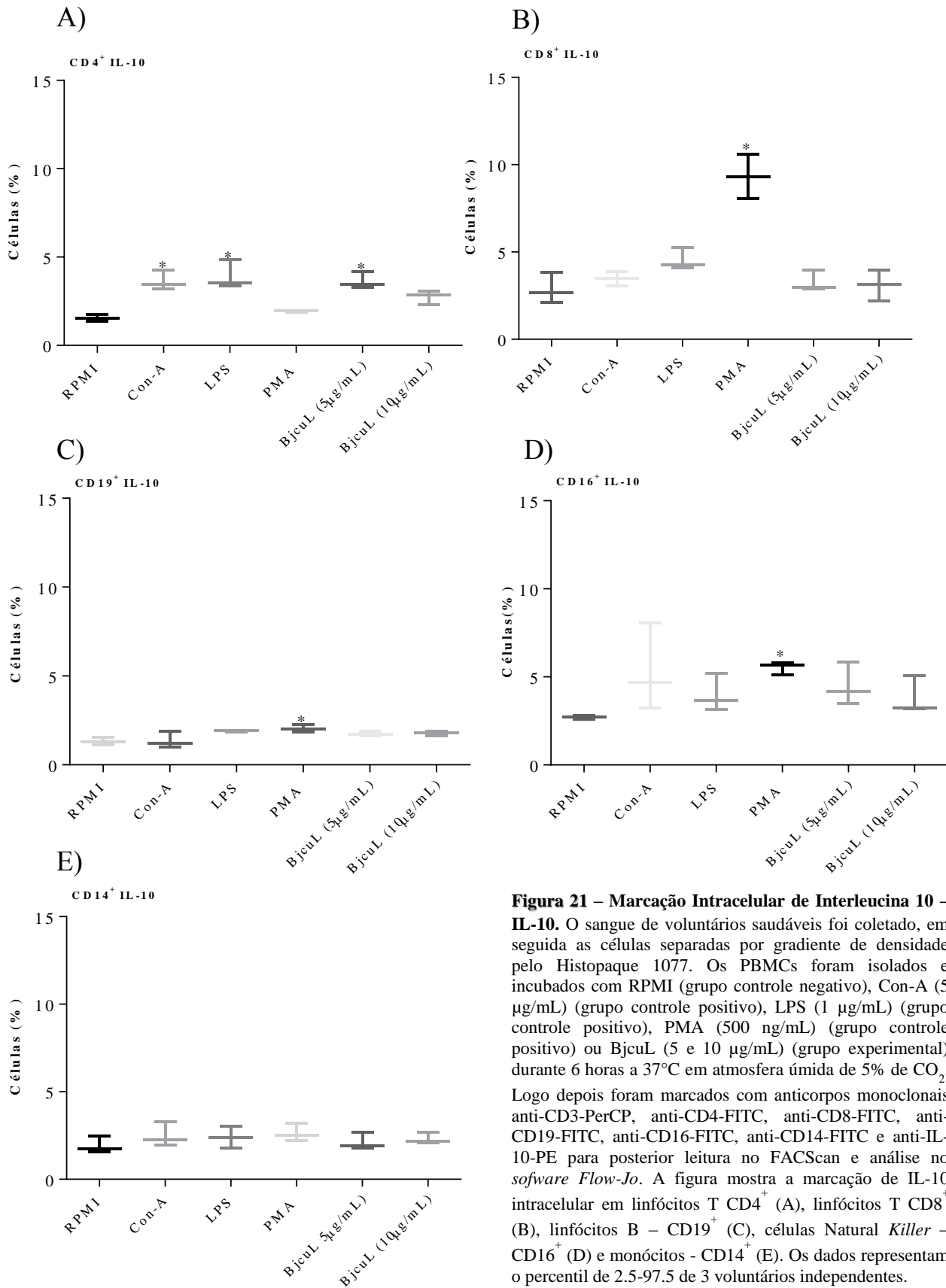


Figura 21 – Marcação Intracelular de Interleucina 10 – IL-10. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (grupo controle negativo), Con-A (5 µg/mL) (grupo controle positivo), LPS (1 µg/mL) (grupo controle positivo), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo) ou BjuL (5 e 10 µg/mL) (grupo experimental) durante 6 horas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Logo depois foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CD3-PerCP, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD19-FITC, anti-CD16-FITC, anti-CD14-FITC e anti-IL-10-PE para posterior leitura no FACScan e análise no *software Flow-Jo*. A figura mostra a marcação de IL-10 intracelular em linfócitos T CD4⁺ (A), linfócitos T CD8⁺ (B), linfócitos B – CD19⁺ (C), células Natural Killer – CD16⁺ (D) e monócitos - CD14⁺ (E). Os dados representam o percentil de 2.5-97.5 de 3 voluntários independentes.

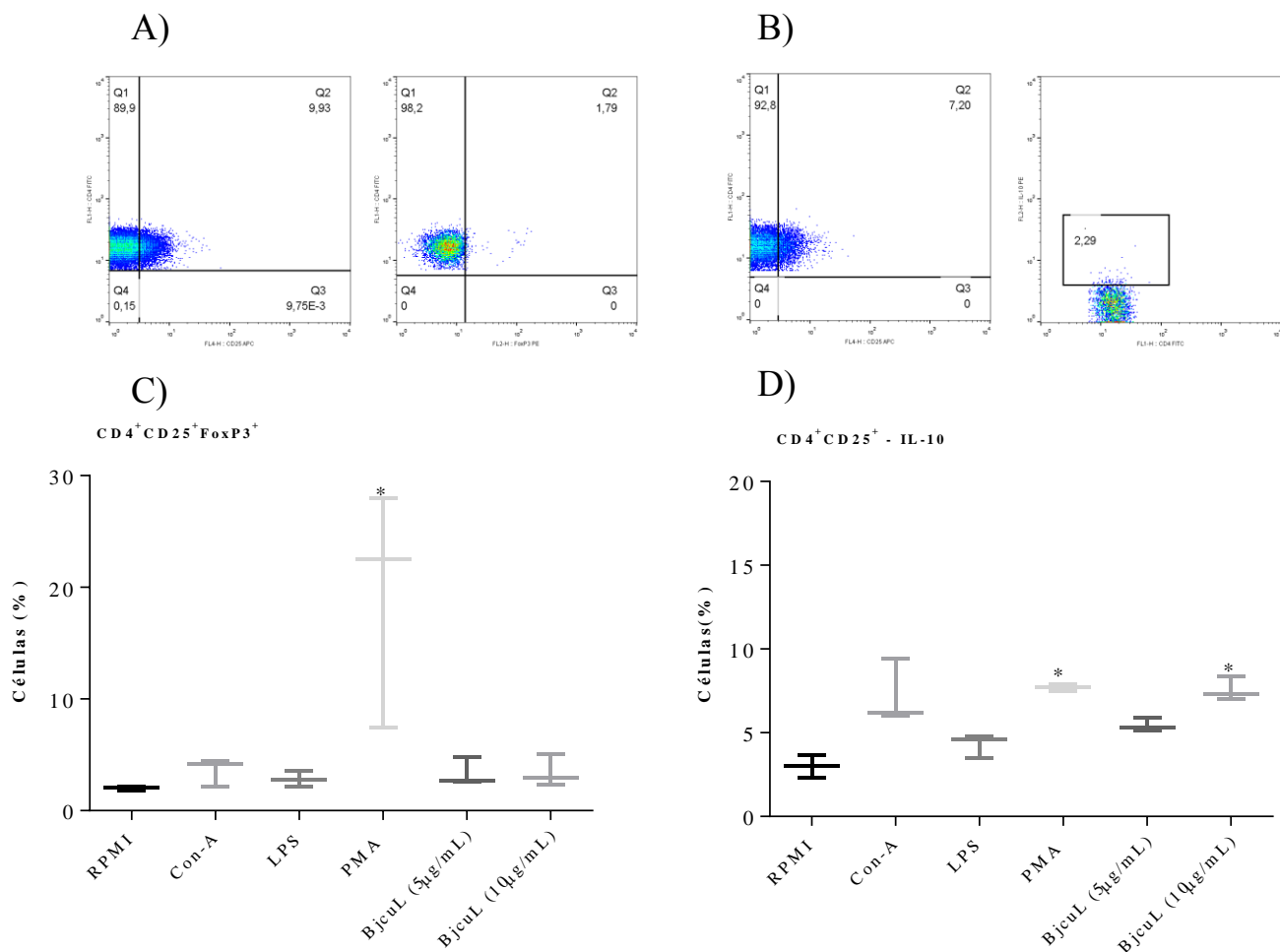


Figura 22 – Marcação Intracelular do fator de transcrição FoxP3 e IL-10. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo), Con-A (5 µg/mL) (grupo controle positivo), LPS (1 µg/mL) (grupo controle positivo), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo) ou BjuL (5 e 10 µg/mL) (grupo experimental) durante 6 horas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Em seguida, foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CD3-PerCP, anti-CD4-FITC, anti-CD25-APC, anti-FoxP3-PE e anti-IL-10-PE, leitura no FACScan e análise no *software Flow-Jo*. A figura mostra a marcação de FoxP3 intracelular em células Treg – CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (A e C) e IL-10 intracelular em linfócitos T CD4⁺CD25⁺ (B e D). Os dados representam o percentil de 2.5-97.5 de 3 voluntários independentes.

4.9.2- Marcação intracelular de TNF- α

Os PBMCs (1×10^6 células/poço), isolados conforme item 3.3, foram cultivados em placas de 96 poços com volume final de 100 μ L de RPMI suplementado, a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂. As células foram incubadas com RPMI (grupo controle negativo), Con-A (5 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL), PMA (500 ng/mL) (controles positivos) ou BjuL (5 e 10 μ g/mL) (grupo experimental). Após o período de incubação as células foram marcadas com anticorpos monoclonais, a leitura realizada no FACScan e analisada no *software Flow-Jo*.

A figura 23 mostra que as células responsáveis por produzirem TNF α quando incubadas com a BjuL foram as células Natural *Killer* - CD16⁺, e principalmente os monócitos - CD14⁺.

Nessa mesma figura é possível observar que o PMA induziu uma porcentagem significativa de linfócitos T CD4⁺ (Figura 23A) a produzirem TNF- α , o Con-A estimulou as células T CD8⁺ a produzirem essa citocina (Figura 23B), quando comparados ao controle negativo. A porcentagem significativa de células Natural *Killer* - CD16⁺ (Figura 23D) que produziram TNF- α ocorreu quando essas células foram estimuladas pela BjuL (5 μ g/mL), enquanto os monócitos - CD14⁺, responsáveis pela produção de altos níveis de TNF- α , teve porcentagens significantes quando estimulados pelo Con-A e BjuL (5 e 10 μ g/mL) (Figura 23E). Os linfócitos B - CD19⁺, não induziram a produção de TNF- α (Figura 23C).

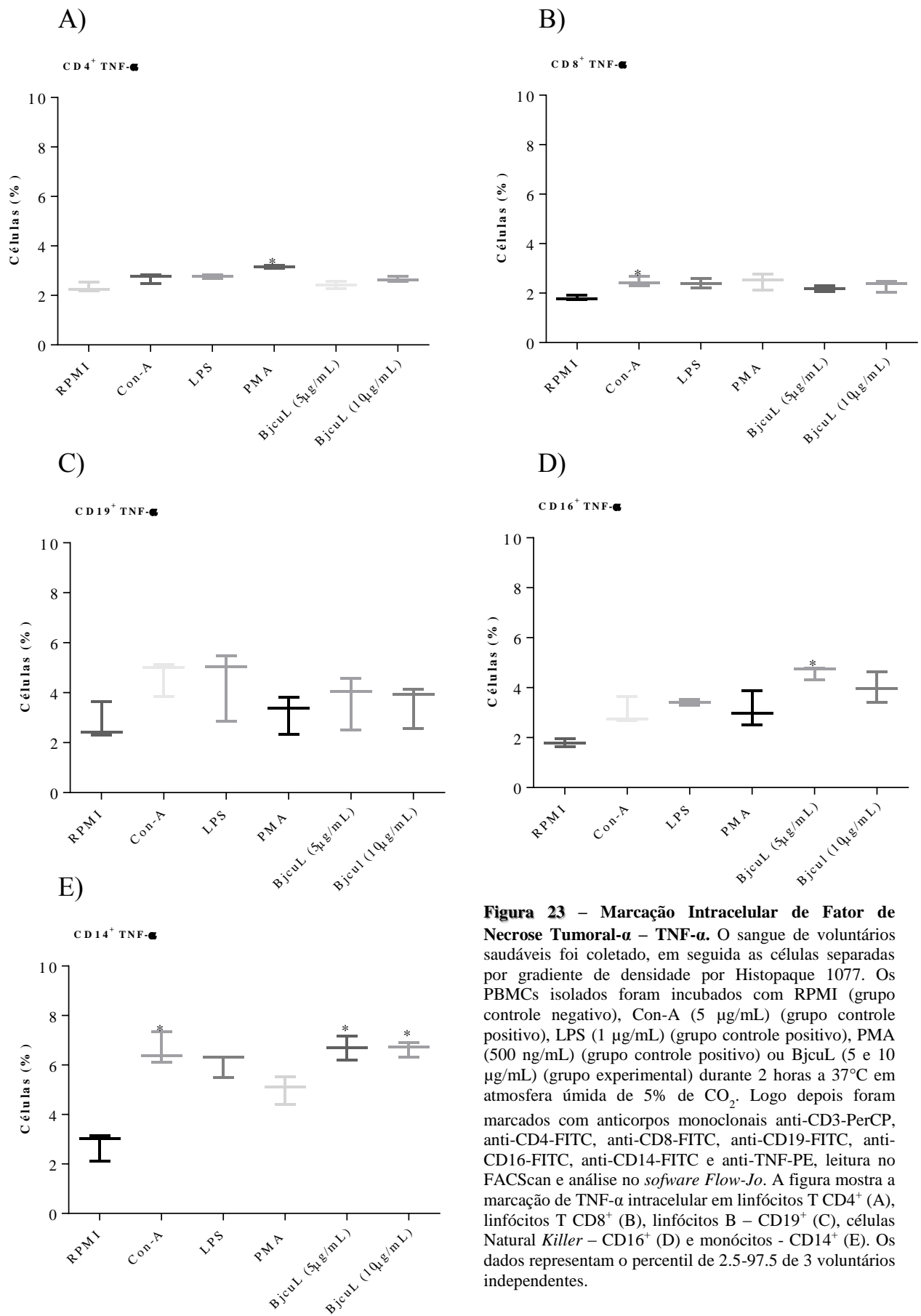


Figura 23 – Marcação Intracelular de Fator de Necrose Tumoral- α – TNF- α . O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram incubados com RPMI (grupo controle negativo), Con-A (5 μ g/mL) (grupo controle positivo), LPS (1 μ g/mL) (grupo controle positivo), PMA (500 ng/mL) (grupo controle positivo) ou BjcUL (5 e 10 μ g/mL) (grupo experimental) durante 2 horas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Logo depois foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CD3-PerCP, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD19-FITC, anti-CD16-FITC, anti-CD14-FITC e anti-TNF-PE, leitura no FACSscan e análise no *software Flow-Jo*. A figura mostra a marcação de TNF- α intracelular em linfócitos T CD4⁺ (A), linfócitos T CD8⁺ (B), linfócitos B – CD19⁺ (C), células Natural Killer – CD16⁺ (D) e monócitos - CD14⁺ (E). Os dados representam o percentil de 2.5-97.5 de 3 voluntários independentes.

5- Discussão

5- Discussão

A B_{jcu}L é uma lectina tipo C, pertencente ao grupo VII, presente no veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (ZELENSKY; GREASY, 2005). Essa lectina é constituída por um único CDR – Domínio de Reconhecimento de Carboidrato (DRICKAMER, 1999; DOD; DRICKAMER, 2001; KILPATRICK, 2002; ZELENSKY; GREASY, 2005) e tem sua atividade dependente de íons cálcio (DRICKAMER, 1988; CARVALHO et al., 1998; CARVALHO et al., 2001; KILPATRICK, 2002; ZELENSKY; GREASY, 2005).

O estudo das lectinas, devido a sua alta especificidade de ligação a carboidratos, é uma importante ferramenta de bioprospecção (DRICKAMER, 1993; STRATHMANN et al., 2002). A participação das lectinas em estudos que tem por objetivo estabelecer as relações entre estas proteínas e os processos de reconhecimento e sinalização celular, infecções parasitárias, bacterianas e virais, crescimento e diferenciação celular e neoplasias, dentre outros, está cada vez mais evidente na literatura (SHARON; LIS, 1993; KILPATRICK, 2002; ELIFIO-ESPOSITO et al., 2011; NUNES et al., 2011; NOLTE et al., 2012). Assim, as interações de lectinas com glicoconjugados presentes na superfície de células do sistema imune podem induzir a uma ativação celular, e conseqüentemente alterações no padrão de secreções de citocinas (MANNEL et al., 1991).

De acordo com Pires e colaboradores (2017) a B_{jcu}L, uma lectina isolada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*, apresentou em ensaios de proliferação celular, a partir de PBMCs (mononucleares do sangue periférico) humanos, uma considerável inibição do efeito proliferativo destas células. Assim, o estudo destes padrões de mitogênese por meio do conhecimento do perfil de expressão gênica e de produção de citocinas além dos mediadores inflamatórios envolvidos nesse processo poderá auxiliar no entendimento dos mecanismos de inibição da proliferação celular, bem como auxiliar na busca de novos modelos de fármacos que possuam atividades que poderiam ser melhores estudados e explorados para futuras aplicações clínicas.

Em um primeiro momento, nesse trabalho avaliou-se a ação da B_{jcu}L sobre a viabilidade dos PBMCs humanos isolados. Os dados obtidos por Pires e colaboradores (2017) mostraram que a lectina não afetou a viabilidade dos PBMCs por meio do método de MTT no tempo de 96 horas. Entretanto, a literatura mostra que a B_{jcu}L possui efeito citotóxico sobre algumas linhagens de células tumorais como as células do câncer de mama metastático MDA-MB-435 ou do carcinoma ovariano humano OVCAR-5 (CARVALHO et al., 2001). Ainda, a B_{jcu}L foi capaz

de induzir a apoptose em células do carcinoma gástrico humano MKN45 e AGS. Essa ação foi atribuída a uma possível interação da BjuL com os glicoligantes da superfície celular, induzindo a ativação de sinais intracelulares capazes de inibir a proliferação celular, levando a apoptose ou a alteração da adesão celular (NOLTE et al., 2012).

No presente estudo, a ação da BjuL sobre a viabilidade dos PBMCs foi também analisada com iodeto de propídio e laranja de tiazol por citometria de fluxo. Os dados obtidos mostraram que por essa metodologia a lectina também não apresentou toxicidade para os PBMCs, em todos os tempos analisados. Em apoio aos dados obtidos estão os dados de Dias-Netipanyi e colaboradores (2016), que mostraram que a BjuL, na concentração de 2,5 µg/mL, também não foi citotóxica para as células U937, uma linhagem de monócitos humanos derivado de linfoma, por meio de ensaio de MTT.

A literatura mostra que as lectinas são conhecidas por suas atividades mitogênicas, as quais podem ser inibidas por baixas concentrações de sacarídeos, embora existam inúmeras descritas com ações antimítogênicas. A presença/ausência de proliferação parece estar associada ao fato de que as lectinas mitogênicas se ligam ao complexo do receptor de células T e causam sinais que conduzem à síntese de IL-2, ao passo que lectinas não mitogênicas ou não se ligam ao complexo ou se ligam a outras moléculas acessórias essenciais para a transmissão de sinais de ativação. Essa ligação a moléculas acessórias não induz a produção e secreção de IL-2 e pode ser a razão da atividade antimítogênica (CHILSON; KELLY-CHILSON, 1989; KILPATRICK, 1999; KILPATRICK, 2002).

Cui e colaboradores (2017) relataram que a lectina isolada de *Artocarpus lingnanensis* (ALL), árvore amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, induziu atividade mitogênica em linfócitos T CD4⁺ e secreção equilibrada de citocinas de perfil Th1 e Th2 quando o receptor CD45 foi ativado e, conseqüentemente, acarretou sinalização via TCR.

Algumas lectinas extraídas de plantas, como a concanavalina e a fito-hemaglutinina têm efeito mitogênico (GREENE et al., 1976; KILPATRICK, 1999). Por outro lado, a lectina extraída do tomate não tem ação mitogênica sobre linfócitos T humanos (KILPATRICK, 1999), assim como a aglutinina do germém de trigo, uma lectina que também não tem ação mitogênica, mas possui a capacidade de inibir a absorção do aminoácido aminoisobutírico por linfócitos T humanos (STRATHMANN et al., 2002).

A maioria das lectinas liga-se a diferentes glicoproteínas de superfície celular, a aglutinina do gérmen de trigo liga-se a muitos receptores, enquanto a lectina do tomate liga-se apenas a três tipos principais. Essa natureza não mitogênica para essas duas lectinas pode ser explicada pelo bloqueio do antígeno CD45, comum entre os leucócitos e essencial no papel de ativação das células T (KILPATRICK, 1999; STRATHMANN et al., 2002). Esses mecanismos de ligação entre a lectina e as moléculas de superfície celular ou até mesmo matriz extracelular, devem ser melhor explorados e estudados.

Dados experimentais obtidos por Pires e colaboradores (2017) determinaram que a BjcuL não foi capaz de induzir proliferação celular de PBMCs por meio do método de MTT no tempo de 96 horas. Neste estudo, esses autores também utilizaram a marcação com diacetato de carboxifluoresceína succinimidiléster (CFDA-SE). Essa metodologia permite medir a proliferação celular por citometria de fluxo pelo fato do CFSE emitir fluorescência (HASBOLD et al., 1999; TESFA et al., 2003; QUAH et al., 2007). Assim os dados confirmaram que a BjcuL não tem atividade mitogênica sob os PBMCs humanos quando comparado aos grupos controle negativo e positivo.

Esse mesmo resultado foi observado por Pereira-Bittencourt e colaboradores (1999) estudando linhagens de células de câncer em humanos. Em seu estudo, a BjcuL inibiu a proliferação de oito linhagens celulares de câncer humano de maneira dose-dependente. Além disso, a lectina teve mais ação na inibição do crescimento de linhagens de células de câncer renal (Caki-1 e A-498) e pancreáticas (CFPAC-1), porém não mostrou nenhum efeito sobre as linhagens de células do câncer do cólon (Caco-2) e de mama (MCF7).

Hasbold e colaboradores (1999) mostraram em seus estudos com CFSE a relação existente entre diferenciação e o número de divisões celulares sofridas por linfócitos, após 48 horas de cultura celular, e como marcações de superfície celular permitem prever o tipo de resposta imunológica que será desenvolvida e o comportamento dos linfócitos durante reações imunológicas *in vivo*.

A literatura também mostra que até mesmo para analisar a proliferação de linfócitos T em anfíbios (*Xenopus laevis*) infectados por vírus – FV3, a marcação por CFSE é utilizada e neste caso, foi destacado a conservação evolutiva da proliferação de linfócitos T (MORALES, 2008).

Os mecanismos de proliferação podem ser regulados pela produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (EROS), sendo que este último está envolvido na atividade

antimitogênciã de linfócitos T por meio da regulaçã da induçã de produçã de citocinas (PIRES et al., 2017). No presente estudo foi verificado que os linfócitos T sã o tipo celular predominante responsãvel pela produçã de EROS induzidas por BjcuL, essa lectina realmente nã promoveu atividade mitogênica.

A imunofenotipagem é a identificaçã quantitativa de antígenos celulares utilizando marcações com anticorpos monoclonais acoplados a diferentes fluorocromos para leitura no citômetro de fluxo. A aplicaçã dessa tãcnica vai atã amostras de cãlulas sanguíneas, medulares ou tumorais (OWENS et al., 2000; CRAM, 2002; FAILACE, 2003; FARIA et al.; 2008; MAECKER et al., 2012). O diagnõstico e o acompanhamento clínic de inúmeras doençãs vêm sendo realizado a partir de imunofenotipagem por citometria de fluxo (AUTISSIER et al., 2010).

O ensaio de acoplamento da BjcuL ao fluorocromo FITC foi realizado com a finalidade de se avaliar a interaçã da lectina às diferentes subpopulações celulares. O efeito da BjcuL-FITC na imunofenotipagem mostrou que a lectina interage com monócitos, linfócitos B, e também com as subpopulações de linfócitos T. Essa interaçã celular teve suas porcentagens variadas de acordo com o número de diferentes fenótipos celulares presentes na amostra, e pode indicar que a lectina interage com diferentes tipos de carboidratos presentes na membrana celular, tais como manose e/ou galactose. Em seu trabalho de revisã Kilpatrick (1999) mostrou que a maioria das lectinas liga-se a diferentes glicoproteínas de superfície celular. Porém, Elífiõ-Esposito e colaboradores (2007) mostraram que também há interaçã com a matriz extracelular.

Para complementar os dados obtidos por citometria de fluxo foi realizado imunofluorescência, observadas em microscópio confocal. Os dados mostraram que a BjcuL-FITC além de ser encontrada na membrana celular também foi encontrada no citoplasma e próximo ao núcleo celular dos PBMCs.

Em apoio ao presente estudo estã os dados obtidos por Cui e colaboradores (2017) que também relataram por meio do uso da citometria de fluxo e microscopia confocal que a lectina isolada de *Artocarpus lingnanensis* (ALL), árvore amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, quando conjugada ao FITC tem como principal receptor a proteína transmembrãnica CD45. Essa lectina induziu atividade mitogênica em linfócitos T CD4⁺ e secreçã equilibrada de citocinas de perfil Th1 e Th2 quando ativou o receptor CD45 e consequente sinalizaçã via TCR. Com base nessas observações os autores propuseram que as lectinas podem interagir diretamente com um número diversificado de glicoproteínas de membrana presentes nos linfócitos T.

Uma vez que a BjuL-FITC interage com os PBMCs, e que um possível resultado dessa interação é a ativação celular, foram conduzidos estudos de liberação de citocinas os quais mostraram que a lectina induziu a liberação de citocinas com perfil imunoregulatório. A IL-2 é uma citocina pleiotrópica com papel central na resposta imunológica protetora. A ativação de células T por meio do receptor de células T (TCR) e o co-estimulador CD28 induzem a produção de IL-2 e em seguida, impulsiona ampla expansão clonal com a proliferação de células T CD4⁺ e diferenciação terminal de células T CD8⁺. Porém, a deficiência em sua produção também está relacionada a auto-imunidade, tendo portanto, relação com o desenvolvimento de células T reguladoras (Treg - CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) e na homeostase. Outro aspecto interessante é que a IL-2 impede a geração de células Th17 *in vitro*. Assim, as células T produtoras de IL-17 se desenvolvem após estímulo por meio de TCR e CD28 quando TGF-β e IL-6 estão presentes (EKLUND; KUZEL, 2004; MALEK, 2008; KLATZMANN; ABBAS, 2015).

Nesse trabalho foi possível observar que a BjuL induziu um pico de produção de IL-2 pelos PBMCs até 24 horas de cultura celular, decaindo até chegar a 96 horas. Esse perfil pode indicar que a IL-2 está envolvida na diferenciação das células Treg, que participam da produção de IL-10, e que a IL-17 realmente só aparece a níveis detectáveis com 96 horas de cultura celular, momento esse em que a IL-2 não tem mais atividade e a IL-6 atingiu altos níveis.

As células Treg (fenótipo - CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) expressam quantidades abundantes do receptor de IL-2 (IL-2R), dependem da IL-2 produzida por células T ativadas e consomem IL-2 em sua função de supressão (CHINEN et al., 2016; PANDIYAN; ZHU, 2015). Em apoio a essa argumentação, os dados obtidos nesse estudo mostraram que a BjuL estimulou as células CD4⁺CD25⁺ a produzirem IL-10.

A IL-10 é conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias e pela capacidade de inibir a síntese de citocinas inflamatórias que estimulam diversas funções celulares e atuam tardiamente na resposta imunológica (MOORE et al., 1993; ROPELLE et al., 2010). Essa citocina pode ser secretada por vários tipos celulares tais como monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B, células Natural *Killer*, linfócitos T auxiliares (fenótipo CD3⁺CD4⁺), e células Treg (fenótipo - CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), geralmente de modo tardio se comparada a outras citocinas (MOORE et al., 1993; RHODES et al., 2008; BOUAZIZ et al., 2010).

Em linfócitos T, a IL-10 é secretada logo após a interação com o receptor TCR (receptor de célula T) (BENEINHAUER et al., 2004) sendo capaz de inibir a proliferação e a síntese de

citocinas pelas células T auxiliares, tais como IL-2, IFN- γ pelo padrão Th1 e de IL-4, IL-5 pelo padrão Th2 (SABAT, 2010a; SABAT et al., 2010b)). Desse modo, é possível sugerir que a presença de IL-10 induzida pela BjcUL esteja modulando negativamente a proliferação dos PBMCs.

Macrófagos murinos e PBMCs humanos produzem IL-10 quando ativados por LPS, essa citocina pode inibir as monocinas do tipo IL-6 e TNF- α , porém pode ser inibida por IL-4 e IFN- γ . A literatura relata que a IL-10 além de estar envolvida na inibição de citocinas de perfil Th2 na dependência de células APC, também inibe a apresentação de antígenos e a secreção da citocina IL-12 (RHODES et al., 2008; BOUAZIZ et al., 2010).

A proliferação de macrófagos e células T de camundongos, bem como de células T humanas estimuladas com Con-A é significativamente inibida por IL-10, porém essa citocina não afeta a proliferação de células dendríticas dependentes de IFN- γ produzidos por células Th1. Além disso, a IL-10 não é uma citocina estritamente de perfil Th2, tendo seu padrão de expressão mais semelhante a IL-6 do que IL-4 ou IL-5 (MOORE et al., 1993; MA et al., 2015).

A BjcUL estimulou os linfócitos T auxiliares (CD3⁺CD4⁺) e as células Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) a produzirem IL-10, que de início apresentou níveis baixos, atingiu um pico entre 24 e 48 horas, decaiu, porém manteve-se a níveis detectáveis até 96 horas de cultura celular. Esse perfil explica a queda de IL-2 a partir de 24 horas de cultura celular, já que a IL-10 tem ação modulatória negativa sobre essa citocina, e conseqüentemente modula negativamente proliferação celular dos PBMCs. Além disso, a queda e/ou oscilações no nível de IL-10 permitiu a detecção de IFN- γ mesmo que esse tenha atingido maiores quantidades de forma tardia, ou seja, com 96 horas de cultura celular.

Durante seu decurso temporal a IL-10 não inibiu a produção de IL-6, que apresentou altos níveis desde o início da cultura celular e atingiu pico máximo de detecção em 96 horas. Os altos níveis de TNF- α coincidem com a baixa quantidade de IL-10 no início da cultura celular. A partir de 24 horas, a liberação de IL-10 foi crescente e manteve-se detectável até 96 horas, fato que explica a queda no nível de TNF- α que chegou a níveis não detectáveis em 96 horas.

Os resultados também mostraram que a BjcUL não induziu a produção de IL-4, o que favorece a ação da IL-10, e com a produção de IFN- γ mesmo que de forma tardia, é possível afirmar que a BjcUL induziu, além de regulador, um perfil Th1 de resposta imunológica.

Platanias (2005) mostrou em seu trabalho de revisão as propriedades do INF- γ , que além de ser uma citocina que age como primeira linha de defesa contra infecções virais, também tem efeito antiproliferativo e imunomodulador. A BjuL estimulou os PBMCs a produzirem INF- γ , que pode ter contribuído para a inibição da proliferação exercida por essa lectina.

A IL-6 é uma citocina com característica pleiotrópica e redundante, não estando envolvida apenas em respostas inflamatórias e infecção, mas também na regulação dos processos metabólicos, regenerativos e neurais (SCHELLER et al., 2011). Esta citocina desempenha importante papel na transição da resposta inata para a resposta imunológica adquirida. Na fase aguda da inflamação as células endoteliais são ativadas por TNF- α e produzem quimioquinas que em conjunto com a IL-6 pode levar a grande infiltração de neutrófilos para o tecido inflamado, porém essa citocina exerce papel circunstancial no controle da inflamação ao induzir apoptose nos neutrófilos e permitir o recrutamento de mononucleares, evitando assim, danos ao tecido que pode ser causado por proteases e espécies reativas do oxigênio. O mesmo não ocorre com células T, pois a IL-6 não induz apoptose nessas células, na realidade ela desempenha papel crucial na diferenciação de linfócitos T e B (RATH et al., 2015).

A IL-6 atua na indução para o perfil imunológico Th2 e Th17. A diferenciação de células Th2 está relacionada a ação conjunta de IL-6 e IL-4 e supressão de IFN- γ . Outro papel importante da IL-6 é a capacidade de inibir TGF- β , mediando assim a diferenciação de células T CD4⁺ em células Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). Por outro lado, a ação conjunta de IL-6 e TGF- β induz a diferenciação de células Th17, que são um subconjunto de células T distintas de células Th1 e Th2, secretoras de IL-17 e que estão implicadas na indução de doenças auto-imunes. Apenas a ação associada da IL-6 leva a supressão de células Treg e diferenciação de células Th17, portanto, trata-se de uma citocina com papel importante na diferenciação de linfócitos T (SCHELLER et al., 2011; RATH et al., 2015; GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2016).

Neste trabalho foi possível observar que houve a produção de IL-6 em todos os tempos de cultura celular com a BjuL e que essa citocina chegou a atingir pico máximo de produção em alguns momentos. A BjuL não induziu a liberação de IL-4 e levou a secreção de INF- γ , sendo assim, mesmo com grande produção de IL-6, não houve diferenciação de células com perfil Th2. Na realidade a IL-6 pode ter contribuído com a diferenciação de células T CD4⁺ em células Treg.

Ropelle e colaboradores (2010) mostraram em seu trabalho a participação da IL-6 nos mecanismos relacionados a obesidade. A IL-6 quando presente em altos níveis induziu efeito

anti-inflamatório ao mediar uma resposta que envolve o aumento de IL-10. Os dados mostraram que essa citocina, além de suas características pró-inflamatórias, tem a capacidade de regular negativamente a fase aguda da inflamação. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os estudos do autor, pois a BjuL induziu a produção de grande quantidade de IL-6 e também a produção de IL-10. Dessa forma, ao contribuir com a diferenciação de células Treg e induzir a liberação de IL-10, a BjuL confirma sua capacidade imunoreguladora.

O papel da IL-6 na diferenciação de células Th17 difere entre células humanas e murinas. As células Th17 murinas originam-se de um precursor comum às células Treg quando a IL-6 age em conjunto com TGF- β , as células Th17 humanas são derivadas do precursor CD4⁺CD161⁺ em resposta à atividade de IL-1 β , IL-23 e IL-6, podendo aumentar a polarização para Th17 induzida por IL-1 β de células T CD4⁺ humanas (RATH et al., 2015). Os dados obtidos nesse trabalho mostraram que houve produção de IL-17 em pequenas quantidades e de forma tardia, portanto a IL-6 pode ter contribuído com a diferenciação de células Th17 apenas ao final da cultura celular.

Zimmermann e colaboradores (2015) mostraram que o LPS induz os neutrófilos a produzirem IL-6, e o TNF- α potencializa essas células a produzirem essa citocina. A BjuL induziu os monócitos e as células Natural *Killer* a produzirem TNF- α , a qual pode ter contribuído com a potencialização da liberação de IL-6.

O TNF- α é de uma citocina pleiotrópica considerada mediador pró-inflamatório com principal ação sobre a atividade citotóxica contra tumores ao agir na vascularização tumoral e comprometer o fornecimento de sangue, e ainda, sobre a ação combinada com IFN- γ , induz senescência nas células tumorais (WAJANT et al., 2003). Essa citocina geralmente é produzida por monócitos/macrófagos, porém outras células como linfócitos, mastócitos, células endoteliais, células Natural *Killer* e fibroblastos podem também produzi-la, principalmente quando o estímulo são os lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos. Componentes gerados a partir de EROS atuam como um mecanismo de amplificação da atividade do TNF- α , que pode promover ativação de NF- κ B, mediadores de apoptose como caspases, ou ainda morte celular por necrose (BRADLEY, 2008). O TNF- α tem a capacidade de inibir a IL-10 (MOORE et al., 1993), e de induzir a produção de IL-6 em neutrófilos e macrófagos (KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2015).

A capacidade de induzir inflamação, ativar o endotélio vascular e recrutar leucócitos para o tecido são funções que o TNF- α pode executar de forma descontrolada e que tem sido associada ao desenvolvimento de doenças inflamatórias auto-imunes tais como, artrite reumatoide e

psoríase. Novos conceitos têm sido introduzidos em terapêuticas para doenças mediadas por TNF- α , porém, seu uso generalizado foi prevenido devido a sua toxicidade sistêmica (KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2015).

Os dados obtidos nesse trabalho mostraram que a BjuL induziu as células Natural *Killer* e principalmente monócitos a produzirem TNF- α . Essa citocina apresentou altos níveis em sua produção no início da cultura celular, porém chegou a níveis não detectáveis após 96 horas.

O TNF- α pode ter tido sua atividade potencializada por EROS que foram produzidos por linfócitos T, também pode ter contribuído com a síntese de IL-6, inibiu a produção de IL-10 no início da cultura celular, porém com a queda em seus níveis, a IL-10 passou a ser detectada até 96 horas.

A IL-17 é uma citocina que não é produzida pelas células Th1 ou Th2, e sua produção não depende de citocinas que medeiam o desenvolvimento desses subconjuntos celulares. Essa citocina está envolvida em processos inflamatórios e no desenvolvimento de doenças auto-imunes, com mecanismo de ação distinto de IFN- γ e IL-4, sendo secretada por uma outra linhagem de diferenciação de células T CD4⁺ denominadas Th17 (DONG, 2006; WAEVER et al., 2007).

A diferenciação de células Th17 só ocorre de forma eficiente na ausência de citocinas de perfil Th1 e Th2, e na presença de IL-23, sendo assim, IFN- γ exerce atividade inibitória sobre as células Th17 (DONG, 2006).

A expressão de IL-17 também pode ser regulada por TGF- β e IL-1 β , demonstrando que existe envolvimento da IL-17 na transição entre o sistema imune inato e adaptativo. Algumas ações da IL-17 podem ser potencializadas por TNF- α , e em consequência disso a IL-17 ativa a produção de TNF- α e IL-1 β por macrófagos. Essa população de células T efectoras que responde a IL-17 e TNF- α , porém é inibida por IFN- γ ou IL-4 e apresenta fenótipo diferente de células Th1 e Th2, tornaram-se Th17, mas também revelou uma característica crítica para o seu desenvolvimento, o estímulo por IL-6 (WAEVER et al., 2007).

O TGF- β é um elemento crítico para o desenvolvimento das células Th17, a IL-6 suprime a ação do TGF- β no desenvolvimento de células Treg direcionando justamente a diferenciação de células Th17. Outro fato é que a IL-6 pode induzir a produção de IL-23 e não depender de TGF- β para direcionar o perfil Th17 (WAEVER et al., 2007; GU et al., 2013).

Neste trabalho não foi possível detectar IL-17 no início da cultura celular, esse fato pode ser justificado pelo perfil regulatório predominante devido a produção de IL-2 até 24 horas e consequente aumento na produção de IL-10. A presença do IFN- γ e ausência de IL-4 indica desvio para o fenótipo Th1, sendo que o IFN- γ inibe a secreção de IL-17.

Rath e colaboradores (2015) definiram que a diferenciação das células Th17 pode ser mediada de forma tardia por meio do estímulo promovido por IL-6. Os dados obtidos nesse trabalho corroboram os dados do autor, pois a BjuL induziu a produção de grande quantidade de IL-6 que pode ter contribuído com a diferenciação de células Th17 no final da cultura celular, justificando a detecção de IL-17 após 96 horas, mesmo que em pequenas quantidades.

Os receptores de lectina tipo C (CLRs) estão envolvidos na diferenciação de células T CD4⁺ (Th). O dectin 1 é um tipo de receptor de lectina tipo C presente em células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, linfócitos B, queratinócitos e células de Langerhans. Este receptor está envolvido na resposta imunológica contra fungos e participa da diferenciação de células Th em fenótipos Th1 e Th17 (GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2016; MAYER et al., 2016). A BjuL é um tipo de lectina tipo C e pode estar contribuindo com a modulação dos fenótipos Th1 ou Th17.

Pandiyan; Zhu (2015) descreveram em seu trabalho sobre a capacidade das células Treg em se reprogramar para células T auxiliares e produzir citocinas inflamatórias sem a perda do fator de transcrição FoxP3. Os mecanismos de ação das células Treg diferem dependendo do tipo de doença envolvida, como psoríase, periodontite, artrite, diabetes tipo I e alergias, do estado inflamatório do ambiente local, da sua localização anatômica e principalmente do microambiente de citocinas. A presença de citocinas como IL-12 pode fazer com que as células Treg se comportem como células de perfil Th1, levando a produção de IFN- γ . As citocinas IL-6, IL-23 e IL-1 β podem estimular as células Treg a se comportarem como células de perfil Th17, levando a síntese de IL-17. Neste trabalho foi constatado a produção de IL-17 apenas no final da cultura celular, e também o envolvimento de células Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) na produção de citocinas quando estimuladas pela BjuL. Sendo assim, é possível sugerir que essa lectina induziu as células Treg a se comportarem como células de perfil Th17, sendo as responsáveis pela produção de IL-17 ao final da curva temporal.

A IL-4 é produzida principalmente por linfócitos T ativados, mas também por mastócitos, basófilos e eosinófilos. Funcionalmente, IL-4 é mais conhecida por determinar a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o fenótipo Th2 e ao mesmo tempo inibir o perfil Th1, estando envolvida

com a resposta imunológica adaptativa humoral e processos alérgicos (MOORE et al., 1993). Os linfócitos T quando estimulados por Con-A promovem a síntese de IL-4, porém outras células são sensíveis a essa citocina, como monócitos/macrófagos, mastócitos, células endoteliais e fibroblastos (LUZINA et al., 2012).

Além de estar envolvida na diferenciação de células T, o conhecimento sobre a IL-4 também levou ao conceito de ativação de macrófagos que se diferenciam em M1 e M2, ou seja, os mesmos estados coincidentes com as citocinas que polarizam perfis Th1 e Th2. As designações M1 e M2 agora coexistem com esses fenótipos descritos como classicamente ou alternativamente ativados e direcionado a patógenos bacterianos ou helmintícos, respectivamente (LUZINA et al., 2012).

A BjcuL não induziu a produção de IL-4, porém houve a produção de INF- γ , sendo assim, reforçando que essa lectina não induziu polarização de linfócitos para o perfil Th2.

Moore e colaboradores (1993) descreveram que a combinação de IL-4 e IL-10 têm efeitos proeminentes na proliferação e diferenciação de linfócitos T e B humanos. A ausência de IL-4 e a concomitante produção de IL-10 na cultura celular estimulada com a BjcuL pode ter contribuído com o efeito anti-mitogênico promovido por essa lectina. Os dados mostraram que apenas o Con-A induziu a produção de IL-4, mesmo que em pequenas quantidades, corroborando com a descrição de Luzina e colaboradores (2012).

A BjcuL não é tóxica aos PBMCs humanos, interage com diferentes subpopulações celulares, internaliza para o citoplasma, podendo estimular diferentes vias de sinalização celular. A lectina isolada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* não tem atividade mitogênica sobre os PBMCs, e o perfil de citocinas produzidas pelas células quando estimuladas pela BjcuL permite afirmar que essa lectina apresenta atividade imunoreguladora. Porém, os possíveis receptores com que a BjcuL interage e as vias de sinalização celular ativadas por essa lectina devem ser ainda estudados.

6- Conclusões

6- Conclusões

Os resultados obtidos nesse estudo permite afirmar que:

1. A BjuL não é tóxica para os PBMCs humanos nas concentrações de 5 e 10 µg/mL;
2. A BjuL não exerce atividade mitogênica sobre os linfócitos T humanos nas concentrações de 5 e 10 µg/mL;
3. Os linfócitos T são os principais responsáveis pela produção de EROS induzidos pela BjuL;
4. A imunofenotipagem permite observar as subpopulações celulares com grau de pureza maior que 95%;
5. A BjuL-FITC interage com monócitos, linfócitos B, e também com subpopulações de linfócitos T;
6. A BjuL-FITC, além de interagir com a membrana, internaliza para o citoplasma celular;
7. A BjuL induziu a liberação de IL-2, IL-10, INF- γ , IL-6, TNF- α e IL-17 pelos PBMCs;
8. A BjuL não induziu a liberação de IL-4 pelos PBMCs;
9. A BjuL induziu a liberação de TNF- α pelas células Natural *Killer* (CD16⁺), e principalmente por monócitos (CD14⁺);
10. A BjuL induziu a liberação de IL-10 pelos linfócitos T CD4⁺ e linfócitos Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), confirmando o papel imunoregulador para essa lectina.

Referências

Referências

- ABREU, P. A.; ALBUQUERQUE, M. G.; RODRIGUES, C. R. R.; CASTRO, H. C. Structure–function inferences based on molecular modeling, sequence-based methods and biological data analysis of snake venom lectins. **Toxicon**, v. 48, p. 690-701, 2006.
- ANDO, Y.; YASUOKA, C.; MISHIMA, T.; IKEMATSU, T.; UEDE, T.; MATSUNAGA, T.; INOBE, M. Concanavalin A-mediated T cell proliferation is regulated by herpes virus entry mediator costimulatory molecule. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal**, v. 1, p. 1-8, 2013.
- ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, v. 38, p. 775-791, 2000.
- ARAGÓN-ORTIZ, F.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E. A. Amino acid sequence of a lectin-like protein from *Lachesis muta stenophrys* venom. **Toxicon**, v. 34, p. 763–769, 1996.
- AUTISSIER, P.; SOULAS, C.; BURDO, T. H.; WILLIAMS, K. C. Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: Clarification on DC heterogeneity. **J. Immunol. Methods**, v. 360, p. 119-128, 2010
- BALLERSTADT, R.; EVANS, C.; MCNICHOLS, R.; GOWDA, A. Concanavalin A for in vivo glucose sensing: A biotoxicity review. **Biosensors and Bioelectronics**, v.22, p. 275-284, 2006.
- BEINHAEUER, B. G.; MCBRIDE, J. M. M.; GRAF, P. PURSCH, E.; BONGERS, M.; ROGY, M.; KORTHAUER, U.; VRIES, J. E.; AVERSA, G.; JUNG, T. Interleukin 10 regulates cell surface and soluble LIR-2 (CD85d) expression on dendritic cells resulting in T cell hyporesponsiveness *in vitro*. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, p. 74-80, 2004.
- BIGG, H. F.; WAIT, R.; ROWAN, A. D.; CAWSTON, T. E. The mammalian chitinase-like lectin, YKL-40, binds specifically to type I collagen and modulates the rate of type I collagen fibril formation. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 21083-21095, 2006.
- BORASTON, A. B.; WANG, D.; BURKE, R. D. Blood group antigen recognition by a *Streptococcus pneumoniae* virulence factor. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 35263-35271, 2006.
- BOUAZIS, J. D.; CALBO, S.; VAILLANT, M. M.; SAUSSINE, A.; BAGOT, M. BENSUSSAN, A.; MUSETTE, P. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD41 T-cell activation *in vitro*. **Eur. J. Immunol.**, v. 40, p. 2686-2691, 2010.
- BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal of Pathology**, v. 214, p. 149-160, 2008.
- CARVALHO, D. D.; MARANGONI, B.; NOVELLO, J. C. Isolation and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 44, n. 5. p. 933-938, 1998.

CARVALHO, D. D.; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO, J. C.; MARKLAND, F. S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon**, v. 39, p. 1471-1476, 2001.

CARVALHO, D. D.; MARANGONI, B.; NOVELLO, J. C. Primary Structure Characterization of *Bothrops jararacussu* Snake Venom Lectin. **Journal of Protein Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 43-50, 2002.

CASTRO, H. C.; LEMOS, M. G. J.; BON, C.; ZINGALI, R. B. Comparative evaluation of immunological and structural similarities of snake venom C-type lectin proteins. **Toxicon**, v. 41, p. 525-528, 2003.

CASTRO, O. B. **Estudo dos mecanismos envolvidos na inibição da proliferação de mononucleares do sangue periférico humanos induzida pela lectina BjcuL isolada do veneno de *Bothrops jararacussu***. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) - Universidade Federal de Rondônia – UNIR. Porto Velho/RO, p. 63, 2013.

CHINEN, T.; KANNAN, A. K.; LEVINE, A. G.; FAN, X.; KLEIN, U.; ZHENG, Y.; GASTEIGER, G.; FENG, Y.; FONTENOT, J. D.; RUDENSKY, A. Y. An essential role for IL-2 receptor in regulatory T cell function. **Nat. Immunol.**, v. 17, n. 11, p. 1322–1333, 2016.

CHILSON, O. P.; KELLY-CHILSON, A. E. Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes. **Eur. J. Immunol.**, v. 19, p. 289-296, 1989.

CLAMAN, H. N. The biology of immune response. **J Am Med Ass.**, v. 258, p. 2834-2840, 1987.

CRUCIAT, C. M.; HASSLER, C.; NIEHRS, C. The MRH protein erlectin is a member of the endoplasmic reticulum synexpression group and functions in N-glycan recognition. **J. Biol. Chem**, v. 281, p. 12986-12993, 2006.

CRAM, L. S. Flow cytometry, an overview. **Methods in Cell Science**, v. 24, p. 1-9, 2002.

CUI, B.; LI, L.; ZENG, Q.; LIN, F.; YIN, L.; LIAO, L.; HUANG, M.; WANG, J. A novel lectin from *Artocarpus lingnanensis* induces proliferation and Th1/Th2 cytokine secretion through CD45 signaling pathway in human T lymphocytes. **J, Nat, Med.**, v. 1, p. 1-13, 2017.

DAMASIO, D. C.; NOSTE, S. POLAK, L. P.; BRANDT, A. P.; BONAN, N. B.; ZISCHLER, L.; STUELP-CAMPELO, P. M. CADENA, S. M. S. C.; NORONHA, L.; ELÍFIO-ESPOSITO, S. L.; MORENO-AMARAL, A. N. The lectin BjcuL induces apoptosis through TRAIL expression, caspase cascade activation and mitochondrial membrane permeability in a human colon adenocarcinoma cell line. **Toxicon**, v. 47, p 1-26, 2014.

DIAS-NETIPANVI, M. F.; BOLDRINI-LEITE, L. M.; TRINDADE, E. S.; MORENO-AMARAL, A. N. ELIFIO-ESPOSITO, S. Bjcul, A snake venom lectin, modulates monocyte-derived macrophages to a pro-Inflammatory profile *In Vitro*. **Toxicon**, v. 33, p. 118-124, 2016.

DODD, R. B.; DRICKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: implication for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**, v. 11, n. 5, p. 71-79, 2001.

DONG, C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. **Nature Reviews/Immunology**, v. 6, p. 329-333, 2006.

DRICKAMER, K. Recognition of complex carbohydrates by Ca_2^+ -dependent animal lectins. **Biochem Soc Trans.**, v. 21, n. 2, p. 456-459, 1993.

DRICKAMER, K.; DODD, B. C-Type lectin-like domains in *Caenorhabditis elegans*: predictions from the complete genome sequence. **Glycobiology**, v. 9, n. 12, p. 1357-1369, 1999.

DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 34, p. 26-34, 2015.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 20, p. 9557-9560, 1988.

EKLUND, J. W.; KUZEL, T. M. A review of recent findings involving interleukin-2-based cancer therapy. **Curr Opin Oncol.**, v. 16, p. 542-546, 2004.

ELÍFIO-ESPOSITO S. L.; HESS, P. L.; MORENO, A. N.; LOPES-FERREIRA, M. RICART, C. A. O.; SOUZA, M. V.; HASSELMAN-ZIELINSKI, F.; BECKER, J. A.; PEREIRA, L. F. A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom can adhere to extracellular matrix proteins and induce the rolling of leukocytes. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 4, p. 782-799, 2007.

ELÍFIO-ESPOSITO S. L.; TOMAZELI, L.; SCHWATZ, C.; GIMENEZ, A. P.; FUGII, G. M.; FERNANDES, L. C.; ZISHLER, L. F. M.; STUELP-CAMPELO, P.; MORENO, A. N. Human neutrophil migration and activation by BJcuL, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Immunology**, v. 12, n. 10, p. 1-7, 2011.

FARIA, A. M. C.; MORAES, S. M.; FREITAS, L. H. F. F.; SPEZIALI, E.; SOARES, T. F.; FIGUEIREDO-NEVES, S. P.; VITELLI-AVELAR, D. M.; MARTINS, M. A.; BARBOSA, K. V. B. D.; SOARES, E. B.; SATHLER-AVELAR, R.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; CARDOSO, G. M.; COMIM, F.; TEIXEIRA, R.; ELÓI-SANTOS, S. M.; QUEIROZ, D. M. M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; BAUER, M. E.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A. Variation Rhythms of Lymphocyte Subsets during Healthy Aging. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, p. 365-369, 2008.

FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

GASTEIGER, G.; RUDENSKY, A. Y. Interactions between innate and adaptive lymphocytes. **Nature Reviews/Immunology**, v. 14, p. 631-639, 2014.

GEIJTENBEEK, T. B. H.; GRINGHUIS, S. I. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. **Nature Reviews/Immunology**, v. 55, p. 1-16, 2016.

GOKUDAN, S.; MUTA, T.; TSUDA, R.; KOORI, K.; KAWAHARA, T.; SEKI, N.; MIZUNOE, Y.; WAI, S. W.; IWANAGA, S.; KAWABATA, S. I. Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 10086-10091, 1999.

GU, C.; WU, L.; LI, X. IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. **Cytokine**, v. 22, p. 1-9, 2013.

GUIMARÃES-GOMES, V.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; DUTRA, D. L. S.; PUJOL-LUZ, M.; CASTRO, H. C.; HO, P. L.; ZINGALI, R. B. Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 432, p. 1–11, 2004.

GREENE, W. C.; PARKER, C. M.; PARKER, C. W. Opposing effects of mitogenic and nonmitogenic lectins on lymphocyte activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 13, p. 4017-4025, 1976.

HASBOLD, J.; GETT, A. V.; RUSH, J. S.; DEENICK, E.; AVERY, D.; JUN, J.; HODGKIN, P. D. Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation *in vitro* using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. **Immunology and Cell Biology**, v. 77, p. 516-522, 1999.

HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; NASCIMENTO, N. R. F.; TOYAMA, D. O.; NOBRE, A. C. L.; MARTINS, A. M. C.; BARBOSA, P. S. F.; NOVELLO, J. C.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S.A. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **Int. J. Biochem. Cell Biol**, v. 37, p. 130–141, 2005.

HIRABAYASHI, J.; KUSUNOKI, T.; KASAI, K. Complete primary structure of a galactose specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox* Homologies with Ca_2^+ - dependent type lectins. **J. Biol. Chem**, v. 266, p. 2320-2326, 1991.

HIRAO, K.; NATSUKA, Y.; TAMURA, T.; WADA, I.; MORITO, D.; NATSUKA, S.; ROMERO, P.; SLENO, B.; TREMBLAY, L. O.; HERSCOVICS, A.; NAGATA, K.; HOSOKAWA, N. EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 9650-9658, 2006.

JAYAWARDENA, H. S. N.; WANG, X.; YAN, M. Classification of Lectins by Pattern Recognition Using Glyconanoparticles. **Analytical Chemistry**, v. 12, p 1-17, 2013.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIY, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews/Immunology**, v. 169, p. 1-14, 2015.

KASSAB, B. H.; CARVALHO, D. D.; OLIVEIRA, M. A.; BAPTISTA, G. R.; PEREIRA, G. A.; NOVELLO, J. C. Cloning, expression, and structural analysis of recombinant BJcuL, a c-type lectin from the *Bothrops jararacussu* snake venom. **Protein Expression and Purification**, v. 35, p. 344-352, 2004.

KIDD, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for the health and disease. **Alter. Med. Ver.**, v. 8, p. 223-246, 2003.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 187-197, 2002.

KILPATRICK, D. C. Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. **Molecular Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 55-65, 1999.

KISHORE, U.; EGGELETON, P.; REID, K. B. Modular organization of carbohydrate recognition domains in animal lectins. **Matrix Biol**, v. 15, p. 583-592, 1997.

KLEIN, R. C.; FABRES-KLEIN, M. H.; OLIVEIRA, L. L.; FEIO, R. N.; MALOUIN, F.; RARROS-RIBON, A. O. A C-Type Lectin from *Bothrops jararacussu* Venom Disrupts Staphylococcal Biofilms. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 1-16, 2015.

KLATZMANN, D. ABBAS, A. K. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nature Reviews/Immunology*, v. 15, p.283-294, 2015.

KLEIN, R. C.; FABRES-KLEIN, M. H.; OLIVEIRA, L. L.; FEIO, R. N.; MALOUIN, F.; RIBON, A. O. B. A C-Type Lectin from *Bothrops jararacussu* Venom Disrupts Staphylococcal Biofilms. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 1-16, 2015.

KOMORI, Y.; NIKAI, T.; TOHKAI, T.; SUGIHARA, H. Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. **Toxicon**, v. 37, p. 1053–1064, 1999.

LACOUTH-SILVA, F.; XAVIER, C. V.; SETÚBAL, S. S.; PONTES, A. S.; NERY, N. M.; CASTRO, O. B.; FERNANDES, C. F. C.; HONDAS, E. R.; ZANCHI, F. B.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; SILVA-JARDIM, I.; FACUNDO, V. A.; ZULIANI, P. J. The effect of 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup- 20(29)-ene lupane compound isolated from *Combretum leprosum* Mart. on peripheral blood mononuclear cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 1-10, 2015.

LEBIEN, T. W.; TEDDER, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1570-1580, 2008.

LEE, J. K.; BAUM, L. G.; MOREMEN, K.; PIERCE, M. The X-lectins: a new family with homology to the *Xenopus laevis* oocyte lectin XL-35. **Glycoconj. J.**, v. 21, p. 443-450, 2004.

LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; RAMÍREZ, G. Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godmann's pit viper). **Toxicon**, v. 28, n. 1, p. 75-81, 1990.

LU, Q.; NAVDAEV, A.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure-function relationships and effects on homeostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 1089-1098, 2005.

LUZINA, I. G.; KEEGAN, A. D.; HELLER, N. M.; ROOK, G. A. W.; SHEA-DONOHUE, T.; ATAMAS, S. P. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, p. 1-12, 2012.

MAECKER, H. T.; MCCOY, J. P.; NUSSENBLATT, R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. **Nature**, v. 12, p. 191-200, 2012.

MALEK, T. R. The Biology of Interleukin-2. **Annu. Rev. Immunol**, v. 26, p. 453-479, 2008.

MANNEL, D. N.; BECHER, H. GUNDT, A.; KIST, A. FRANZ, H. Induction of tumor necrosis factor expression by a lectin from *Viscum album*. **Cancer Immunol Immunother.**, v. 33, n. 3, p. 177-182, 1991.

MANNONI, P.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; TURNER, A. R.; MCGANN, L.; TURC, J. M. Monoclonal Antibodies Against Human Granulocytes and Myeloid Differentiation Antigens. **Human Immunology**, v. 5, p. 309-323, 1982.

MA, X.; YAN, W.; ZHENG, H.; DU, Q.; ZHANG, L.; BAN, Y.; LI, N.; WEI, F. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. **F1000Research**, v. 4, p. 1-13, 2015.

MAYER, S.; RAULF, M. K.; LEPENIER, B. C-type lectins: their network and roles in pathogen recognition and immunity. **Histochem Cell Biol.**, v. 7, p. 1-15, 2016.

MESQUITA Jr, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol.**, v. 50, p. 552-580, 2010.

MOORE, K. W.; O’GARRAL, A. MALEFYT, R. W.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. T. Interleukin-10. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 165-190, 1993.

MORALES, H.; ROBERT, J. *In vivo* and *in vitro* techniques for comparative study of antiviral T-cell responses in the amphibian *Xenopus*. **Biol. Proced.**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2008.

MORITA, T. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant, procoagulant and platelet-modulating activities. **Toxicon**, v. 45, p. 1099-1144, 2005.

NIKAI, T.; SUZUKI, J.; KOMORI, Y.; OHKURA, M.; OHIZUMI, Y.; SUGIHARA, H. Primary structure of the lectin from the venom of *Bitis arietans* (puff-adder). **Biol. Pharm. Bull.**, v. 18, p. 1620–1622, 1995.

NITCHKE, L. The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 17, p. 290-297, 2005.

NOLTE, S.; CASTRO-DAMASIO, D.; BARÉA, A. C.; GOMES, J. MAGALHÃES, A.; MELLO-ZISCHLER, L. F.; STUEL-CAMPELO, P. M.; ELÍFIO-ESPOSITO, S. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; REIS, C. A.; MORENO-AMARAL, A. N. BJcuL, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. **Toxicol.**, v. 59, p. 81-85, 2012.

OGAWA, T.; CHIJIWAB, T.; ODA-UEDAB, N.; OHNOB, M. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. **Toxicol.**, v. 45, p. 1-14, 2005.

OWENS, M. A.; VALL, H. G.; HURLEY, A. A.; WORMSLEY, S. B. Validation and quality control of immunophenotyping in clinical flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 33-50, 2000.

OZEKI, Y.; MATSUI, T.; HAMAKO, J.; SUZUKI, M.; FUJIMURA, Y.; YOSHIDA, E.; NISHIDA, S.; TITANI, K. C-Type galactoside binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 308, p. 306-310, 1994.

PANDIYAN, P.; ZHU, J. Origin and functions of pro-inflammatory cytokine producing Foxp3+ regulatory T cells. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 13-24, 2015.

PANUNTO, P. C.; SILVA, M. A.; LINARDI, A.; BUZIN, M. P.; MELO, S. E. S. F. C.; MELLO, S. M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicol.**, v. 47, p. 21-31, 2006.

PEREIRA-BITTENOURT, M.; CARVALHO, D. D.; GAGLIARDI, A. R.; COLLINS, D. C. The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. **Anticancer Res.**, v. 19, p. 4023-4025, 1999.

PIRES, W.L.; CASTRO, O. B.; KAYANO, A. M.; SETUBAL, S. S.; PONTES, A. S.; NERY, N. M.; PALOSCHI, M. V.; PEREIRA, S. S.; STÁBELI, R. G.; FERNANDES, C. F. C.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P. Effect of BjcL, a lectin isolated from *Bothrops jararacussu*, on human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology in Vitro**, v. 41, p. 30-41, 2017.

PLATANIAS, L. C. Mechanisms of Type-I and Type-II Interferon Mediated Signalling. **Nature Reviews/Immunology**, v. 5, p. 375-386, 2005.

QUAH, B.; WARREN, H. S.; PARISH, C. R. Monitoring lymphocyte proliferation *in vitro* and *in vivo* with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2049-2056, 2007.

RATH, T.; BILLMEIER, U.; WALDNER, M. J.; ATREYA, R.; NEURATH, M. F. From physiology to disease and targeted therapy: interleukin-6 in inflammation and inflammation-associated carcinogenesis. **Arch. Toxicol.**, v.89, p. 541-554, 2015.

RHODES, K. A.; ANDREW, E. M.; NEWTON, D. J.; TRAMONTI, D.; CARDING, S. R. A subset of IL-10-producing cd T cells protect the liver from Listeria-elicited, CD8⁺ T cell mediated injury. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, p. 2274-2283, 2008.

ROPELLE, E.; FLORES, M. B.; CINTRA, D. E.; ROCHA, G. Z.; PAULI, J. R.; MORARI, J.; SOUZA, C. T.; MORAES, J. C.; PRADA, P. O.; GUADAGNINI, D.; MARIN, R. M.; OLIVERIA, A. G.; AUGUSTO, T. M.; CARVALHO, H. F.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. A.; CARVALHEIRA, J. B. C. IL-6 and IL-10 Anti-Inflammatory Activity Links Exercise to Hypothalamic Insulin and Leptin Sensitivity through IKKb and ER Stress Inhibition. **PLoS Biology**, v. 8, p. 1-20, 2010.

SABAT, R. IL-10 family of cytokines. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, p. 315-324, 2010a.

SABAT, R.; GRUTZ, G.; WARSZAWKA, K.; KIRSCH, S.; WITTE, E.; WOLK, K.; JENS, G. Biology of interleukin-10. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, p. 331-344, 2010b.

SALEEMUDDIN, M.; HUSAIN, Q. Concanavalin A: A useful ligand for glycoenzyme immobilization--a review. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 13, p. 290-295, 1991.

SARTIM, M. A.; PINHEIRO, M. P.; DE PÁDUA, R. A. P. SAMPAIO, S. V.; NONATO, M; C. Structural and binding studies of a C-type galactose-binding lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 22, p. 1-5, 2017.

SARTIM, M. A.; SAMPAIO, S. V. Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview. **Journal of Venomous Animals and Toxins including**, v. 21, n. 35, p. 1-11, 2015.

SATOH, T.; SATO, K.; KANO, A.; YAMASHITA, K.; YAMADA, Y.; IGARASHI, N.; KATO, R.; NAKANO, A.; WAKATSUKI, S. Structures of the carbohydrate recognition domain of Ca₂⁺-independent cargo receptors Emp46p and Emp47p. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 10410-10419, 2006.

SHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 878-888, 2011.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, p. 949-959, 1972.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Sci. Am.**, v. 268, n. 1, p. 82-89, 1993.

SILVA Jr, F. P.; ALEXANDRE, G. M. C.; RAMOS, C. H. I.; DE SIMONE, S. G. On the quaternary structure of a C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom – BJ-32 (BjcuL). **Toxicon**, v. 52, p. 944-953, 2008.

STRATHMANN, M.; WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 237-248, 2002.

SWAMINATHAN, G. J.; LEONIDAS, D. D.; SAVAGE, M. P.; ACKERMAN, S. J. ACHARYA, K. R. Selective recognition of mannose by the human eosinophil Charcot-Leydon crystal protein (Galectin 10): a crystallographic study at 1.8 Å resolution. **Biochemistry**, v. 38, p. 13837-13843, 1999.

TAYLOR, M. E. Evolution of a family of receptors containing multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. **Glycobiology**, v. 7, p. 5-8, 1997.

TESFA, L.; VOLK, H. D.; KERN, F. A protocol for combining proliferation, tetramer staining and intracellular cytokine detection for the flow-cytometric analysis of antigen specific T-cells. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 1, p. 366-370, 2003.

THOMSON, S. P.; WILLIAMS, D. B. Delineation of the lectin site of the molecular chaperone calreticulin. **Cell Stress Chaperones**, v. 10, p. 242-251, 2005.

VIALARD, J. F.; PELLEGRIN, J. L.; RANCHIN, V.; SCHAEVERBEKES, T.; DEHAIS, J.; LONGY-BOURSIER, M.; RAGNAUD, J. M.; LENG, B.; MOREAU, J. F. Th1 (IL-2, interferon gamma (IFN- γ)) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Clin. Exp. Immunol.**, v. 115, p. 189-195, 1999.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. 45-65, 2003.

WEVER, C. T.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R.; HARRINGTON, L. E. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 25, p. 821-852, 2007.

WIJEYEWICKERMA, L. C.; BERNDT, M. C.; ANDREWS, R. K. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, v. 45, p. 1051-1061, 2005.

XAVIER, C. V.; SETÚBAL, S. S.; LACOUTH-SILVA, F.; PONTES, A. S.; NERY, N. M.; CASTRO, O. B.; FERNANDES, C. F. C.; SOARES, A. M.; FORTES-DIAS, C. L.; ZULIANI, J. P. Phospholipase A₂ Inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake: Effects on human peripheral blood mononuclear cells and human neutrophils cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 22, p. 1-10, 2017.

YOSHIDA, Y.; ADACHI, E.; FUKIYA, K.; IWAI, K.; TANAKA, K. Glycoprotein-specific ubiquitin ligases recognize N-glycans in unfolded substrates. **EMBO Rep.**, v. 6, p. 239-244, 2005.

YUDOH, K.; MATSUNO, H.; NAKAZAWA, F.; YONEZAWA, T.; KIMURA, T. Reduced expression. Of the regulatory CD4⁺ T cell subset related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, n. 3, p. 617-627, 2000.

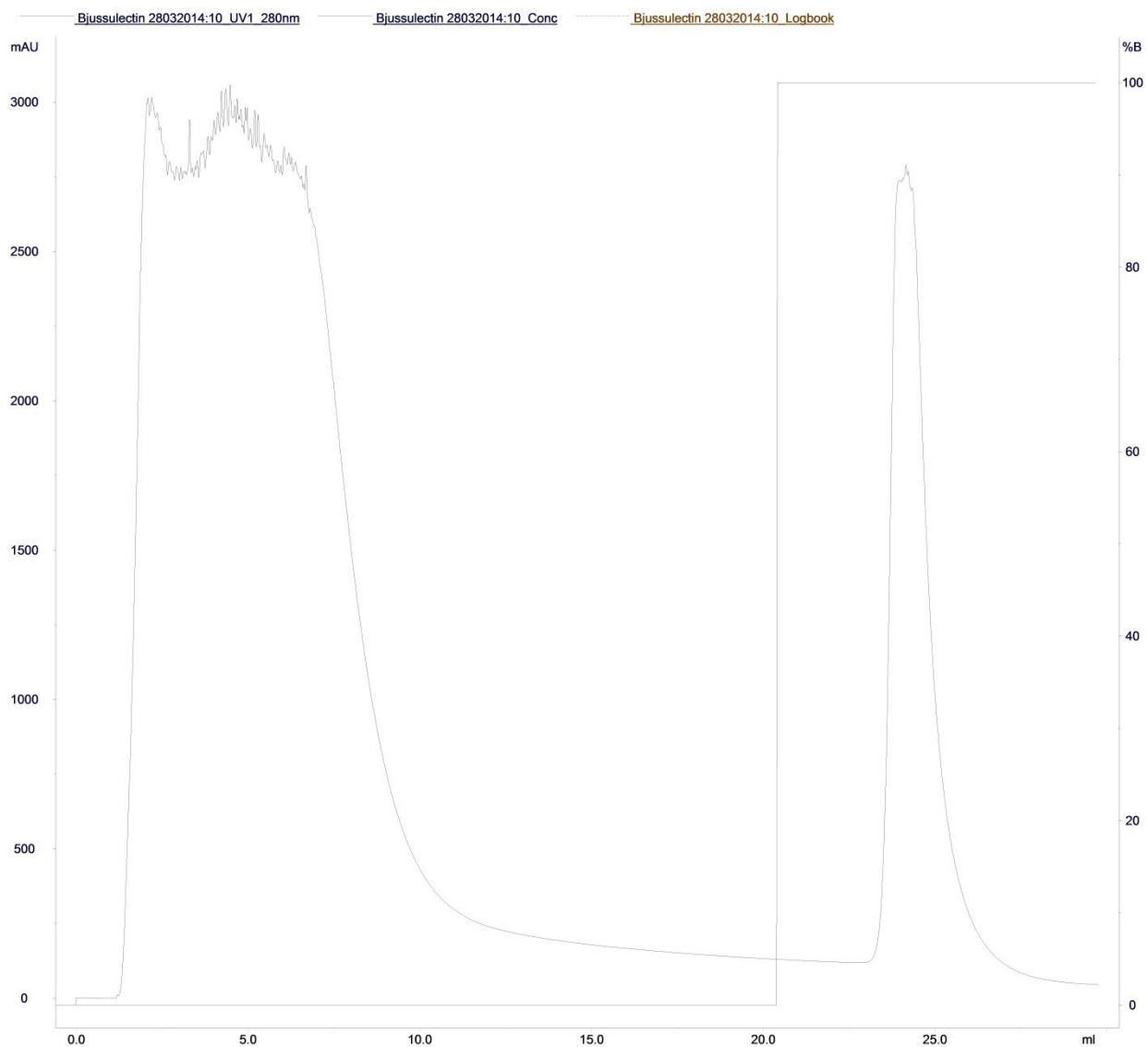
ZELENSKY, A. N.; GREASY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. **FEBS Journal**, v. 272, p. 6179-6217, 2005.

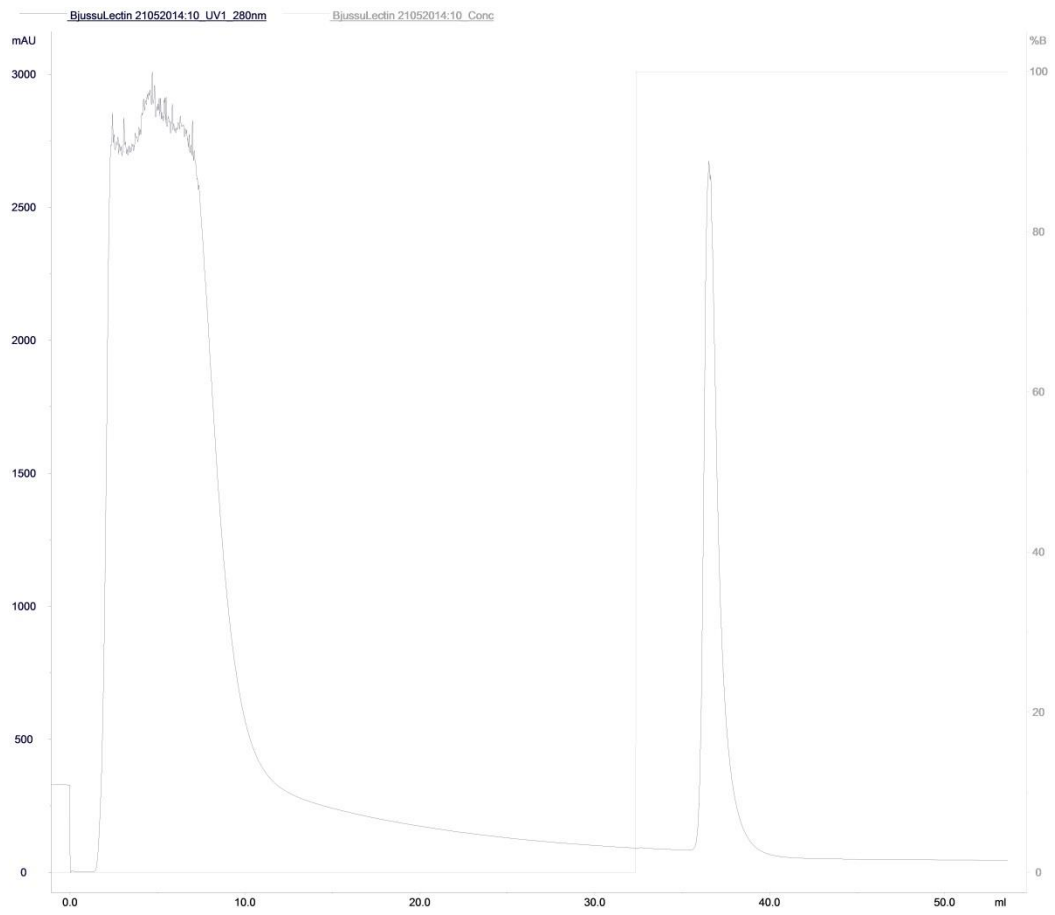
ZENG, R.; XU, Q.; SHAO, X. X.; WANG, K. Y.; XIA, Q. C. Characterization and analysis of a novel glycoprotein from snake venom using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry and Edman degradation. **FEBS Journal**, v. 266, p. 352-358, 1999.

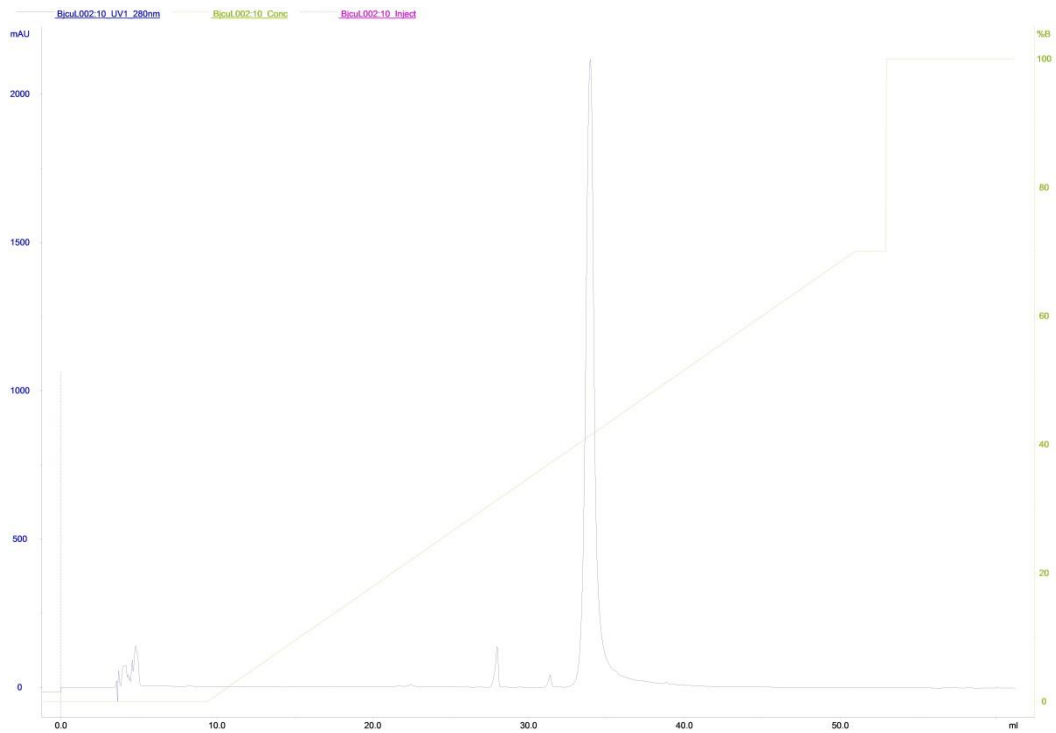
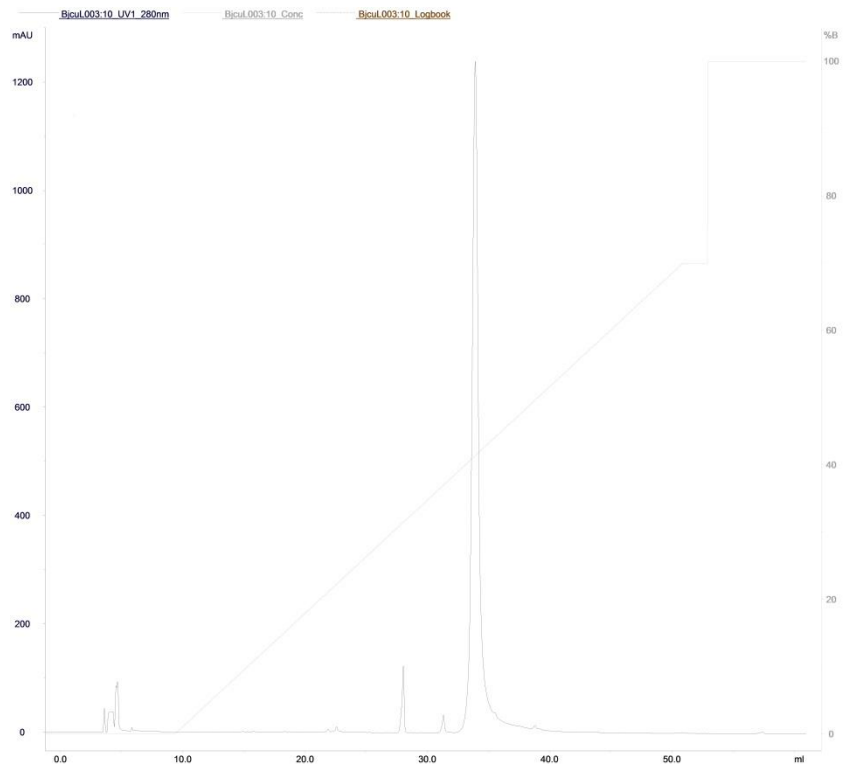
ZHA, H. G.; LEE, W. H.; ZHANG, Y. Cloning of cDNAs encoding C-type lectins from Elapidae snakes *Bungarus fasciatus* and *Bungarus multicinctus*. **Toxicon**, v. 39, p. 1887-1892, 2001.

ZIMMERMANN, M.; AGUILERA, F. B.; CASTELLUCCI, M.; ROSSATO, M.; COSTA, R.; LUNARDI, C.; OSTUNI, R.; GIROLOMONI, G.; NATOLI, G.; BAZZONI, F.; TAMASSIA, N.; CASSATELLA, M. Chromatin remodelling and autocrine TNF α are required for optimal interleukin-6 expression in activated human neutrophils. *Nature Communications*, v. 6, p. 1-14, 2015.

8.1 - Cromatogramas de isolamento de lectina da serpente *Bothrops jararacussu* – BjuL



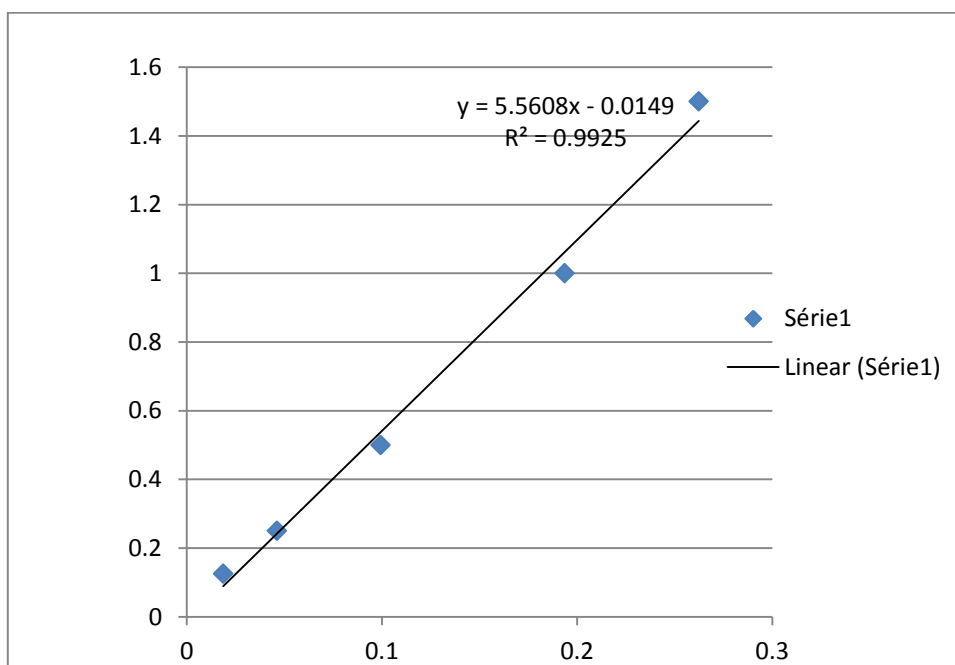




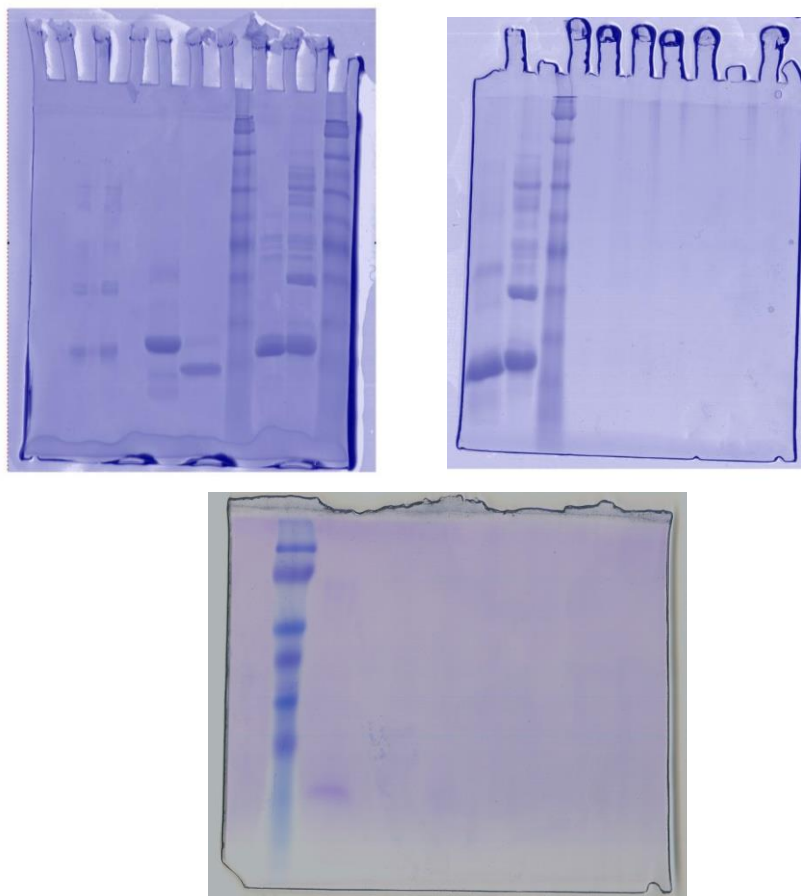
8.2 - Curva de concentração por meio do método BCA de BjcL isolada

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0.099	0.09	0.096	0.095				
B	0.355	0.358	0.359	0.357333	0.26233333	1.5		
C	0.287	0.294	0.285	0.288667	0.19366667	1		
D	0.191	0.195	0.197	0.194333	0.09933333	0.5		
E	0.142	0.138	0.144	0.141333	0.04633333	0.25		
F	0.112	0.115	0.114	0.113667	0.01866667	0.125		
G	0.401	0.396	0.416	0.404333	0.30933333	1.705241		
H	0.142	0.144		0.143	0.048	0.252018	Dosagem Lectina	tubo 1

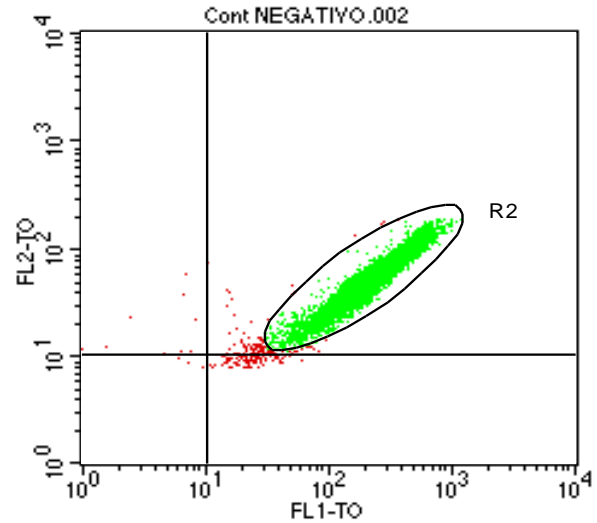
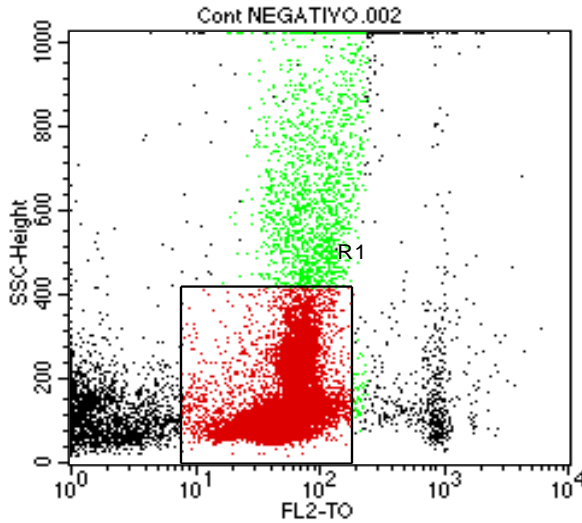
	1	2	3	4	5	6	7	8
A				0.219	0.205	0.212		
B						0.117		
C						0.635714		
D					Dosagem Lectina	1.907141	tubo 2	



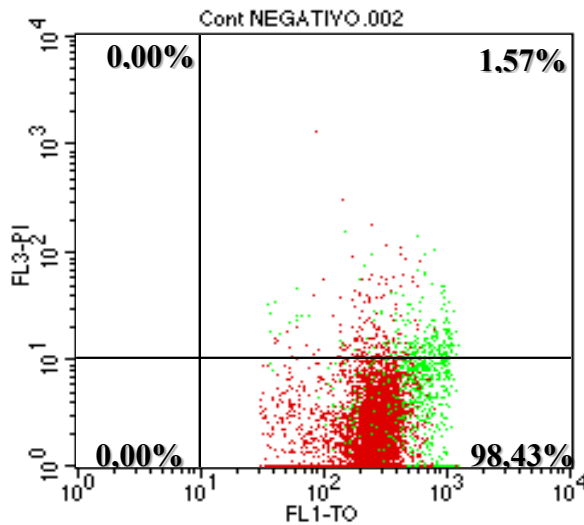
8.3 - Gel de poliacrilamida, SDS-PAGE a 12,5 % de BjuL isolada



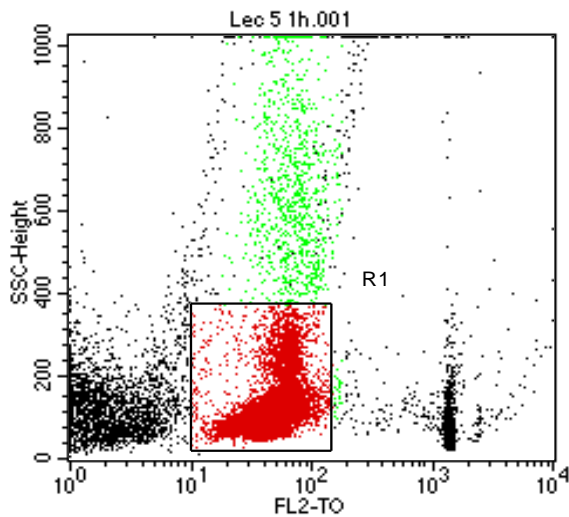
8.4 - Dot Plots do ensaio de viabilidade celular por meio de TO/PI por citometria de fluxo



Aquisição: 30000/G1: 25024 – 83,41% **Aquisição: 30000/G2: 24822 – 99,19%**



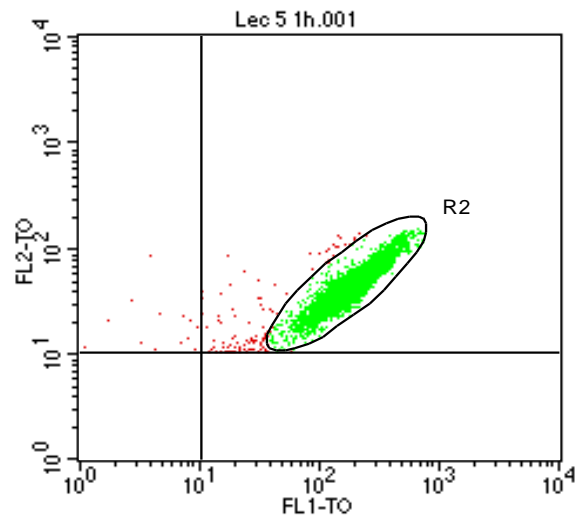
Viabilidade Celular. Controle negativo de 1 hora. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 30000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.



Aquisição: 30000/G1: 24499 –

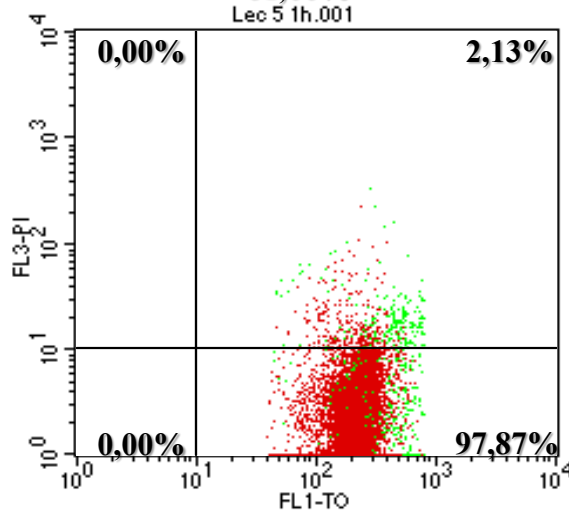
81,66%

Lec 5 1h.001



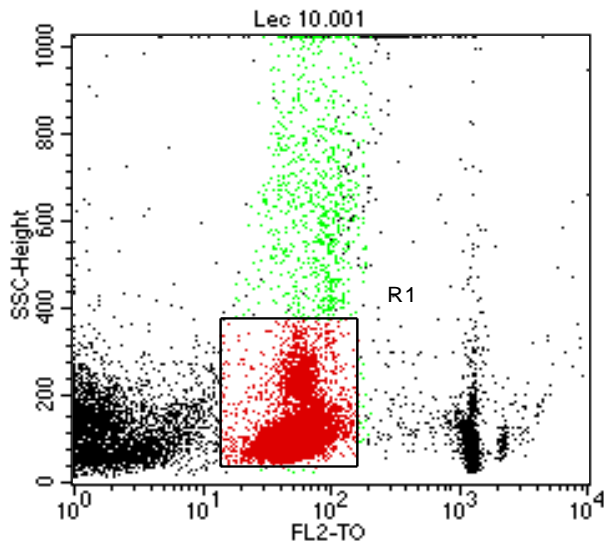
Aquisição: 30000/G2: 24375 –

81,25%

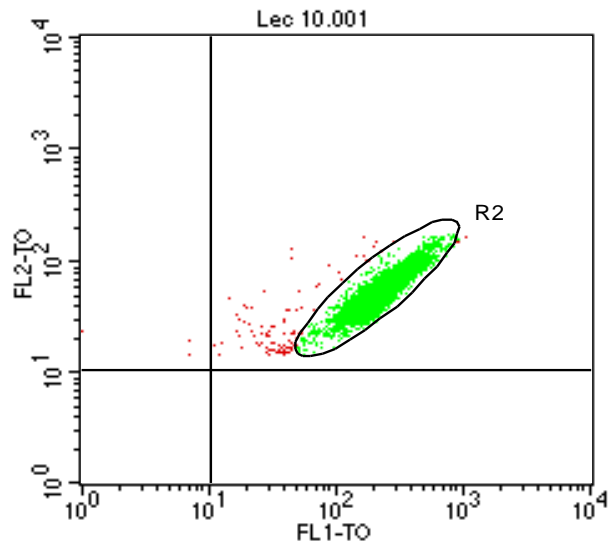


Viabilidade Celular. Lectina 5ug/mL de 1 hora.

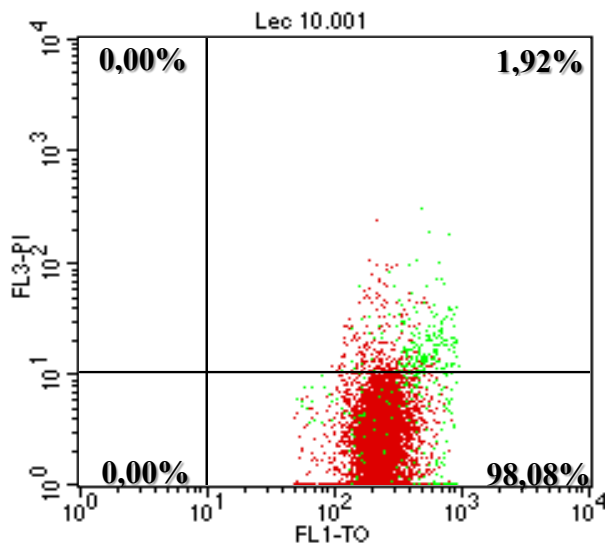
O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 30000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulosidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1



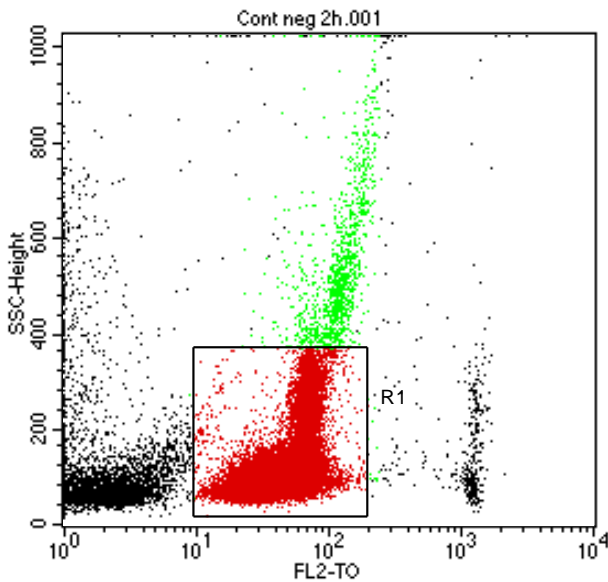
Aquisição: 30000/G1: 23296 – 77,65%



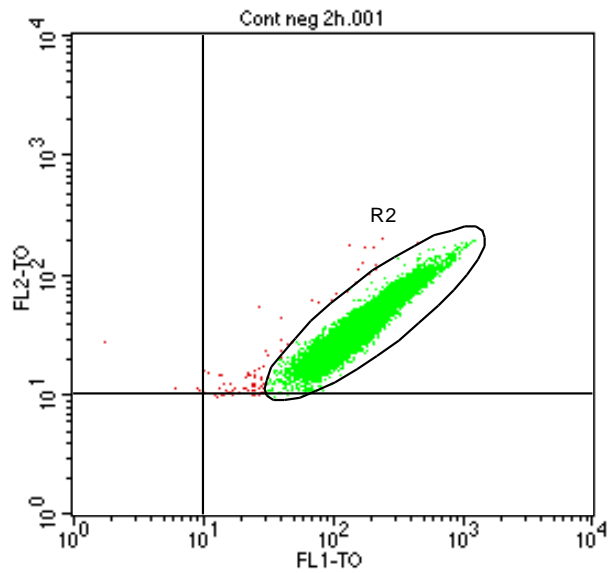
Aquisição: 30000/G2: 23189 – 99,54%



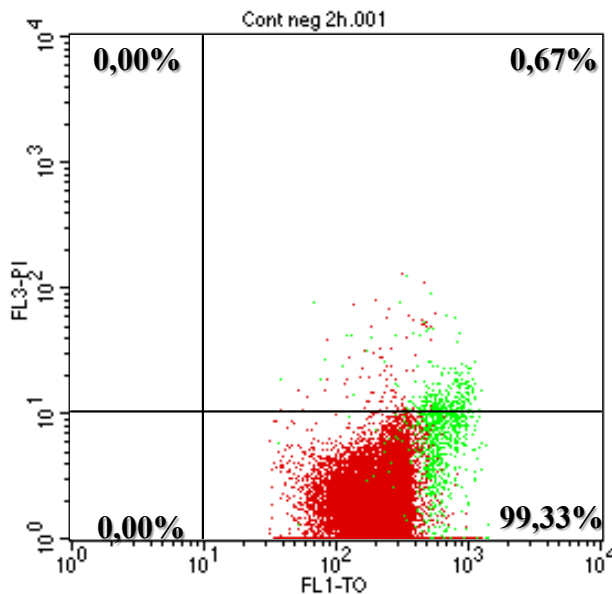
Viabilidade Celular. Lectina 10ug/mL de 1 hora. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo), e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 30000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulosidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.



Aquisição: 60000/G1: 54002 – 90,00%

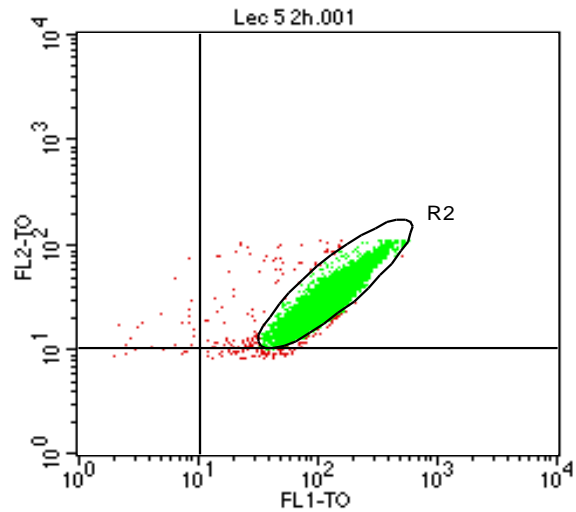
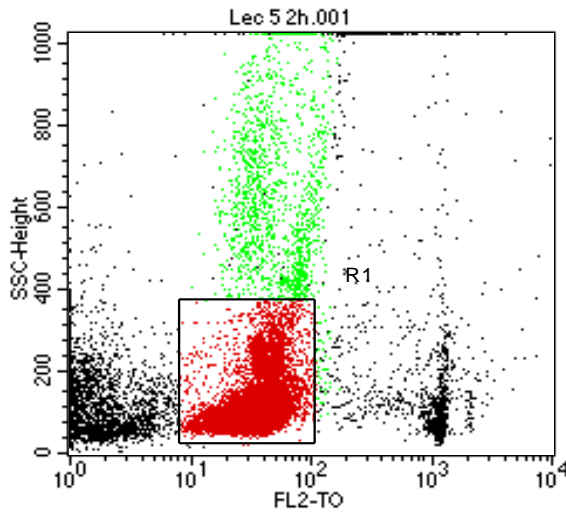


Aquisição: 60000/G2: 53911 – 99,83%

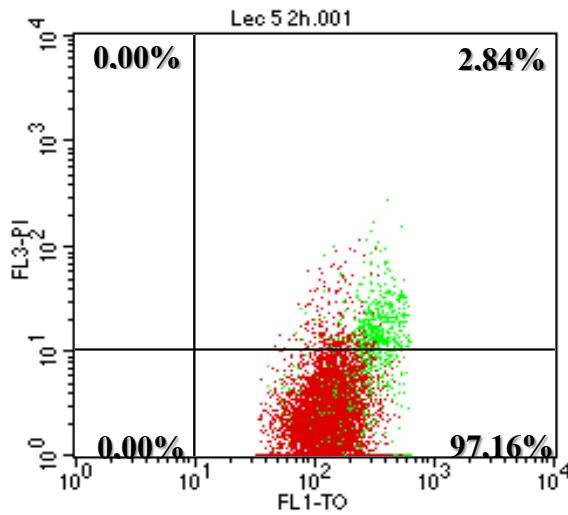


Viabilidade Celular. Controle negativo de 2 horas.

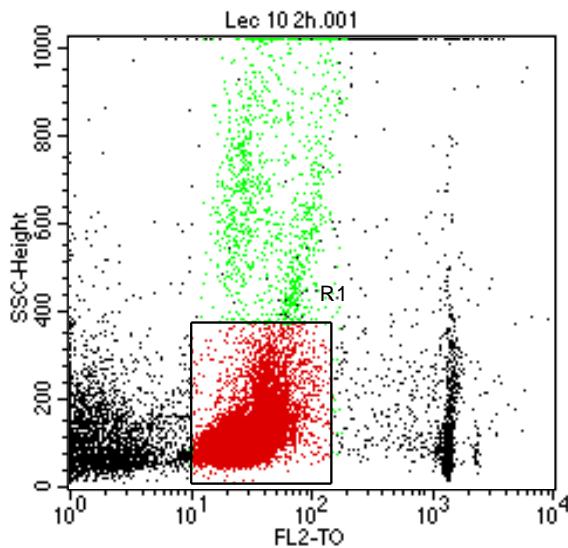
O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 60000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulosidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.



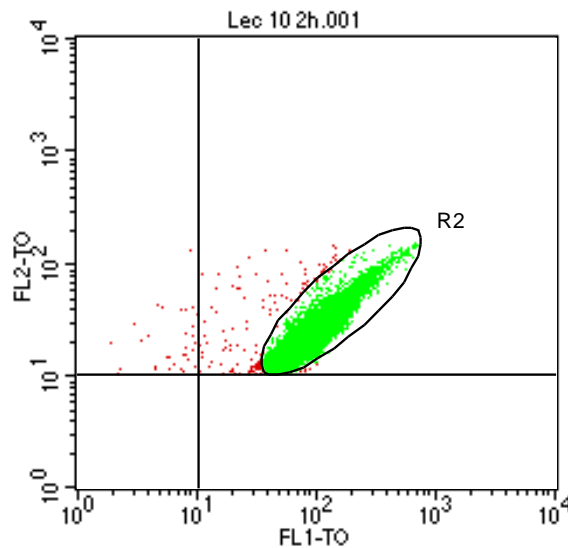
Aquisição: 30000/G1: 24264 – 80,88% **Aquisição: 30000/G2: 24034– 99,05%**



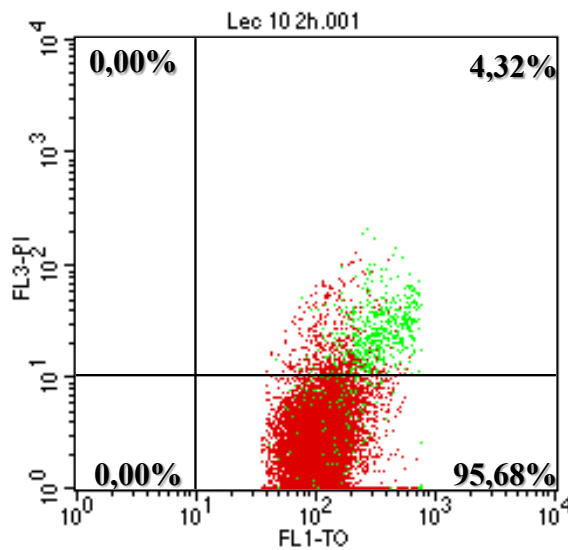
Viabilidade Celular. Lectina de 5ug/mL de 2 horas. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 30000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulosidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.



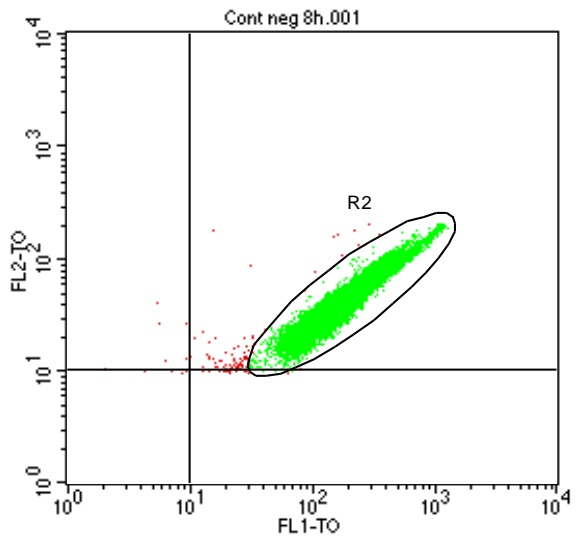
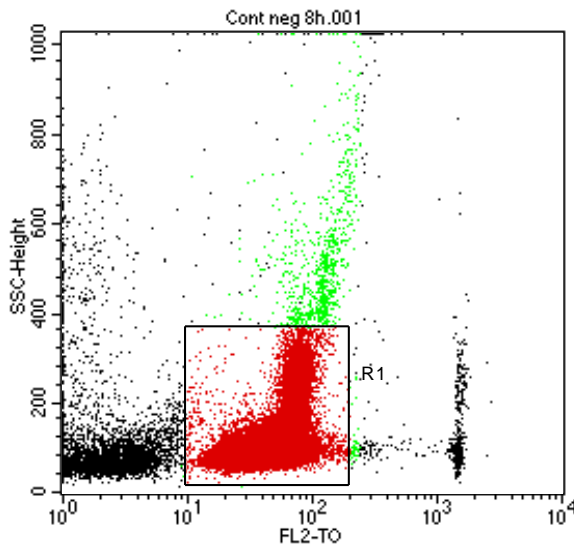
Aquisição: 30000/G1: 23917 – 79,72%



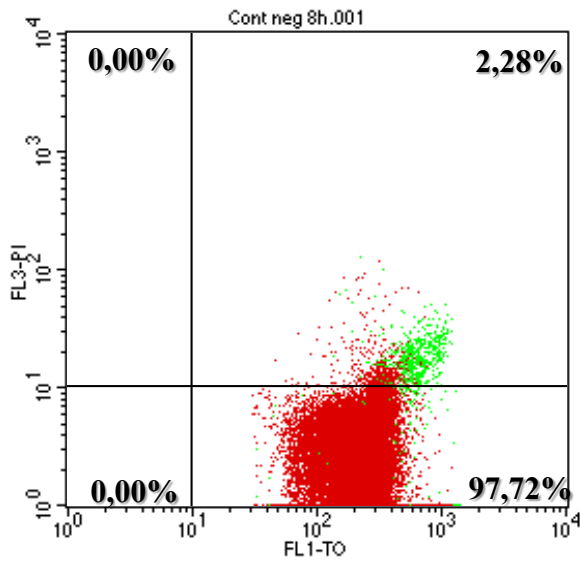
Aquisição: 30000/G2: 23746 – 99,29%



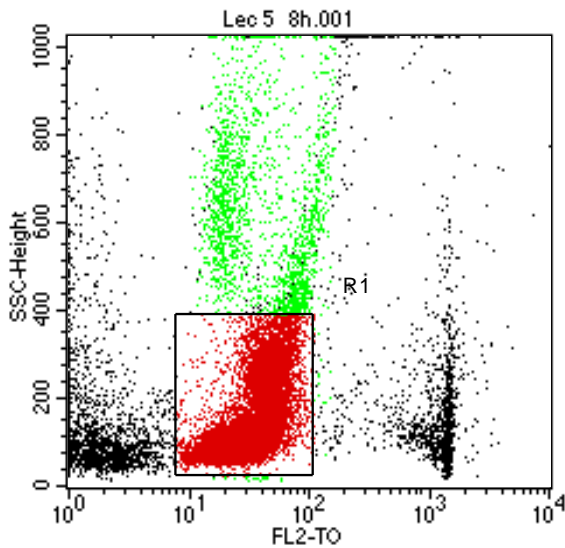
Viabilidade Celular. Lectina de 10ug/mL de 2 horas. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 30000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulosidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.



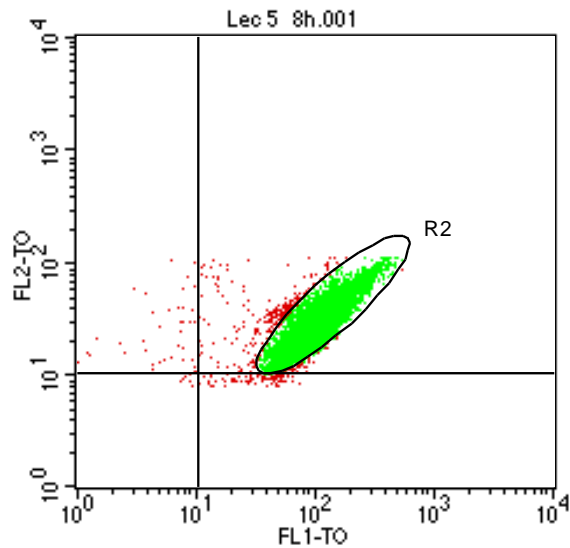
Aquisição: 60000/G1: 54087 – 90,14% Aquisição: 60000/G2: 53976– 99,79%



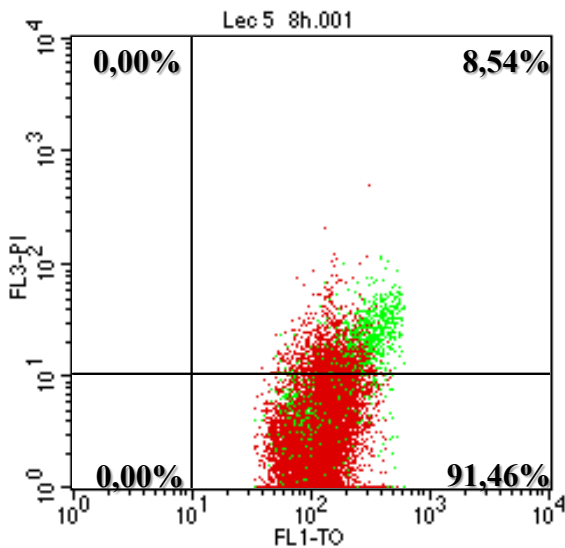
Viabilidade Celular. Controle negativo de 8 horas. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 60000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulosidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.



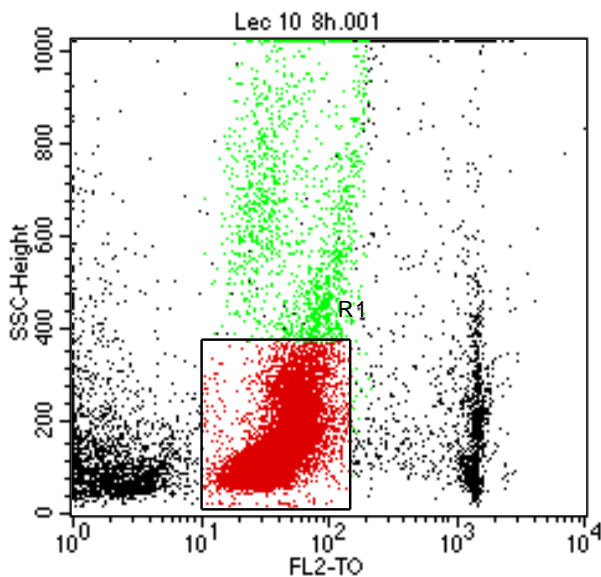
Aquisição: 30000/G1: 24488 – 81,63%



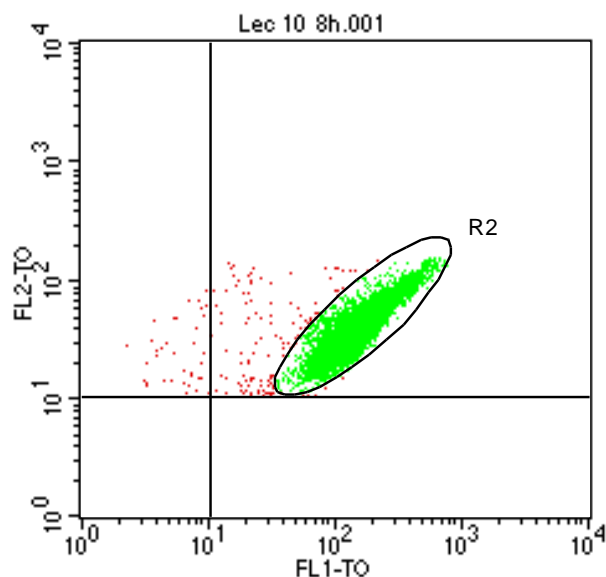
Aquisição: 30000/G2: 24018 – 98,08%



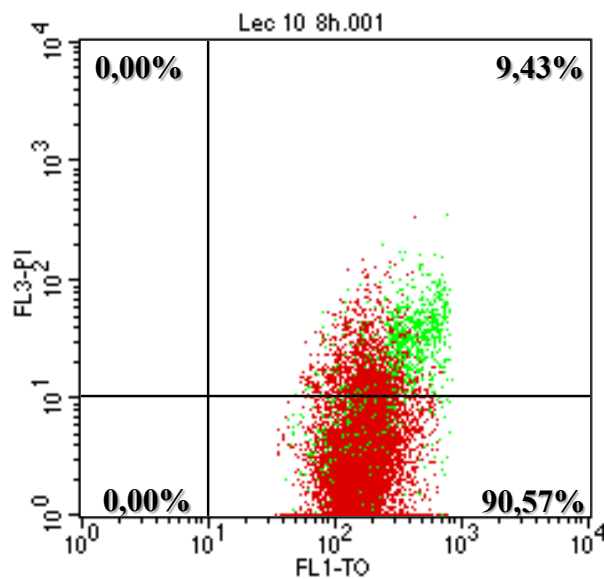
Viabilidade Celular. Lectina de 5ug/mL de 8 horas. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 30000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulosidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.



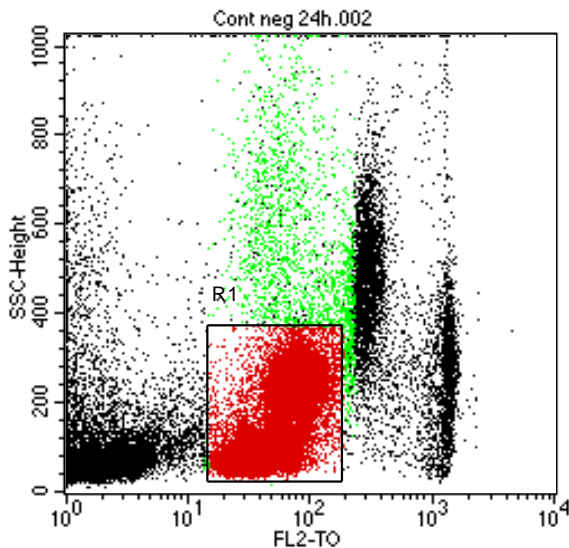
Aquisição: 30000/G1: 24390 – 81,30%



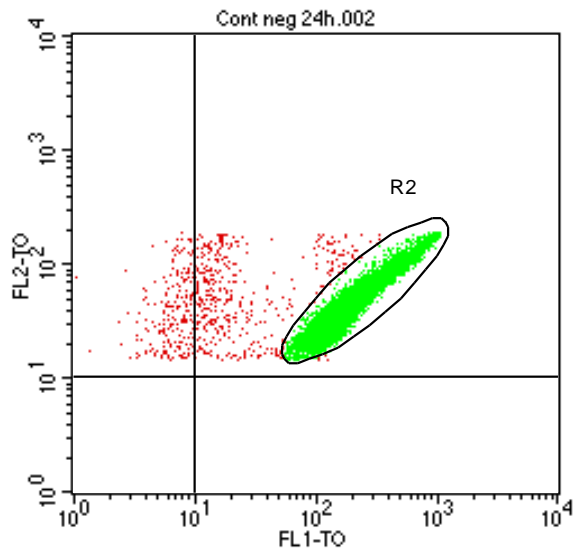
Aquisição: 30000/G2: 24224 – 99,32%



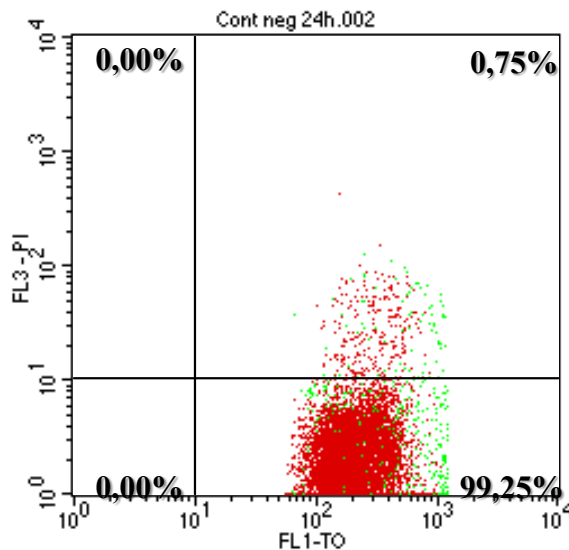
Viabilidade Celular. Lectina de 10ug/mL de 8 horas. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 30000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulosidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.



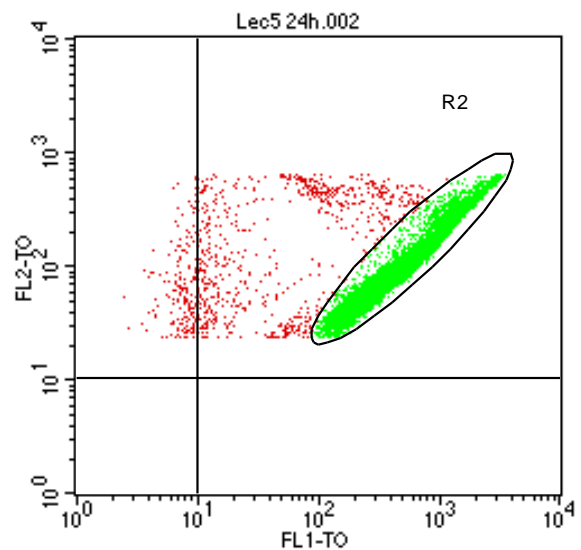
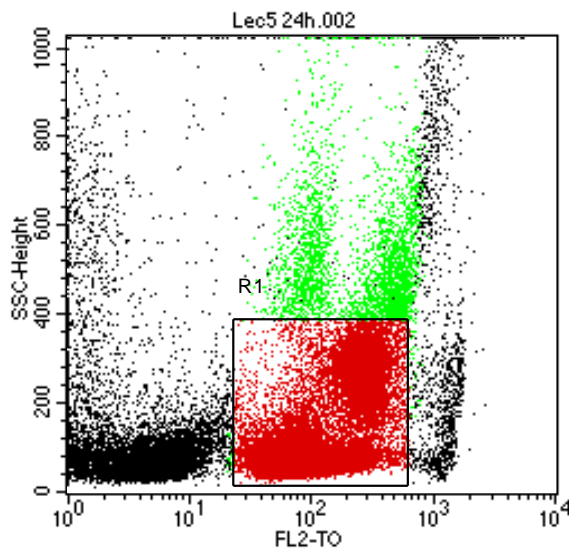
Aquisição: 60000/G1: 44101 – 73,50%



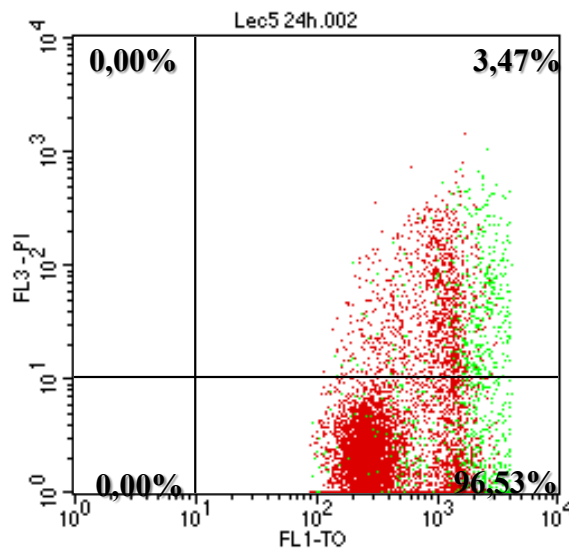
Aquisição: 60000/G2:43482 – 98,60%



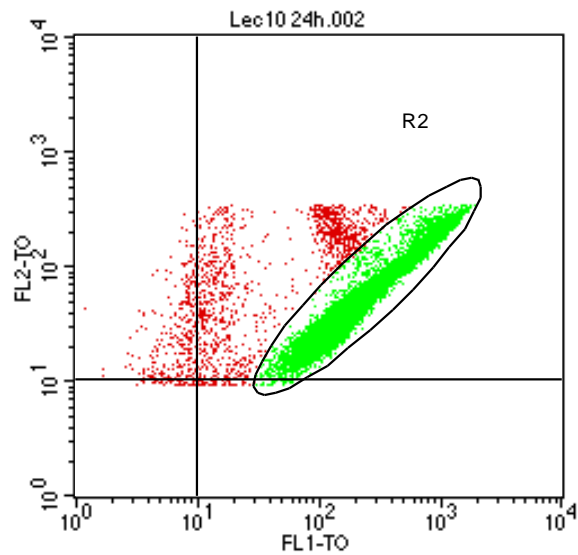
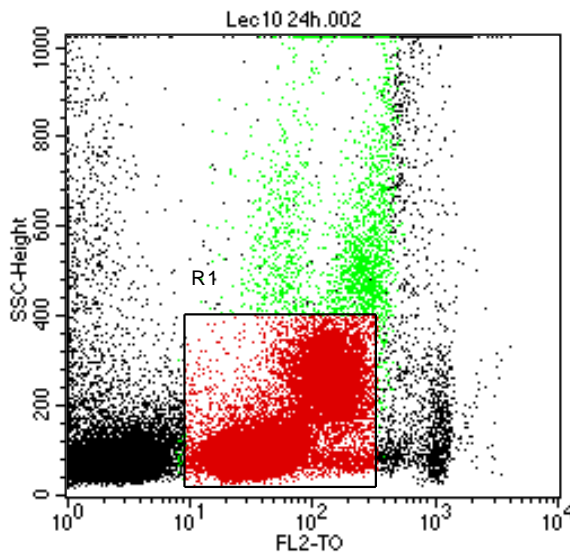
Viabilidade Celular. Controle negativo de 24 horas. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 60000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulosidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.



Aquisição: 60000/G1: 42289 – 70,48% Aquisição: 60000/G2: 41414 – 97,93%

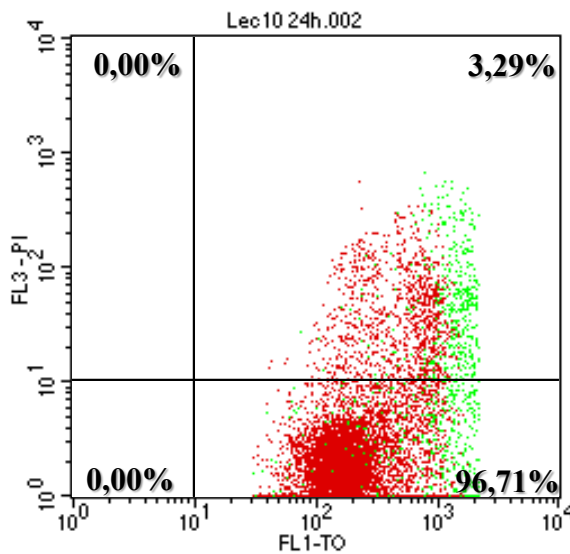


Viabilidade Celular. Lectina de 5ug/mL de 24 horas. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 60000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulosidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.

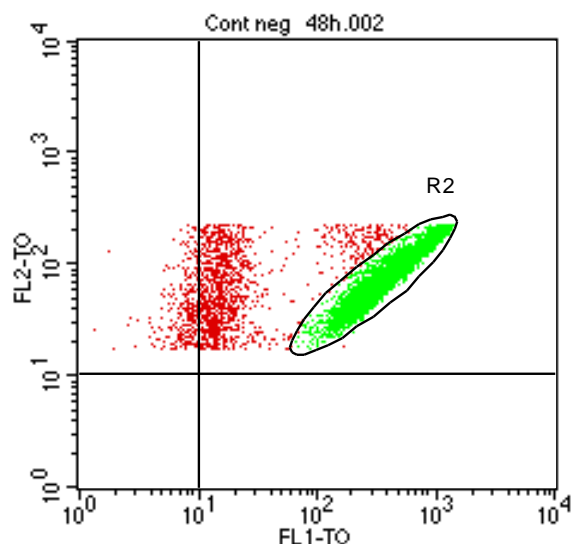
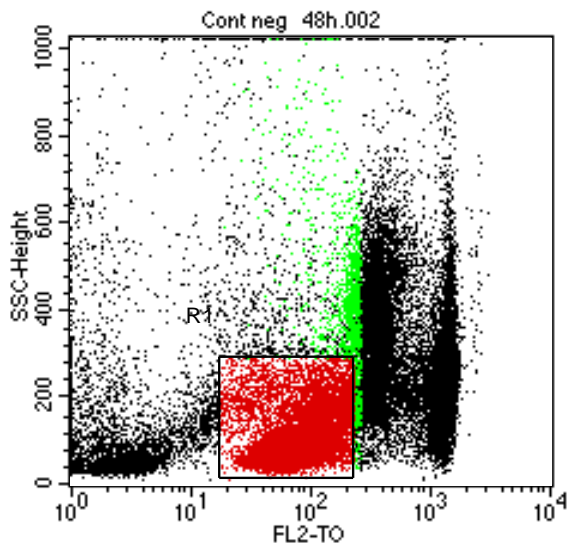


Aquisição: 60000/G1: 44976 – 74,96%

Aquisição: 60000/G2: 43580 – 96,90%

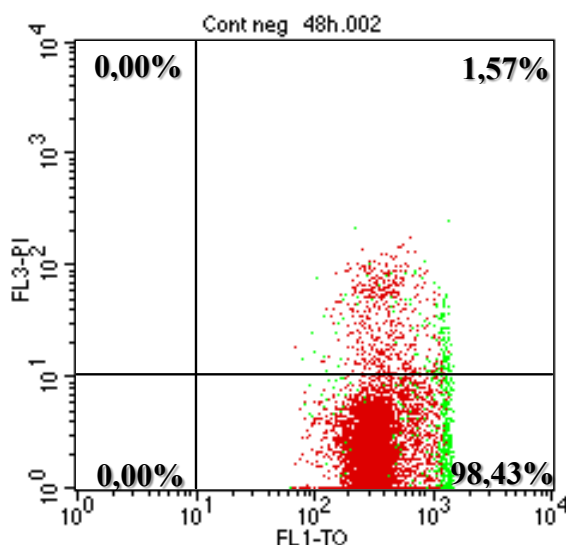


Viabilidade Celular. Lectina de 10ug/mL de 24 horas. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 60000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulosidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.

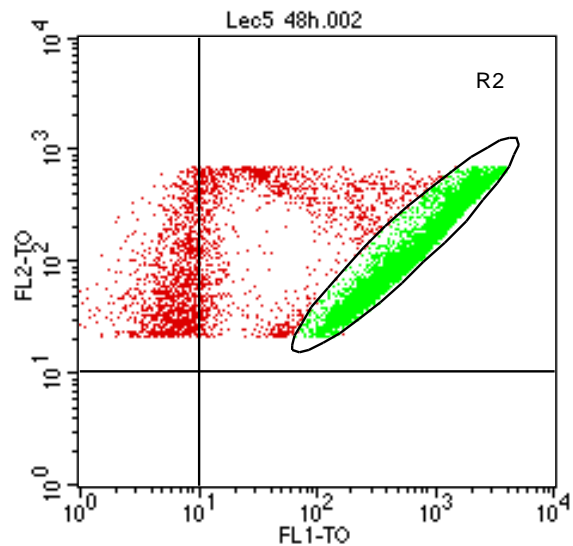
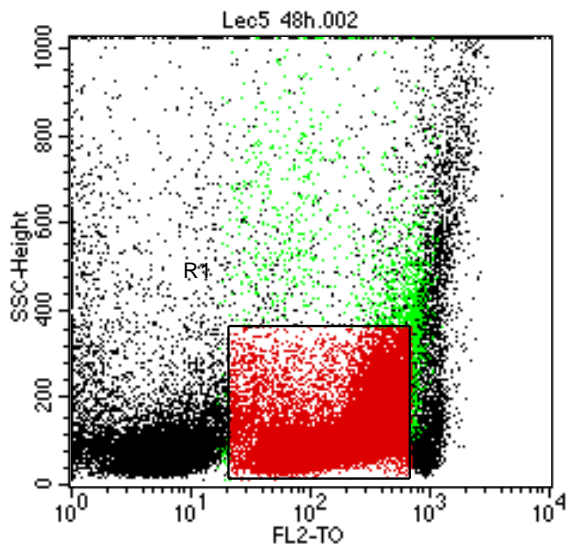


Aquisição: 60000/G1: 40202 – 67,00%

Aquisição: 60000/G2: 38760 – 96,41%

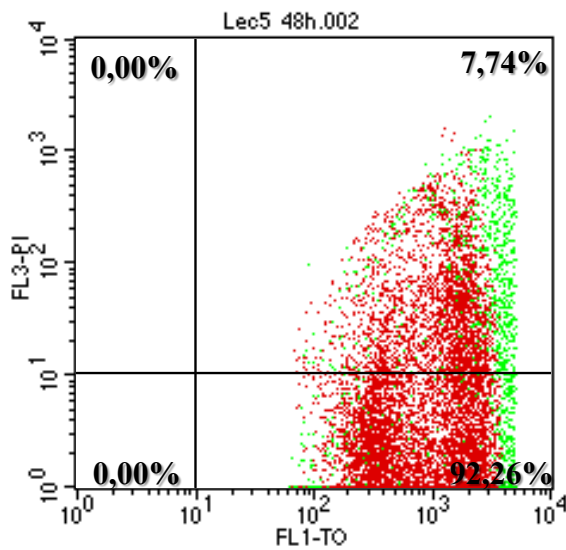


Viabilidade Celular. Controle negativo de 48 horas. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 60000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulocidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.

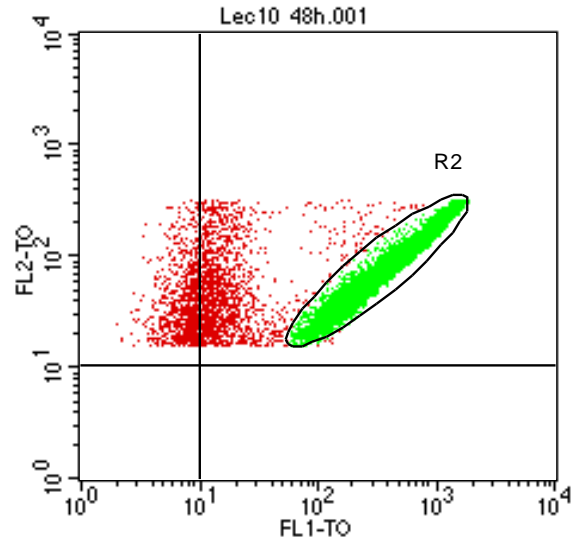
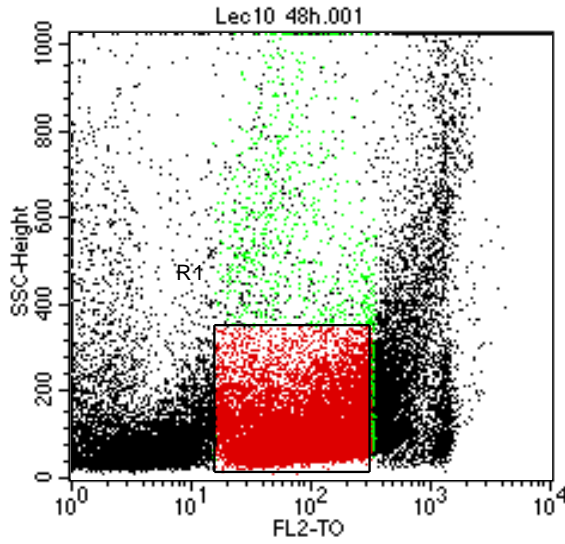


Aquisição: 60000/G1: 43641 – 72,73%

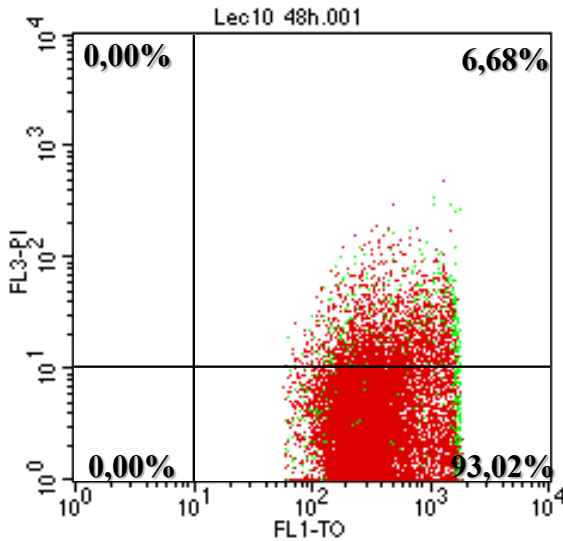
Aquisição: 60000/G2: 41162 – 94,32%



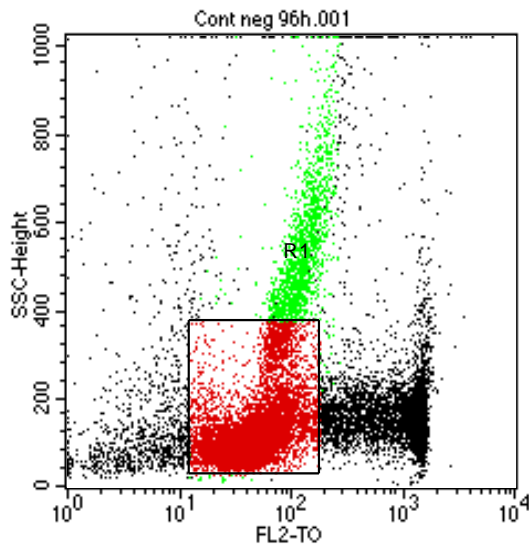
Viabilidade Celular. Lectina de 5ug/mL de 48 horas. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 60000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulocidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.



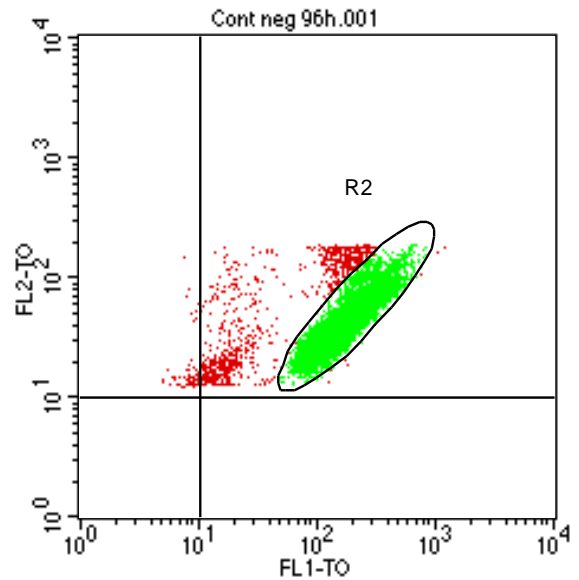
Aquisição: 60000/G1: 39775 – 66,29% **Aquisição: 60000/G2:37367 –93,95%**



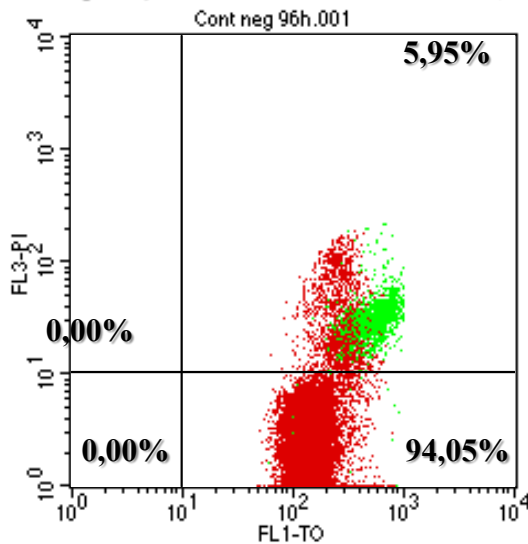
Viabilidade Celular. Lectina de 10ug/mL de 48 horas. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 60000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulocidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.



Aquisição: 60000/G1: 52616 – 87,69%

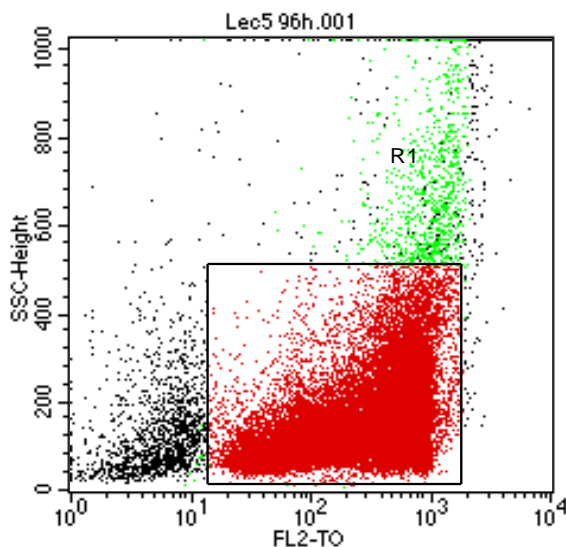


Aquisição: 60000/G2: 51676 – 98,21%

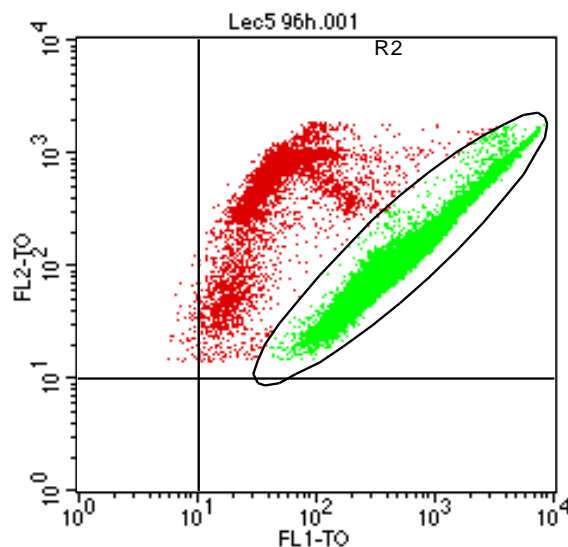


Viabilidade Celular. Controle negativo de 96 horas.

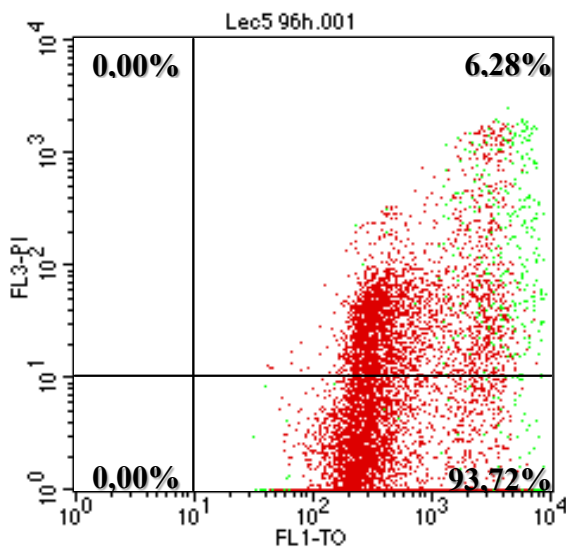
O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 60000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulosidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.



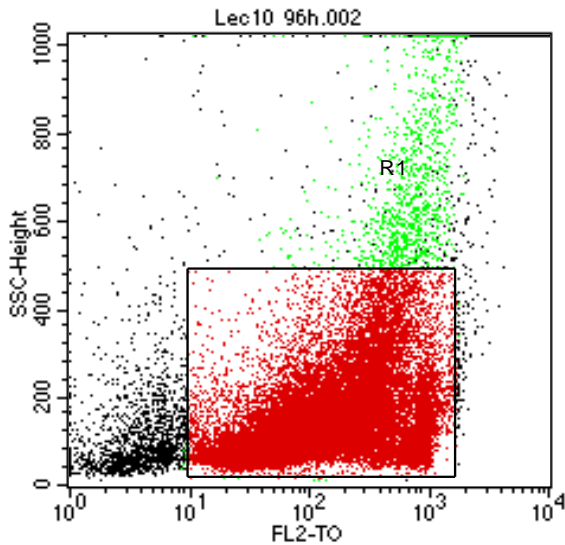
Aquisição: 60000/G1: 57066 – 95,11%



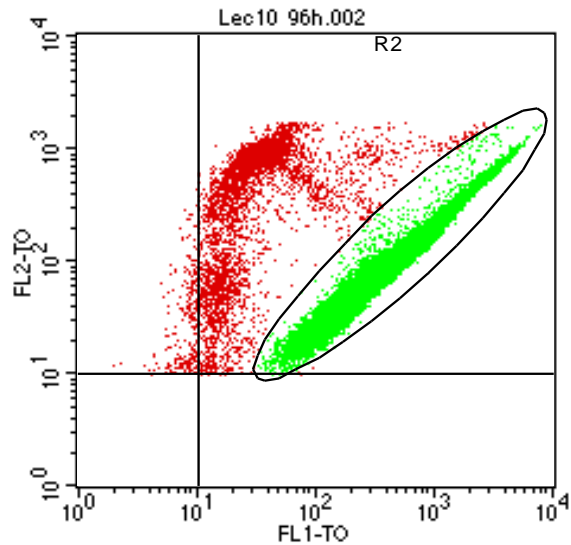
Aquisição: 60000/G2: 51312 – 89,92%



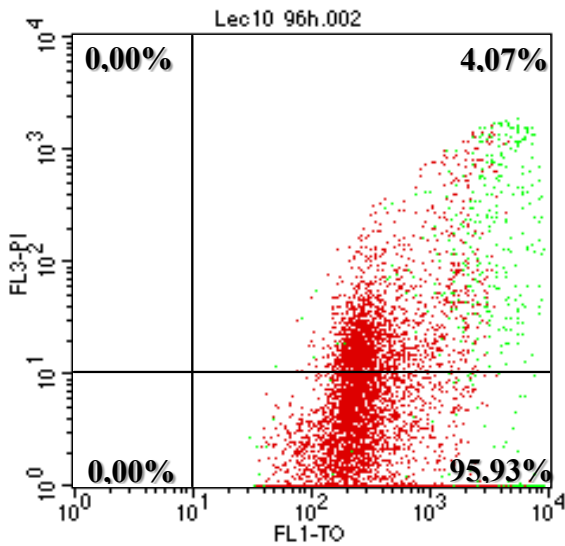
Viabilidade Celular. Lectina de 5 μ g/mL de 96 horas. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5 μ g/mL e 10 μ g/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 60000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulosidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1.



Aquisição: 60000/G1: 56718 – 94,53%

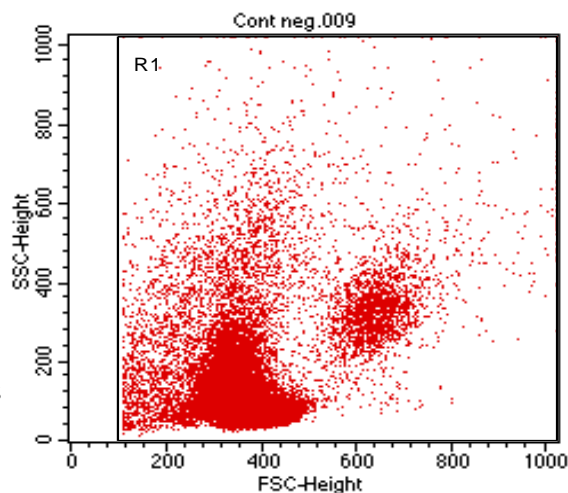


Aquisição: 60000/G2: 51268 – 90,39%

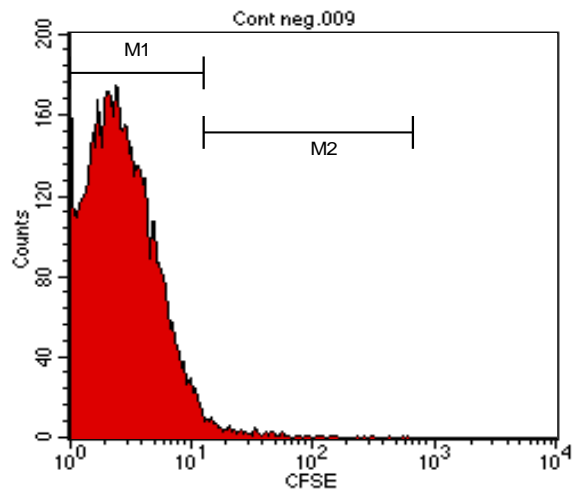


Viabilidade Celular. Lectina de 10ug/mL de 96 horas. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados com RPMI (controle negativo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental) em diferentes tempos, depois foram marcados com laranja de tiazol (TO) e iodeto de propídeo (PI), e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foi feita aquisição e análise de 60000 eventos no FACScan. As porcentagens de células viáveis e mortas foram determinadas com a definição de dois *gates*, o primeiro R1 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada em FL2 e a granulosidade celular, e o segundo R2 de acordo com a fluorescência emitida pelo laranja de tiazol detectada tanto em FL1 quanto em FL2. Em seguida, para determinar as reais porcentagens de células viáveis e mortas foi detectado a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo em FL3, e do laranja de tiazol em FL1

8.5 - Dot Plots e Histogramas do ensaio de proliferação celular por citometria de fluxo

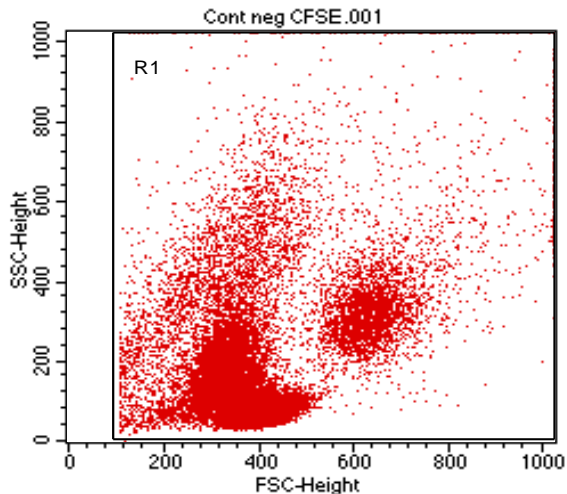


**Aquisição: 30000/G1: 30000 –
100%**

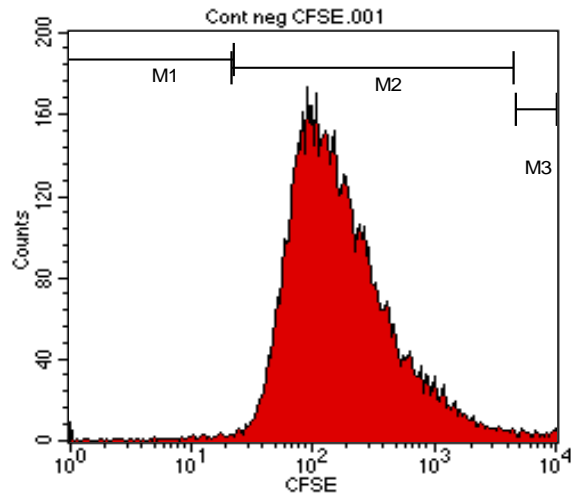


**Aquisição: 30000/M1: 29608 – 98,69%/
M2: 396 – 1,32%**

Proliferação Celular. Controle Negativo - células não marcadas por CFSE. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados, células marcadas e não marcadas por CFSE, com RPMI (controle negativo), Con-A (controle positivo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental), e logo após foi adicionado os anticorpos monoclonais - anti-CD3-PerCP, anti-CD14-PE, anti-CD4-PE, anti-CD19-PE, anti-CD8-PE, anti-CD16-PE, para a marcação de superfície celular. Foi feita aquisição e análise de cerca de 30000 a 60000 eventos no FACScan, com a definição do *gate* em diferentes populações separadas de acordo com seu tamanho (FSC) e granulidade (SSC). Metade do total de eventos adquiridos permanece dentro do *gate*, exceto a população de monócitos que apresenta menor percentual. Os possíveis diferentes picos observados no gráfico de histograma é que determina se há ou não proliferação celular. A figura mostra aquisição e análise de 30000 eventos, *gate* selecionando todos os eventos adquiridos, amostra de controle negativo não marcado por CFSE.

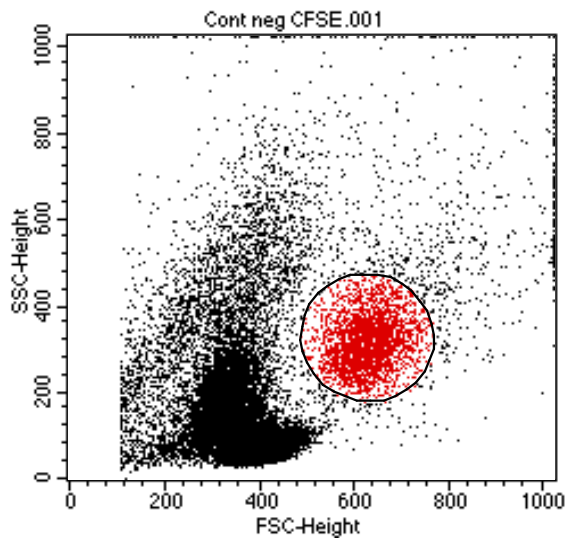


**Aquisição: 30000/G1: 30000 –
100%**

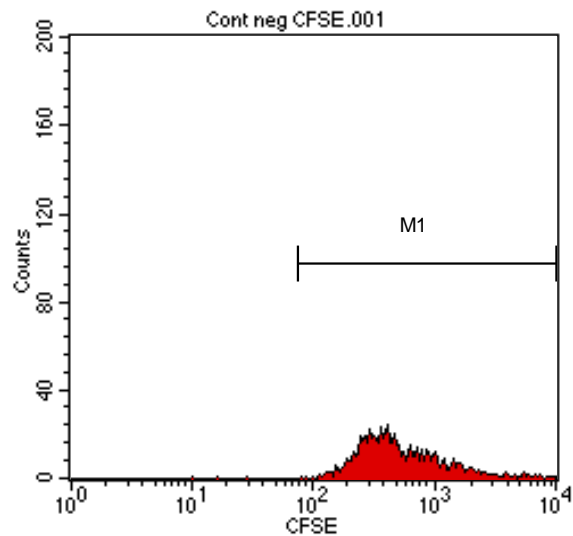


**Aquisição: 30000/M1: 162– 0,54%/
M2: 29654 – 98,85%/M3: 186-0,62%**

Proliferação Celular. Controle Negativo - células marcadas por CFSE. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados, células marcadas e não marcadas por CFSE, com RPMI (controle negativo), Con-A (controle positivo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental), e logo após foi adicionado os anticorpos monoclonais - anti-CD3-PerCP, anti-CD14-PE, anti-CD4-PE, anti-CD19-PE, anti-CD8-PE, anti-CD16-PE, para a marcação de superfície celular. Foi feita aquisição e análise de cerca de 30000 a 60000 eventos no FACScan, com a definição do *gate* em diferentes populações separadas de acordo com seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Metade do total de eventos adquiridos permanece dentro do *gate*, exceto a população de monócitos que apresenta menor percentual. Os possíveis diferentes picos observados no gráfico de histograma é que determina se há ou não proliferação celular. A figura mostra aquisição e análise de 30000 eventos, *gate* selecionando todos os eventos adquiridos, amostra de controle negativo marcado por CFSE.



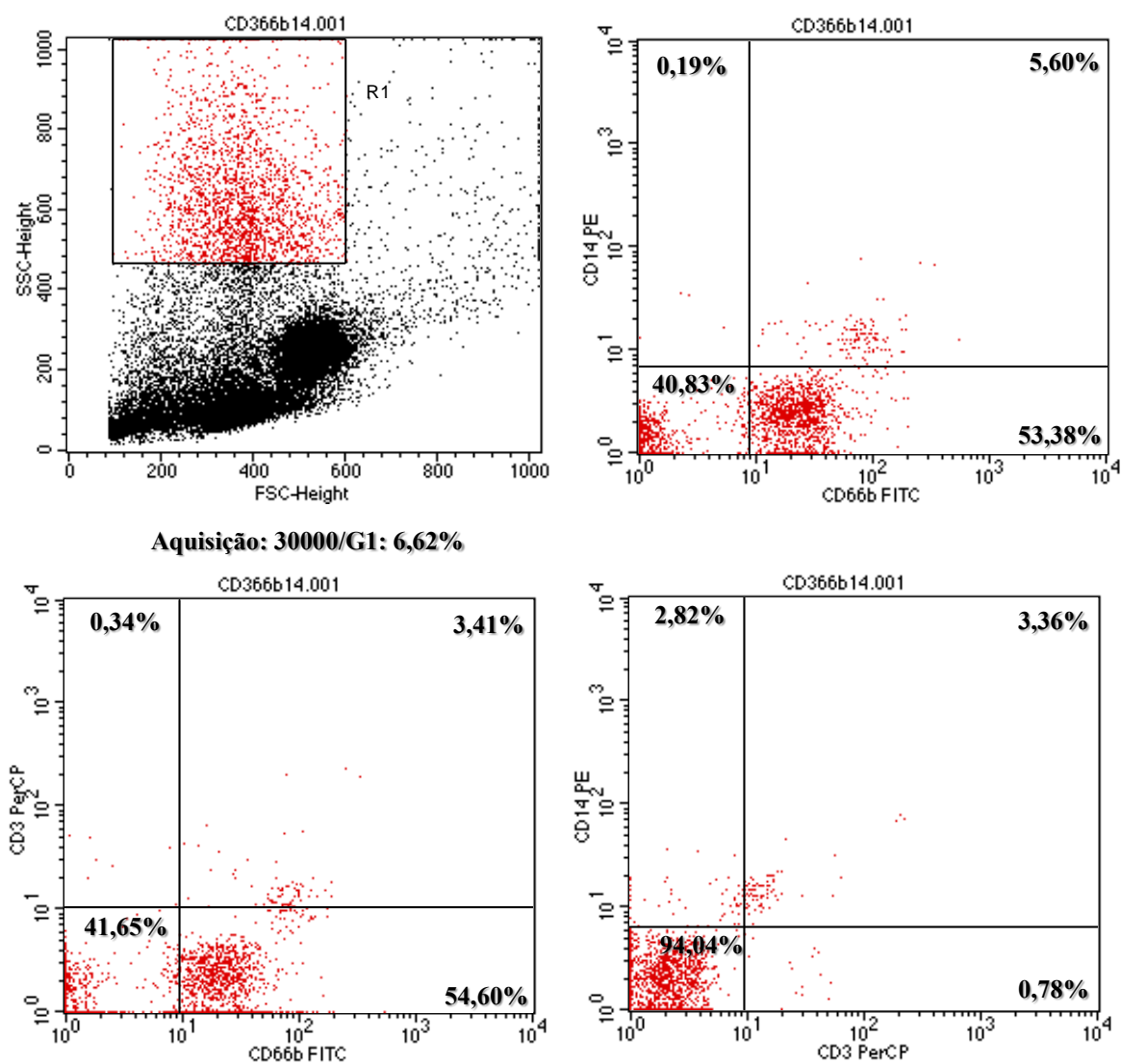
Aquisição: 30000/G1: 2522– 8,41%



Aquisição: 30000/M1: 2519– 99,88%

Proliferação Celular. Controle Negativo – monócitos marcados por CFSE. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, em seguida as células separadas por gradiente de densidade pelo Histopaque 1077. Os PBMCs foram isolados e incubados, células marcadas e não marcadas por CFSE, com RPMI (controle negativo), Con-A (controle positivo) e com lectina de 5ug/mL e 10ug/mL (grupo experimental), e logo após foi adicionado os anticorpos monoclonais - anti-CD3-PerCP, anti-CD14-PE, anti-CD4-PE, anti-CD19-PE, anti-CD8-PE, anti-CD16-PE, para a marcação de superfície celular. Foi feita aquisição e análise de cerca de 30000 a 60000 eventos no FACScan, com a definição do *gate* em diferentes populações separadas de acordo com seu tamanho (FSC) e granulidade (SSC). Metade do total de eventos adquiridos permanece dentro do *gate*, exceto a população de monócitos que apresenta menor percentual. Os possíveis diferentes picos observados no gráfico de histograma é que determina se há ou não proliferação celular. A figura mostra aquisição e análise de 30000 eventos, *gate* na população de monócitos, amostra de controle negativo marcado por CFSE.

8.6- Imunofenotipagem de PBMCs Humanos



Imunofenotipagem de PBMCs Humanos. O sangue de voluntários saudáveis foi coletado, e as células separadas por gradiente de densidade por Histopaque 1077. Os PBMCs isolados foram marcados com anticorpos monoclonais, seguida de aquisição e análise no FACScan. As porcentagens das subpopulações celulares foram determinadas após a definição do *gate* de interesse. Aquisição e análise de 30000 eventos, *gate* na população de granulócitos definidas por tamanho e granulosidade, amostra marcada com anticorpos monoclonais CD66bFITC, CD3PerCP, CD14PE.

8.7 – Tabela de intervalos de confiança do resultado estatístico após aplicação de *bootstrap* a partir dos dados obtidos da dosagem de citocinas por CBA

<u>IL-2</u>	4h	12h	24h	48h	72h	96h
RPMI	0; 1,78	0; 1,95	0; 2,06	0; 1,5	0; 3	0; 2,24
Con-A	2,4; 10,55*	22,53 ;110,07*	2,43; 124,44*	1,8; 88,67*	0; 2	0,19; 1,89
LPS	0; 1,9	0; 1,91	0; 2,20	0; 2,23	0; 1,72	0; 3,84
PMA	0,12; 1,79	0; 3,19	0; 6,87	0; 5,05	0; 2,38	0; 2,40
5	3,82; 48,41#	17,56; 84,98#	8,19; 95,64#	0,46; 24,08	0,11; 2,05	0,41; 6,91
10	1,44; 59,95	4,57; 124,61#	2,65; 95,61#	0,60; 18,16	0,06; 3,59	0,11;1,68

<u>IL-10</u>	4h	12h	24h	48h	72h	96h
RPMI	0; 0,10	0; 0,40	0; 01	0; 03	0; 01	0; 08
Con-A	0,20; 5,02*	3,41; 17,22*	3,40; 96,32*	2,06; 46,06*	11,52; 161,67*	2,08; 73,35*
LPS	0,79; 3,82**	3,83; 75,12**	5,50; 142,13**	4,76; 64,70**	7,04; 140,62**	5,74; 134,70**
PMA	0; 0,01	0; 0,01	0; 0,75	0; 0	0; 0,01	0; 0,4
5	0,40; 6,84#	1,65; 21,45#	5,58; 84,42#	3,24; 125,04#	0,64; 97,09#	1,15; 115,54#
10	0,02; 3,50	0,71; 34,24#	6,04; 224,37#	8,58; 101,07#	2,26; 117,53#	4,40; 67,20#

<u>IFN-γ</u>	4h	12h	24h	48h	72h	96h
RPMI	0; 0	0; 0	0; 0	0; 0	0; 0	0; 0
Con-A	0,12; 0,43*	3,52; 8,22*	0,48; 7,5*	0,35; 5,51*	0; 17,74	0; 9,15
LPS	0; 0,4	0; 0,30	0; 0,19	0; 0,54	0; 0,15	0; 0,12
PMA	0; 7,44	0; 0	0; 0	0; 0	0; 0	0; 0
5	0; 0	0; 0,7	0,02; 0,46#	0,02; 4,08#	0,13; 4,63#	0,015; 15,84#
10	0; 0	0; 0,09	0,19; 2,93#	0,63; 14,74#	0,30; 16,64#	0,24; 10,29#

<u>IL-6</u>	4h	12h	24h	48h	72h	96h
RPMI	0,58; 8,89	1,17; 27,37	0,87; 35,21	0,61; 6,46	0,94; 2,19	0,31; 4,18
Con-A	65,15; 1445,35*	105,27; 4157,17*	60,95; 3780,47*	94,46; 5000*	169,39; 5000*	110,54; 5000*
LPS	283,09; 3037,19**	1245,35; 4241,17**	683,77; 5000**	552,43; 5000**	913,36; 5000**	717,28; 5000**
PMA	0,70; 25,01	9,83; 25,39	38,97; 170,33***	74,91; 286,31***	61,74; 367,86***	118; 280***
5	210,27; 2996,62#	255,76; 4043,77#	998,13; 4176,29#	926,19; 4181,8#	170; 3834,9#	974,45; 5000#
10	508,83; 4274#	913,36; 5000#	1055,78; 4447,60#	1739,37; 5000#	1882,87; 5000#	1200,57; 4424,80#

<u>TNF-α</u>	4h	12h	24h	48h	72h	96h
RPMI	0; 0,4	0; 0,7	0; 0	0; 0	0; 0	0; 0,98
Con-A	0,02; 91,93	1; 113,54*	0,32; 60,78*	0; 53	0,24; 40,52*	0,05; 26,36
LPS	29,5; 509,11**	3,1; 209,45**	0,25; 36,08**	0; 34,12	0; 18,42	0,45; 15,17
PMA	0,5; 205,21***	0,11; 88,1***	9,92; 270,06***	1,67; 173,4***	3,5; 135,7***	1; 73,46***
5	4,6; 377,93#	0,5; 271,48	4,22; 98,16#	0,5; 139,37#	0,14; 70,49#	0,45; 94,37
10	3,46; 837,13#	0,16; 984,03#	10; 761,94#	2,29; 502,79#	1,18; 169,56#	0,6; 181,29

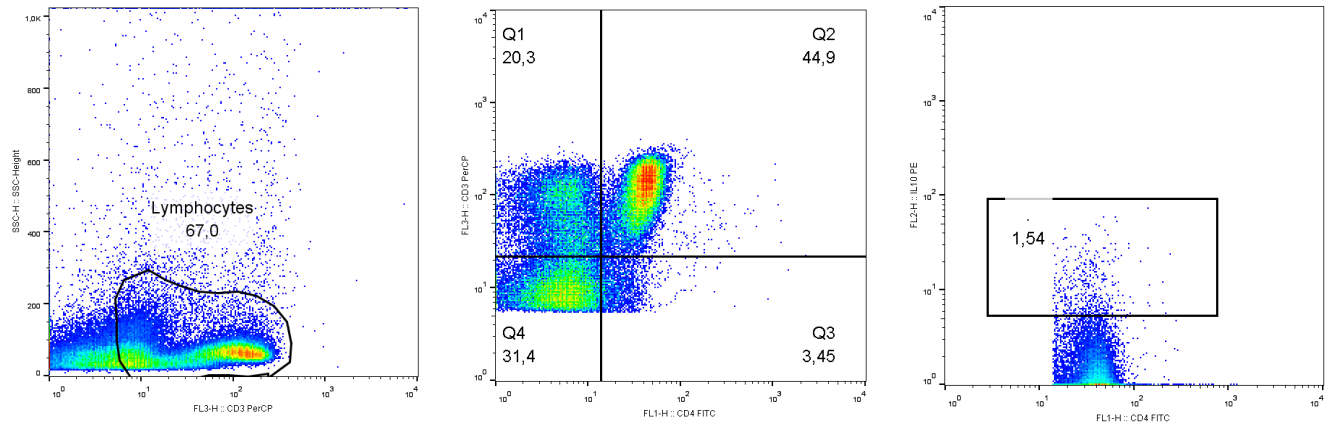
<u>IL-17</u>	4h	12h	24h	48h	72h	96h
RPMI	0; 3,42	0; 2,17	0; 10,15	1,05; 10,93	0; 15,91	0; 2,46
Con-A	0; 13,53	3,7; 47,31*	12,54; 79,64*	10,95; 67,26*	7,5; 97,96	11,13; 65,67*
LPS	0; 2,87	0; 0,58	0; 19,28	0; 5,81	0; 0	0; 2,10
PMA	0; 15,48	0; 0	0; 0	0; 26,14	0; 4,65	0; 3,57
5	0; 8,45	0; 11,89	1,79; 15,84	5,81; 46,82	5,48; 14,18	1,3; 62,62
10	0; 3,39	0; 5,02	5,57; 20,85	3,56; 50,28	6,29; 48,41	3,15; 27,35#

<u>IL-4</u>	4h	12h	24h	48h	72h	96h
RPMI	0,01; 0,55	0; 0,17	0; 0,15	0; 0,17	0; 0,15	0,05; 0,22
Con-A	0; 0,3	0,26; 0,45*	0,12; 1,16	0,20; 0,28*	0,15; 0,25	0,05; 0,13
LPS	0; 0,16	0; 0,13	0,5; 0,17	0,01; 0,14	0,02; 0,14	0,06; 0,5
PMA	0,04; 0,19	0; 0,15	0,03; 0,21	0,15; 0,16	0,01; 0,17	0; 0,15
5	0; 0,37	0; 0,64	0,05; 0,92	0,01; 0,16	0,01; 0,17	0,06; 2,13
10	0; 0,22	0,07; 0,67	0,05; 0,54	0,01; 0,24	0,03; 0,18	0,02; 0,15

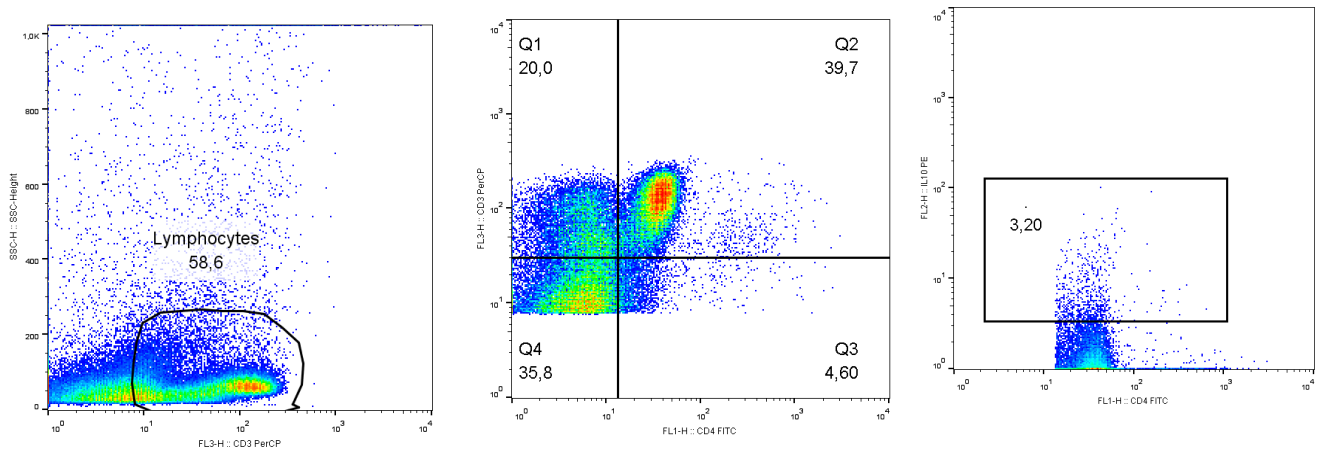
8.8 – Dot plots da marcação intracelular de IL-10 por citometria de fluxo

CD4⁺

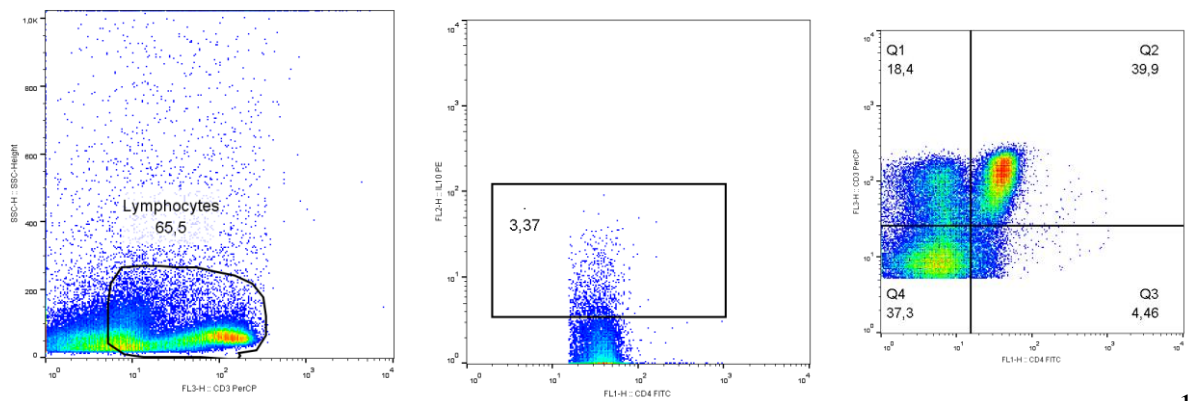
N1 - RPMI



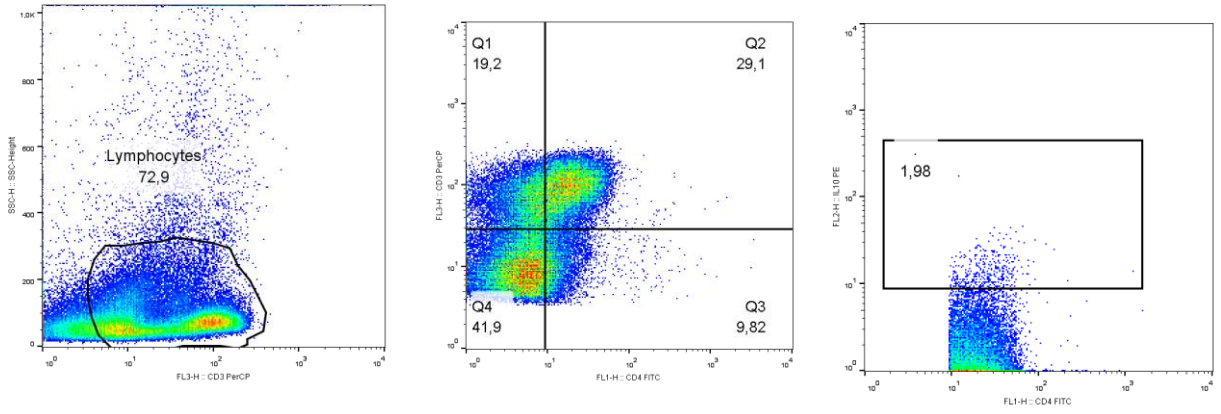
N1- Con-A



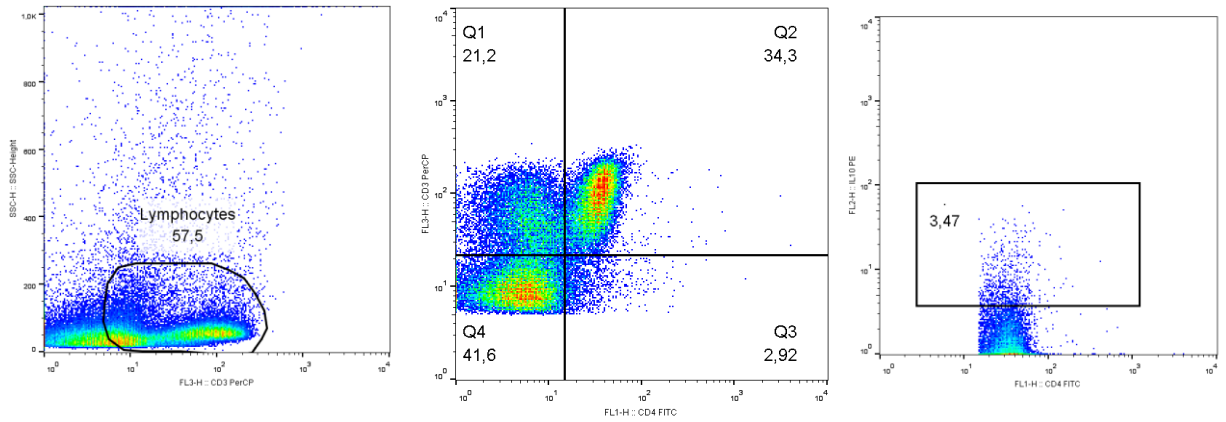
N1 - LPS



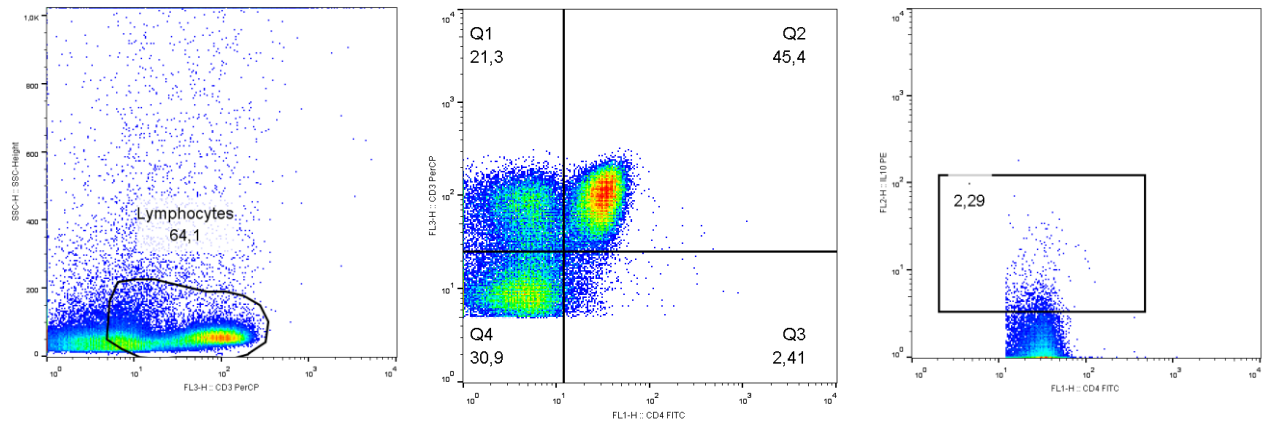
N1 - PMA



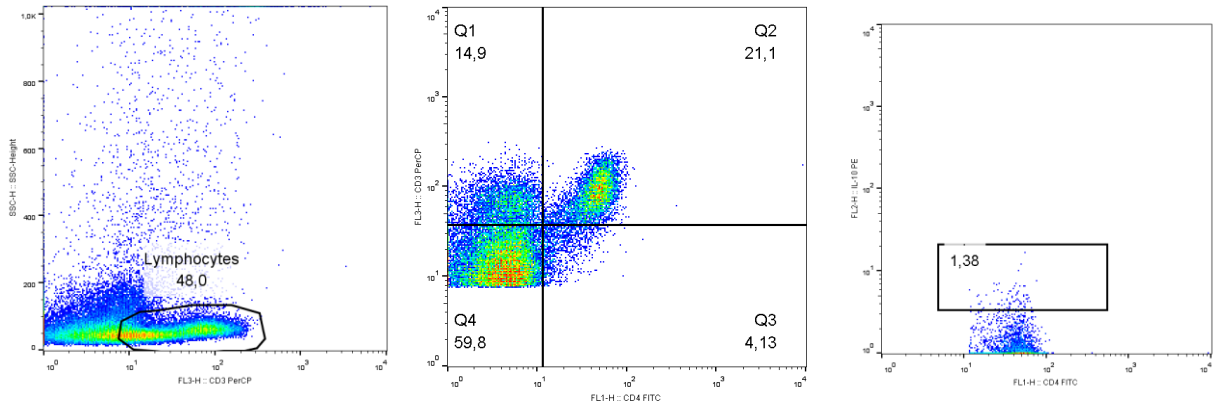
N1- BjuL 5 µg/mL



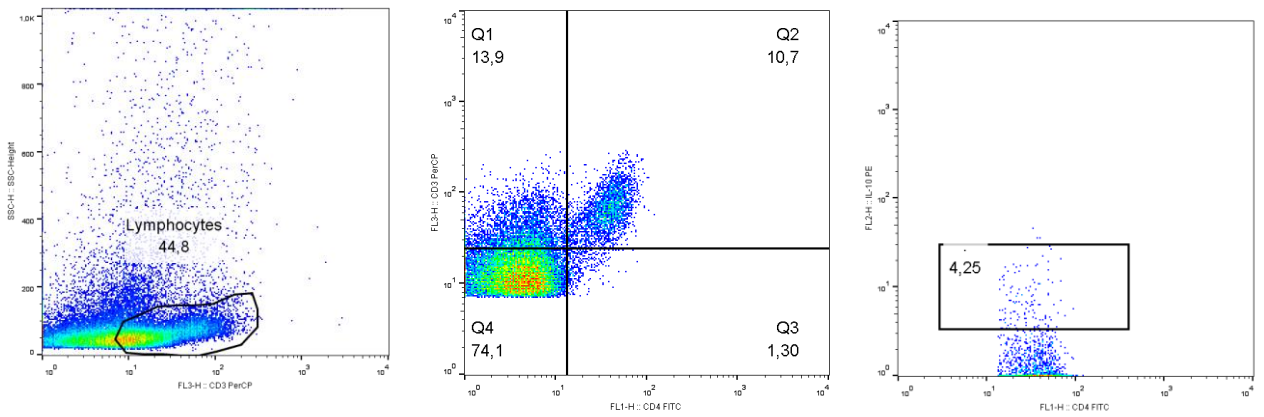
N1-BjuL 10 µg/mL



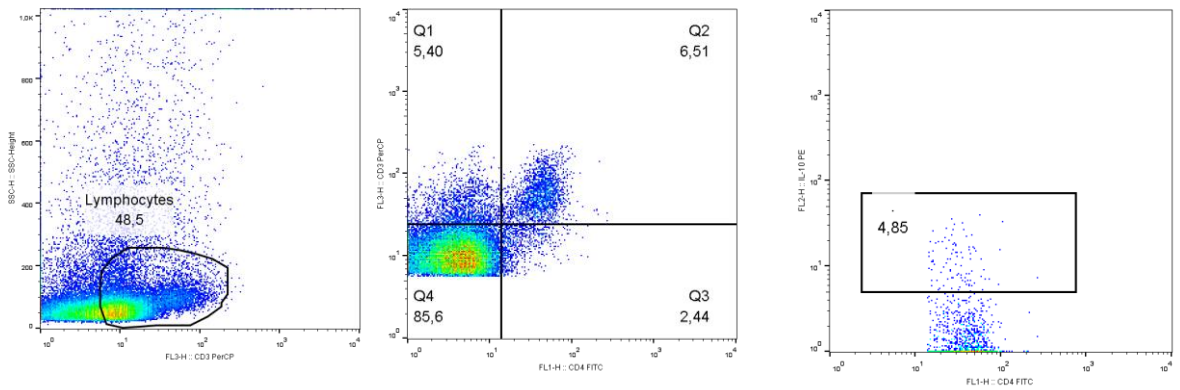
N2 - RPMI



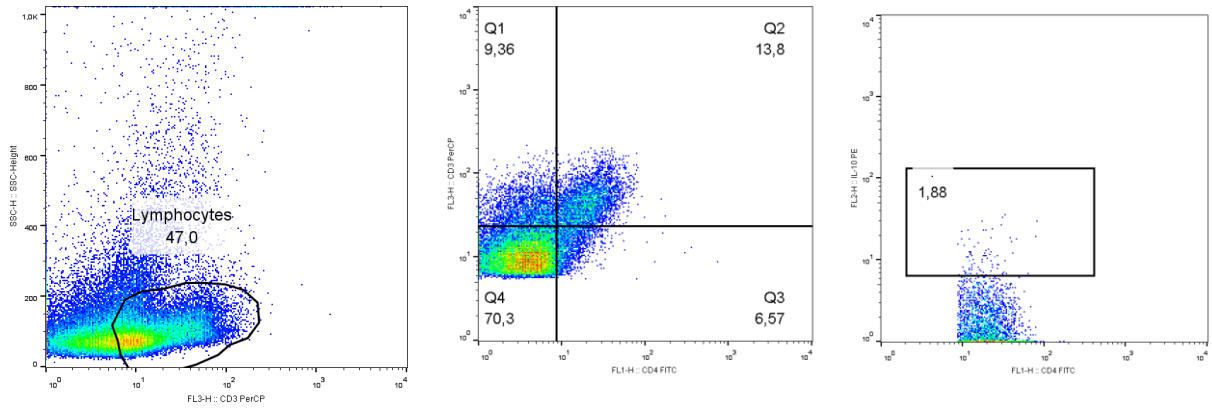
N2 - Con-A



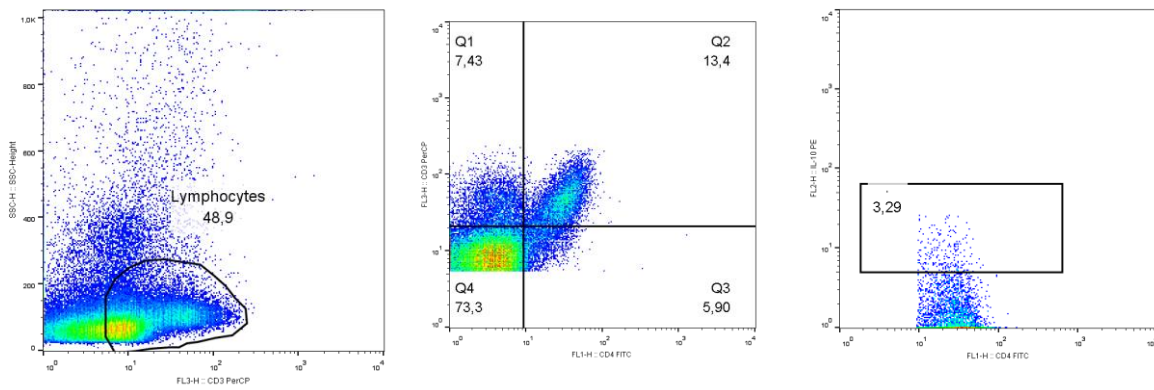
N2 - LPS



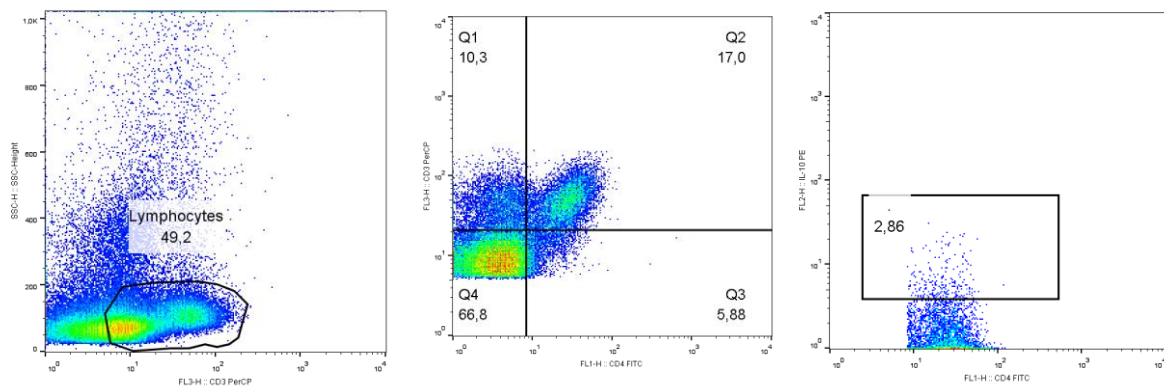
N2 - PMA



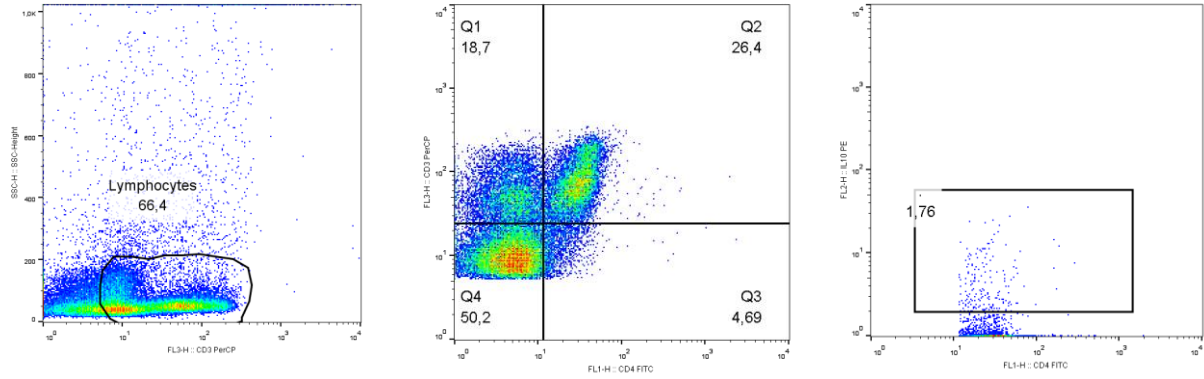
N2 - BjuL 5 µg/mL



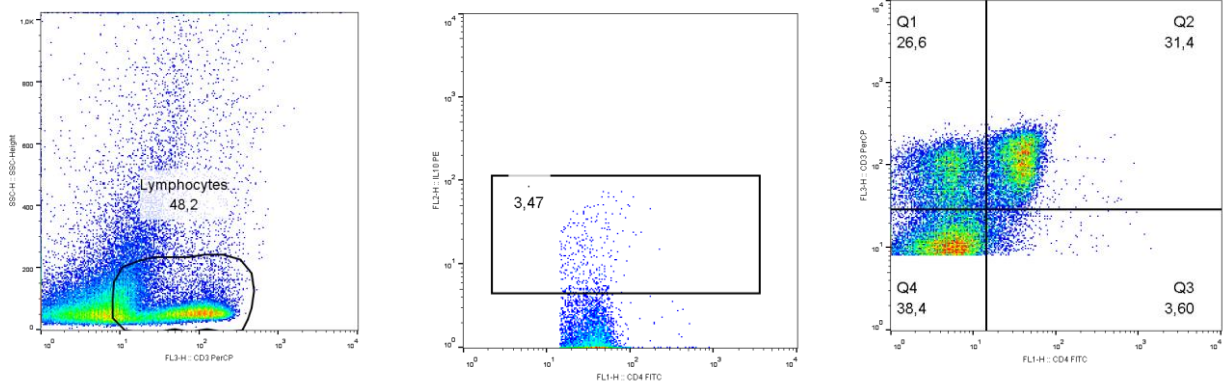
N2 - BjuL 10 µg/mL



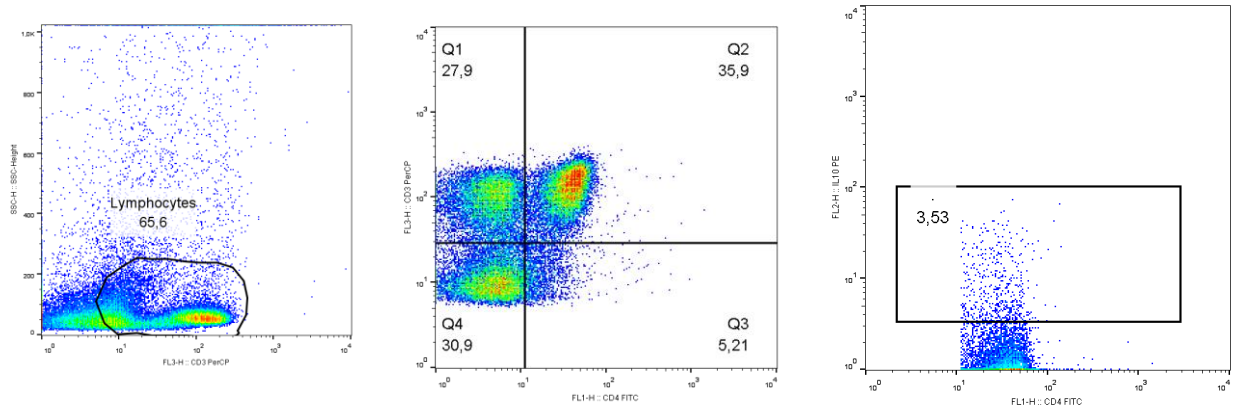
N3 - RPMI



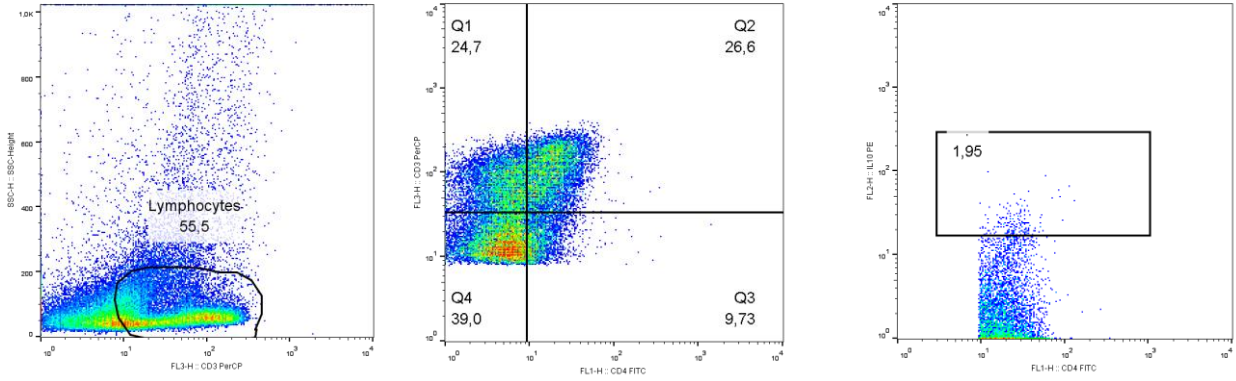
N3 - Con-A



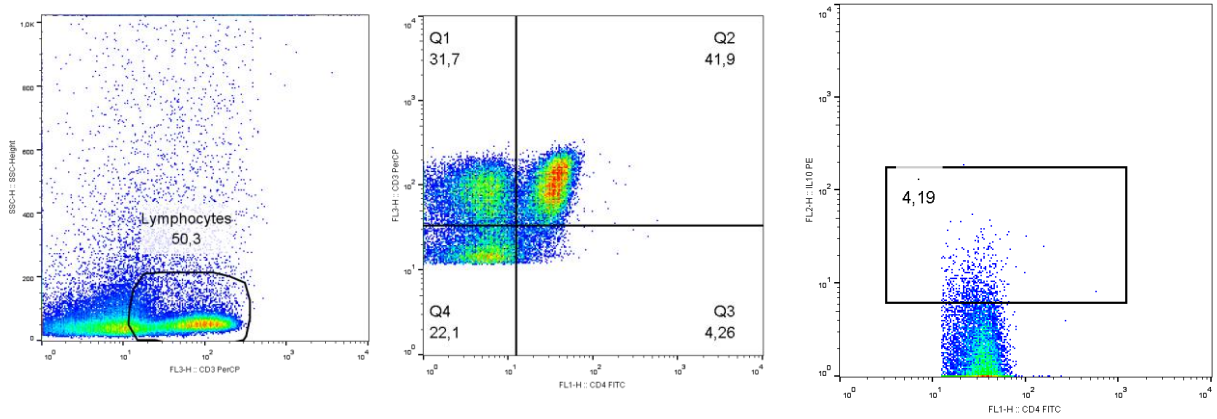
N3 - LPS



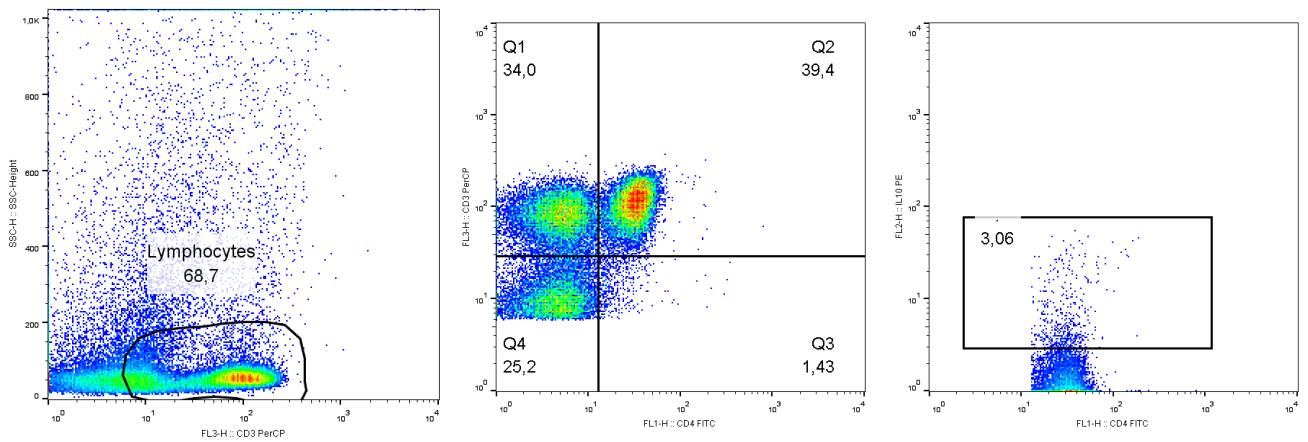
N3 - PMA



N3 - BjuL 5 µg/mL

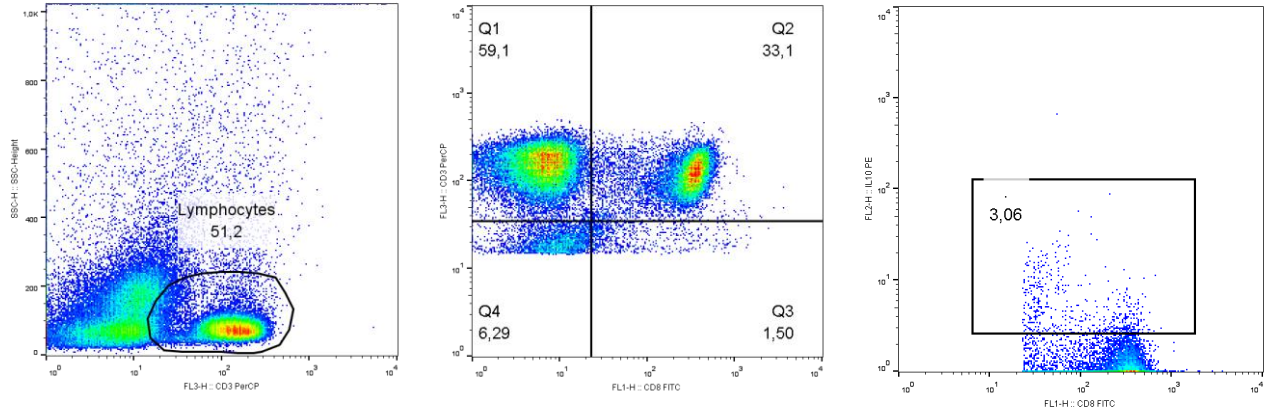


N3 - BjuL 10 µg/mL

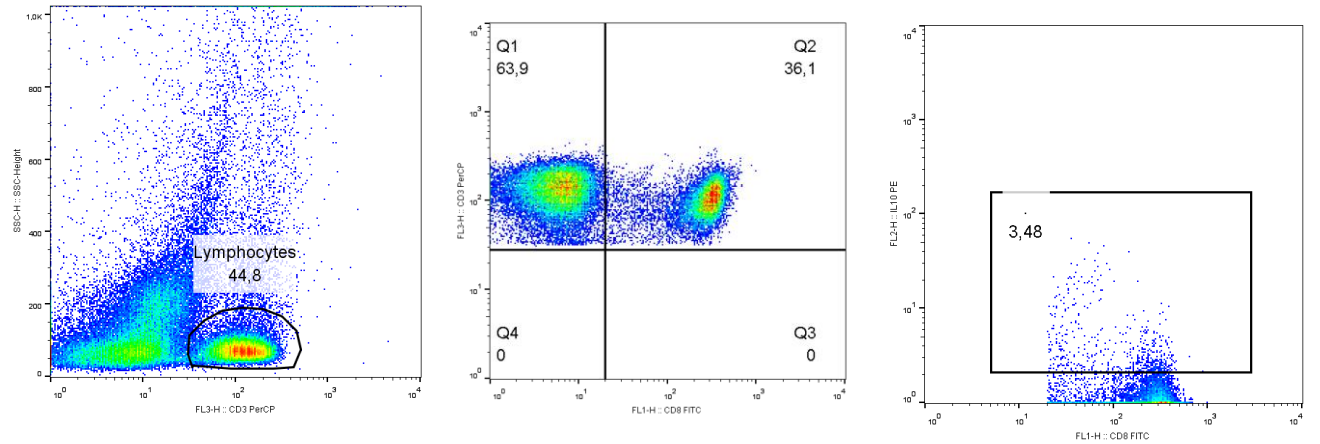


CD8⁺

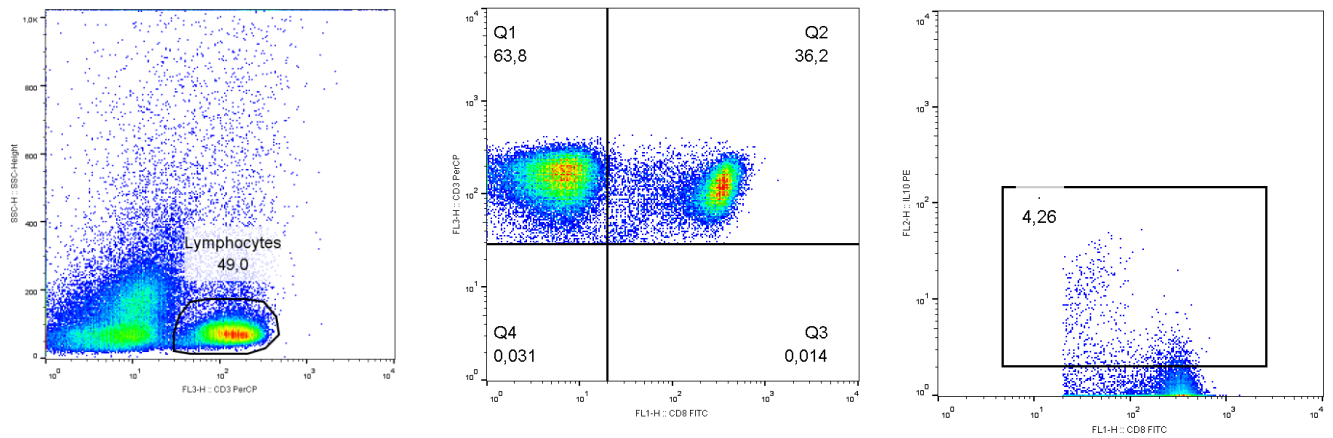
N1- RPMI



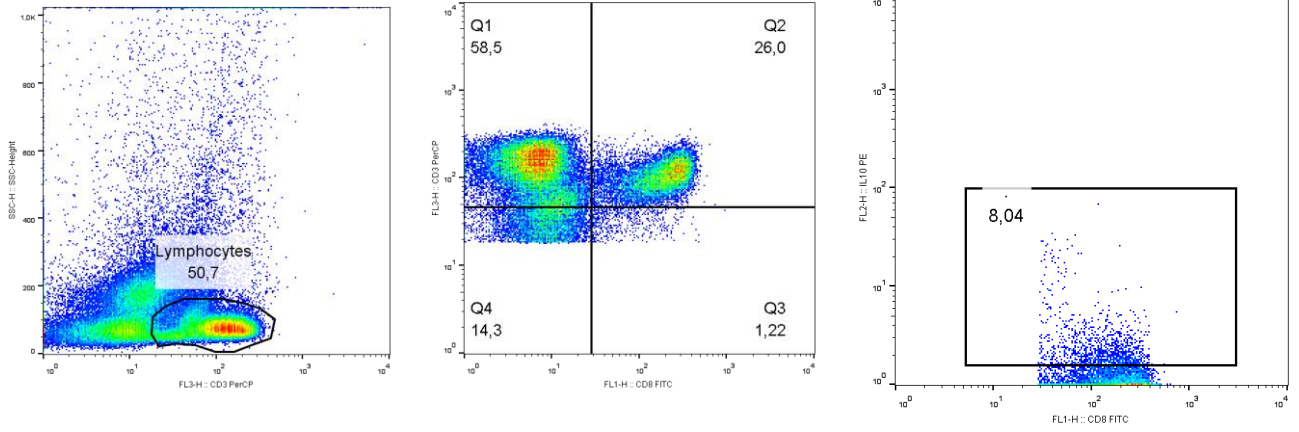
N1 - Con-A



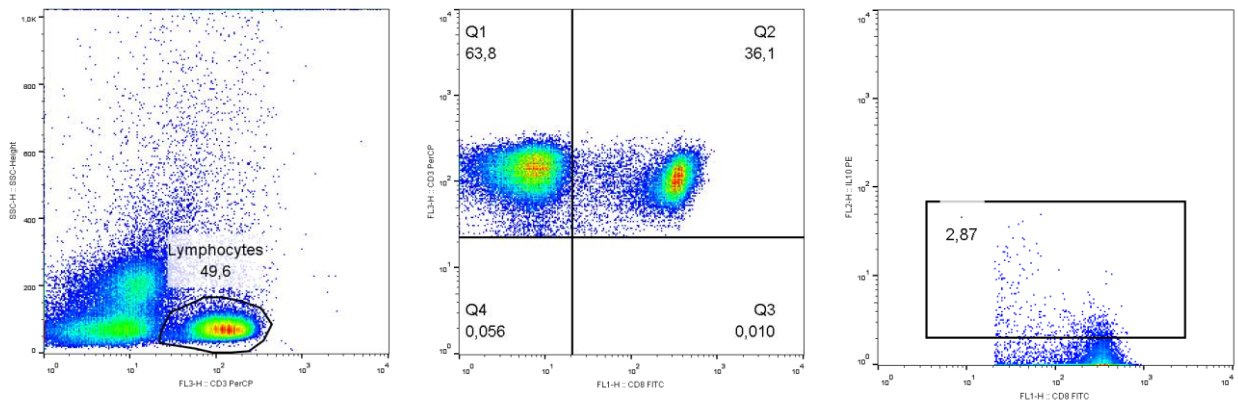
N1 - LPS



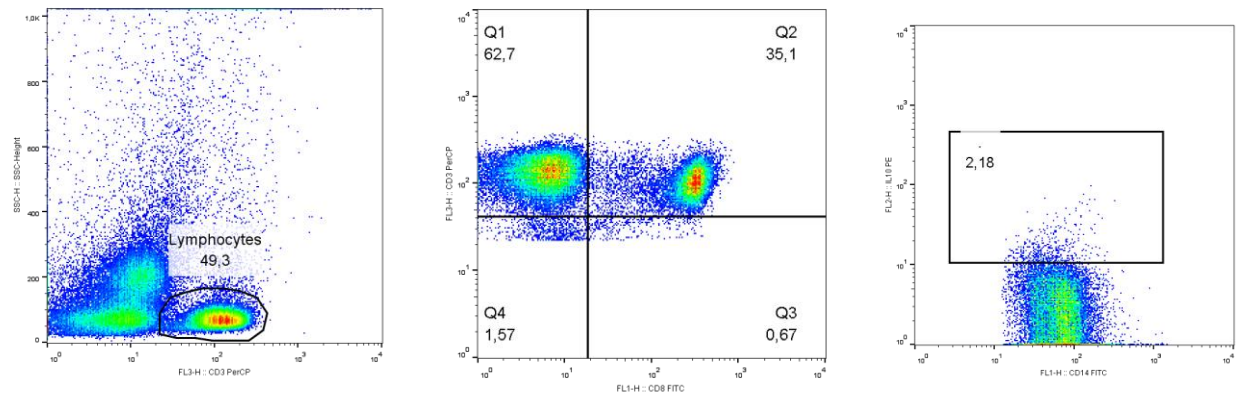
N1 - PMA



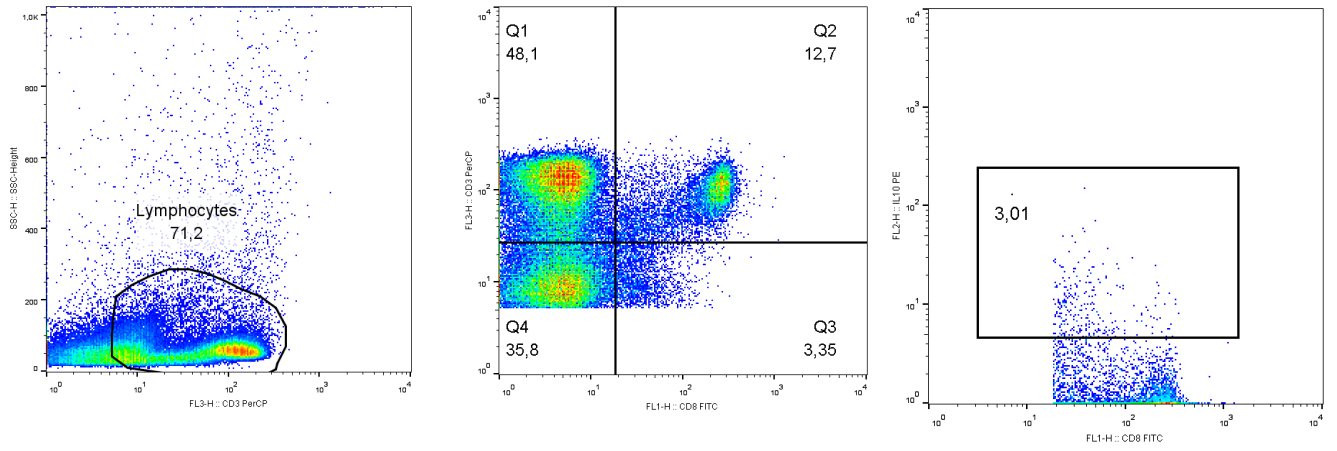
N1 - BjuL 5 µg/mL



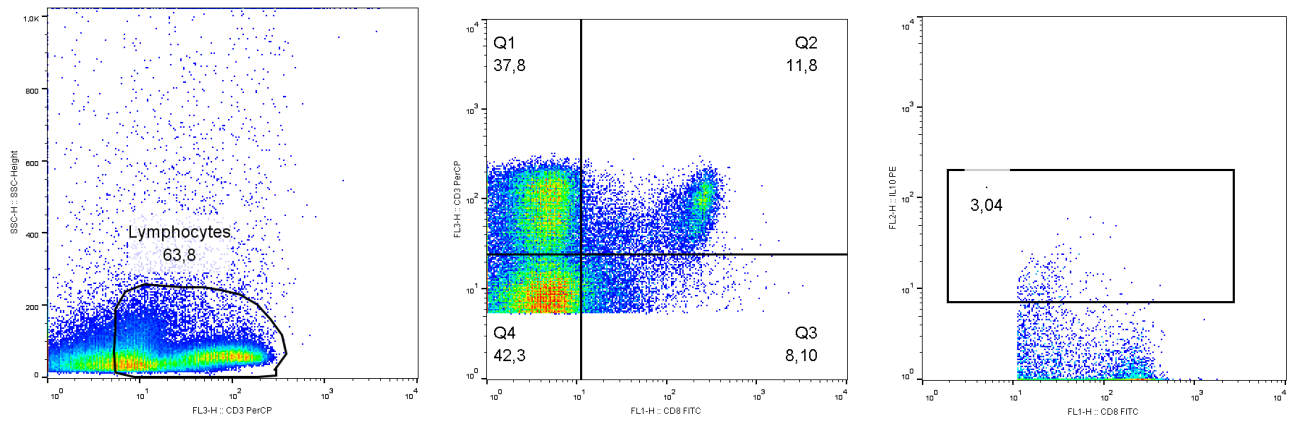
N1 - BjuL 10 µg/mL



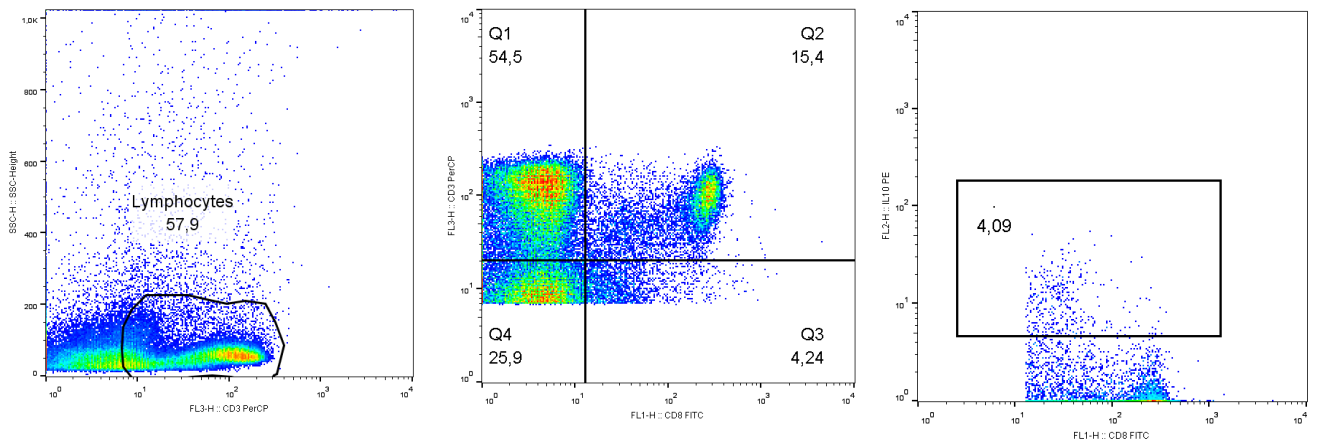
N2 - RPMI



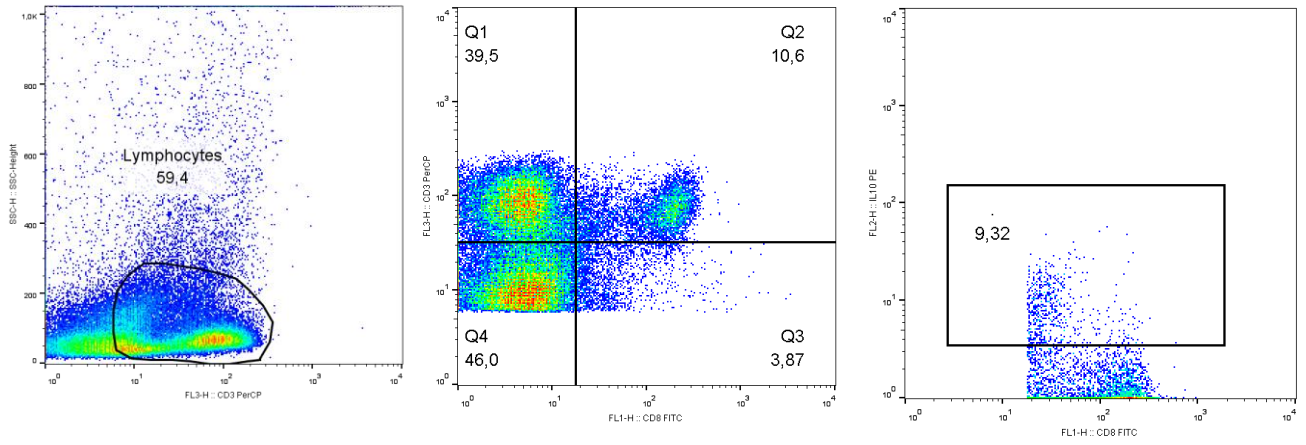
N2 - Con-A



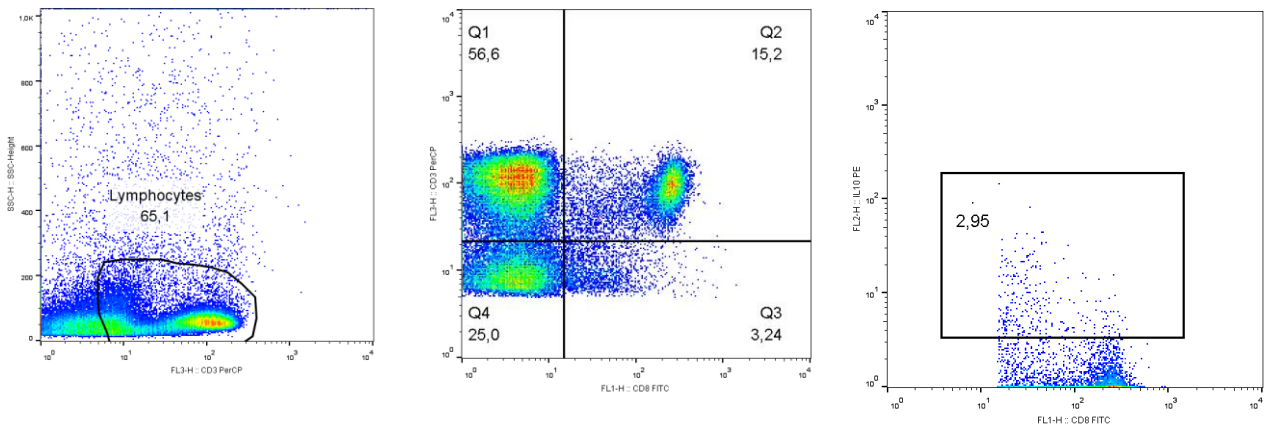
N2 - LPS



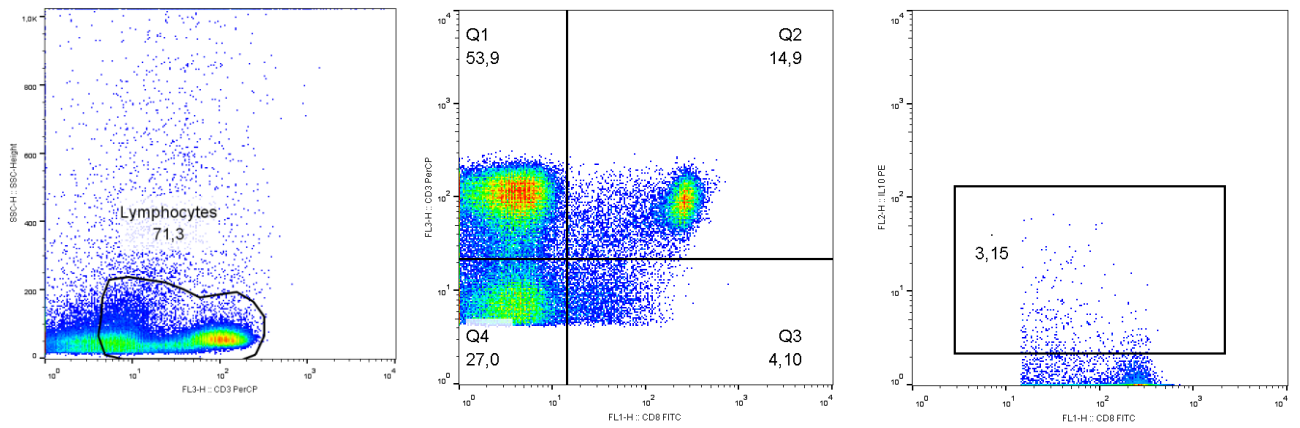
N2 - PMA



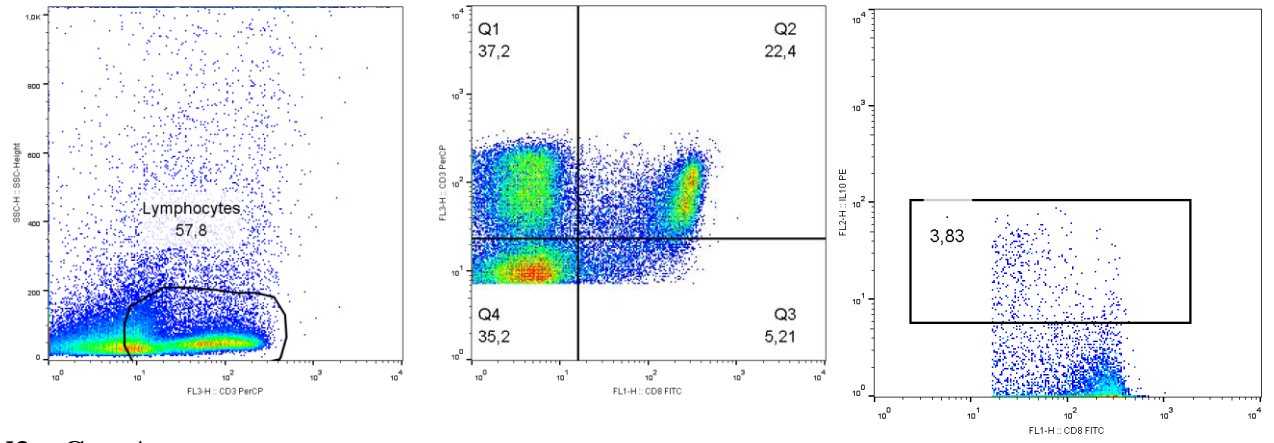
N2 - BjuL 5 µg/mL



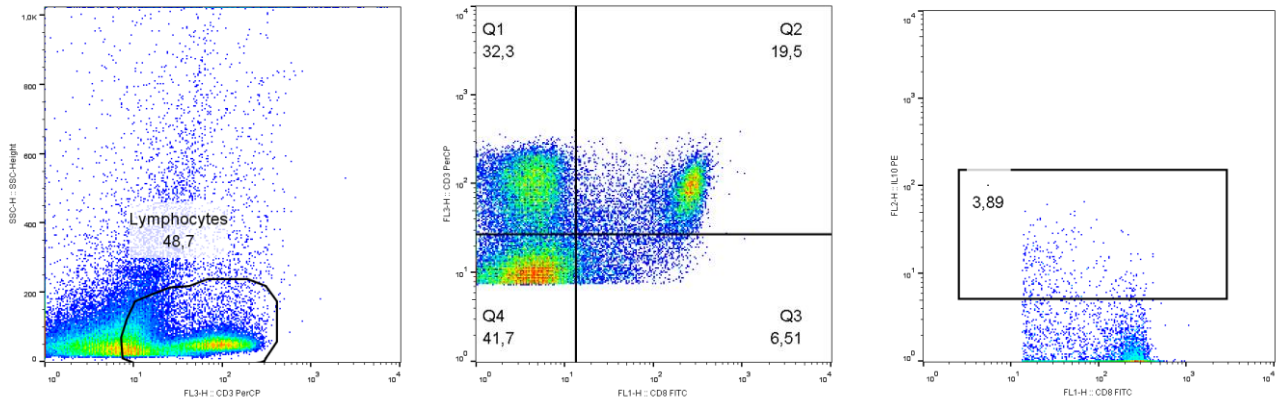
N2 - BjuL 10 µg/mL



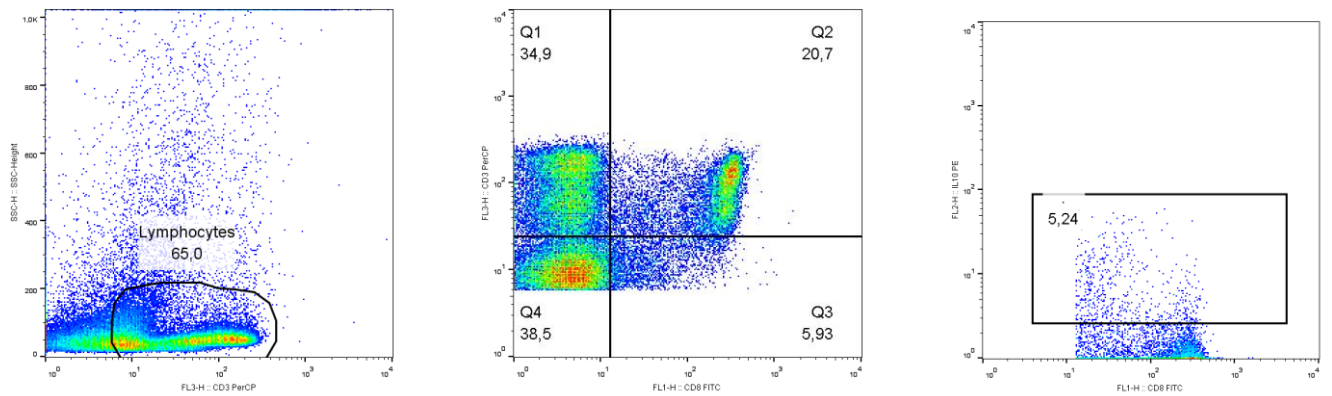
N3 – RPMI



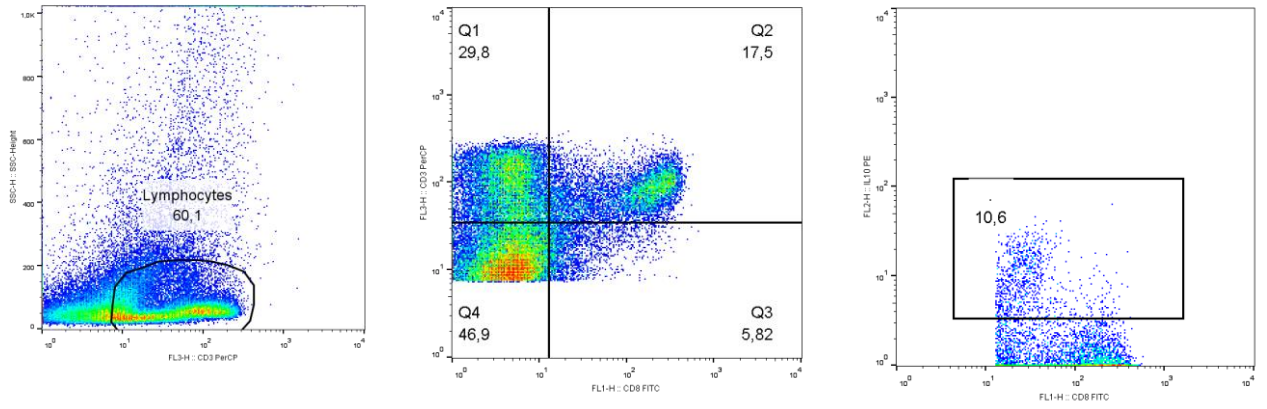
N3 – Con-A



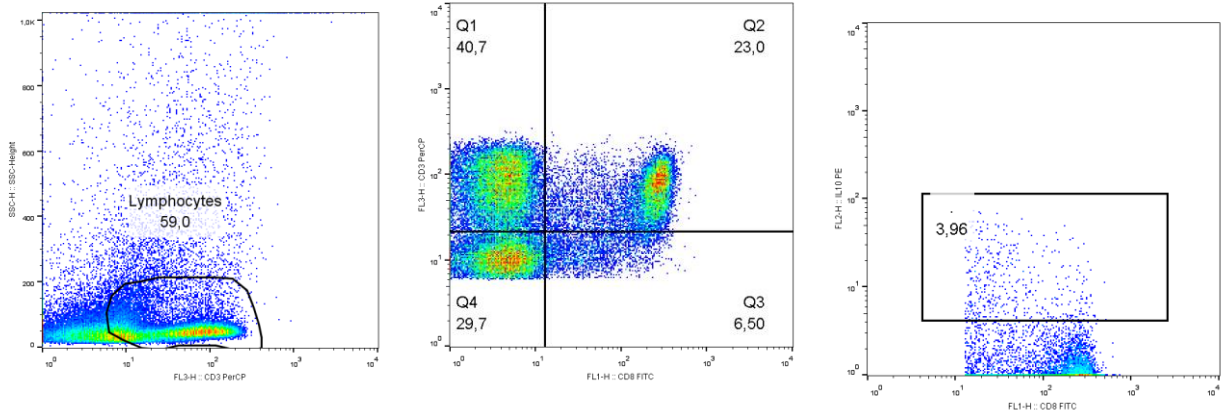
N3 – LPS



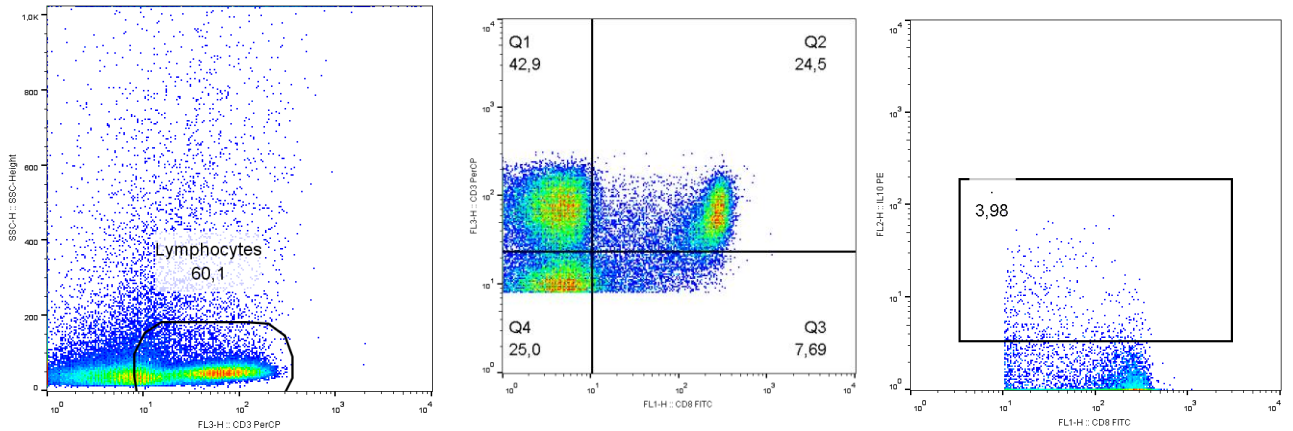
N3 – PMA



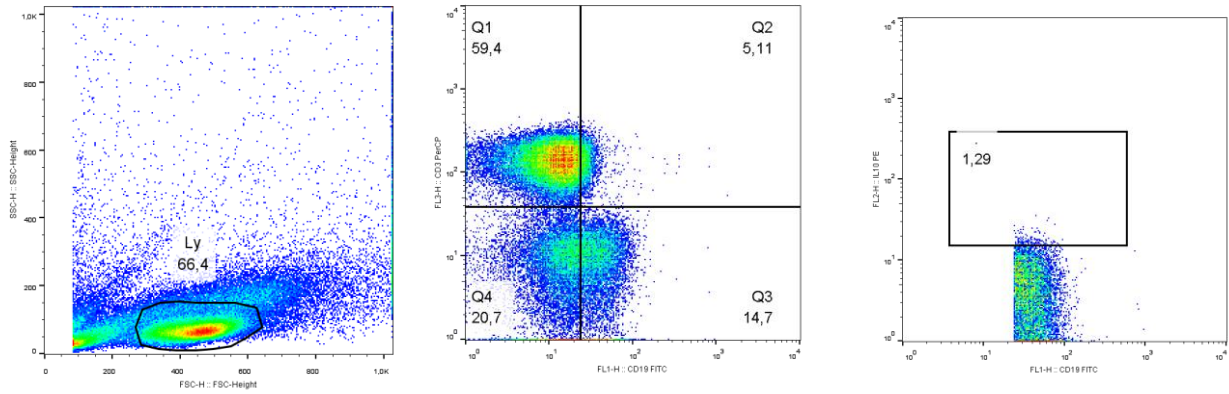
N3 - BjuL 5 µg/mL



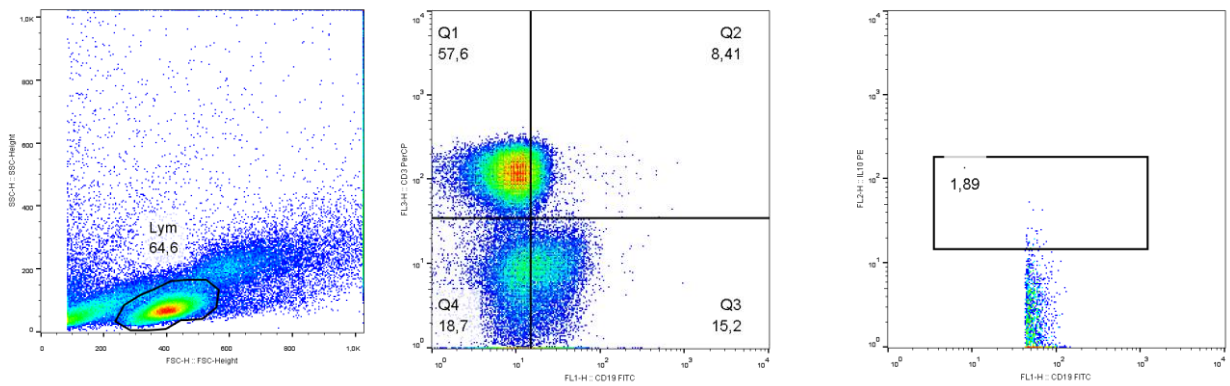
N3 - BjuL 10 µg/mL



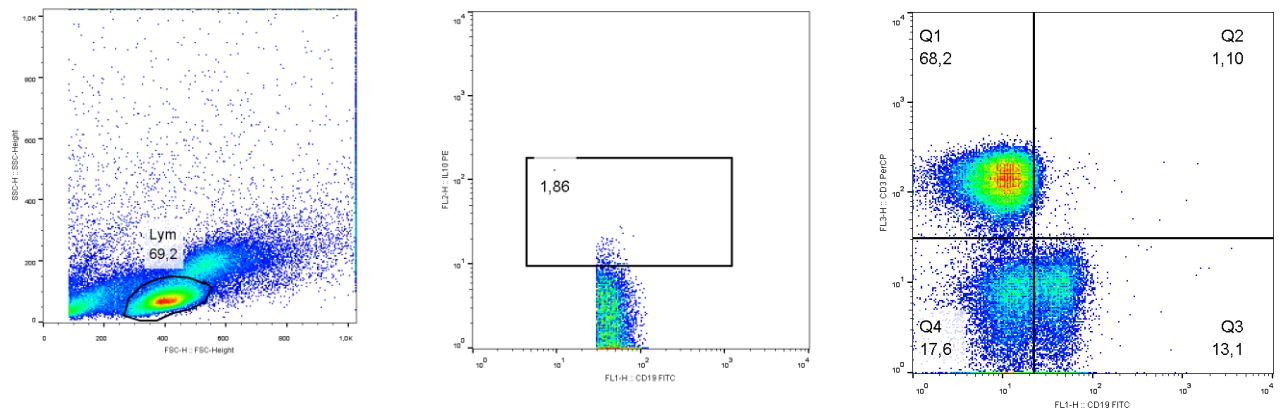
CD19⁺
N1- RPMI



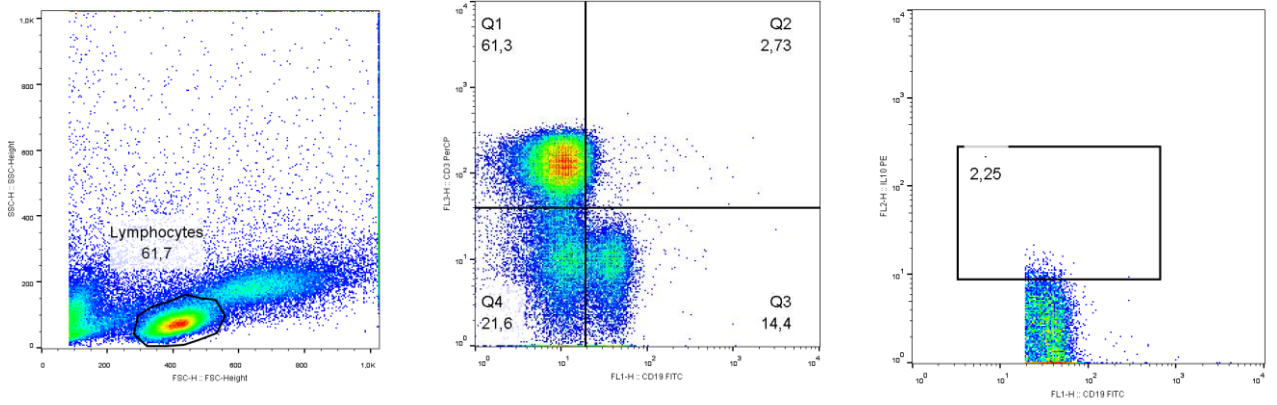
N1- Con-A



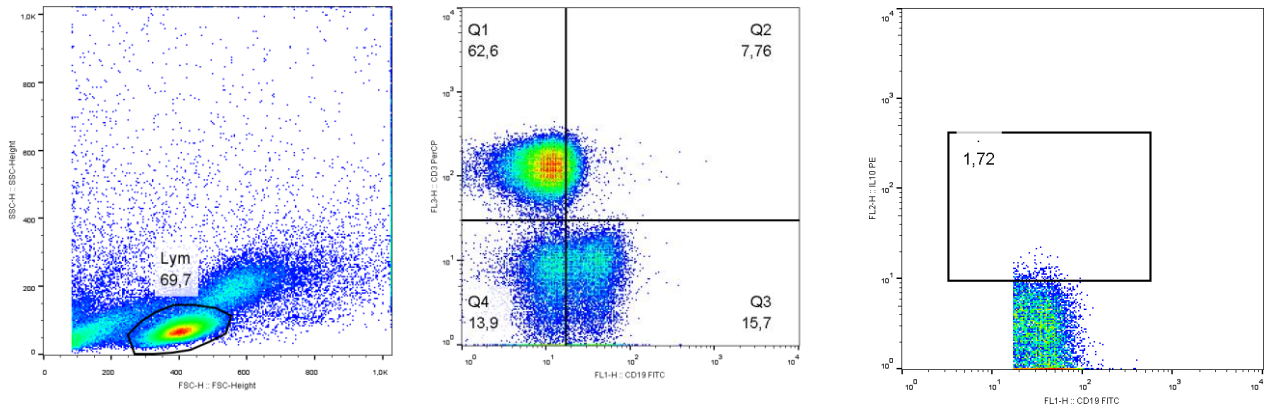
N1 - LPS



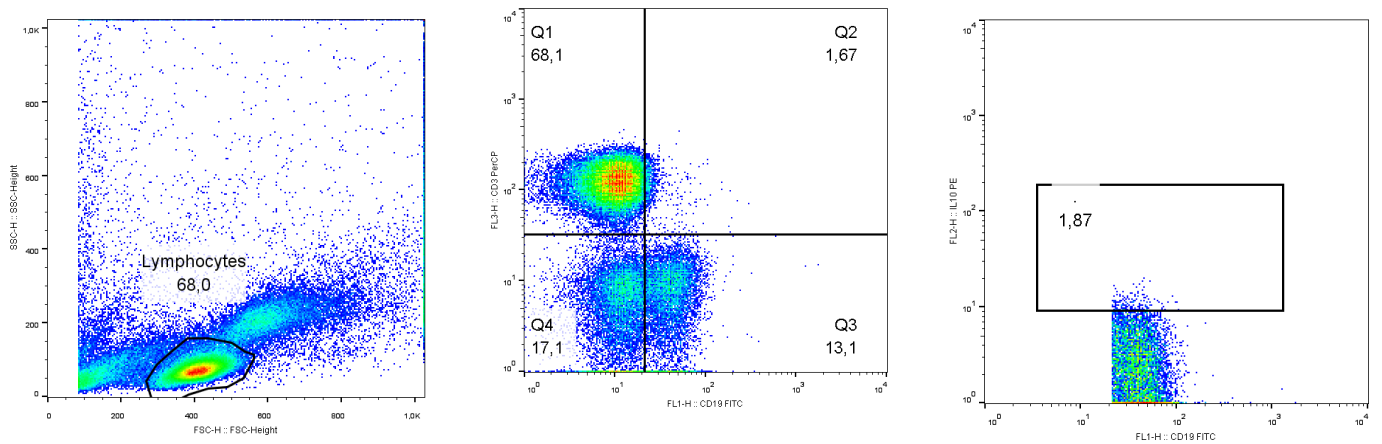
N1 – PMA



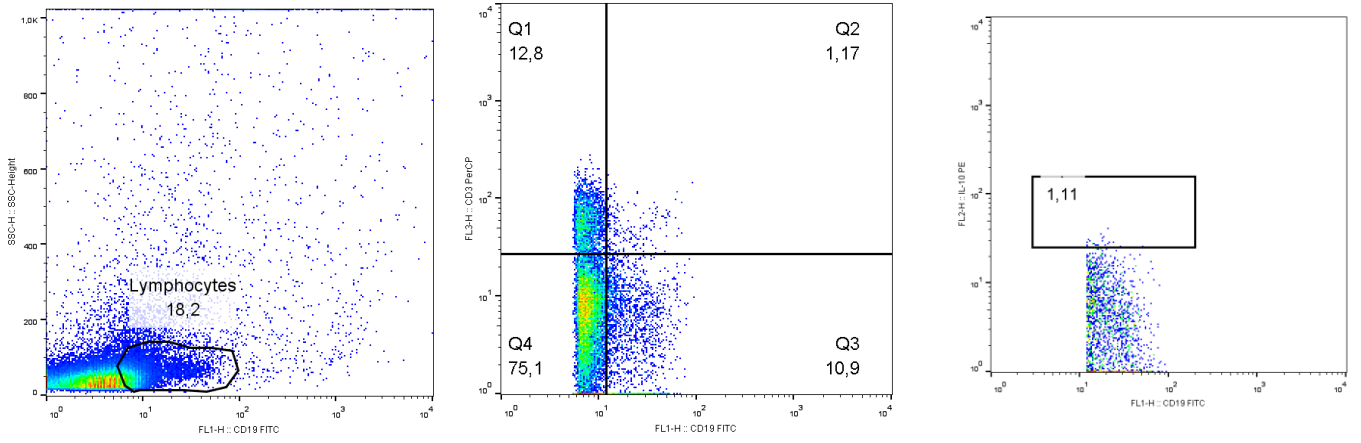
N1 - BjuL 5 µg/mL



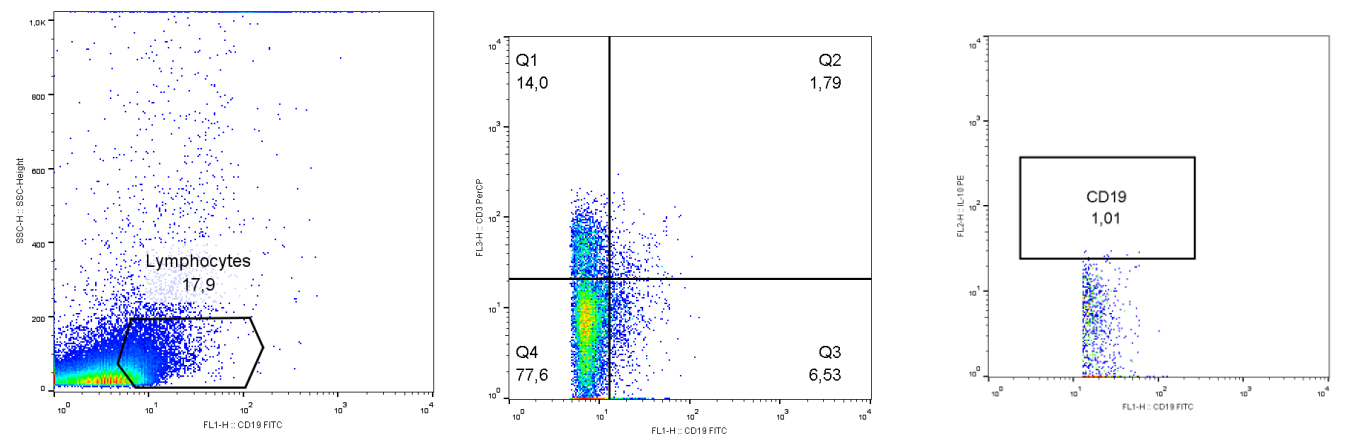
N1 - BjuL 10 µg/mL



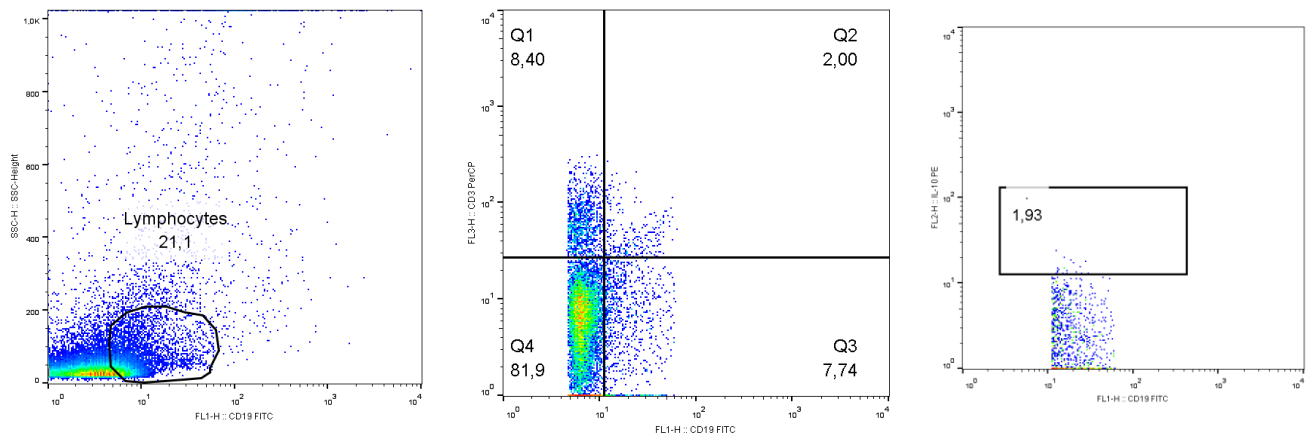
N2 - RPMI



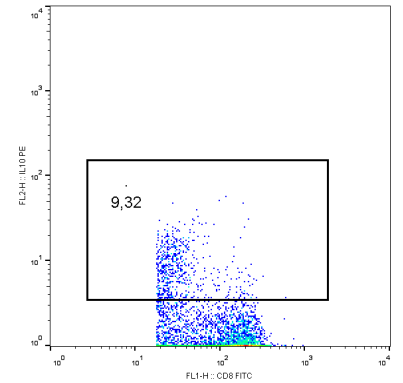
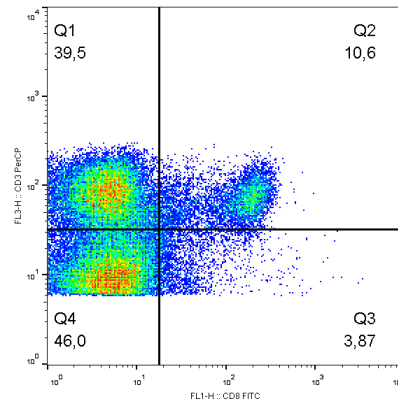
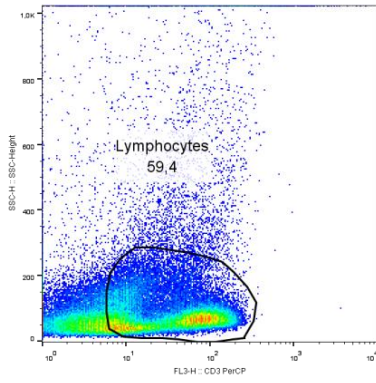
N2 - Con-A



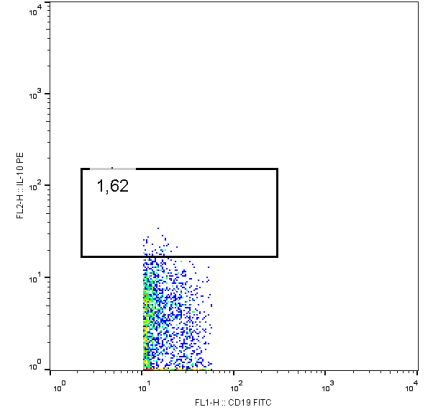
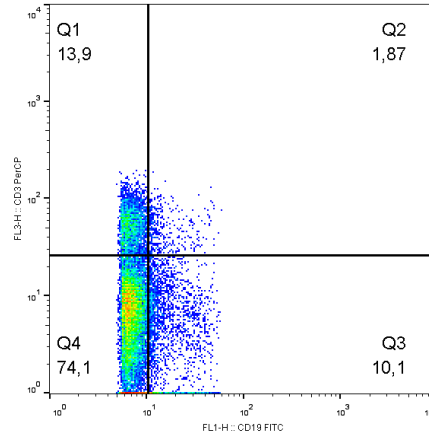
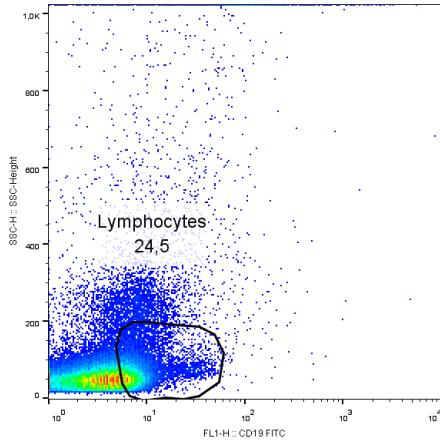
N2 - LPS



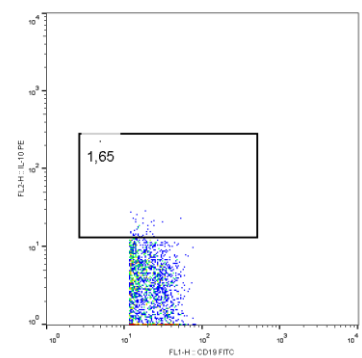
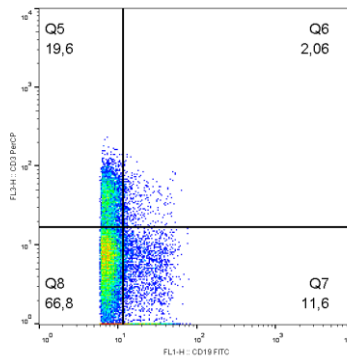
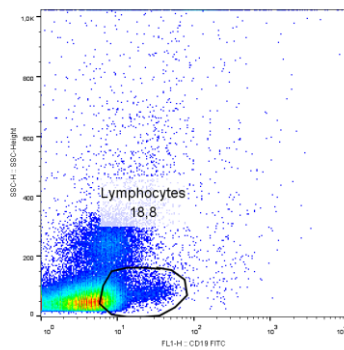
N2 – PMA



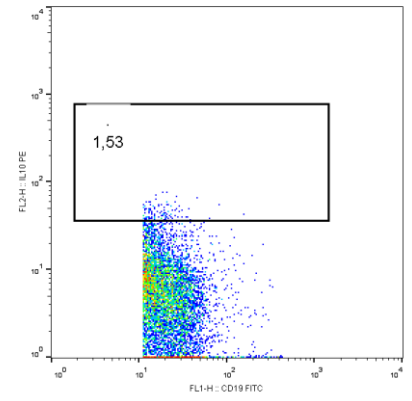
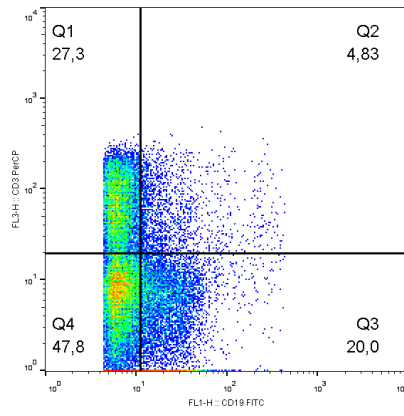
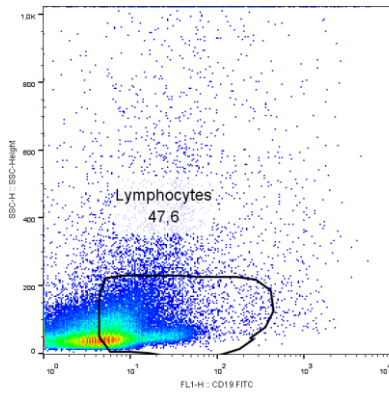
N2 - BjuL 5µg/mL



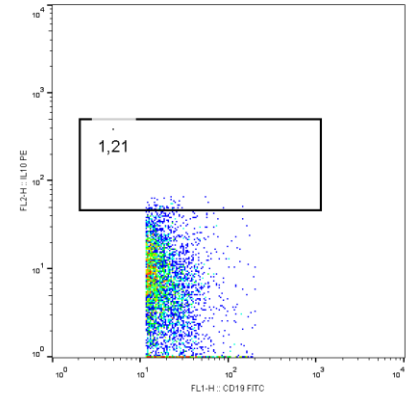
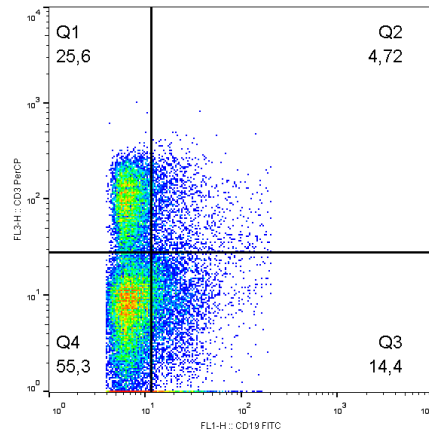
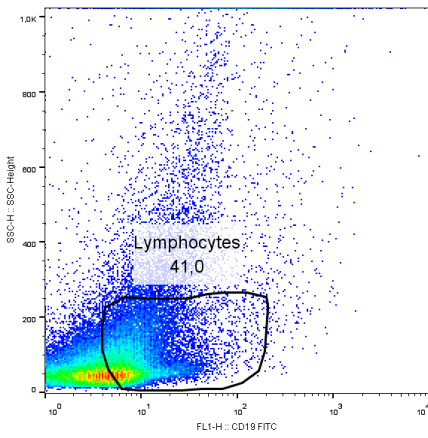
N2 - BjuL 10 µg/mL



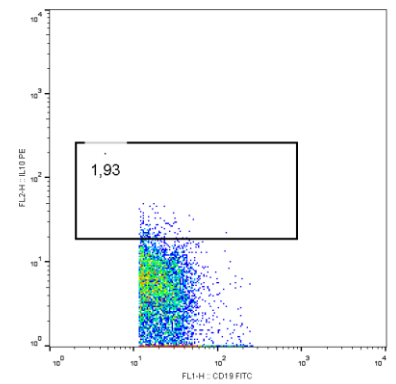
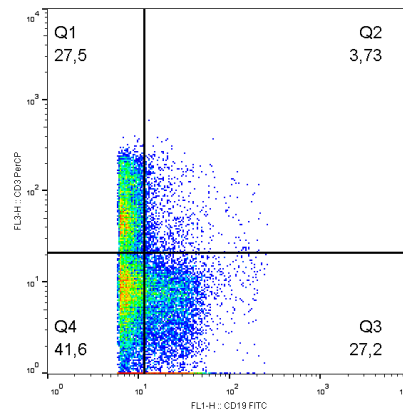
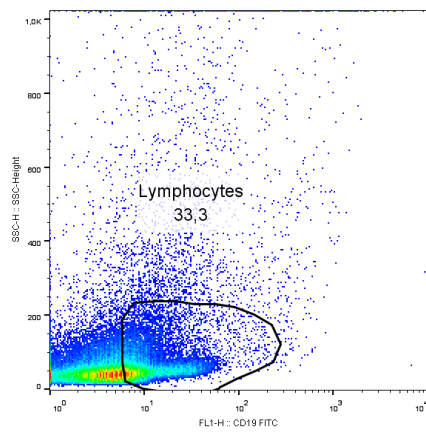
N3 - RPMI



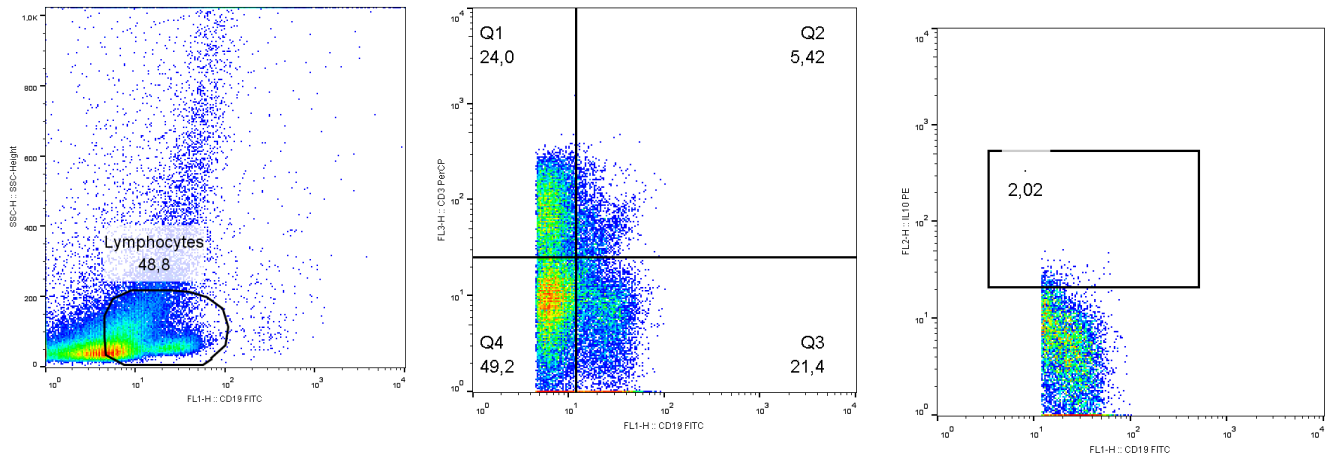
N3 - Con-A



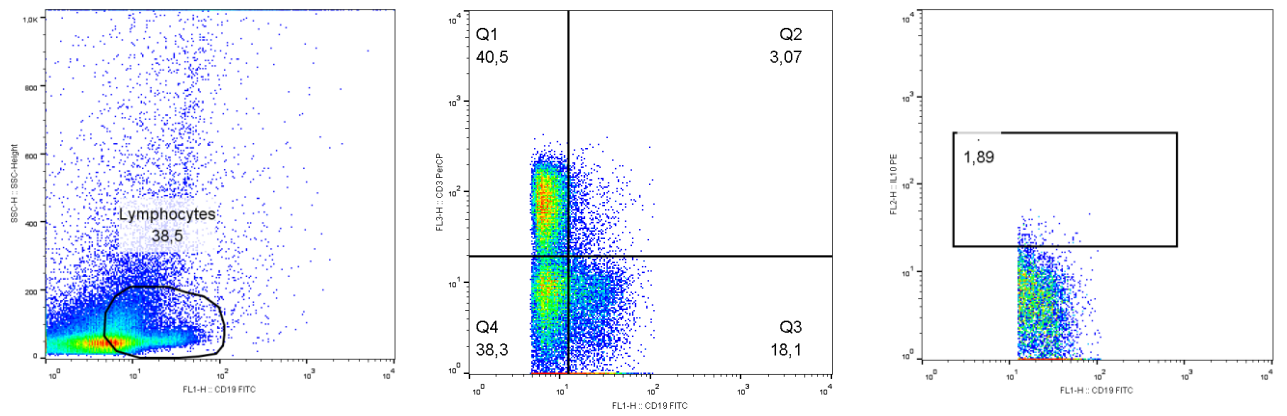
N3 - LPS



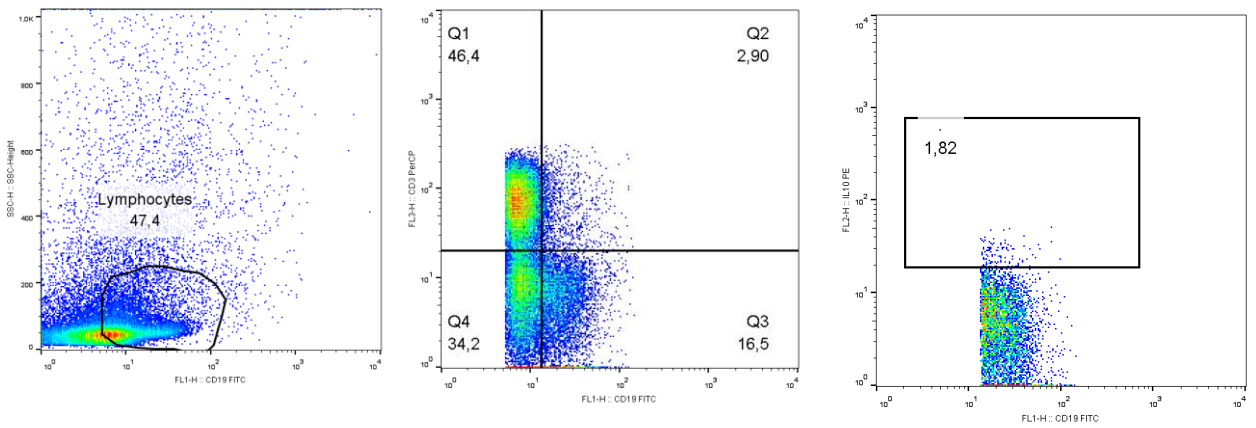
N3 - PMA



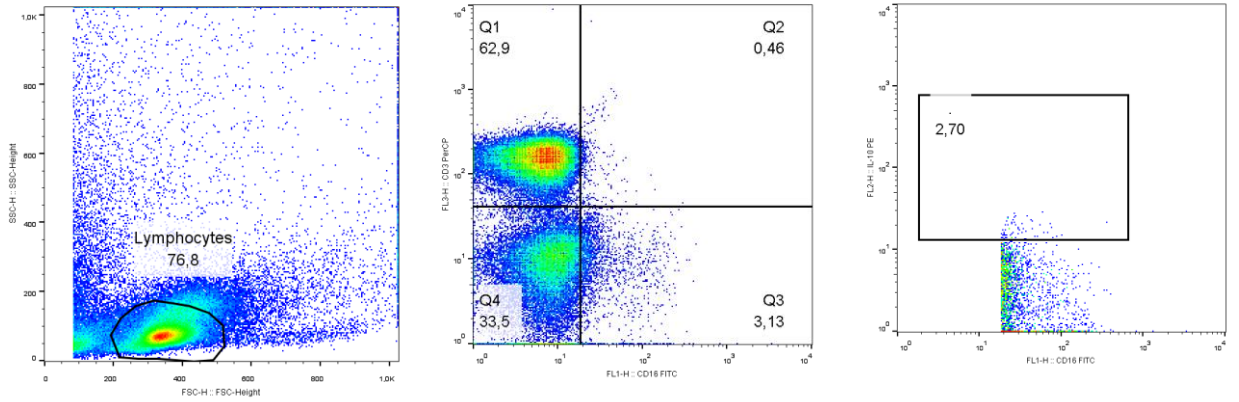
N3 - BjuL 5 µg/mL



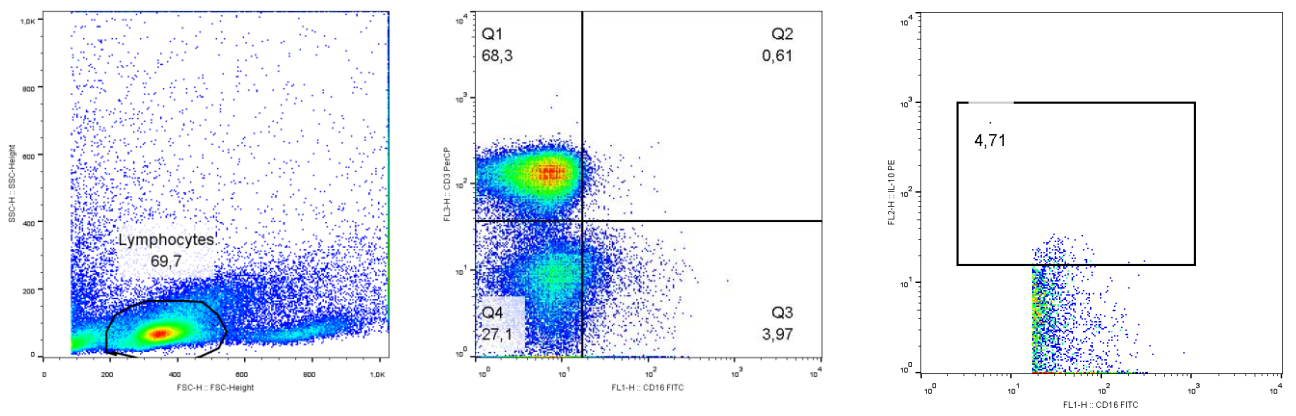
N3 - BjuL 10 µg/mL



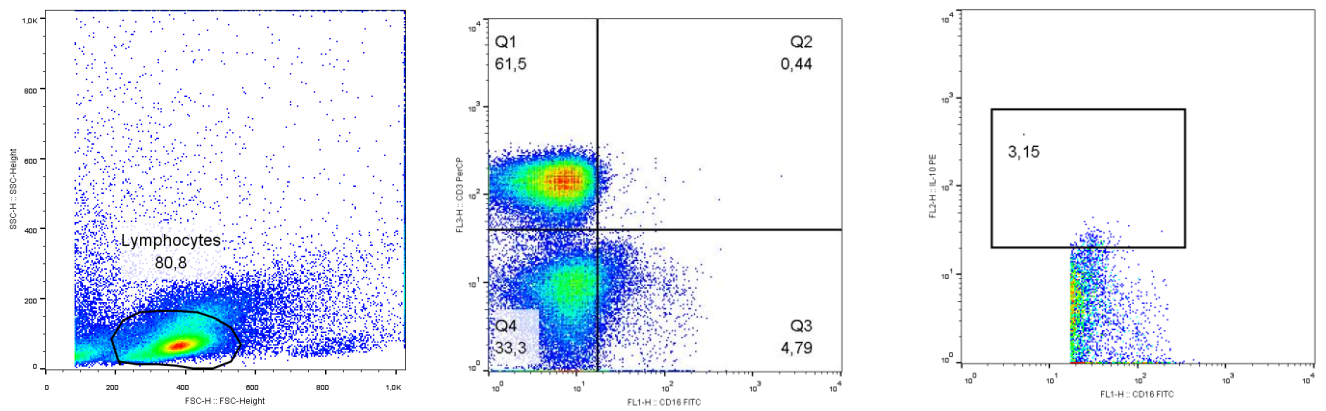
CD16⁺
N1- RPMI



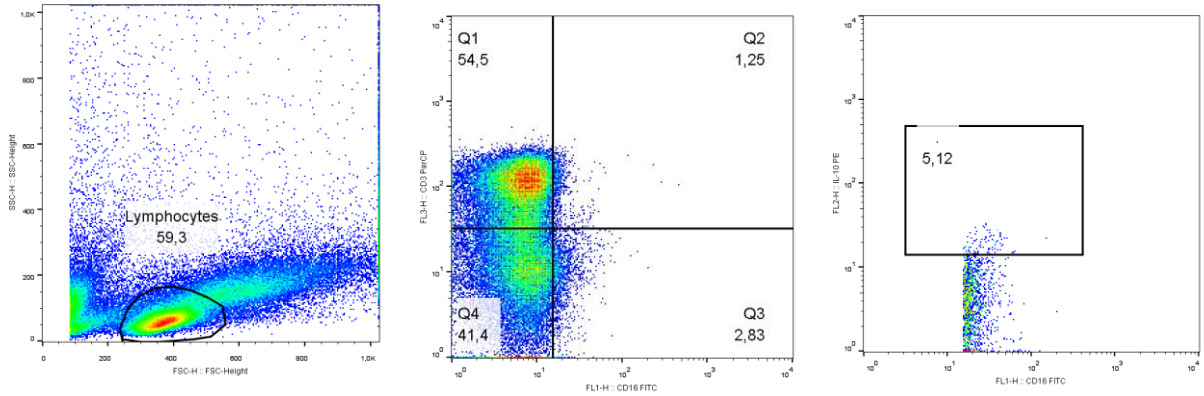
N1 – Con-A



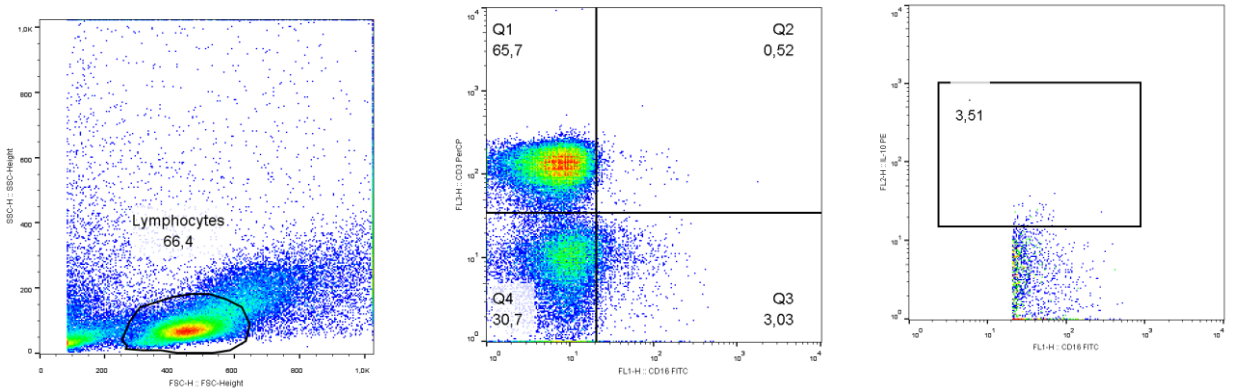
N1 – LPS



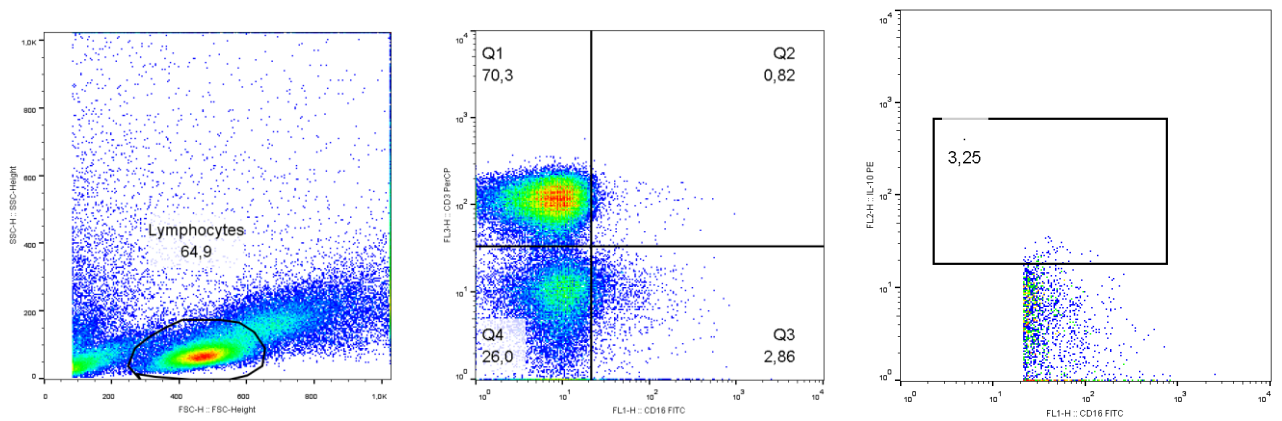
N1 - PMA



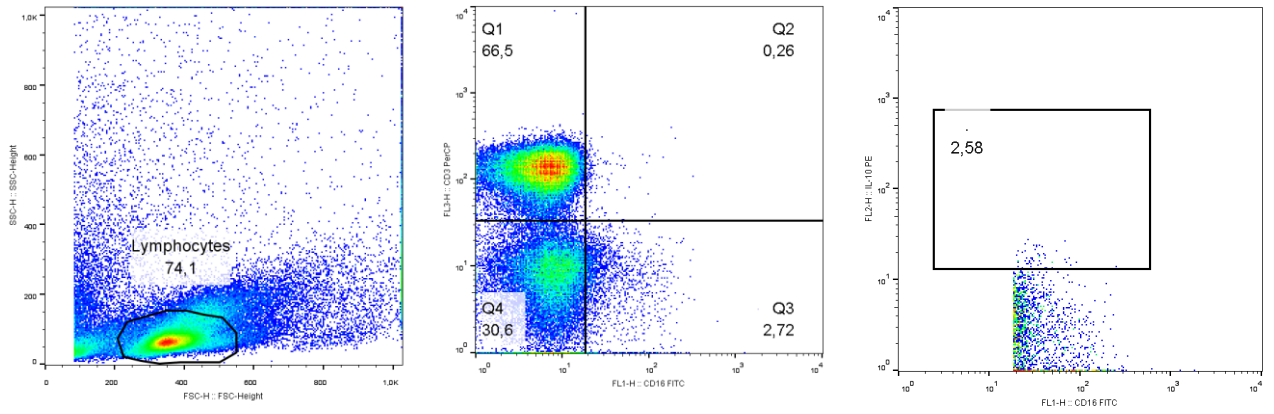
N1 - BjuL 5 µg/mL



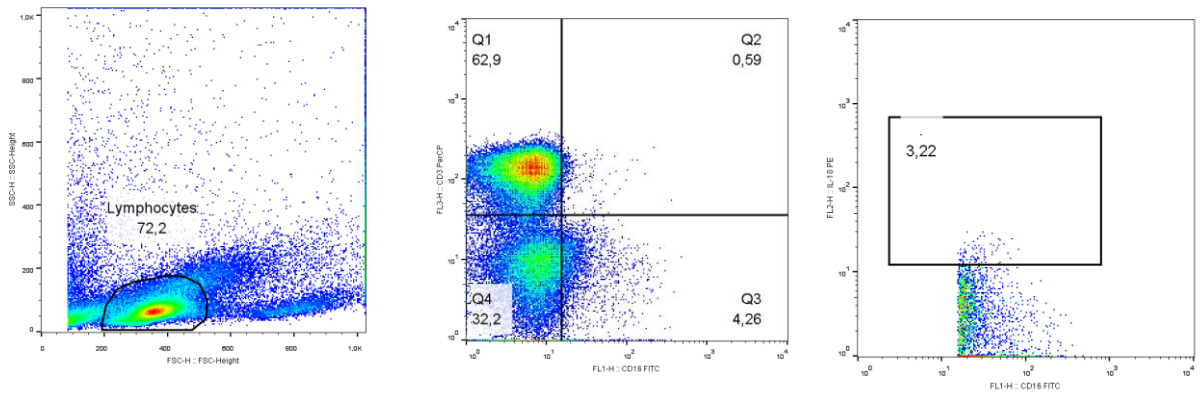
N1 - BjuL 10 µg/mL



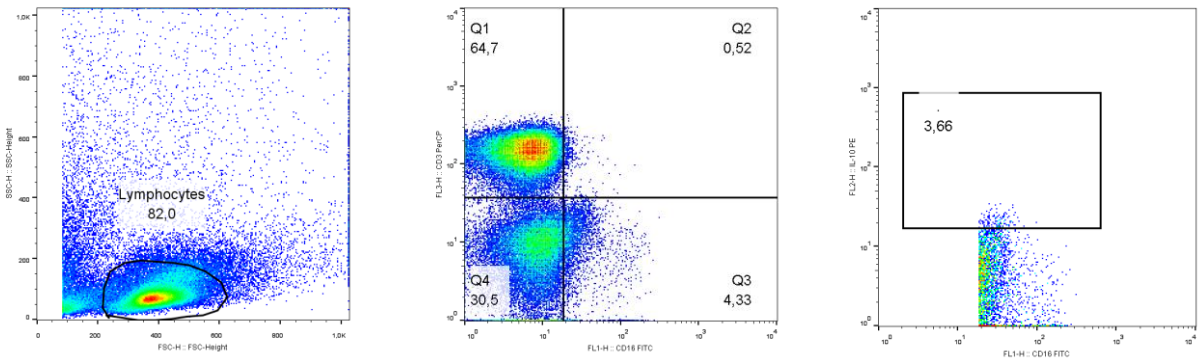
N2 - RPMI



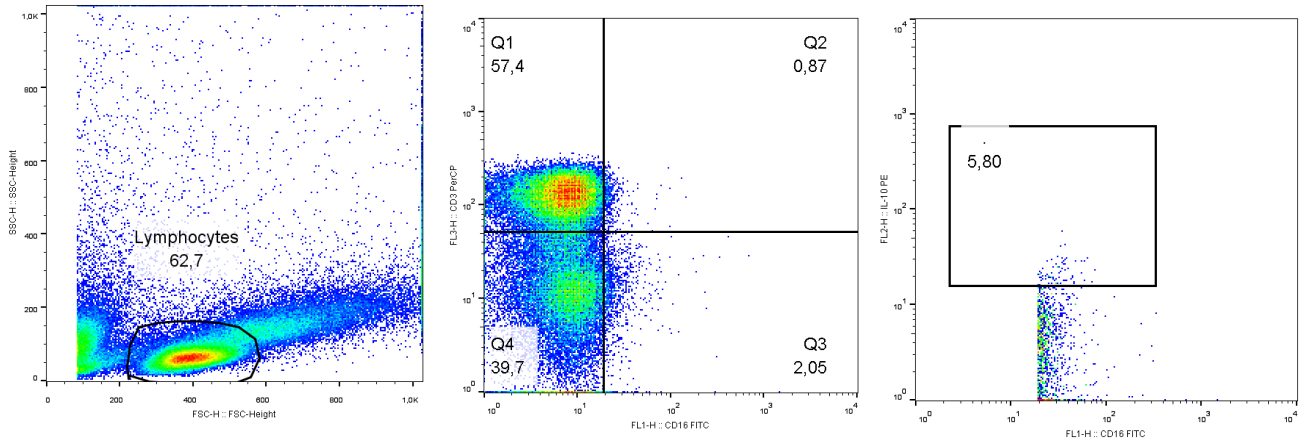
N2 - Con-A



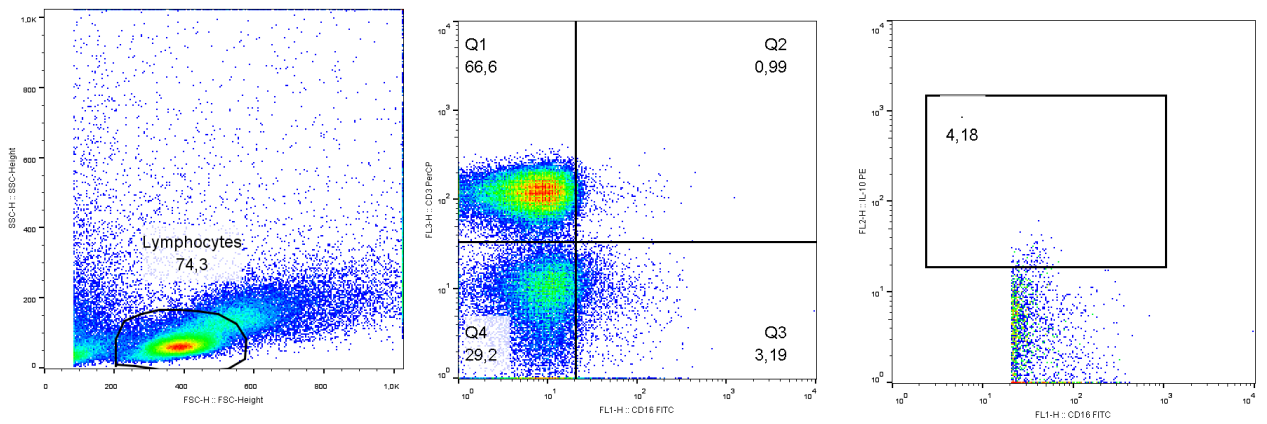
N2 - LPS



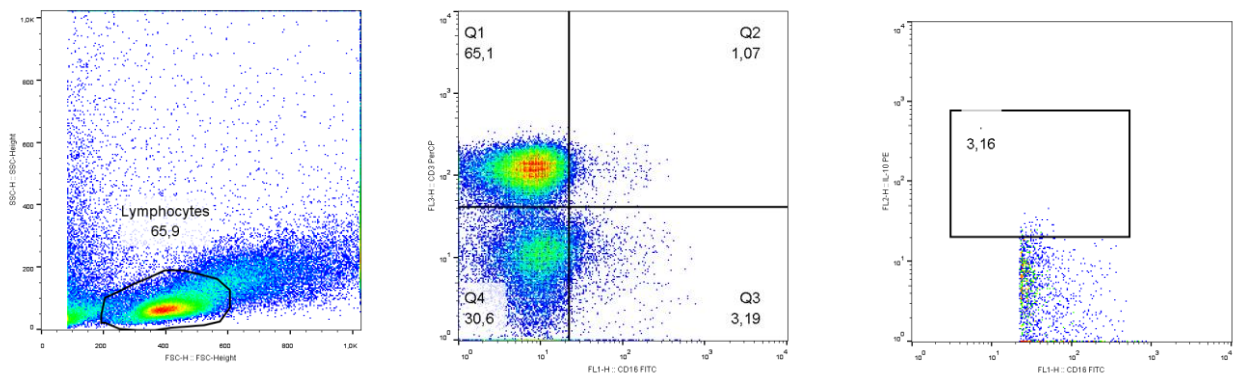
N2 - PMA



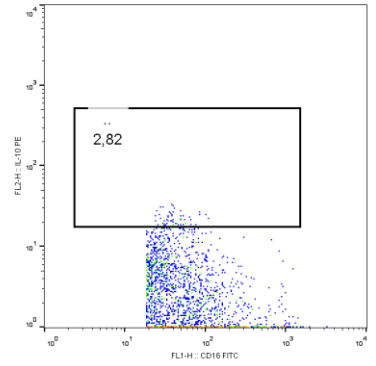
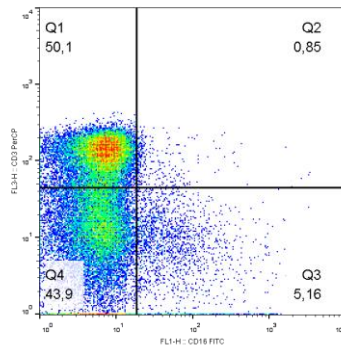
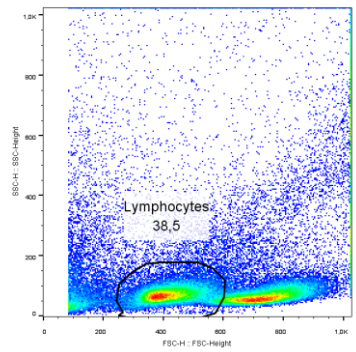
N2 - BjuL 5 µg/mL



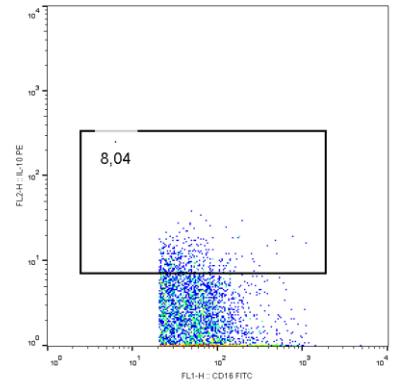
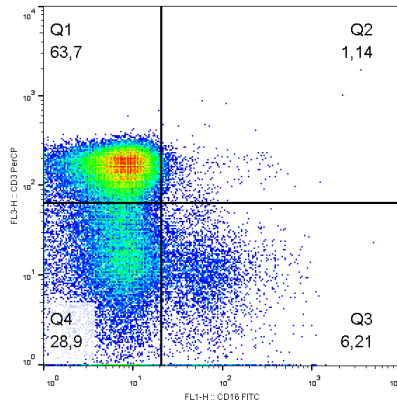
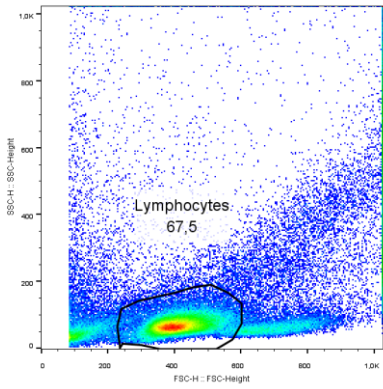
N2 - BjuL 10 µg/mL



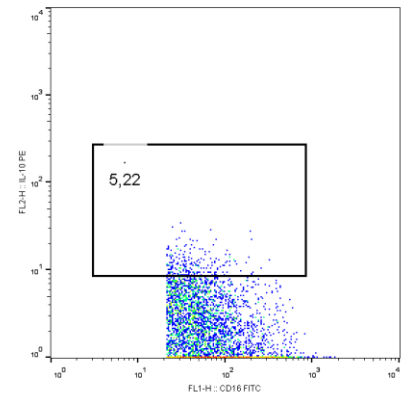
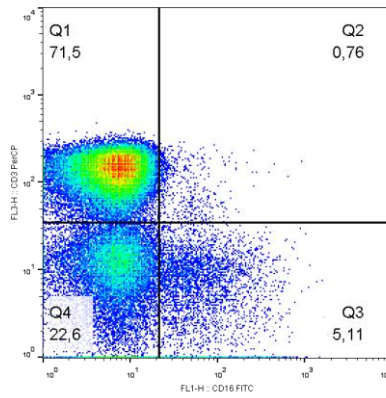
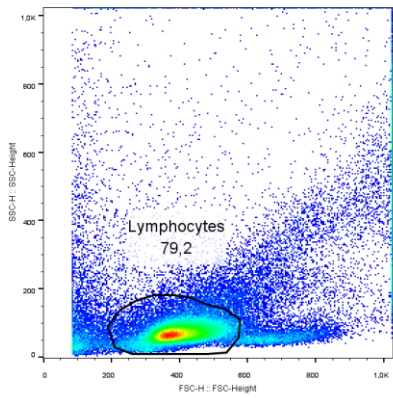
N3 – RPMI



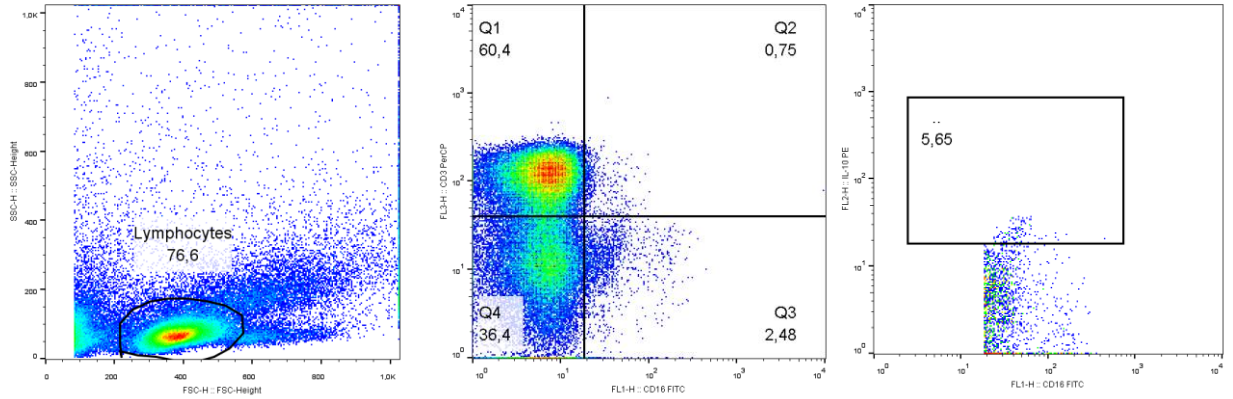
N3 – Con-A



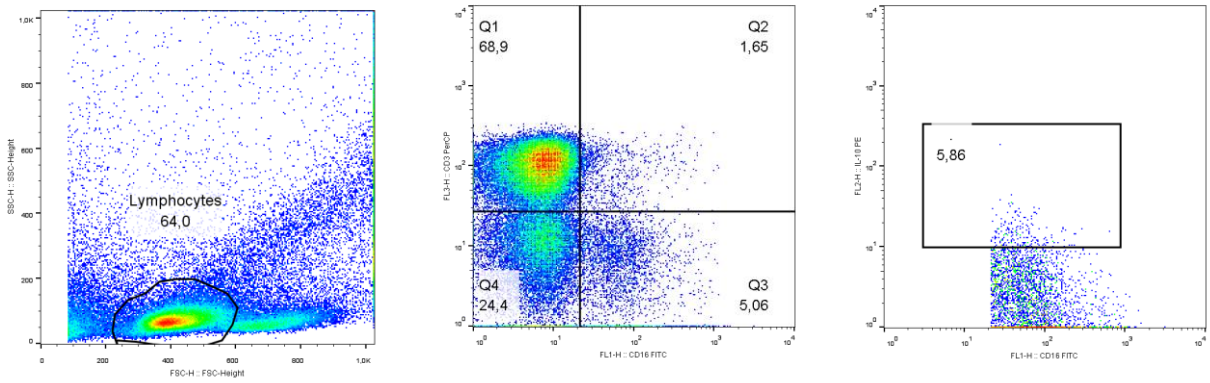
N3 - LPS



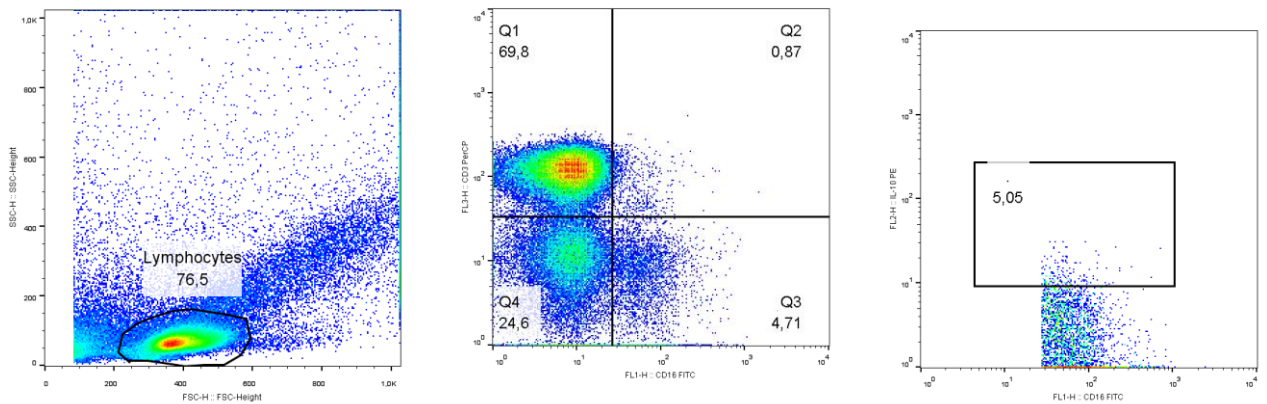
N3 - PMA



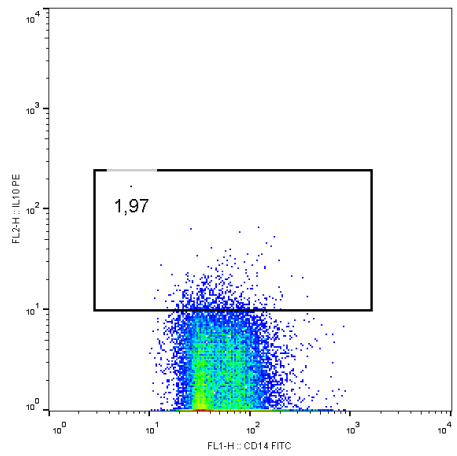
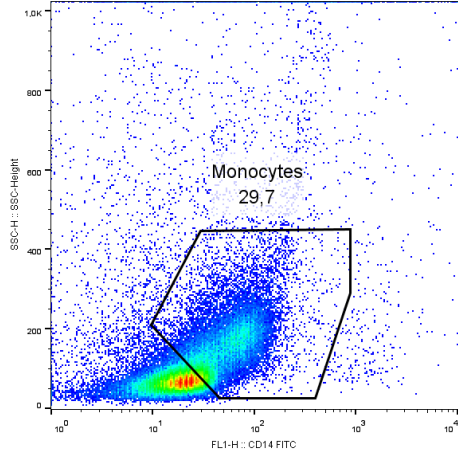
N3 - BjuL 5 µg/mL



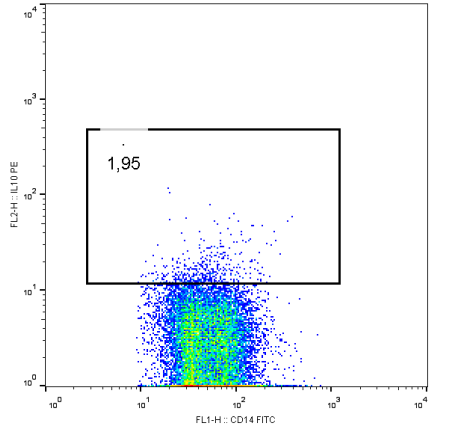
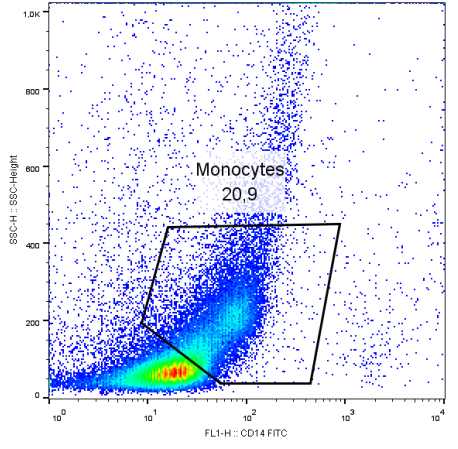
N3 - BjuL 10 µg/mL



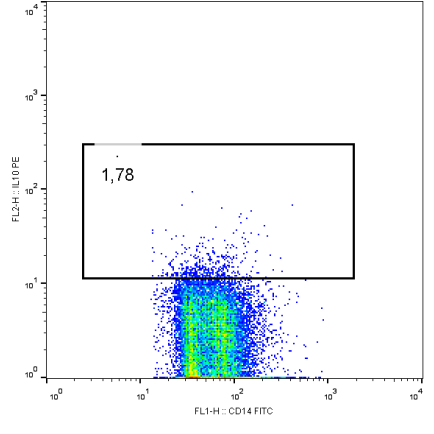
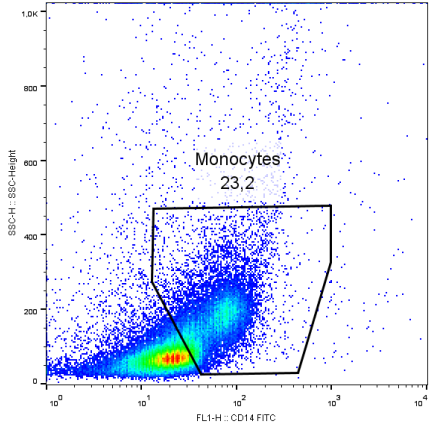
CD14⁺
N1- RPMI



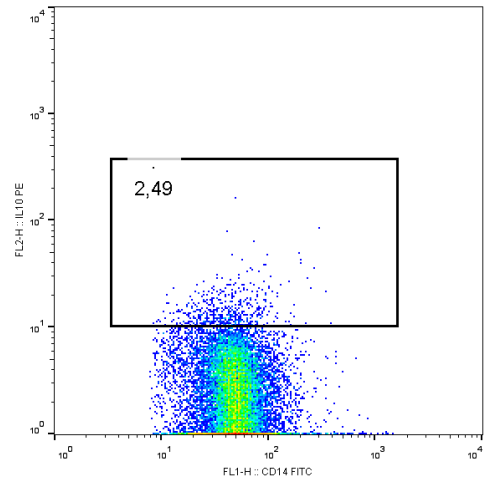
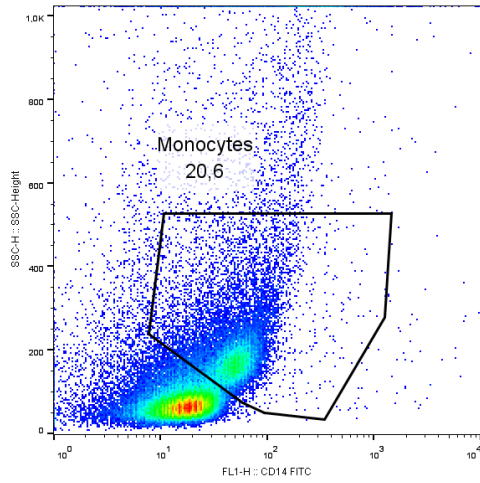
N1 - Con-A



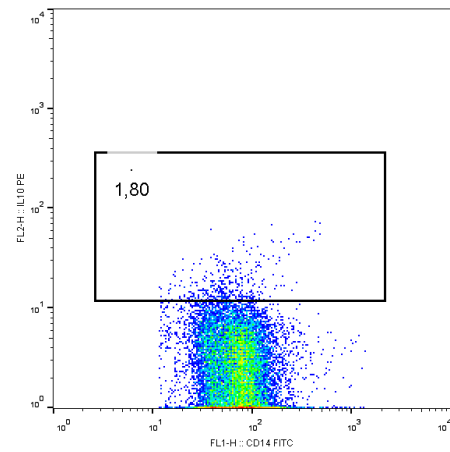
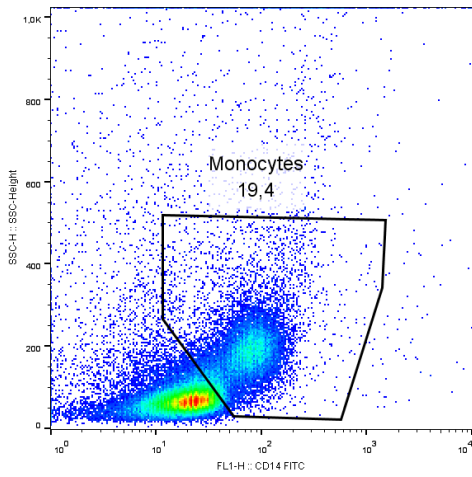
N1 - LPS



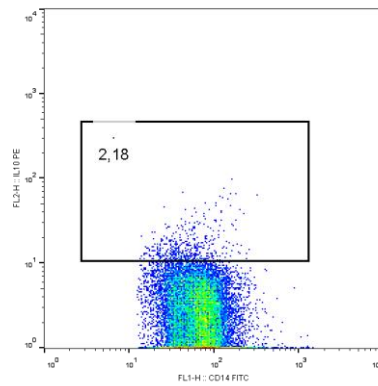
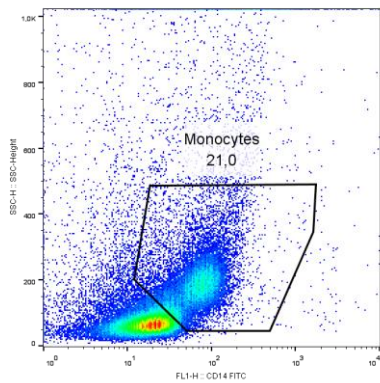
N1 - PMA



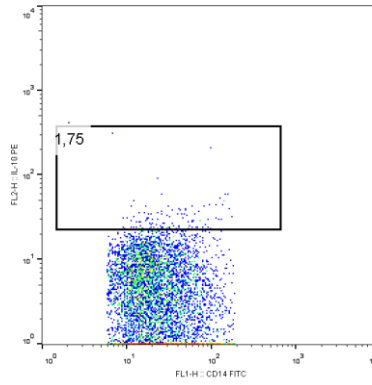
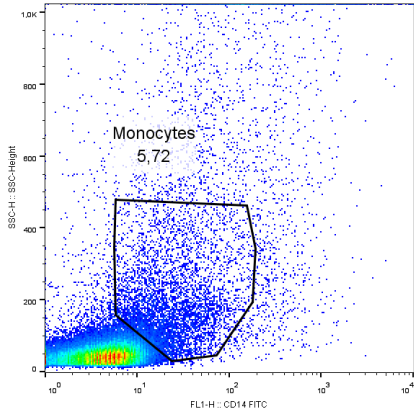
N1 - BjuL 5 µg/mL



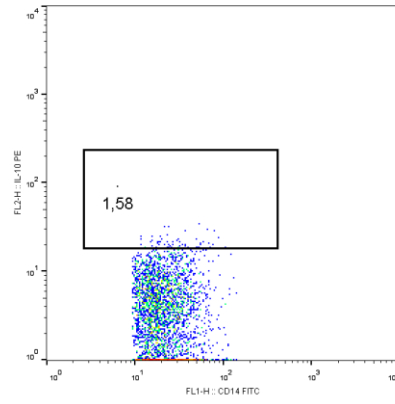
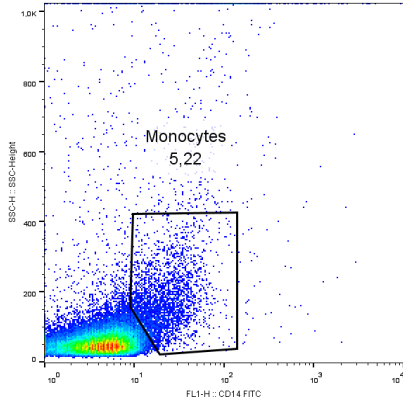
N1 - BjuL 10 µg/mL



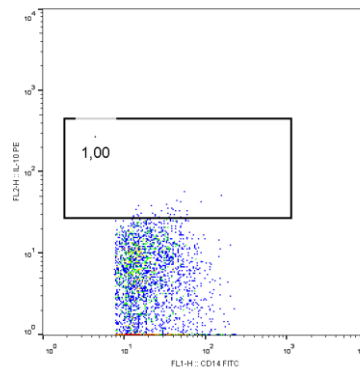
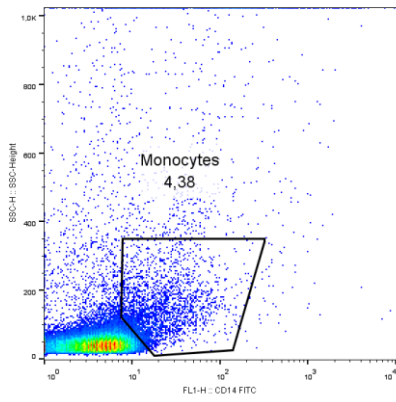
N2 – RPMI



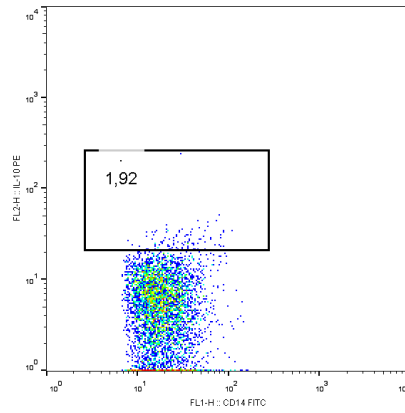
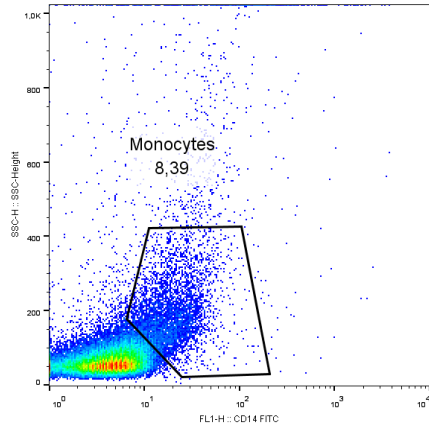
N2 – Con-A



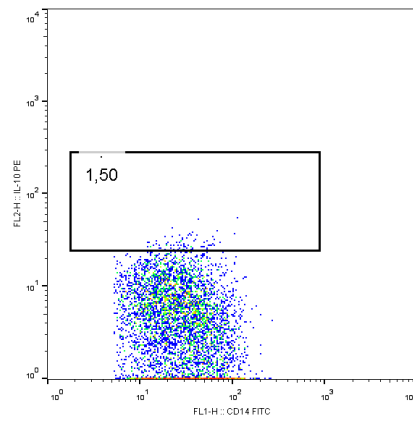
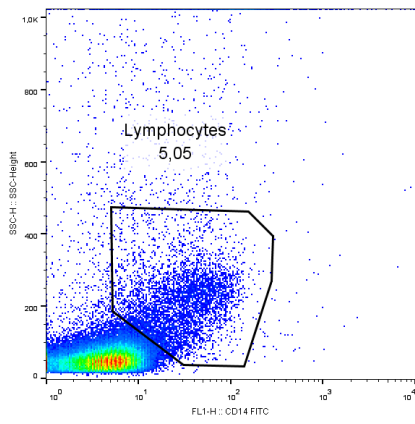
N2 - LPS



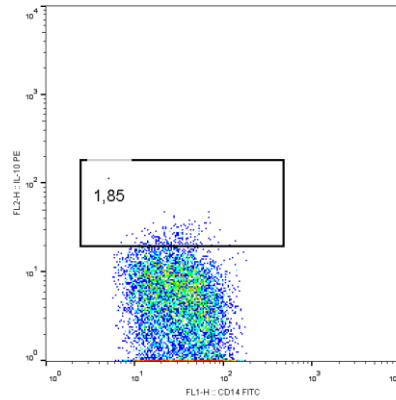
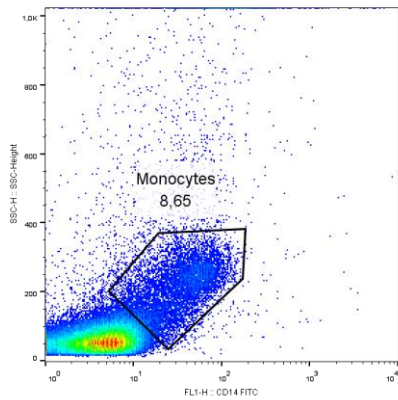
N2- PMA



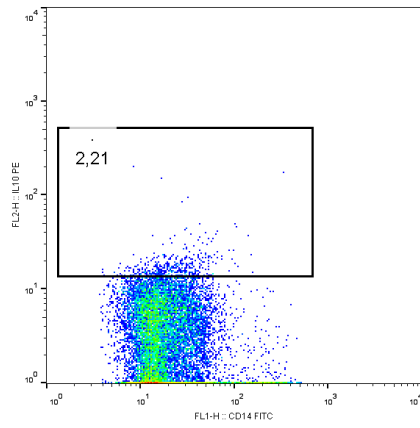
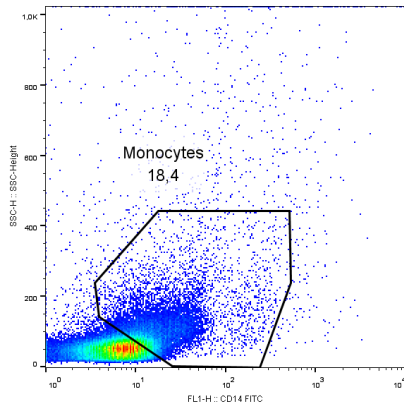
N2 - BjuL 5 µg/mL



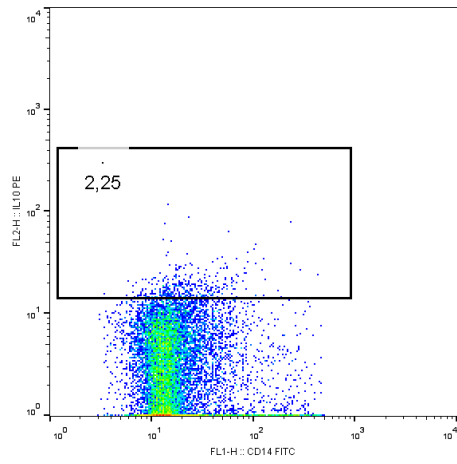
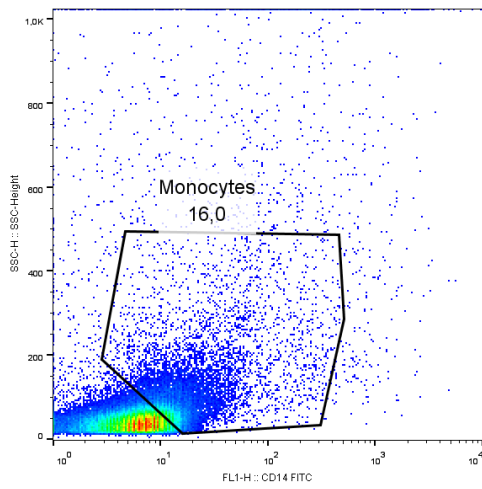
N2 - BjuL 10 µg/mL



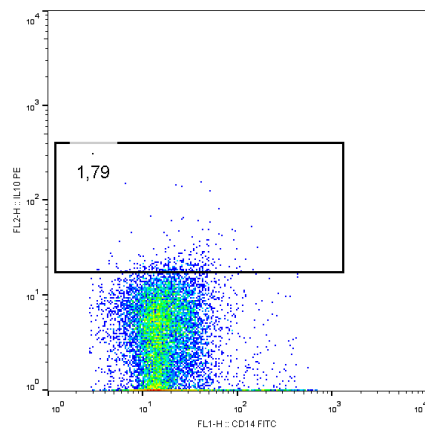
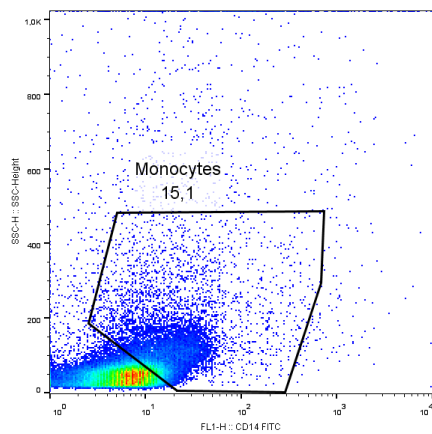
N3 - RPMI



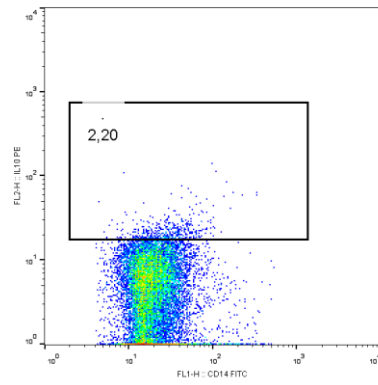
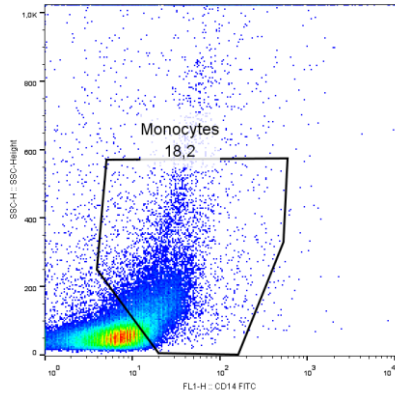
N3 - Con-A



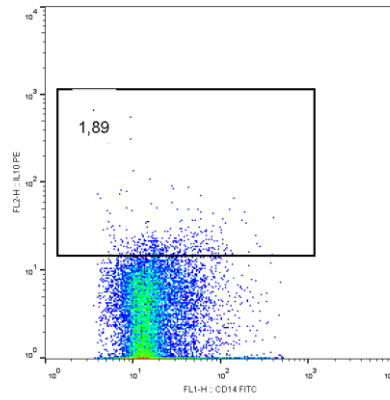
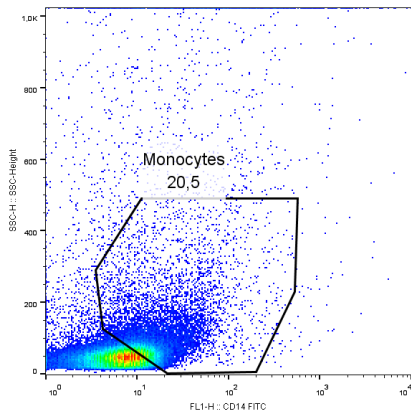
N3 - LPS



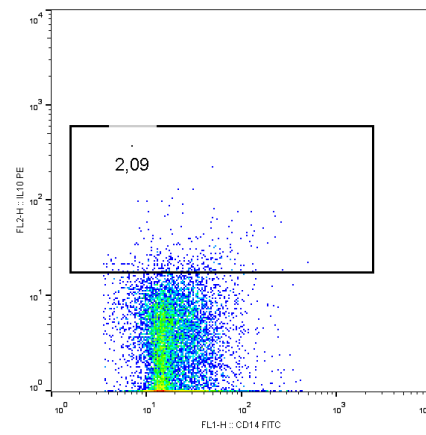
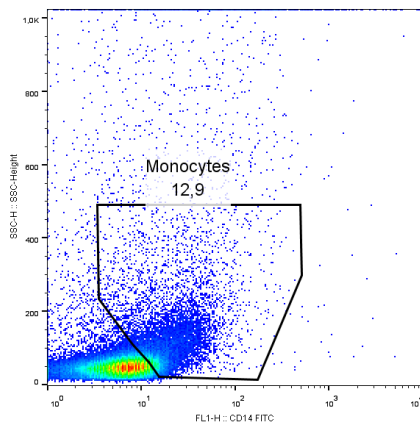
N3 - PMA -



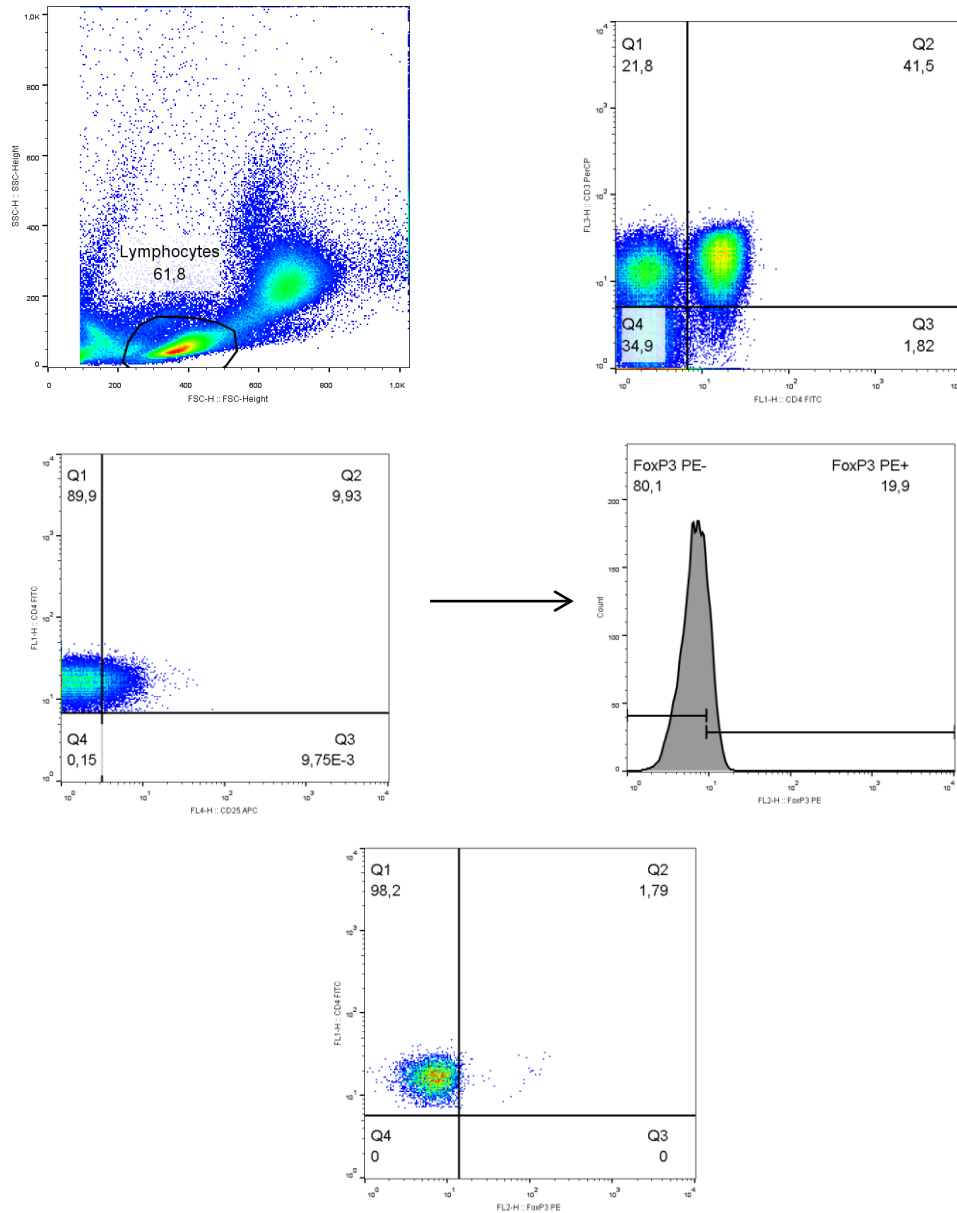
N3 - BjuL 5 µg/mL



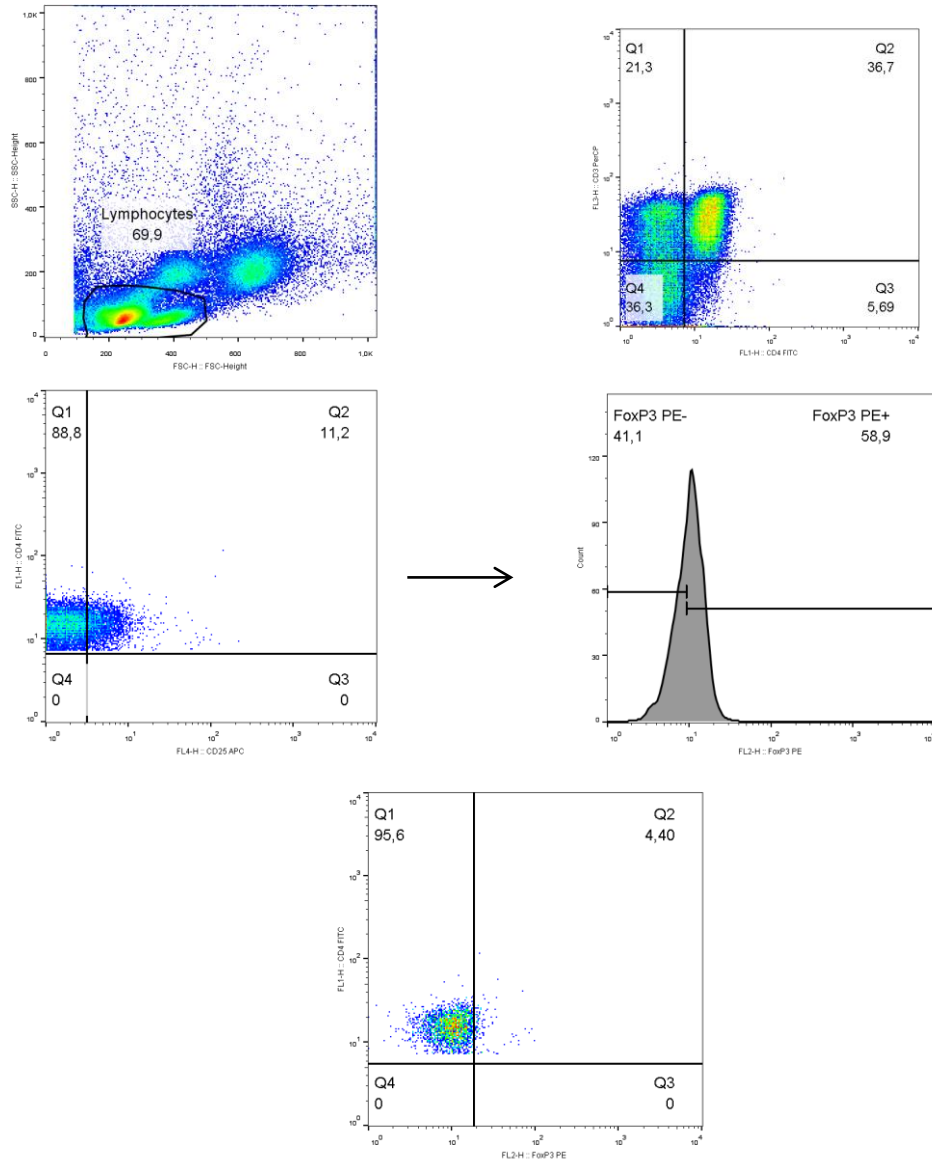
N3 - BjuL 10 µg/mL



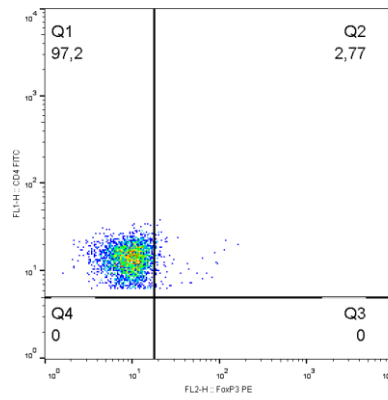
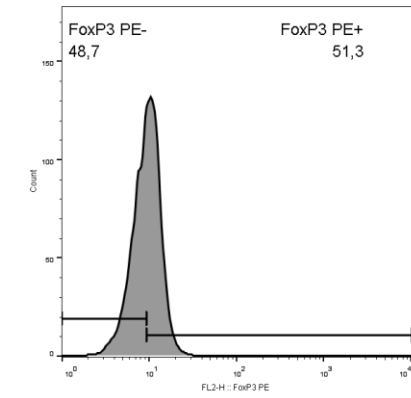
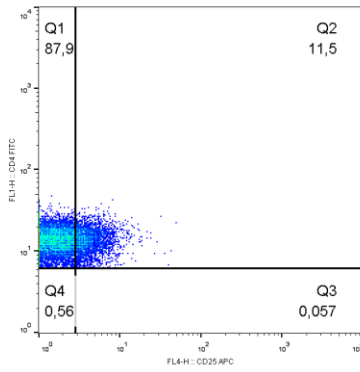
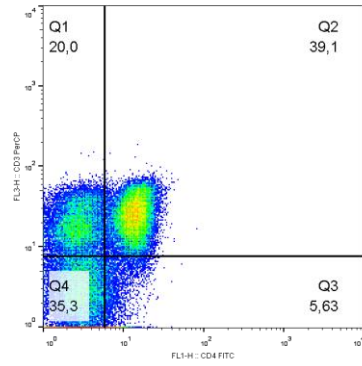
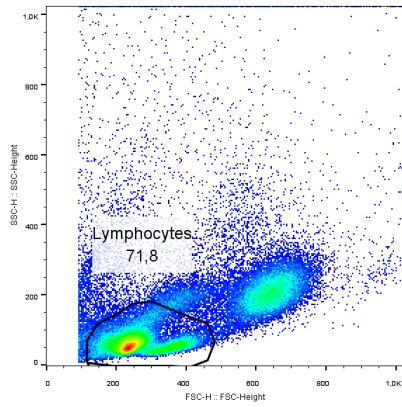
8.9 - Dot plots da marcação do fator de transcrição FoxP3⁺ por citometria de fluxo N1 - RPMI



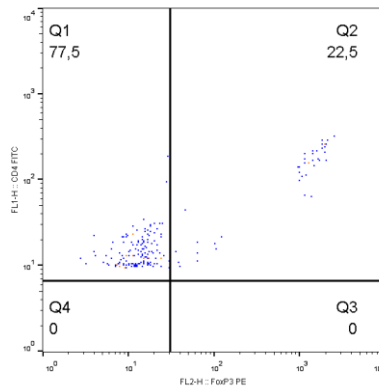
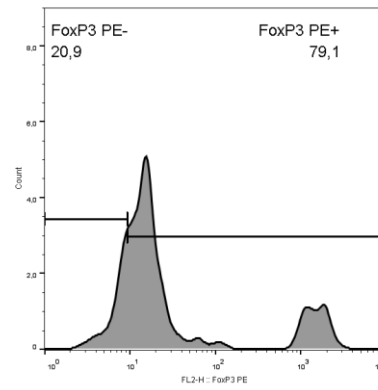
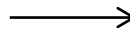
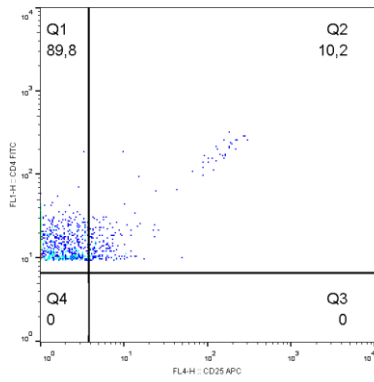
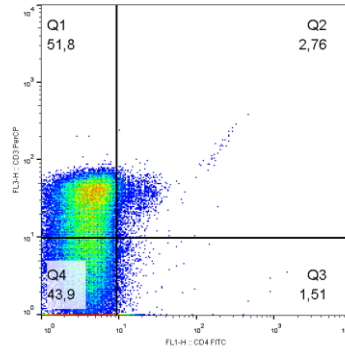
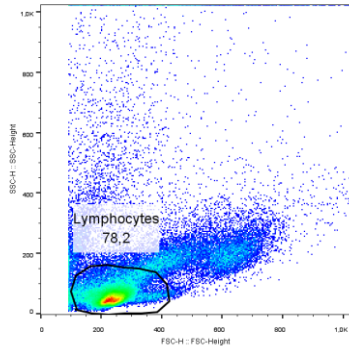
N1 – Con-A



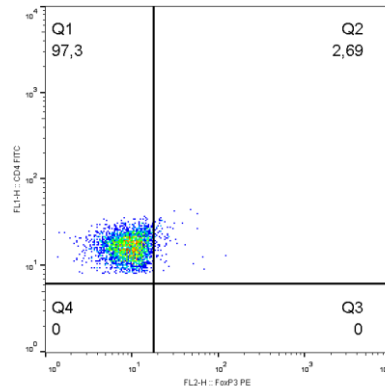
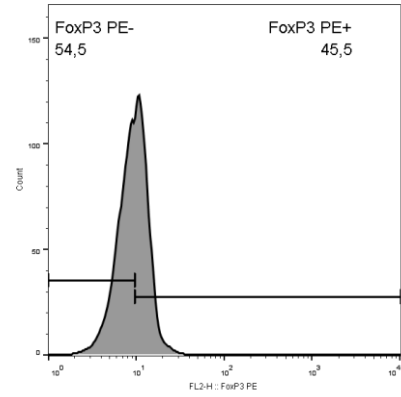
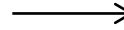
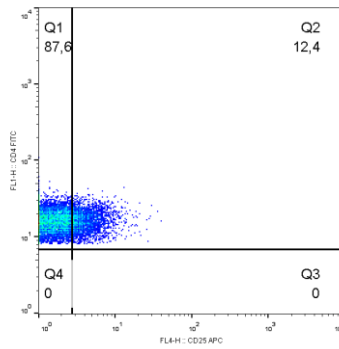
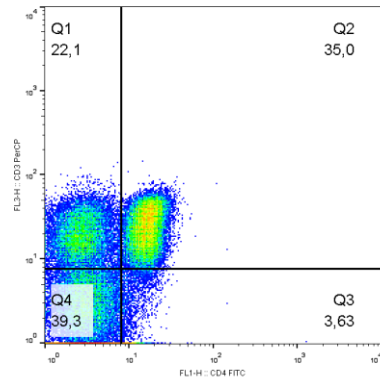
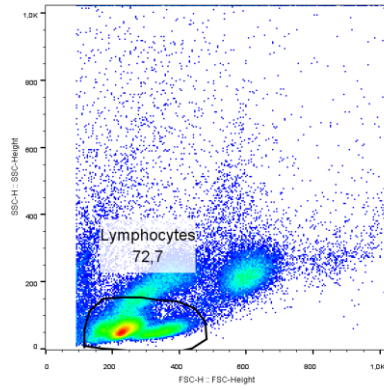
N1 – LPS



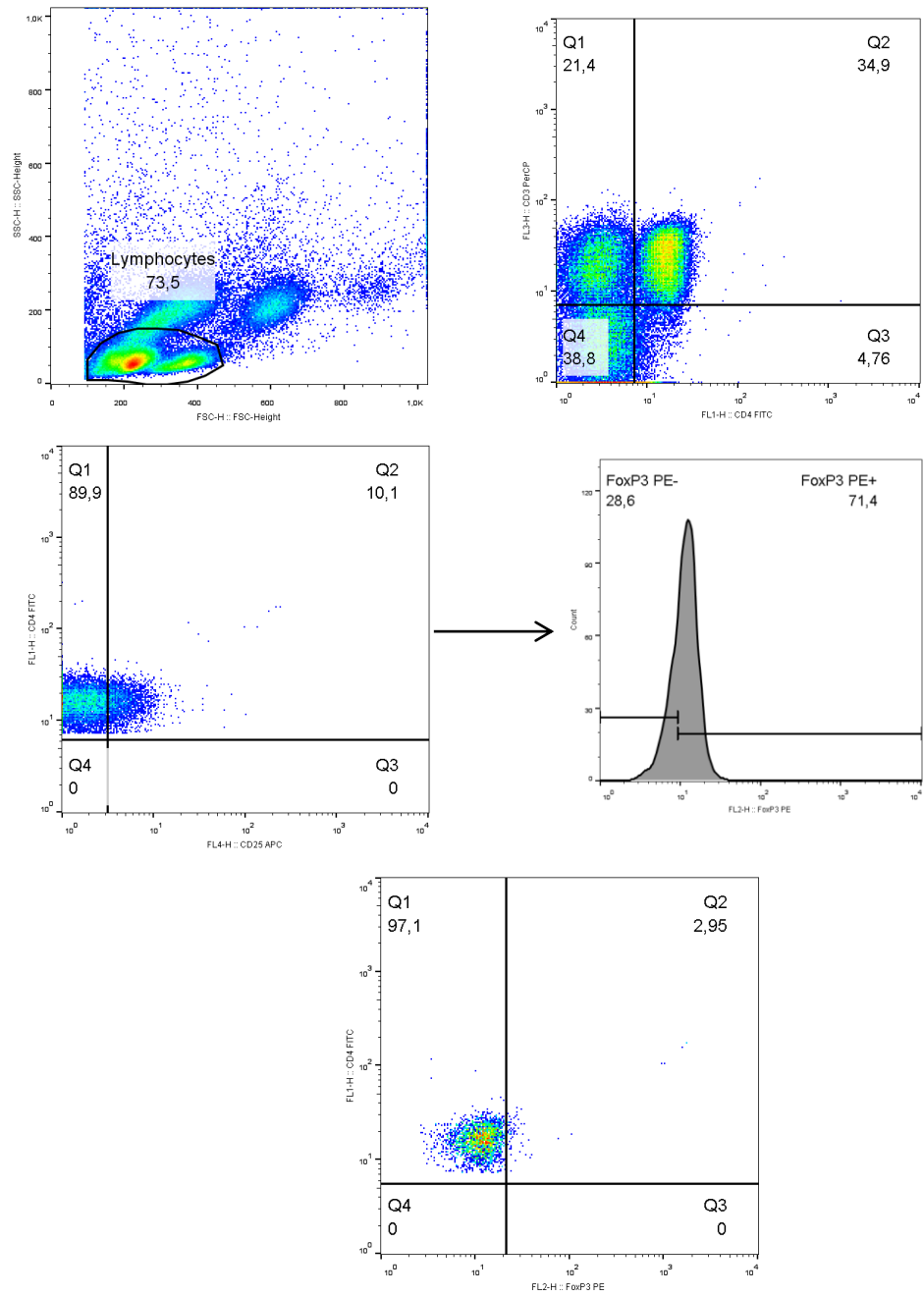
N1 - PMA



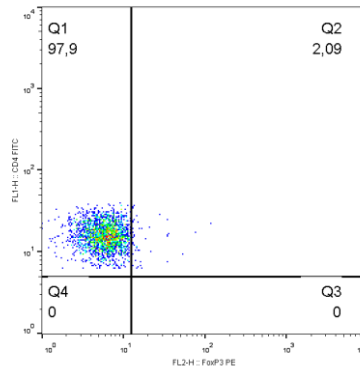
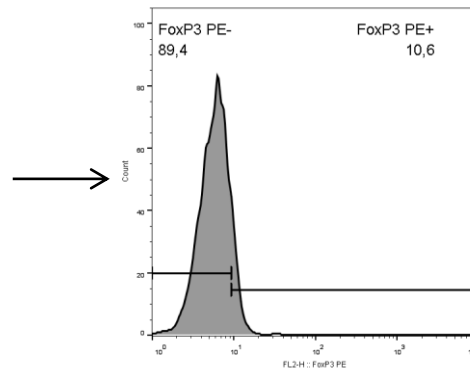
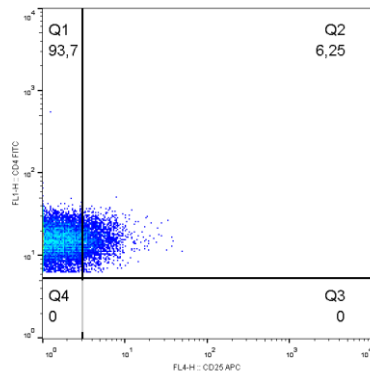
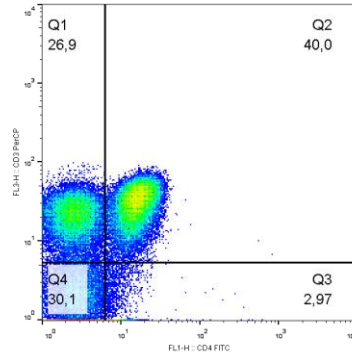
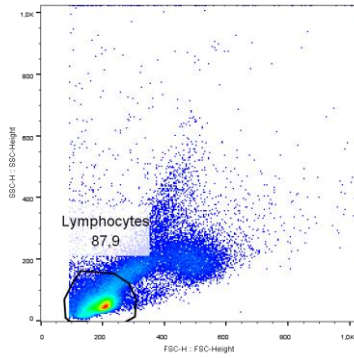
N1 - BjuL 5 µg/mL



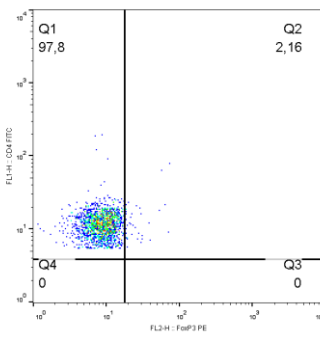
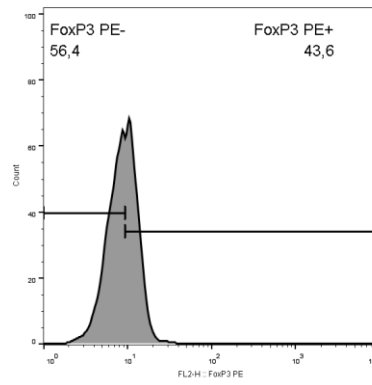
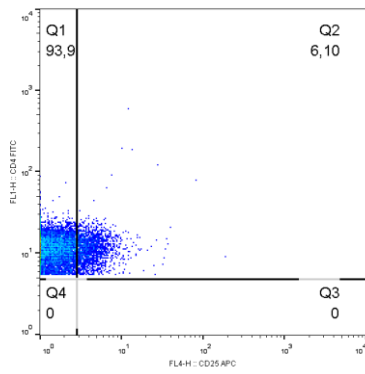
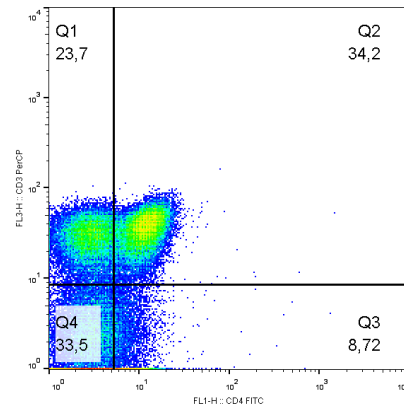
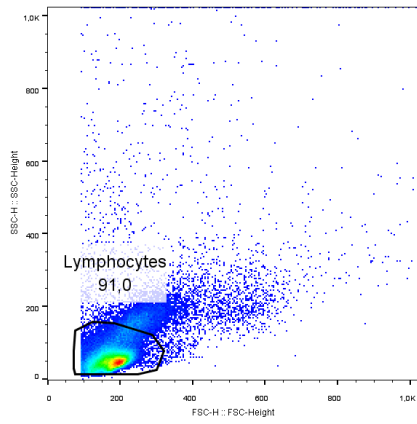
N1 - BjuL 10 µg/mL



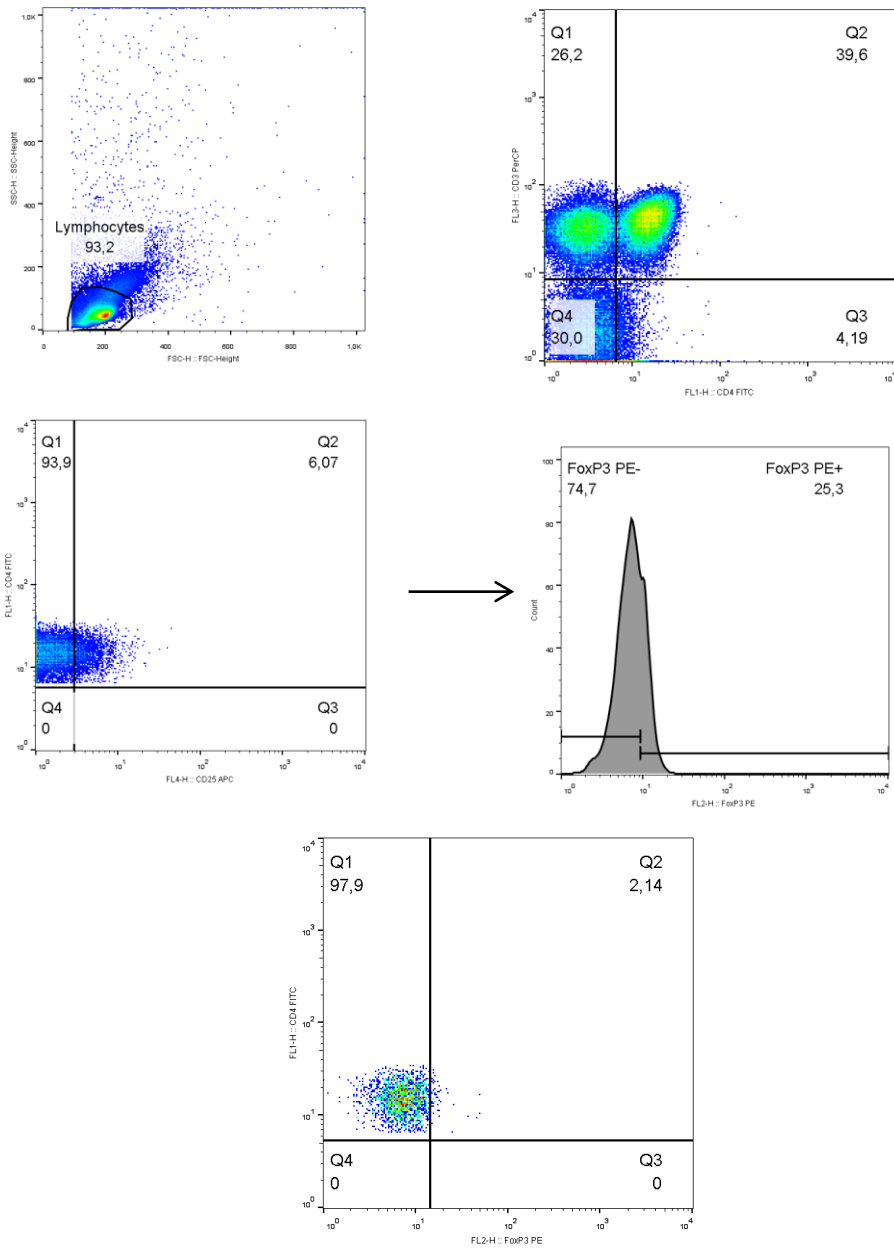
N2 – RPMI



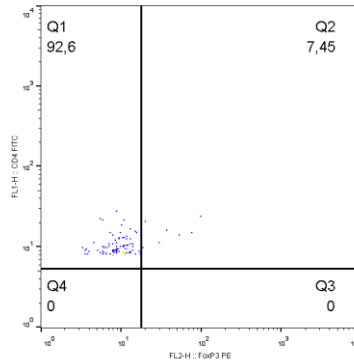
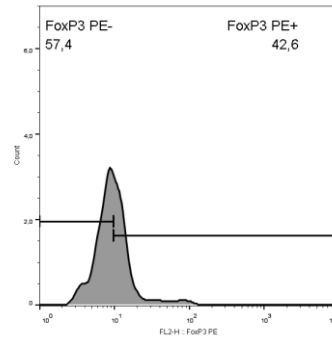
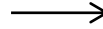
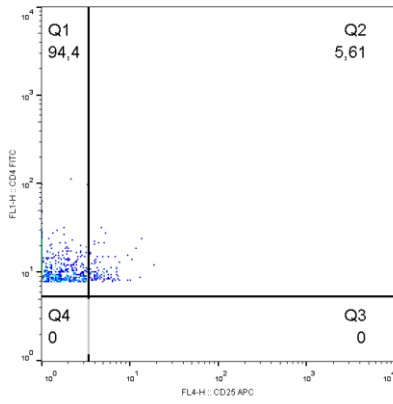
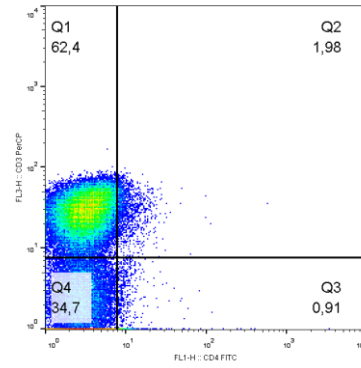
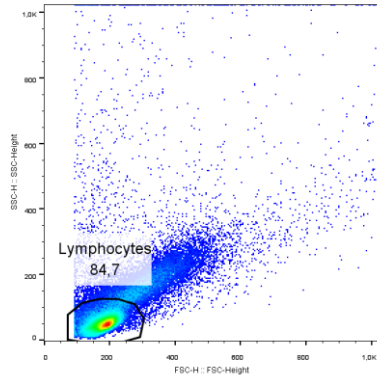
N2 – Con-A



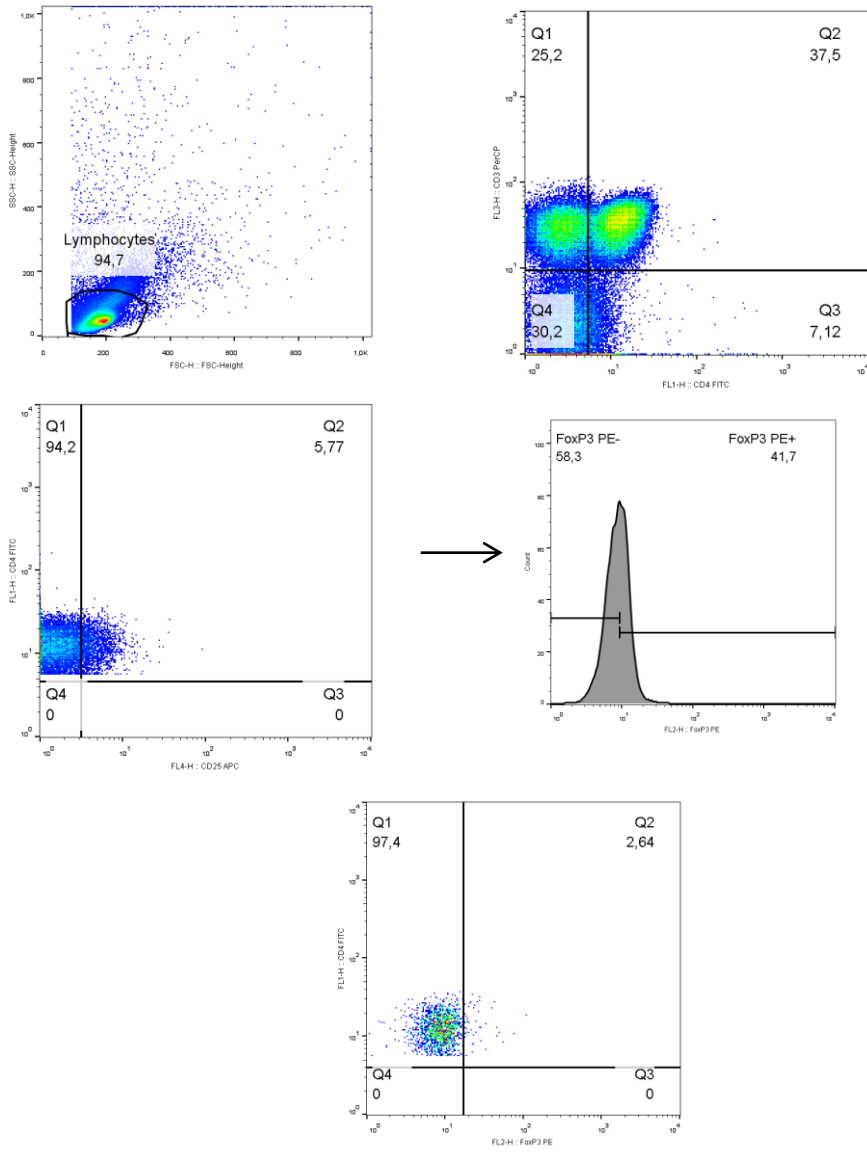
N2 - LPS



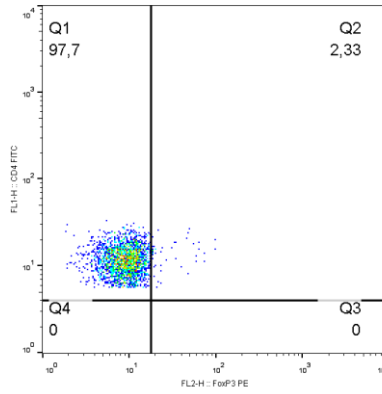
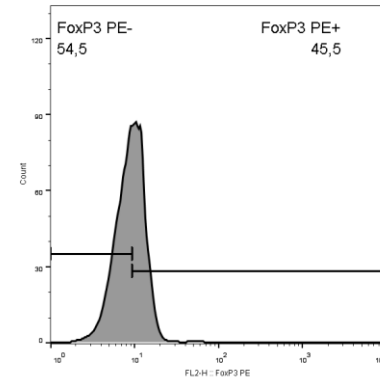
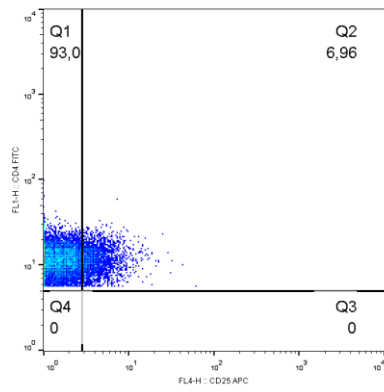
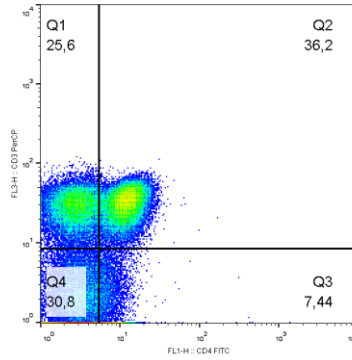
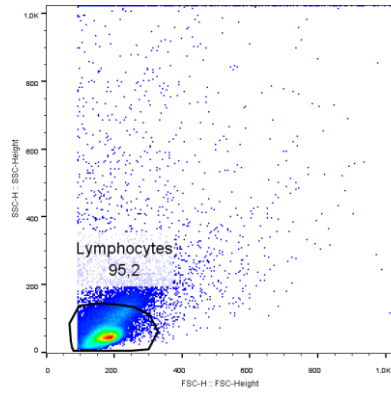
N2 - PMA



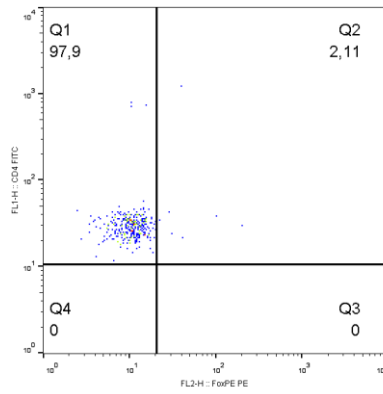
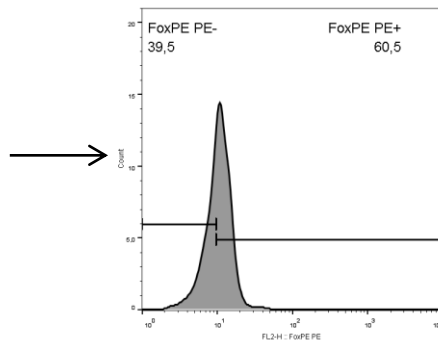
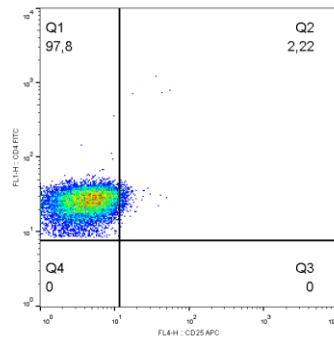
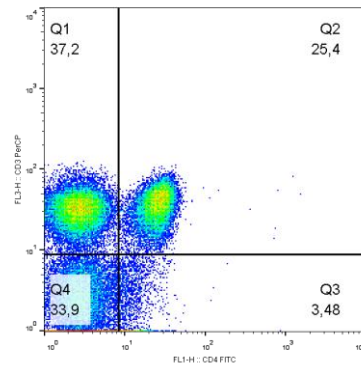
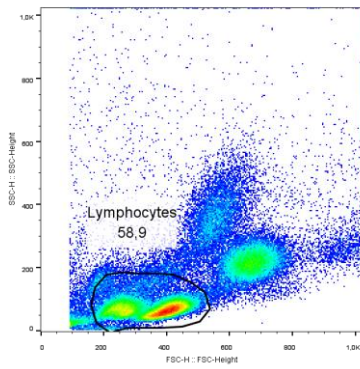
N2 - BjuL 5 µg/mL



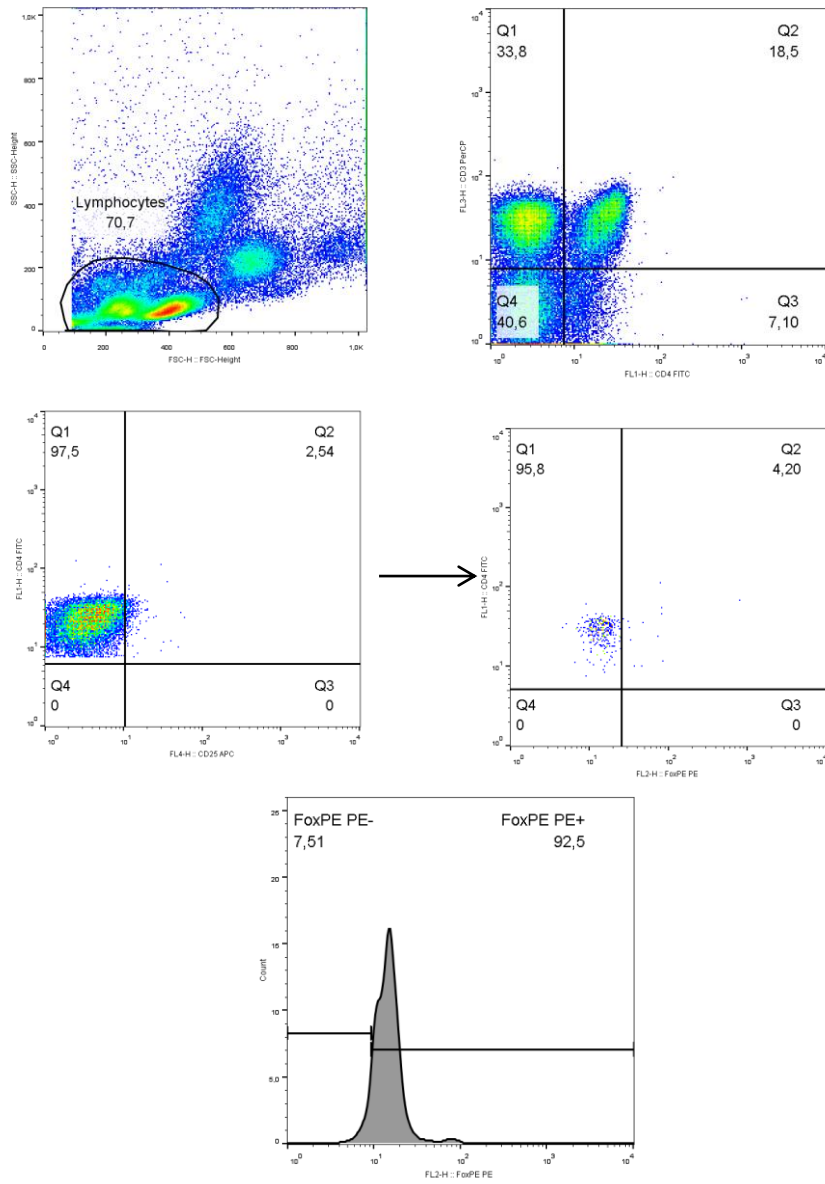
N2 - BjuL 10 µg/mL



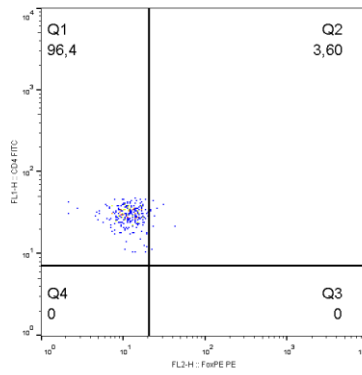
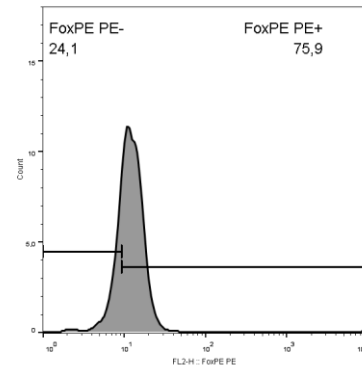
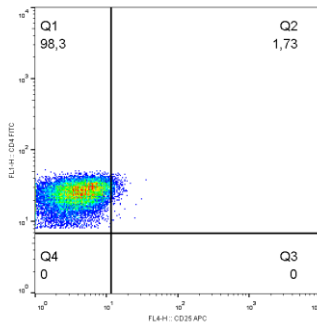
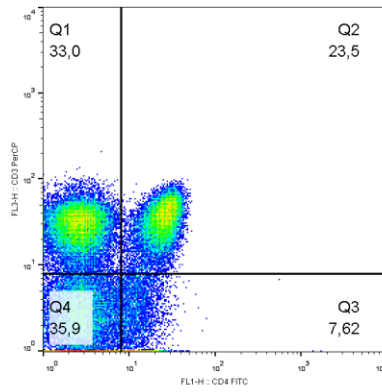
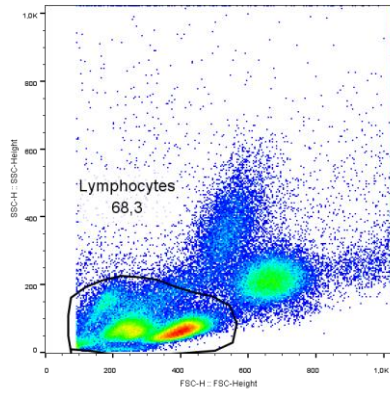
N3 - RPMI



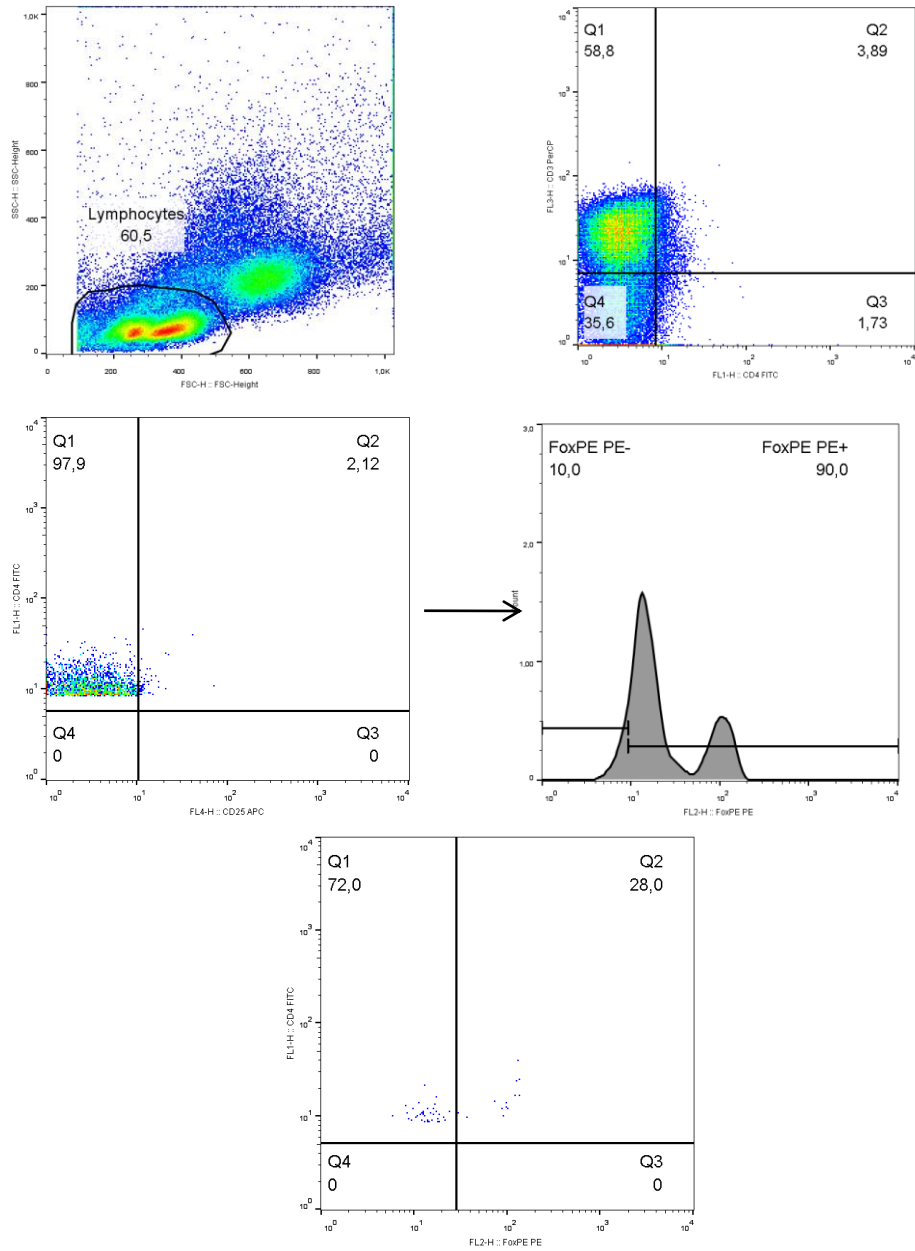
N3 – Con-A



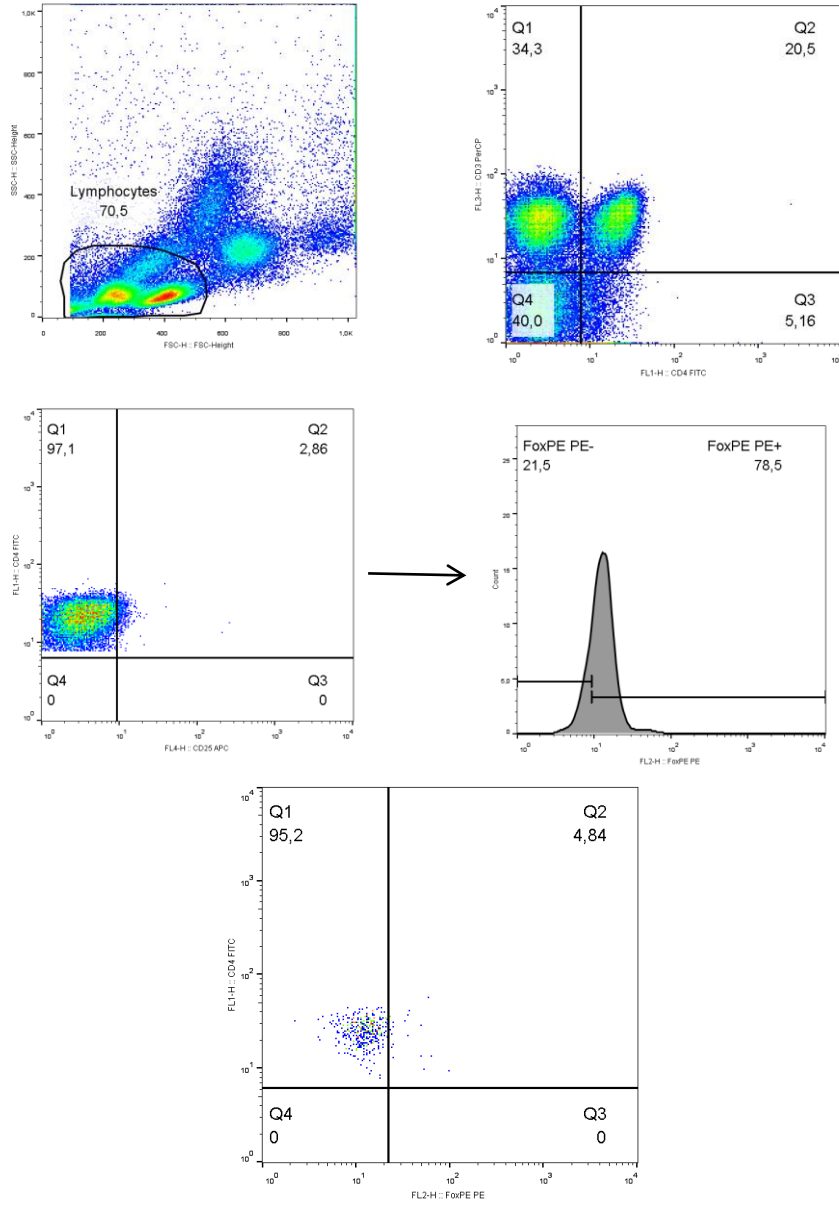
N3 - LPS



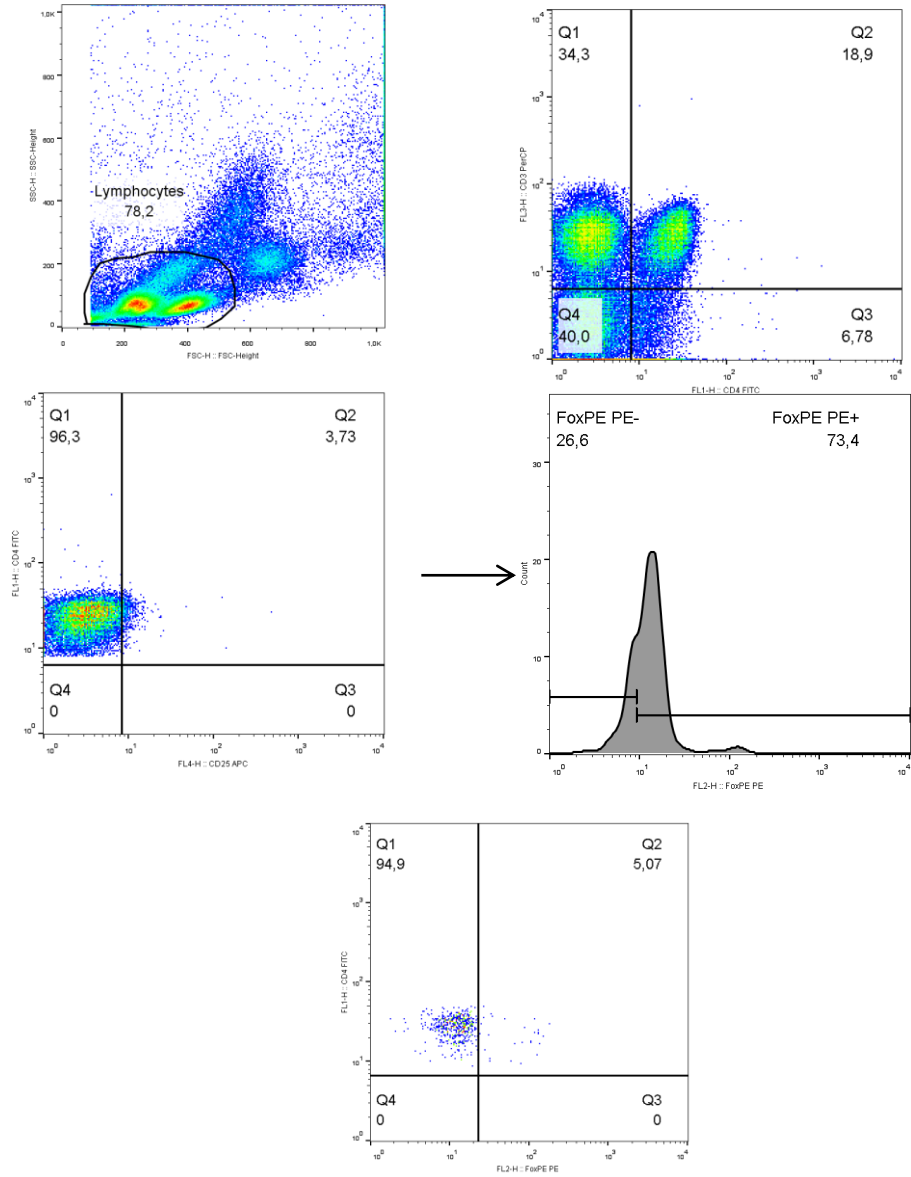
N3 – PMA



N3 - BjuL 5 µg/mL

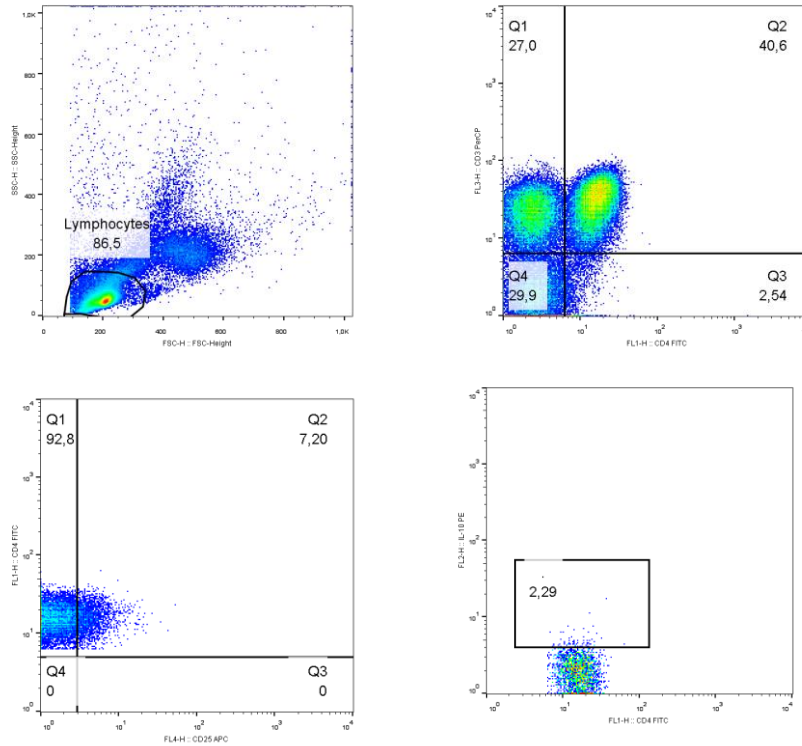


N3 - BjuL 10 µg/mL

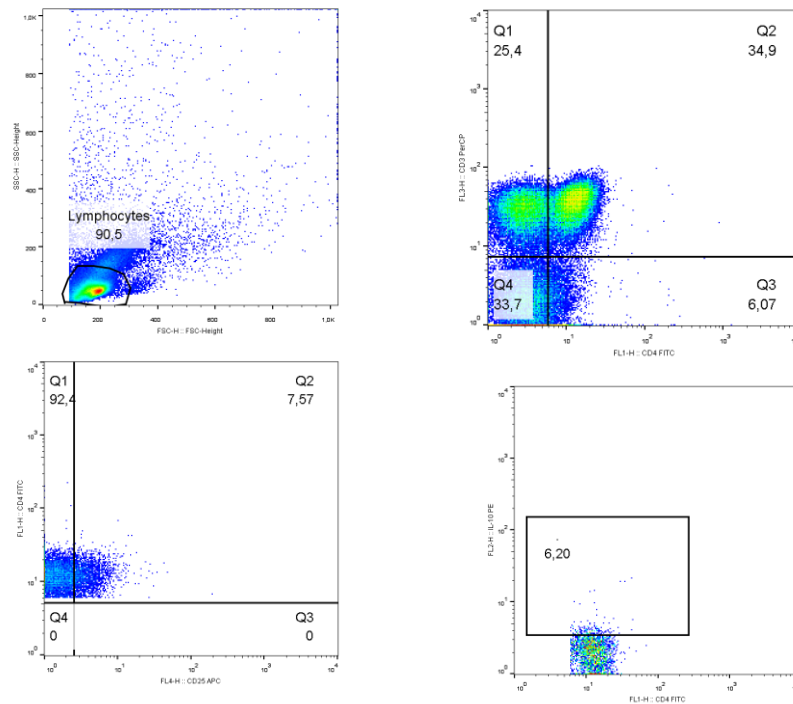


8.10 - Dot plots da marcação intracelular de IL-10 em células CD4⁺CD25⁺ por citometria de fluxo

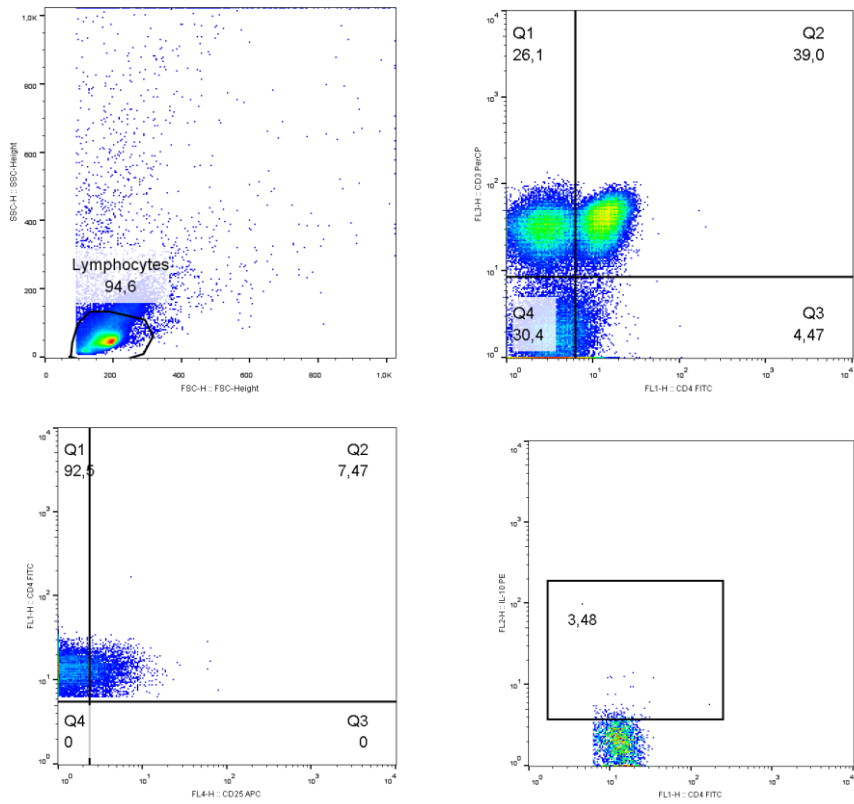
N1 – RPMI



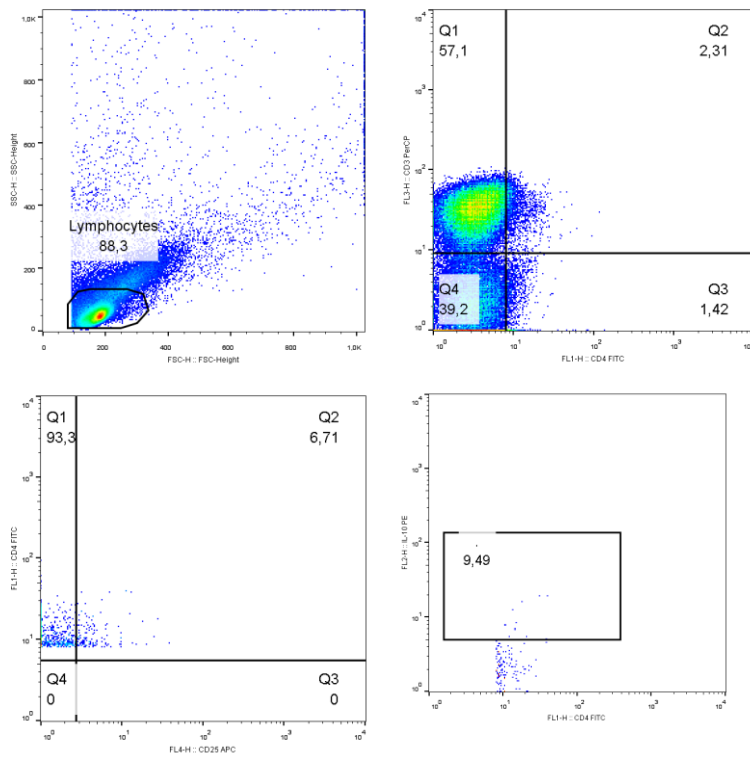
N1 – Con-A



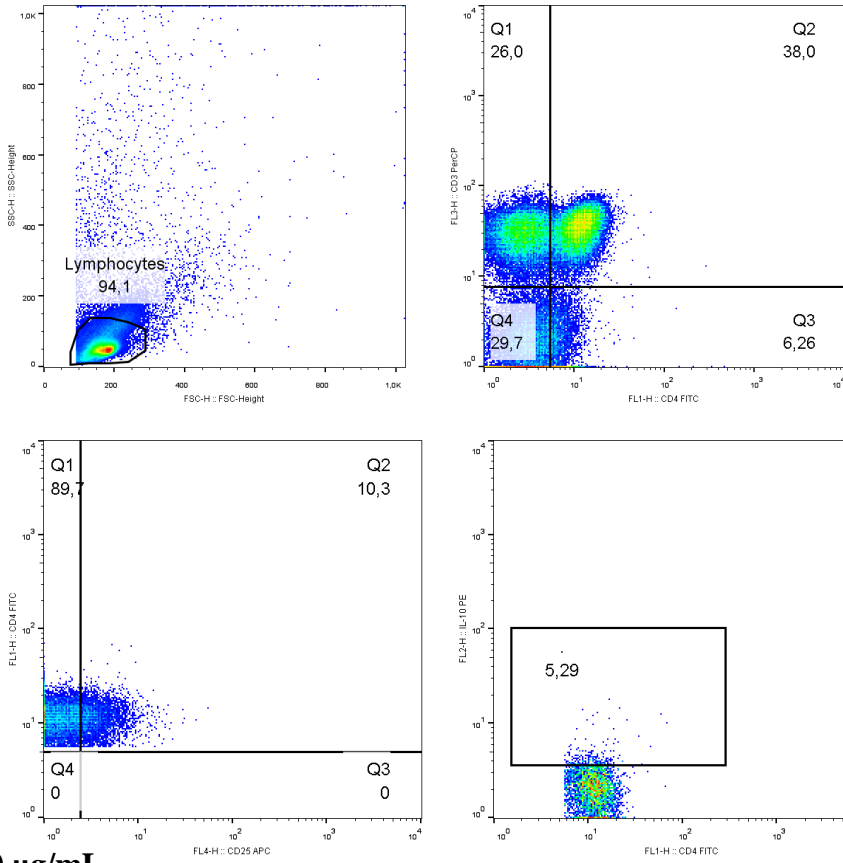
N1 - LPS



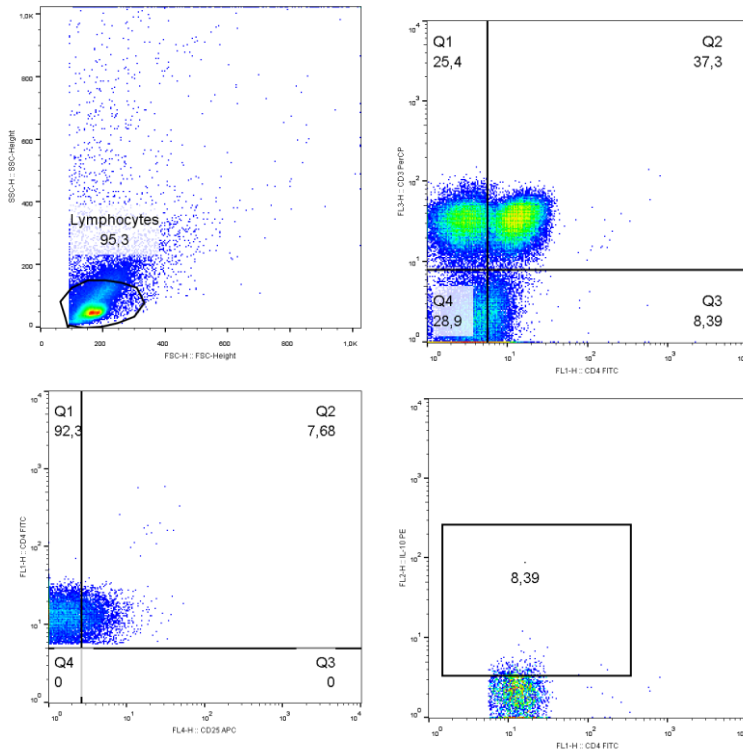
N1 - PMA



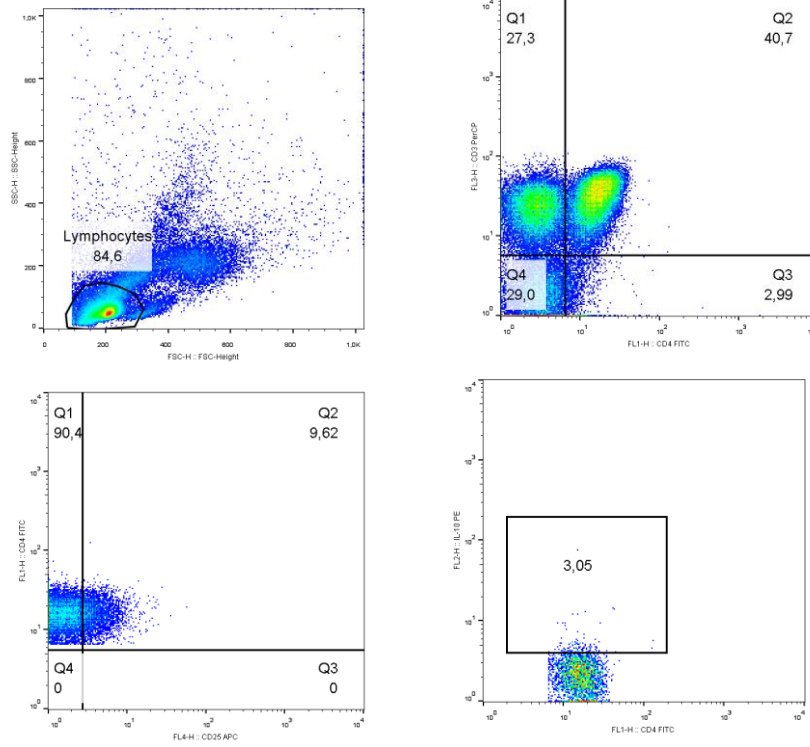
N1 - BjuL 5 µg/mL



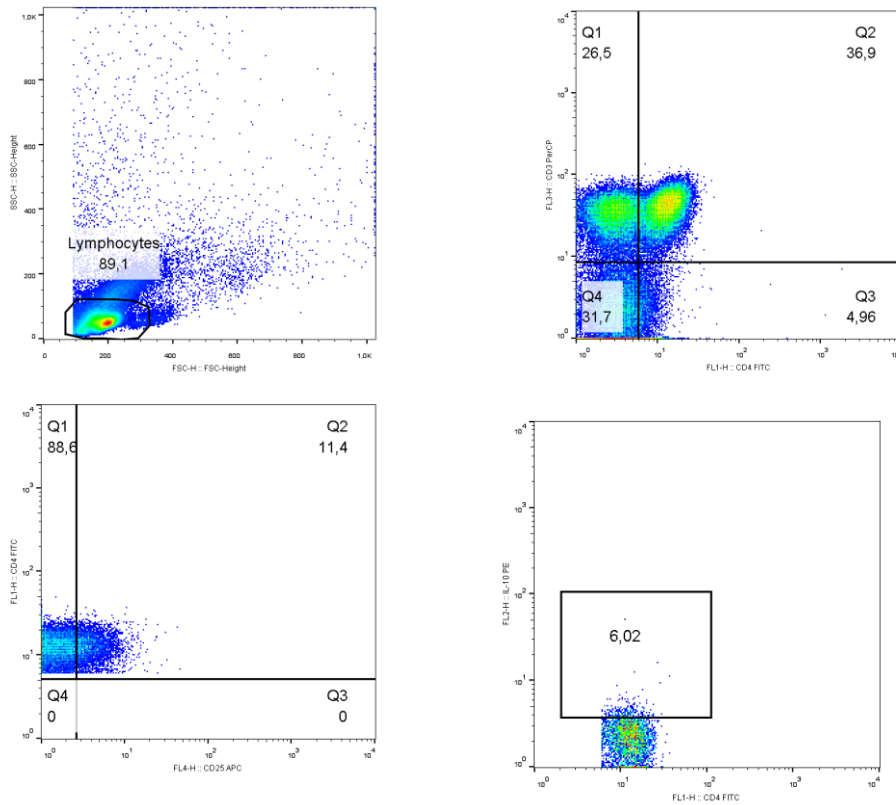
N1 - BjuL 10 µg/mL



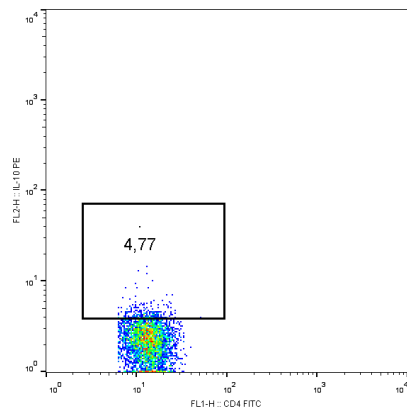
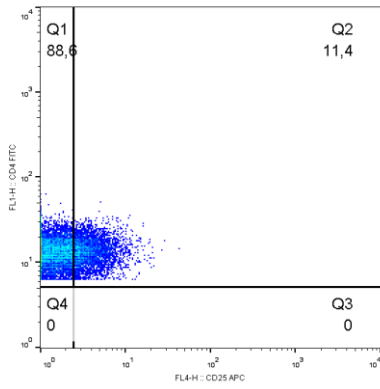
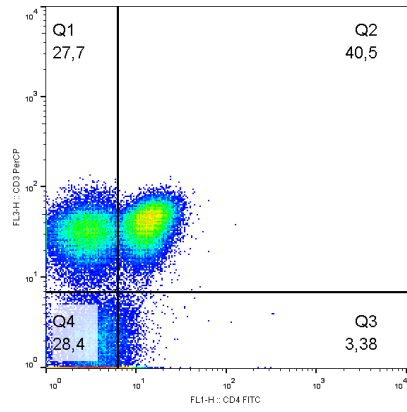
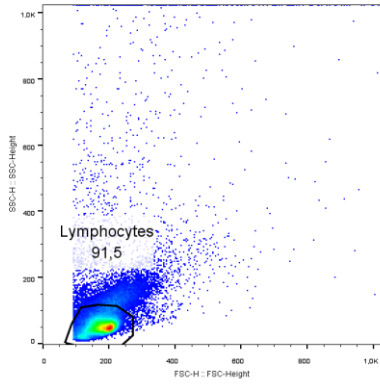
N2 - RPMI



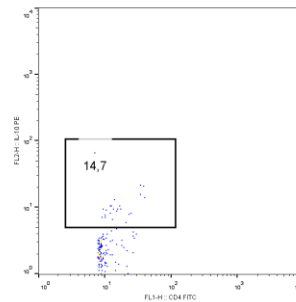
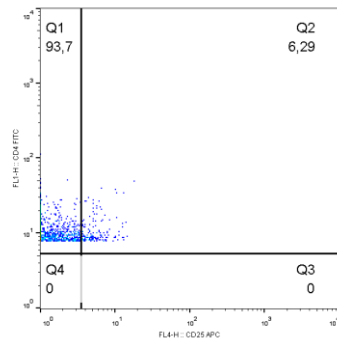
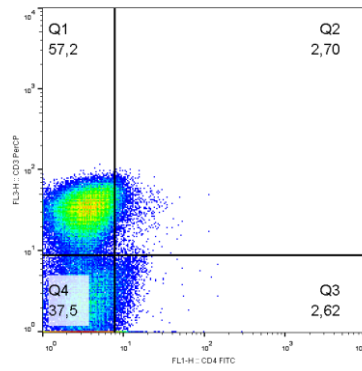
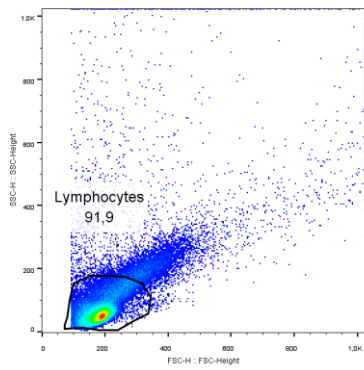
N2 - Con-A



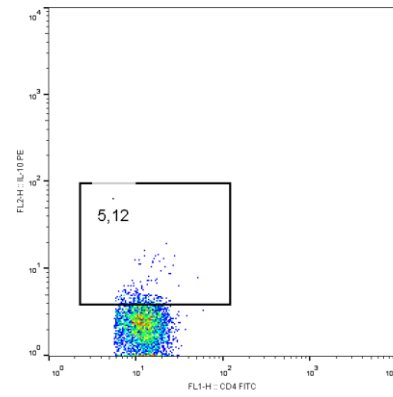
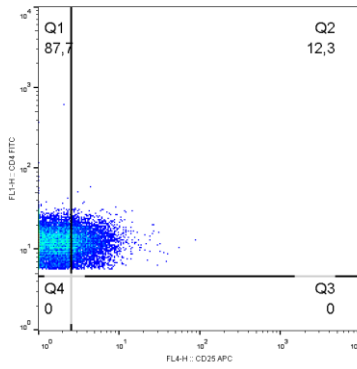
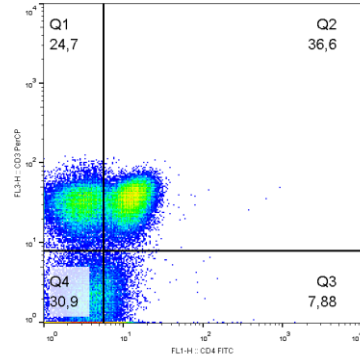
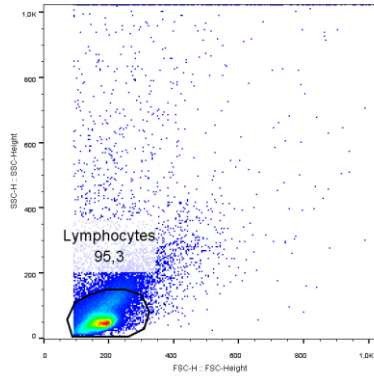
N2 – LPS



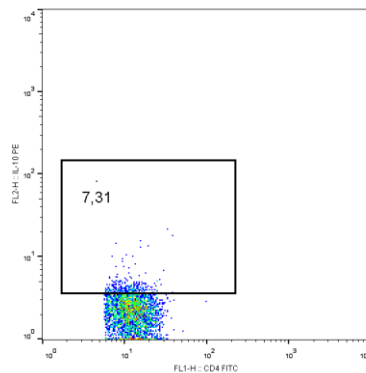
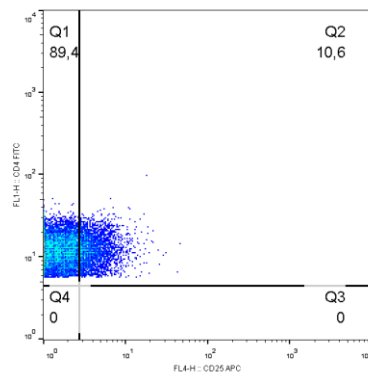
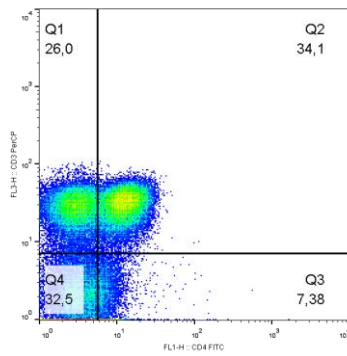
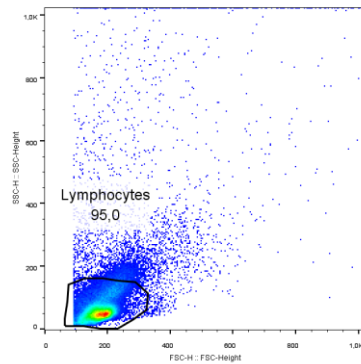
N2 – PMA



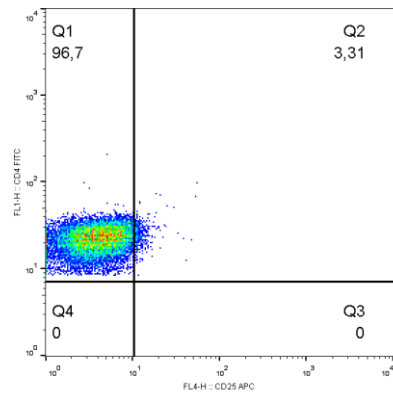
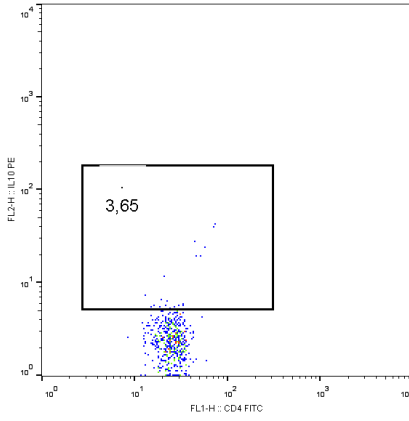
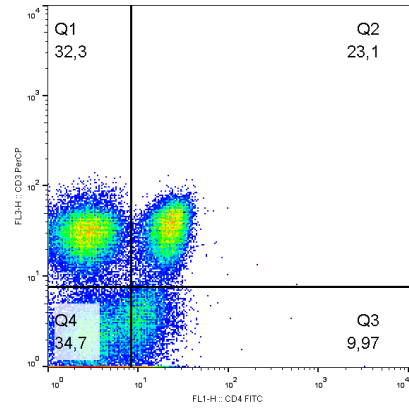
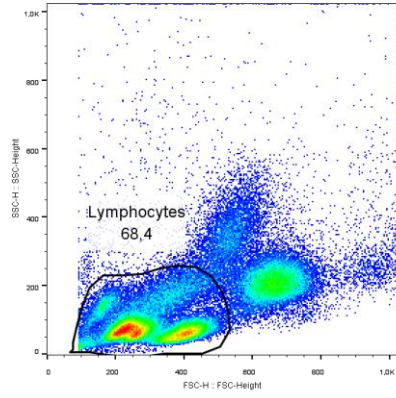
N2 - BjuL 5 µg/mL



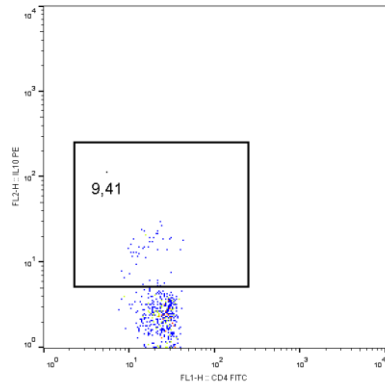
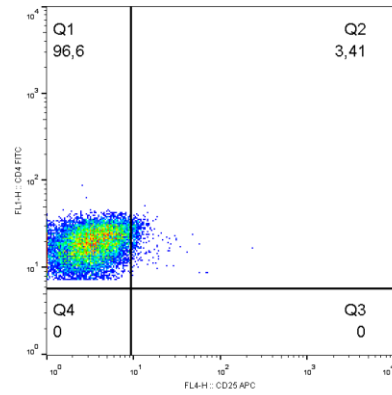
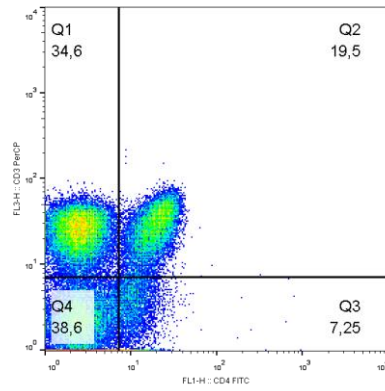
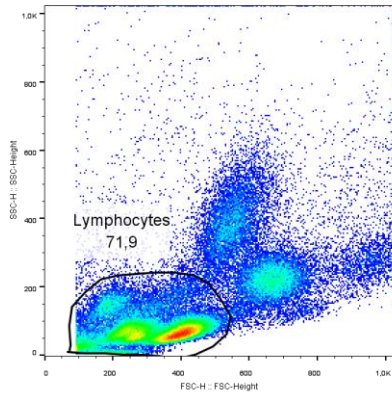
N2 - BjuL 10 µg/mL



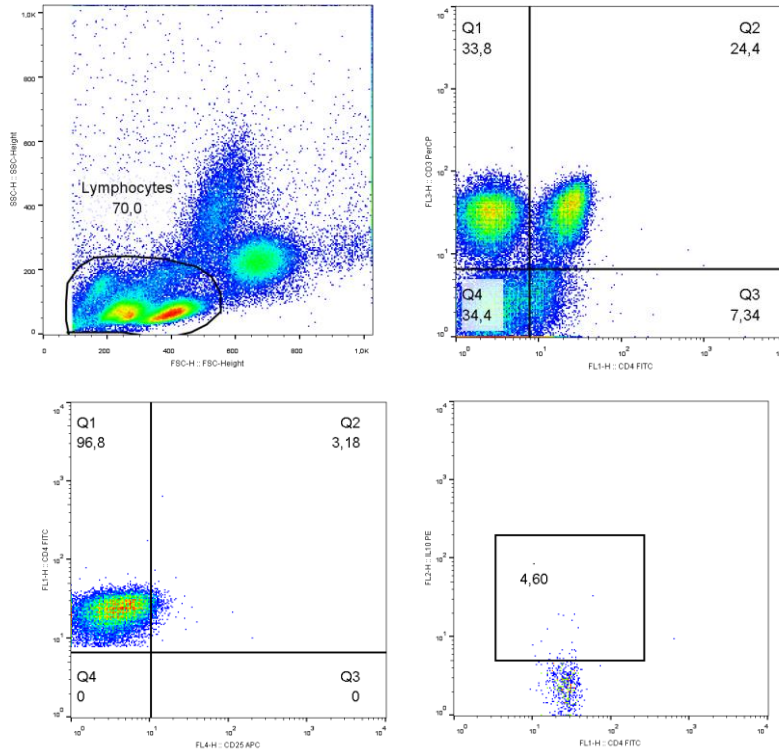
N3 – RPMI



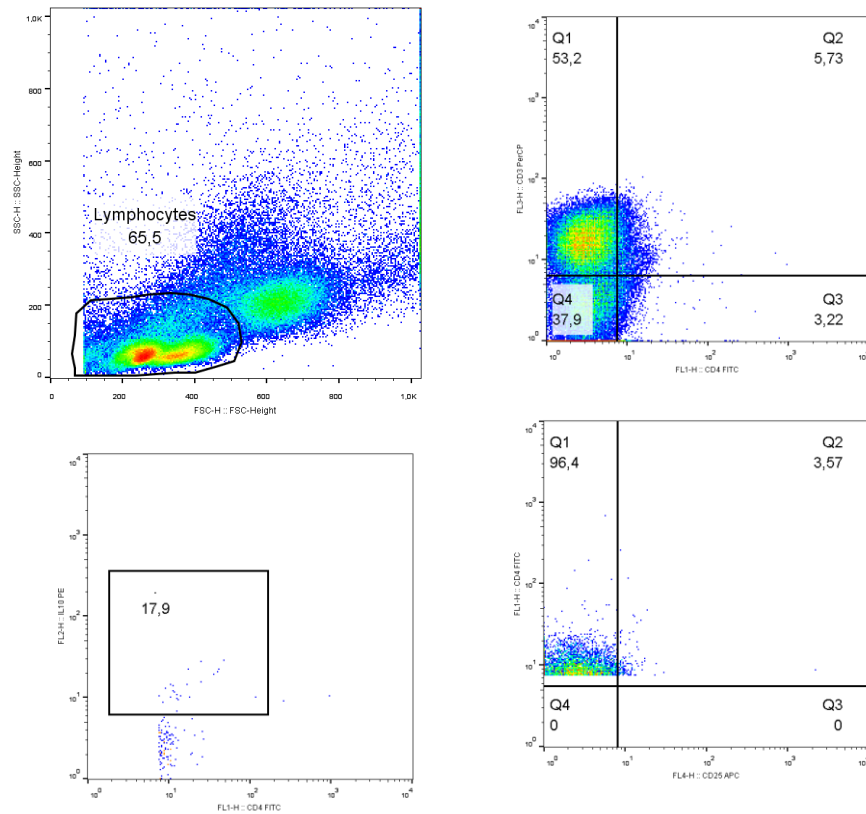
N3 – Con-A



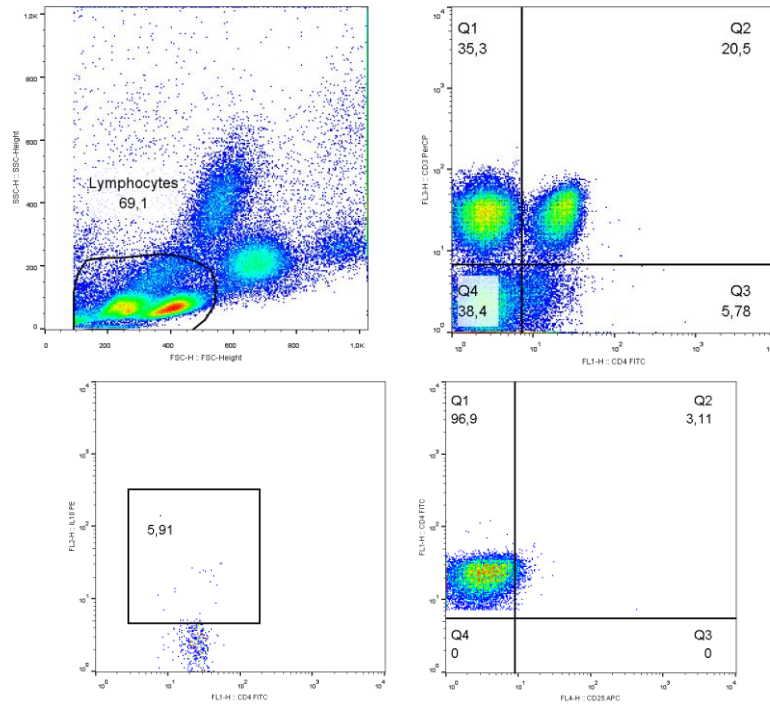
N3 - LPS



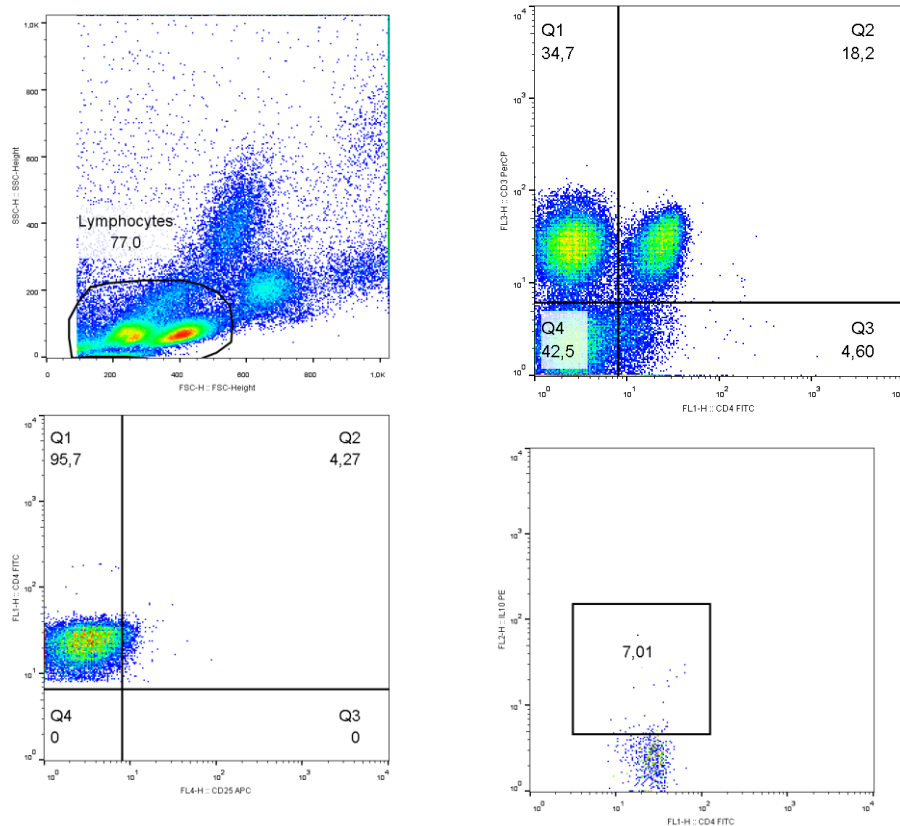
N3 - PMA



N3 - BjuL 5 µg/mL

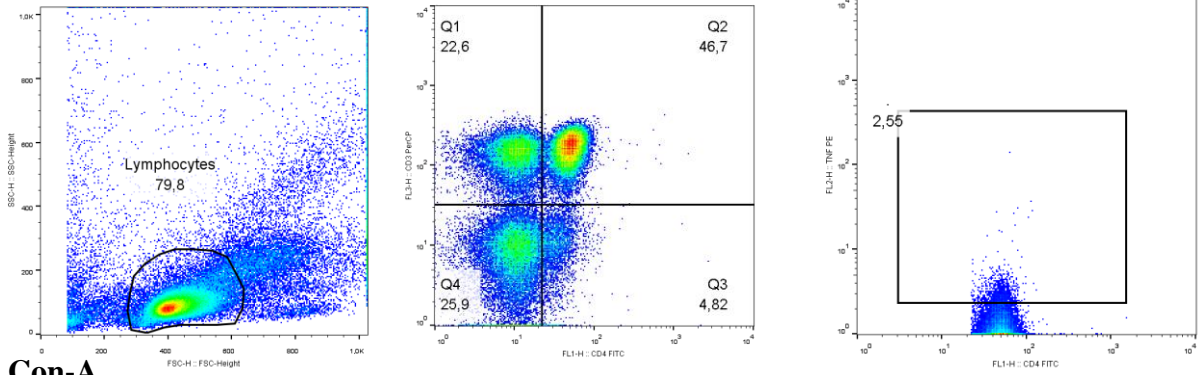


N3 - BjuL 10 µg/mL

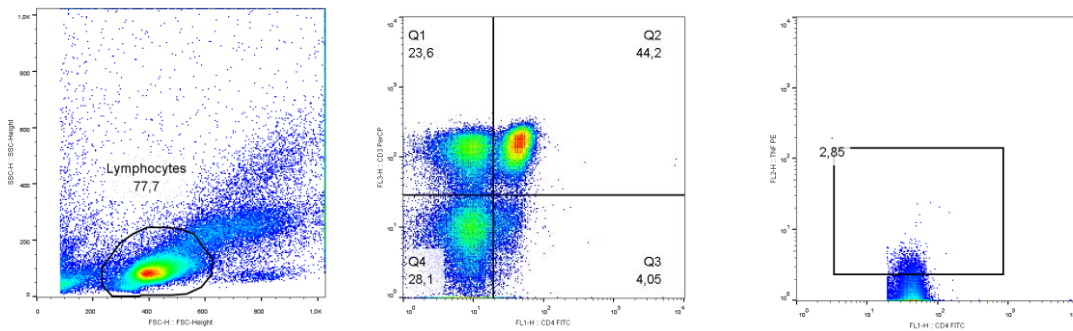


8.11 - Dot plots da marcação intracelular de TNF- α por citometria de fluxo CD4⁺

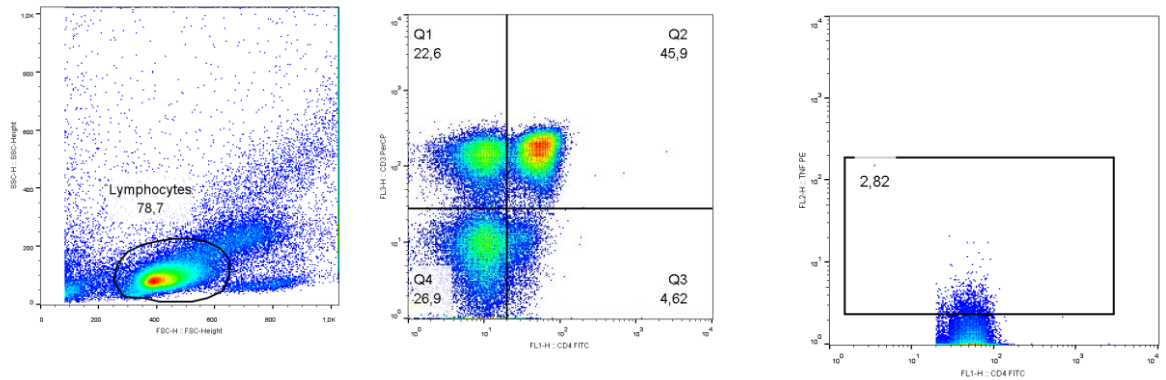
N1 - RPMI



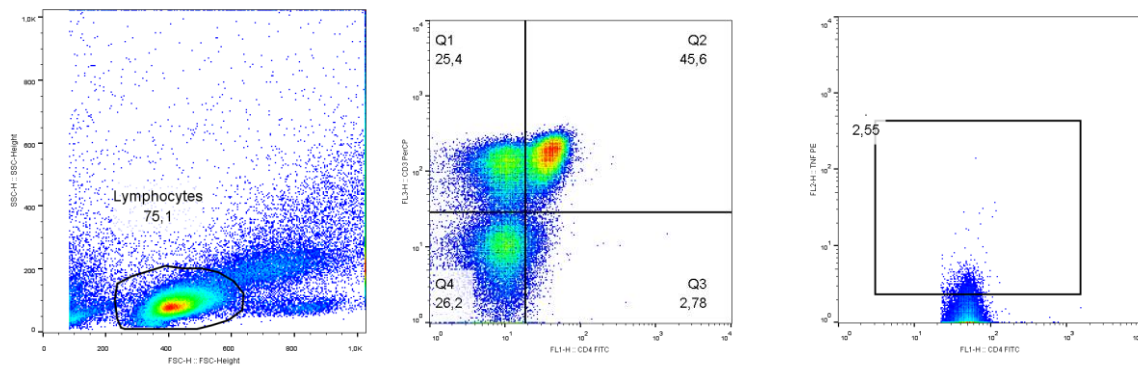
N1 - Con-A



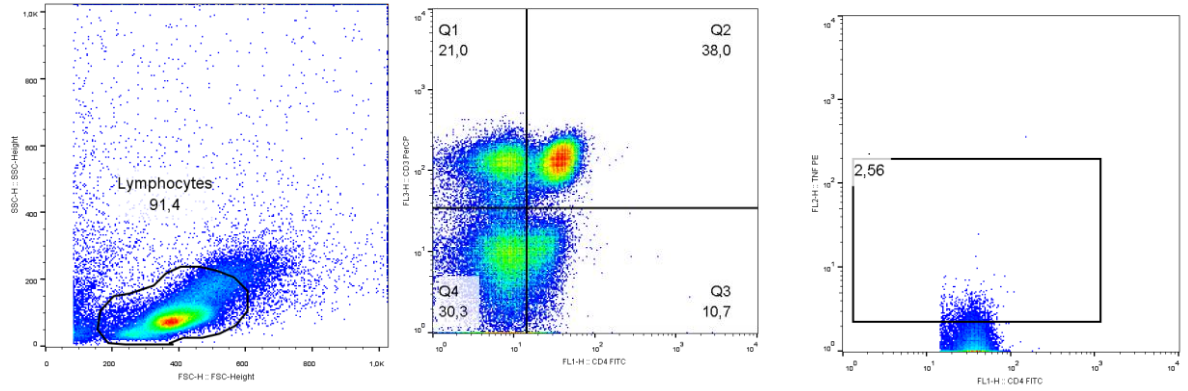
N1 - LPS



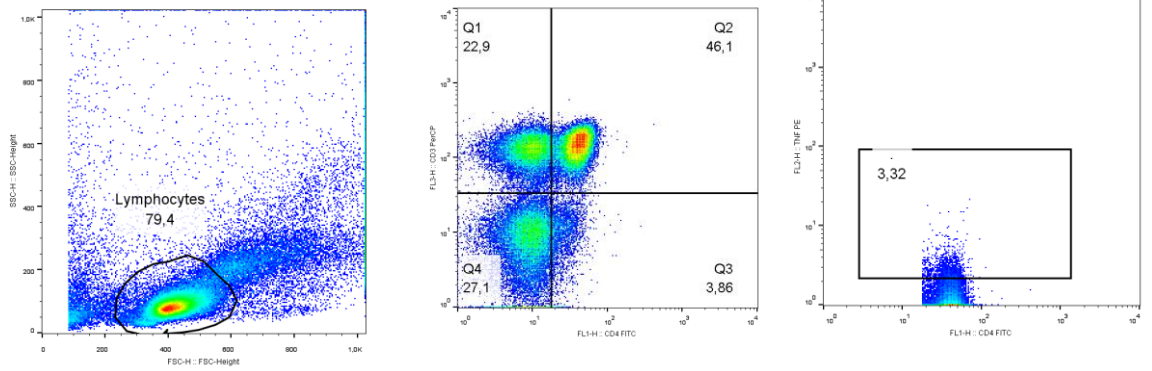
N1 - PMA



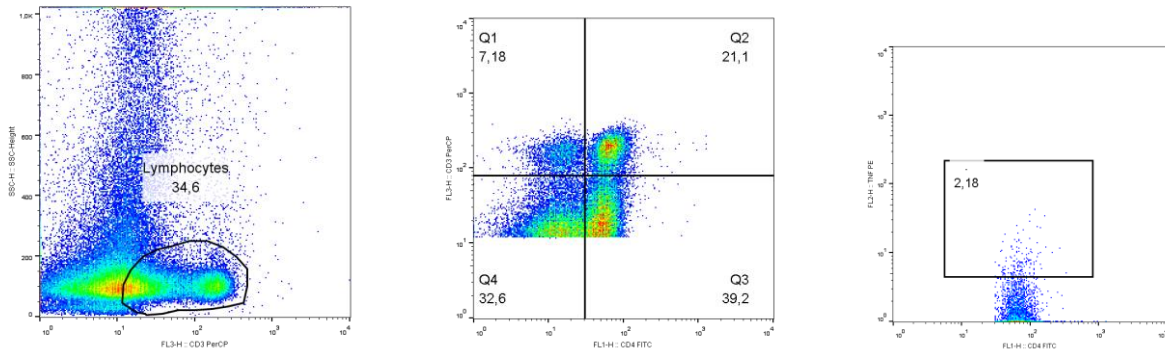
N1 - BjuL 5 µg/mL



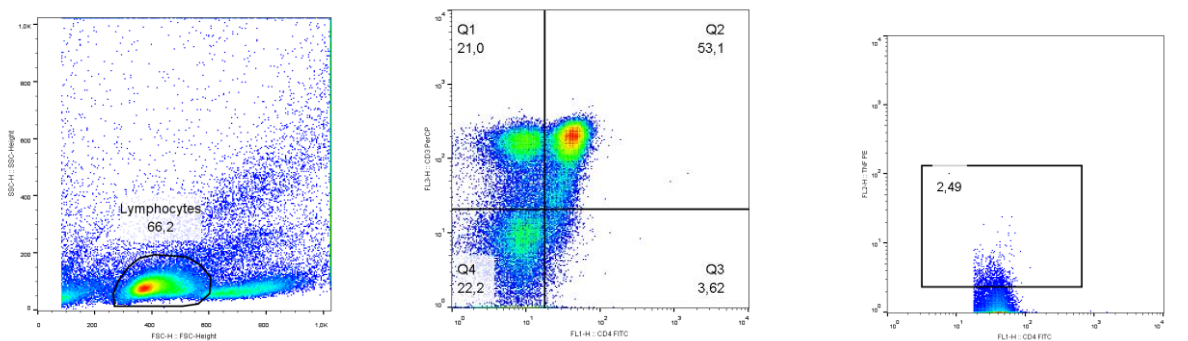
N1 - BjuL 10 µg/mL



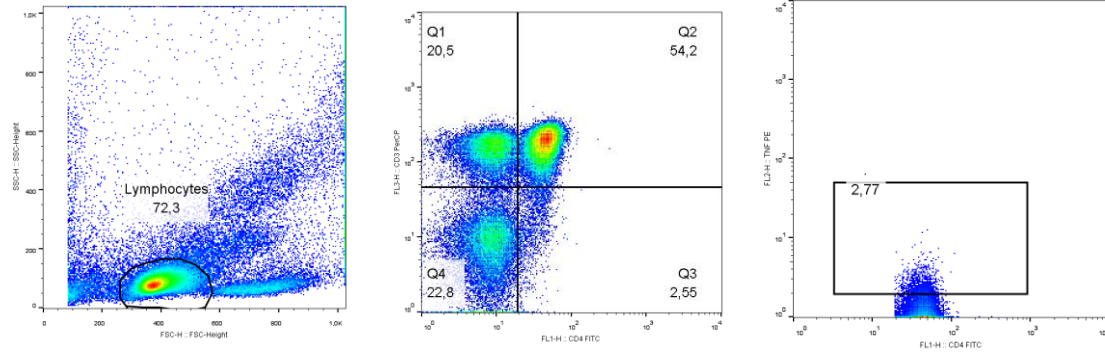
N2 - RPMI



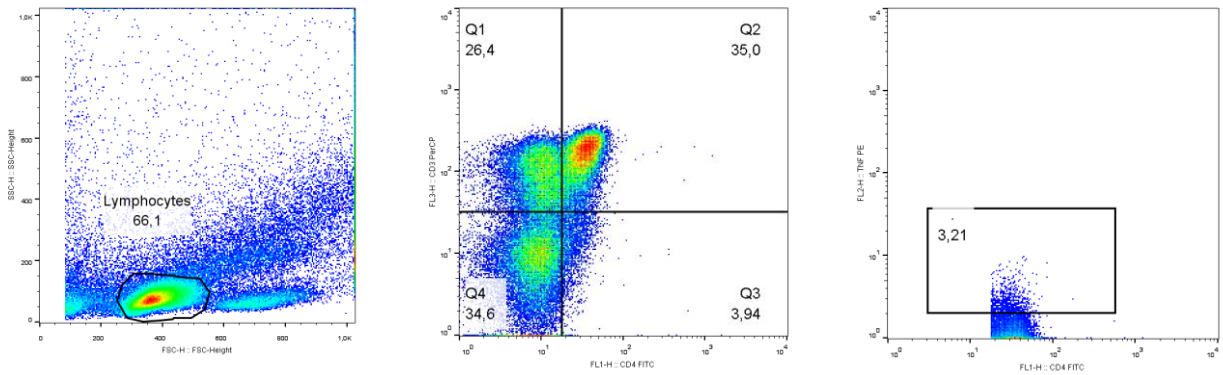
N2 - Con-A



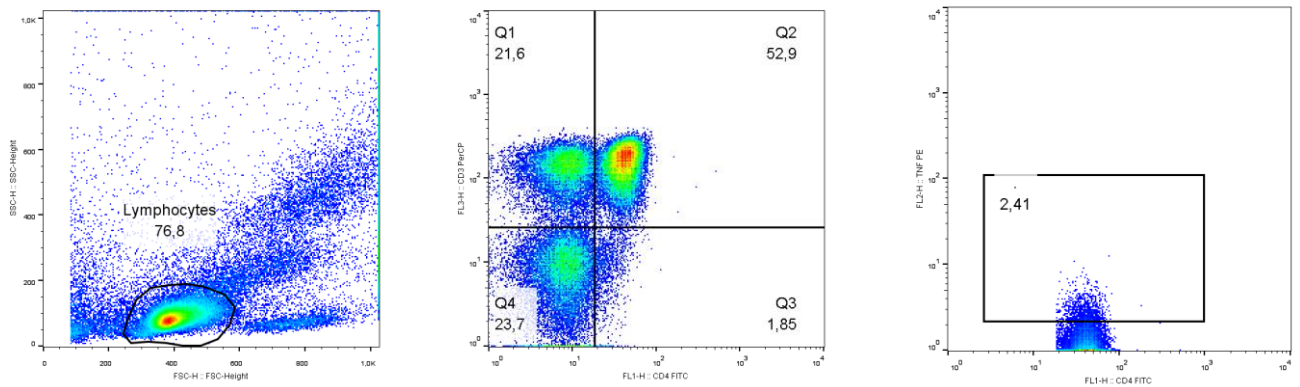
N2 - LPS



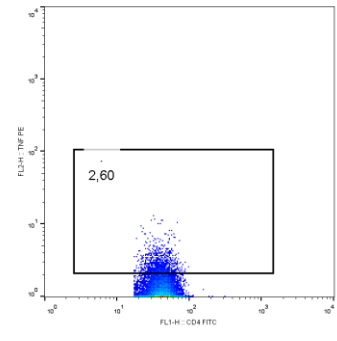
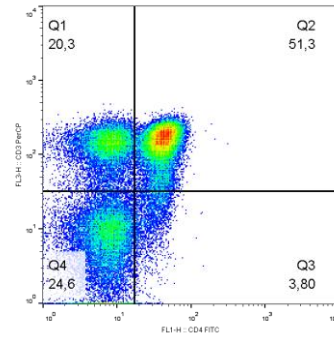
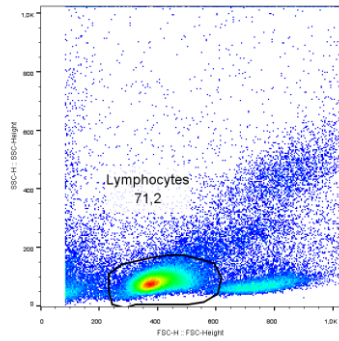
N2 - PMA



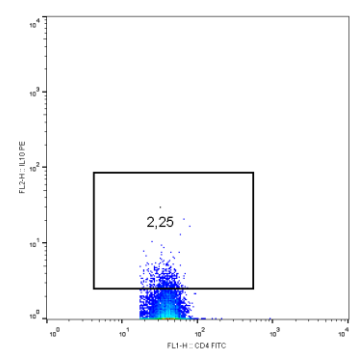
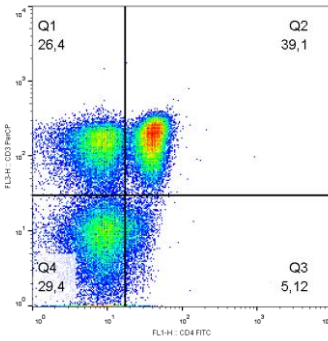
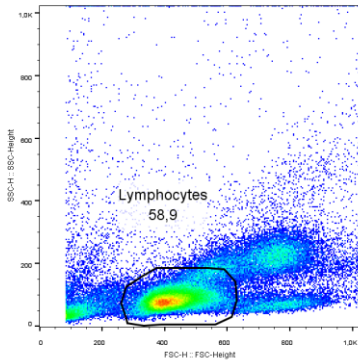
N2 - BjuL 5 µg/mL



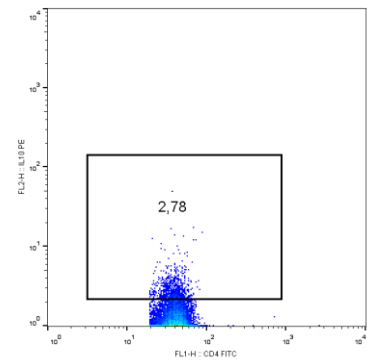
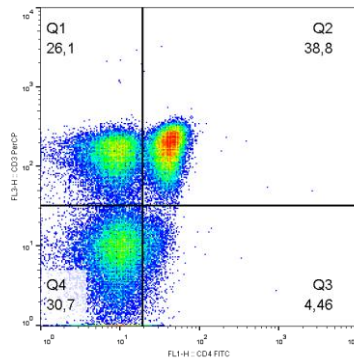
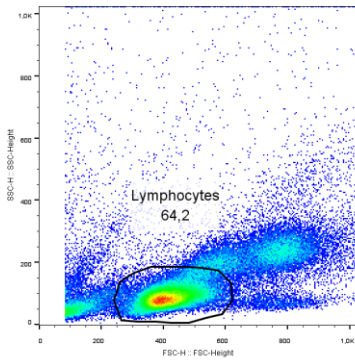
N2 - BjuL 10 µg/mL



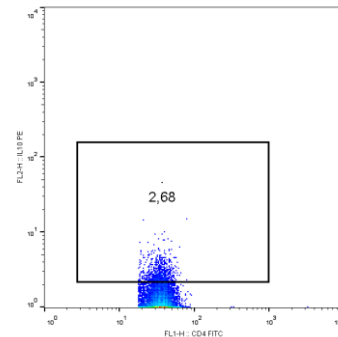
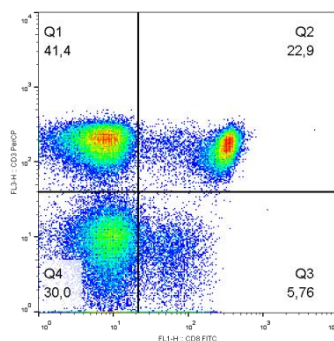
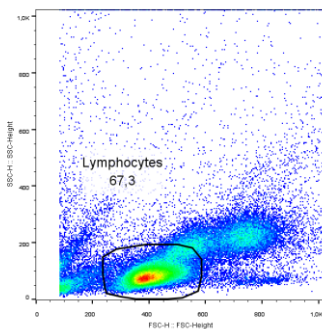
N3 - RPMI



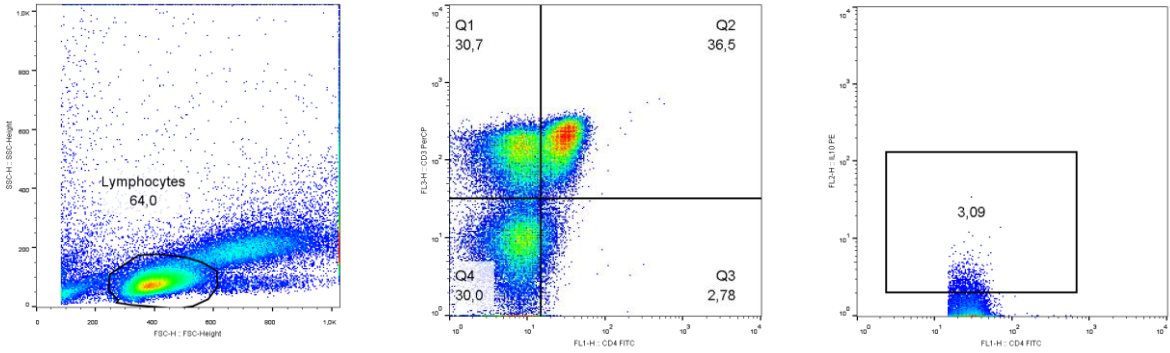
N3 - Con-A



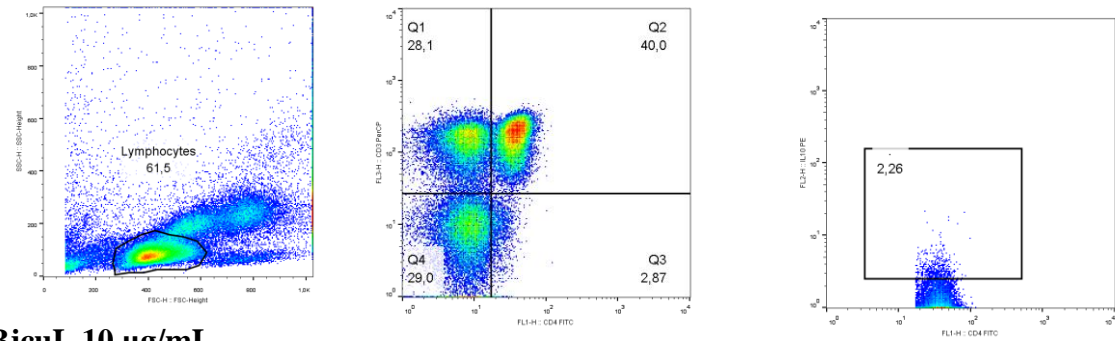
N3 - LPS



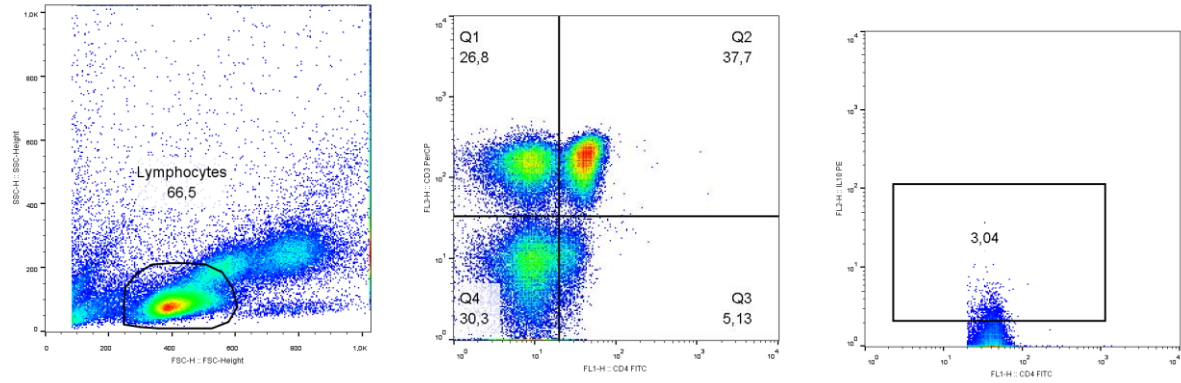
N3 - PMA



N3 - BjuL 5 µg/mL

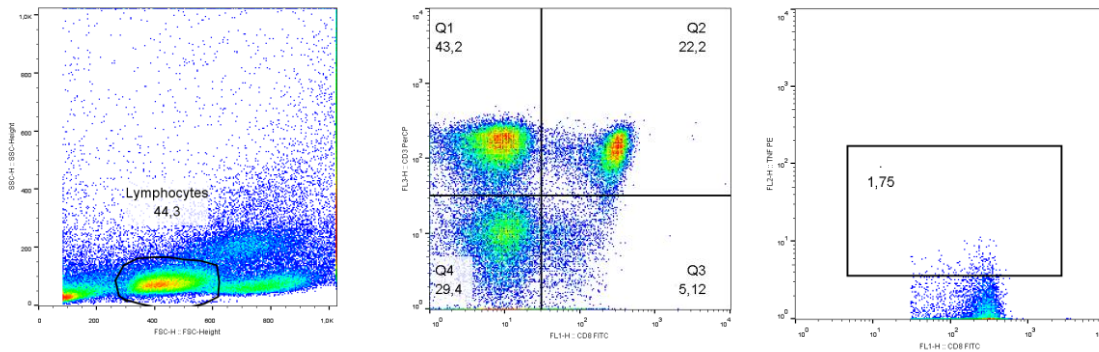


N3 - BjuL 10 µg/mL

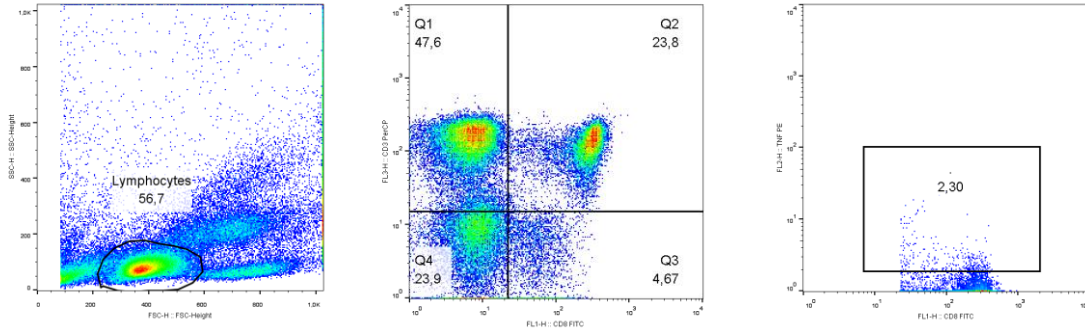


CD8⁺

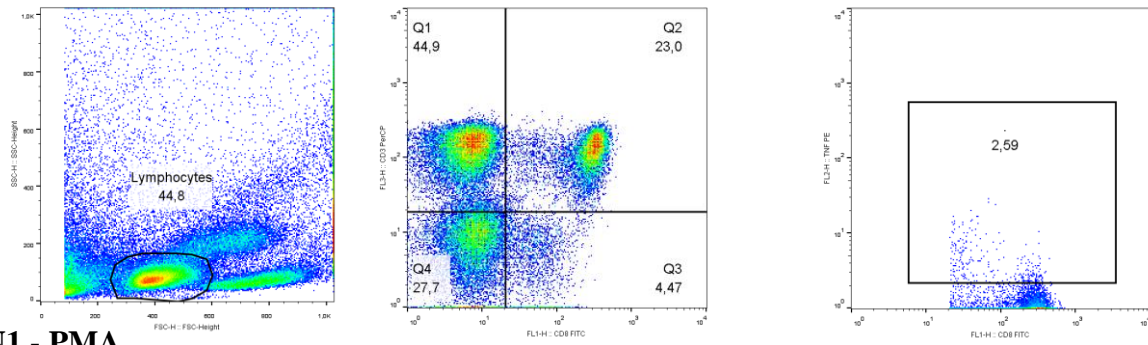
N1 - RPMI



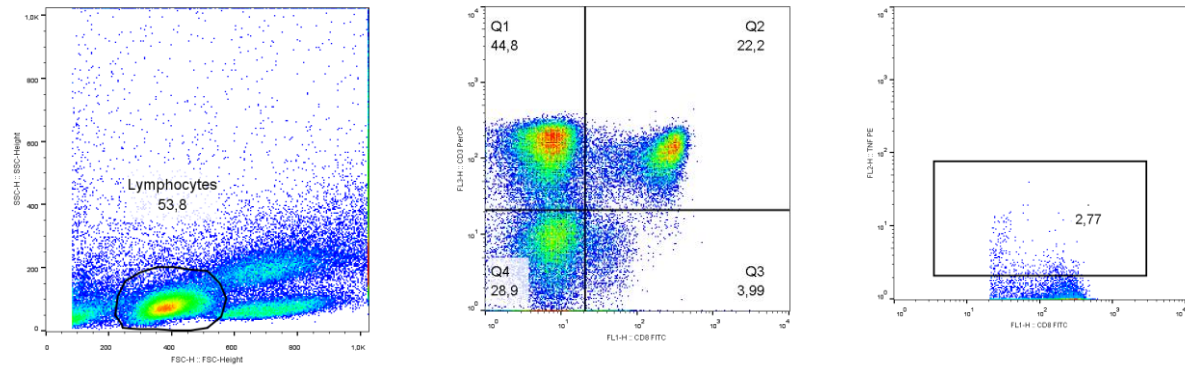
N1 - Con-A



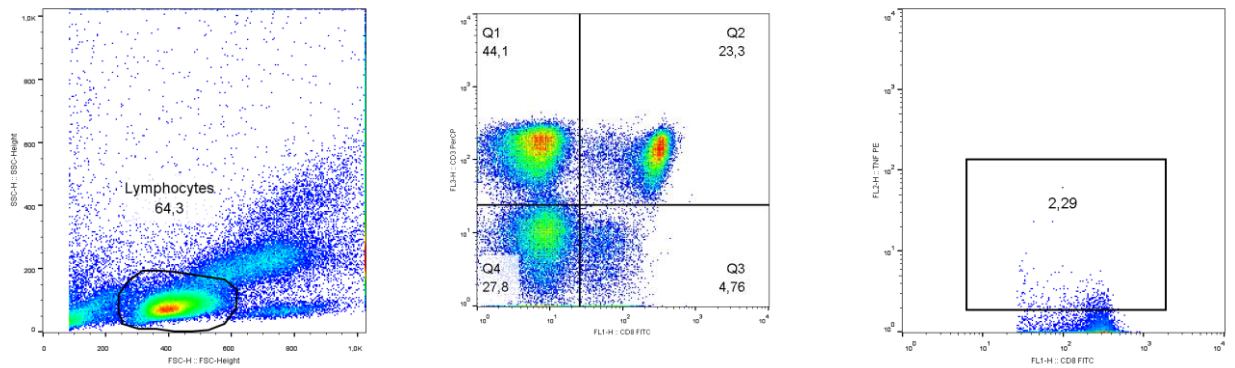
N1 - LPS



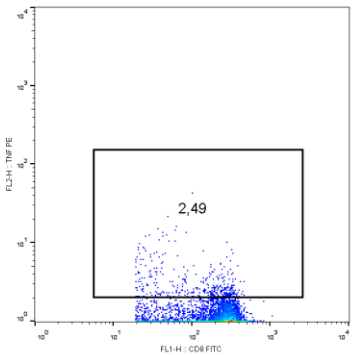
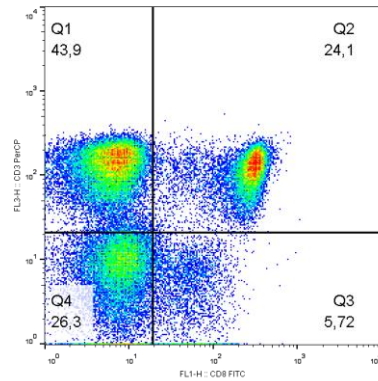
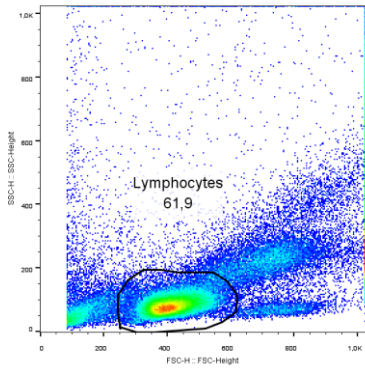
N1 - PMA



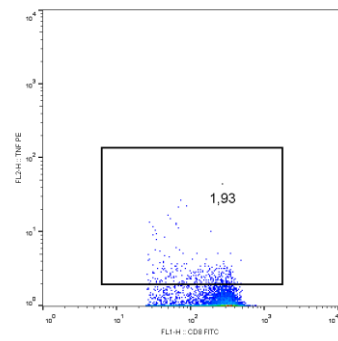
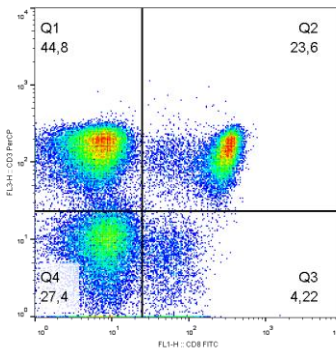
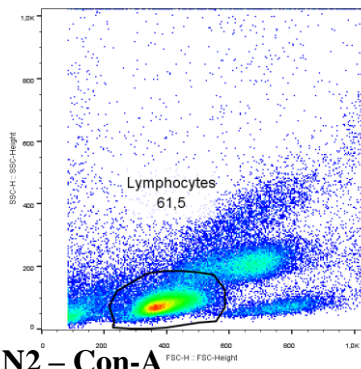
N1 - BjuL 5 µg/mL



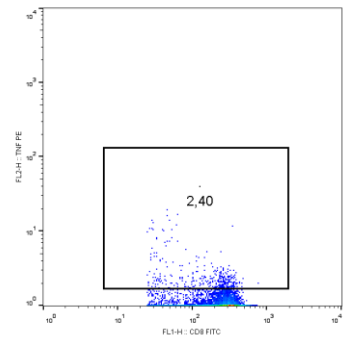
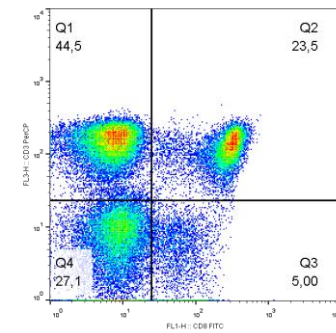
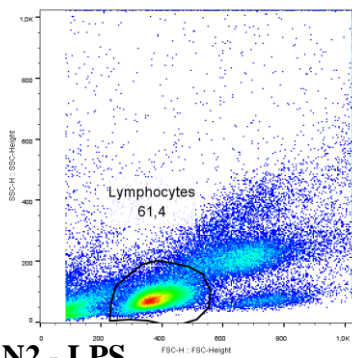
N1 - BjuL 10 µg/mL



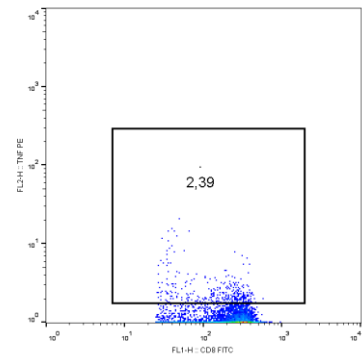
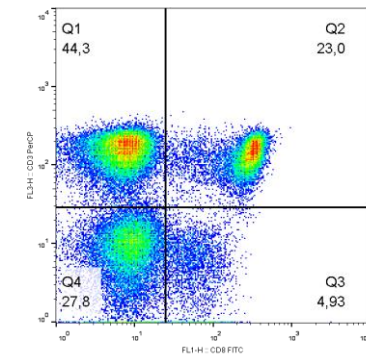
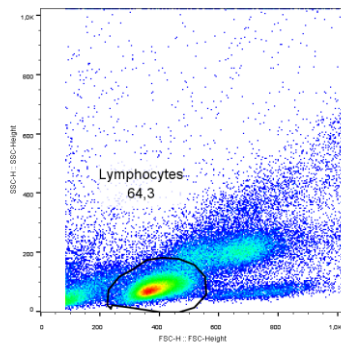
N2 - RPMI



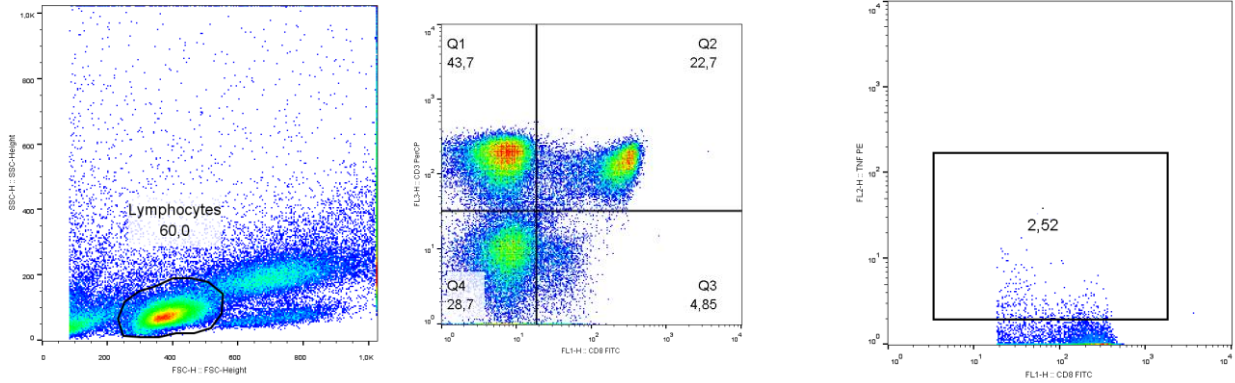
N2 - Con-A



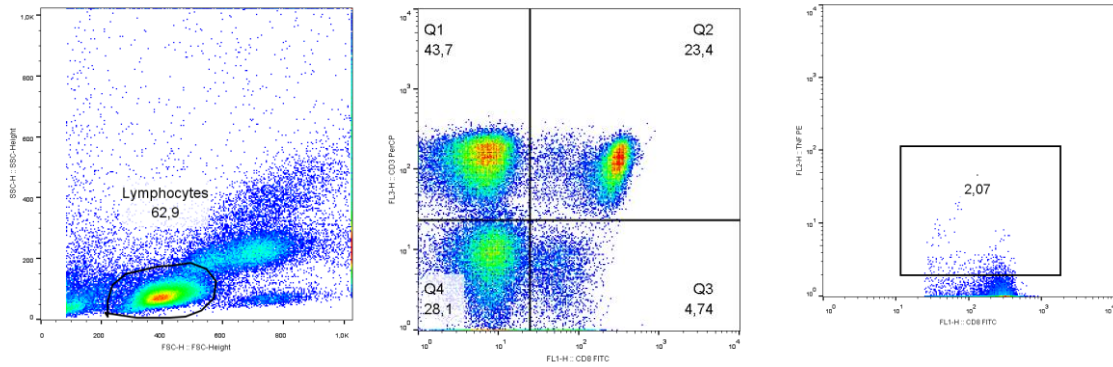
N2 - LPS



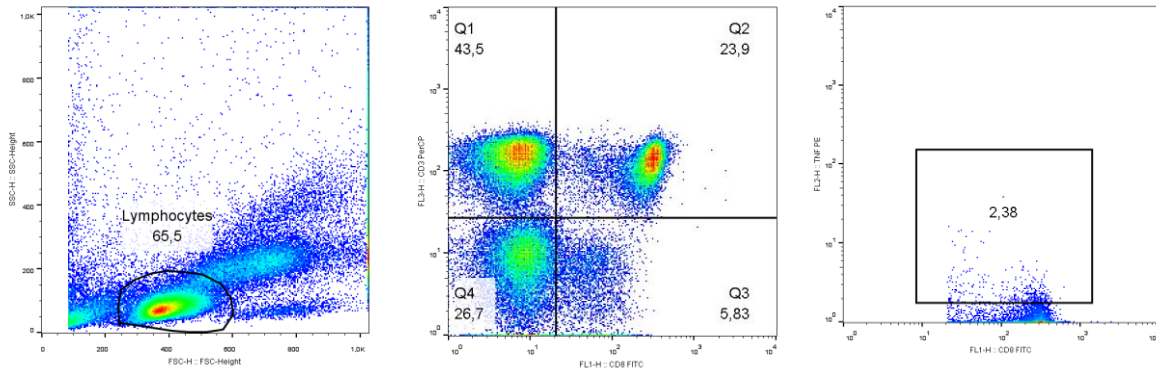
N2 - PMA



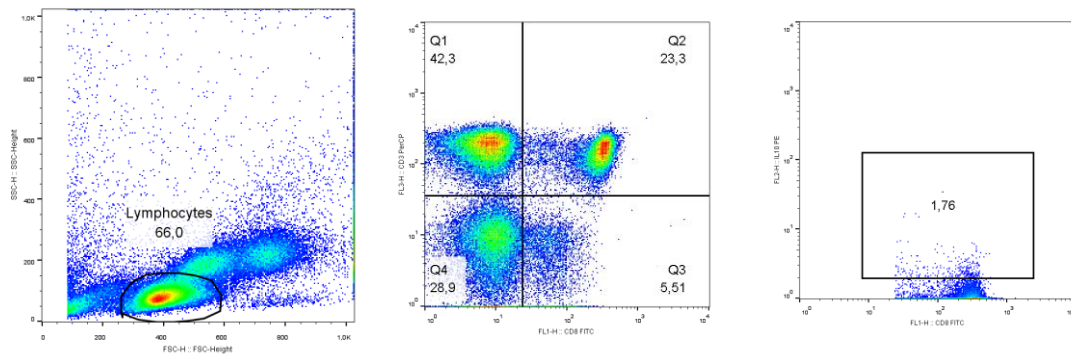
N2 - BjuL 5 µg/mL



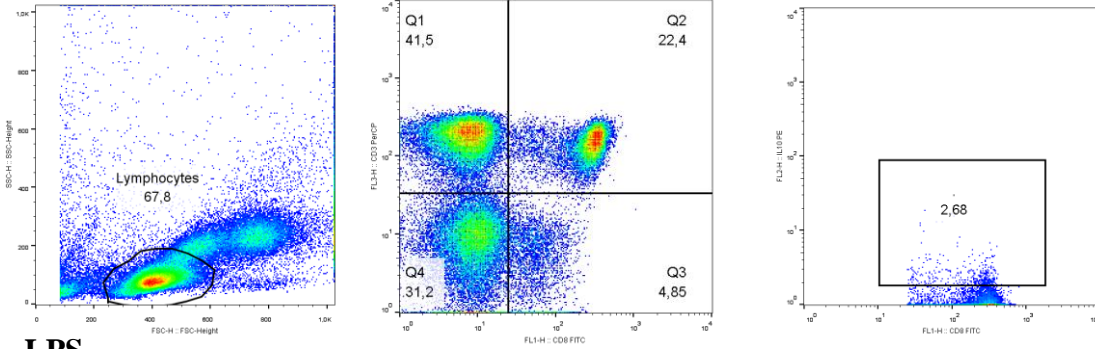
N2 - BjuL 10 µg/mL



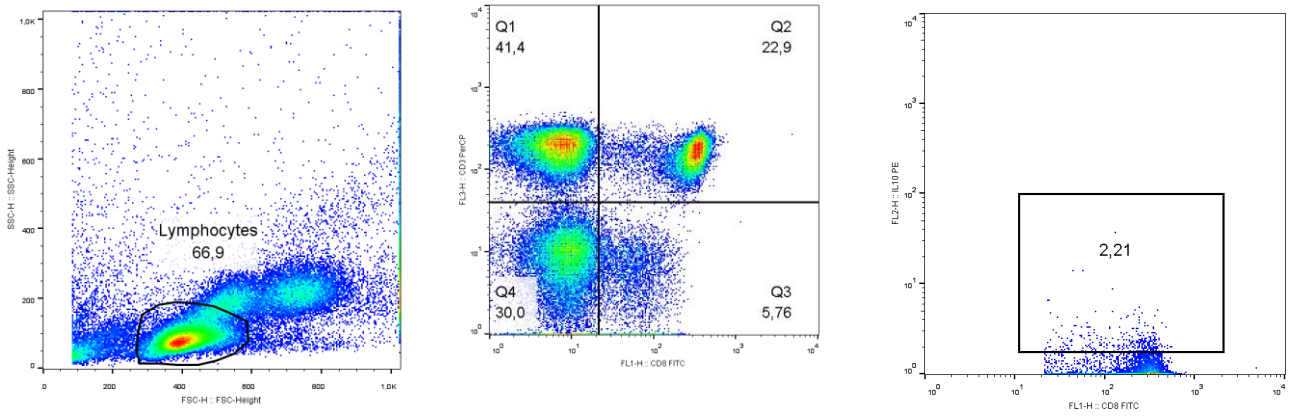
N3 - RPMI



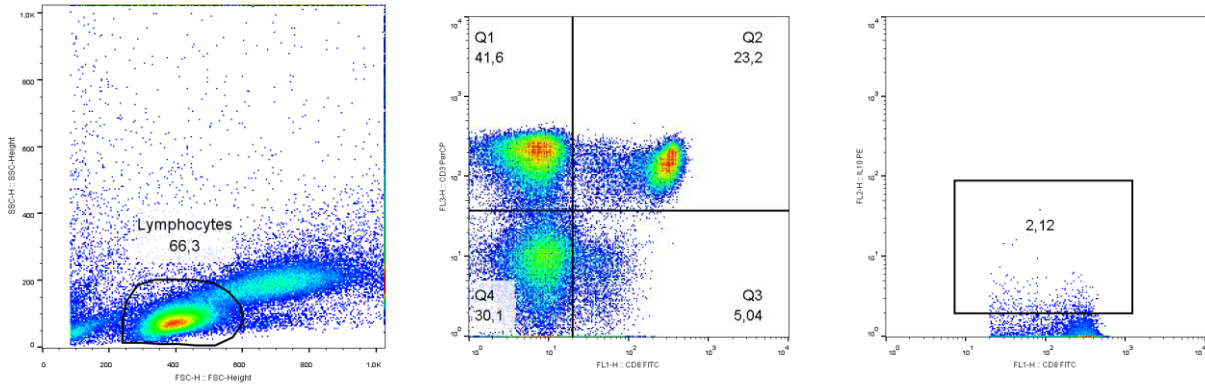
N3 - Con-A



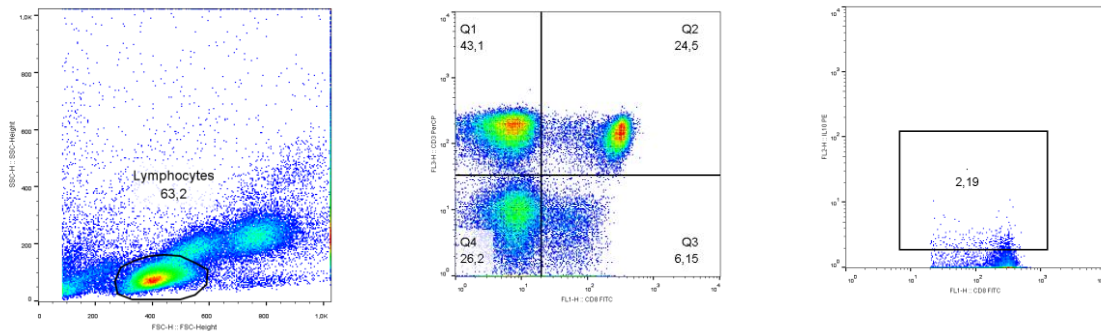
N3 - LPS



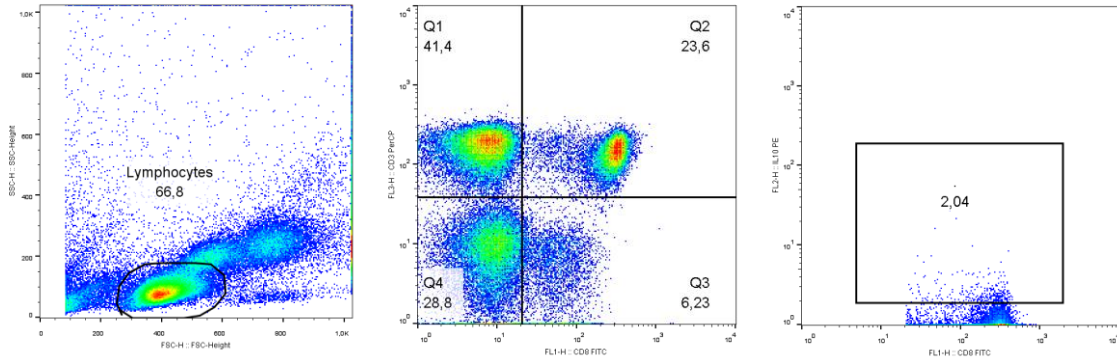
N3 - PMA



N3 - BjuL 5 µg/mL

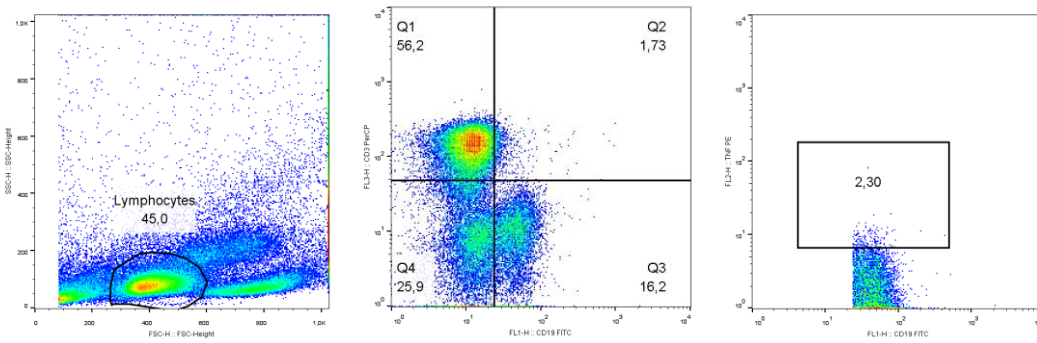


N3 - BjuL 10 µg/mL

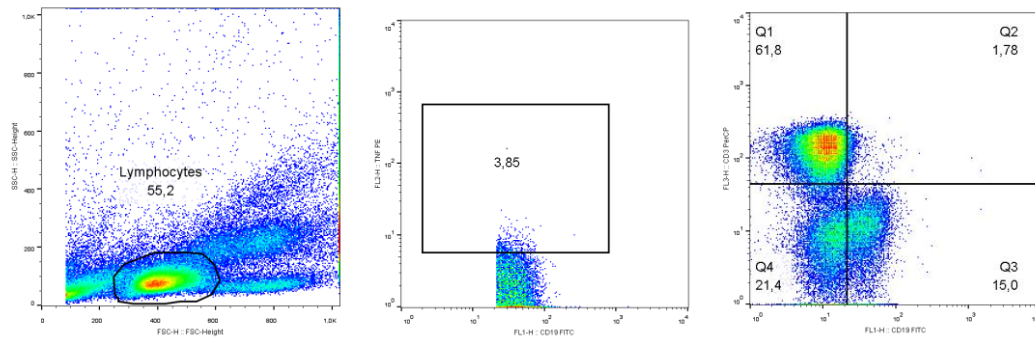


CD19⁺

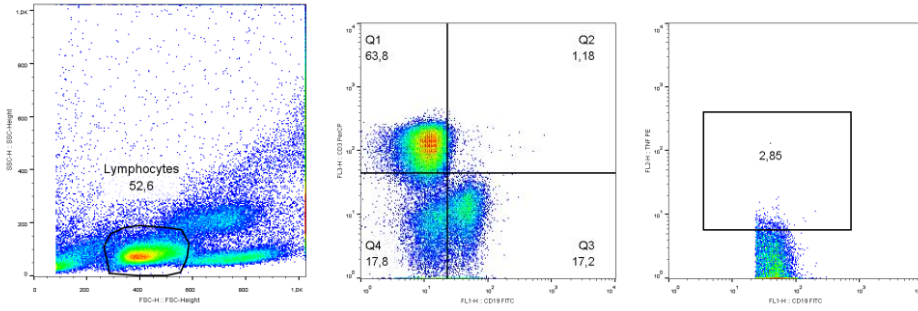
N1 - RPMI



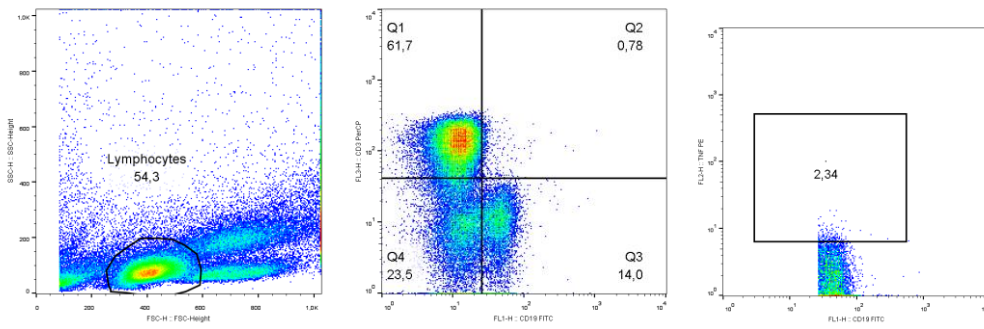
N1 - Con-A



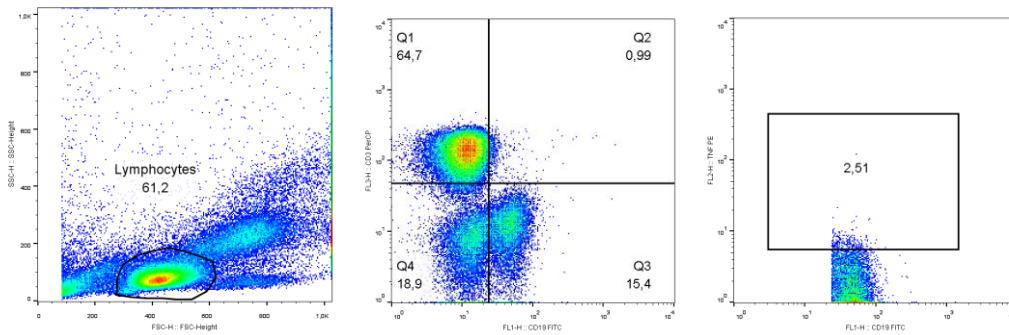
N1 - LPS



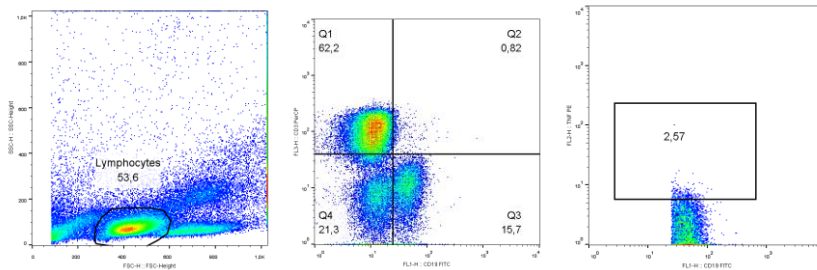
N1 - PMA



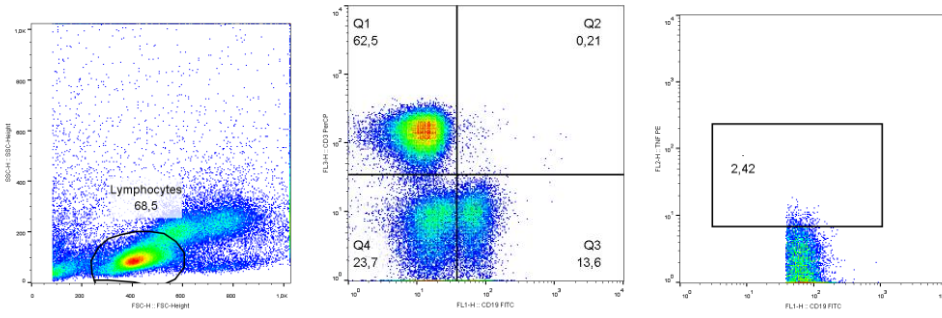
N1 - BjuL 5 µg/mL



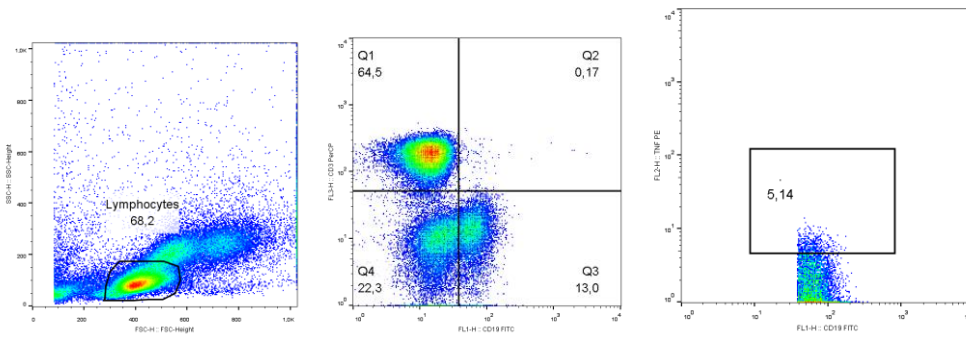
N1 - BjuL 10 µg/mL



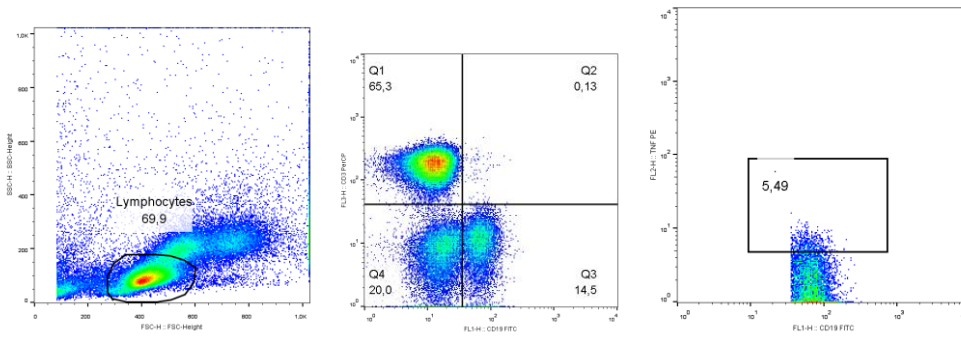
N2 - RPMI



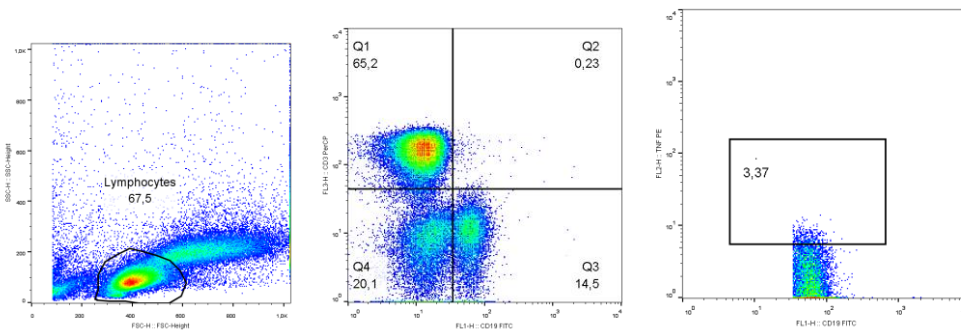
N2 - Con-A



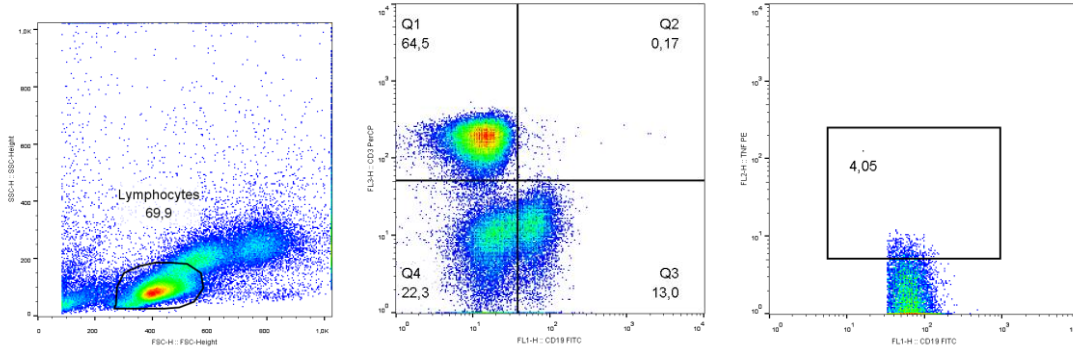
LPS



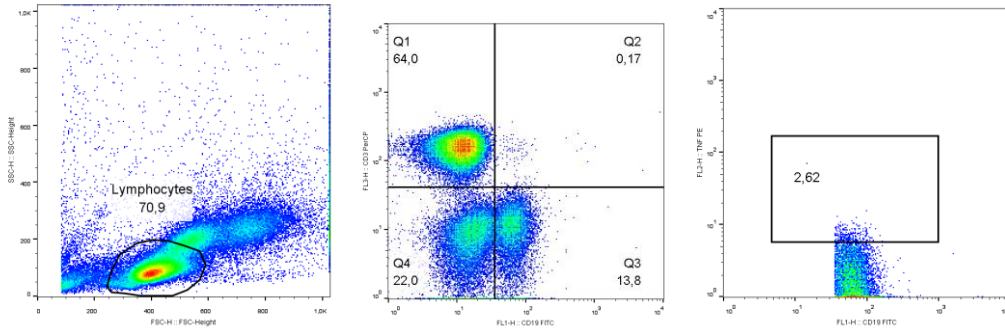
PMA



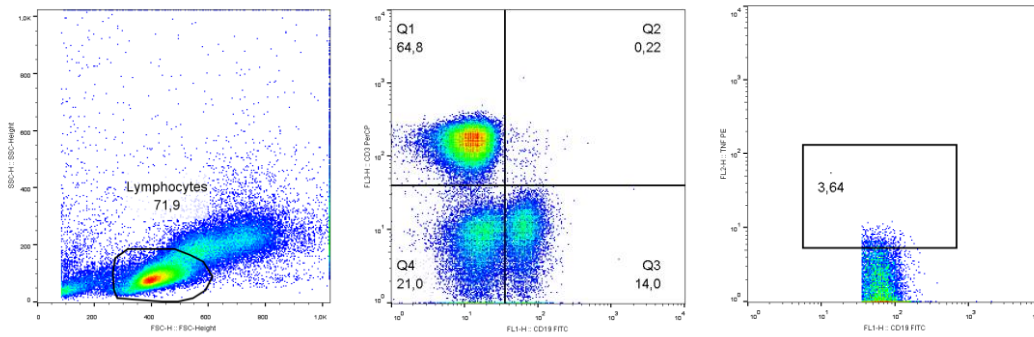
N2 - BjuL 5 µg/mL



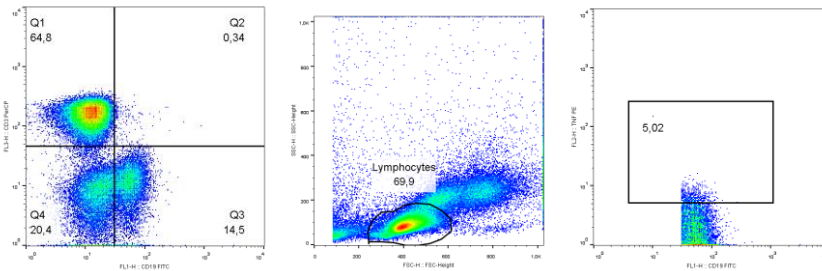
N2 - BjuL 10 µg/mL



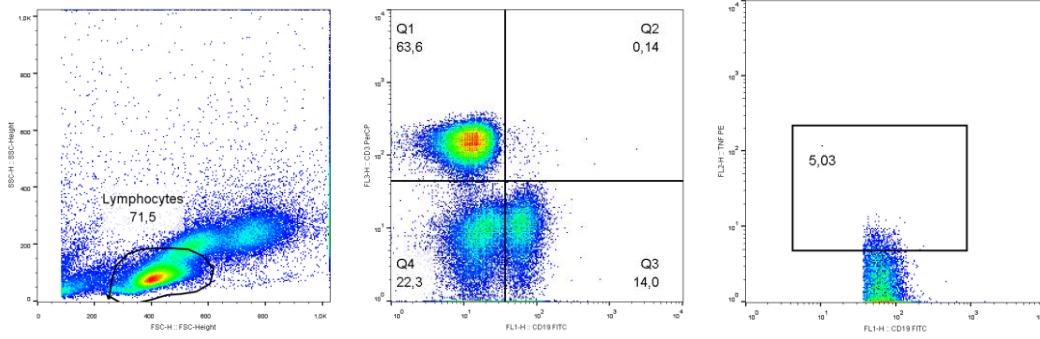
N3 - RPMI



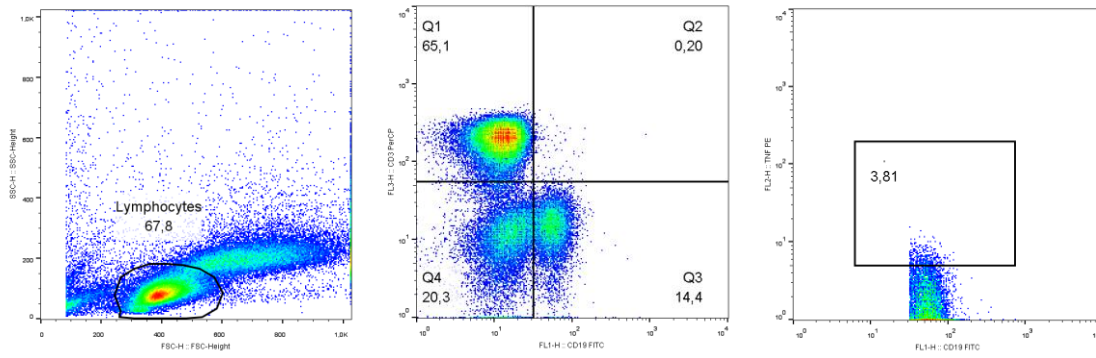
N3 - Con-A



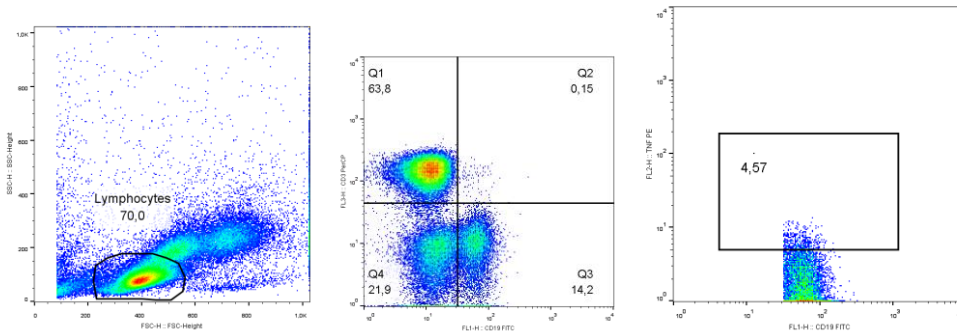
N3 - LPS



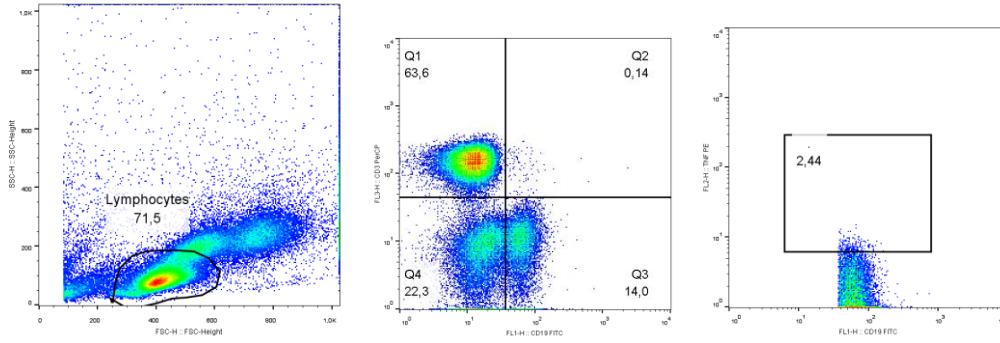
N3 - PMA



N3 - BjuL 5 µg/mL

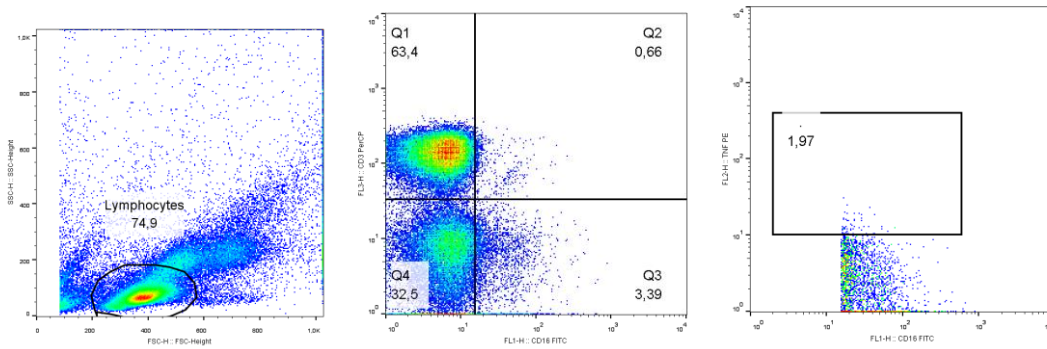


N3 - BjuL 10 µg/mL

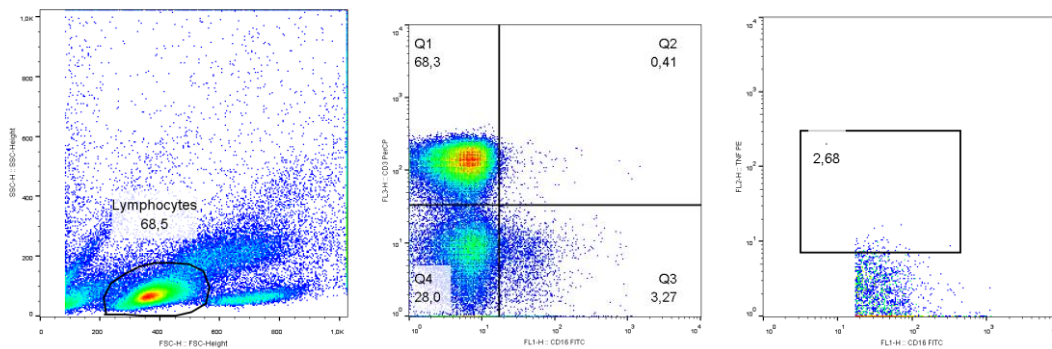


CD16⁺

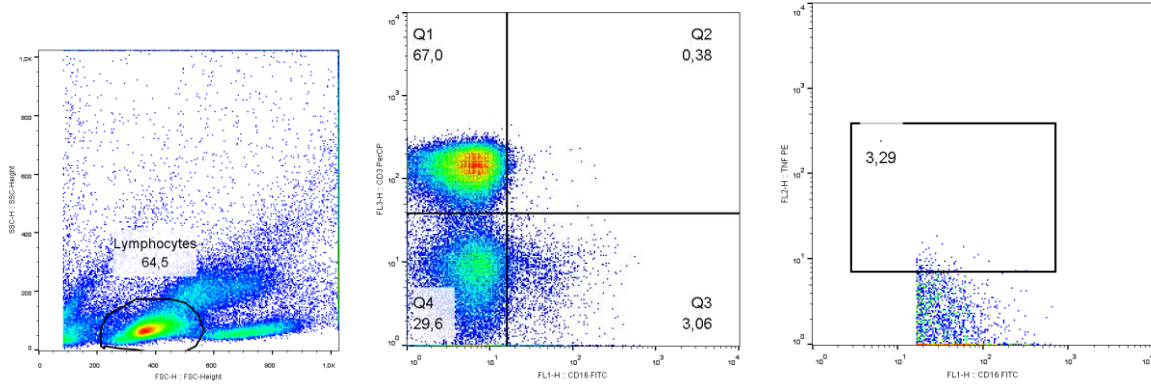
N1 - RPMI



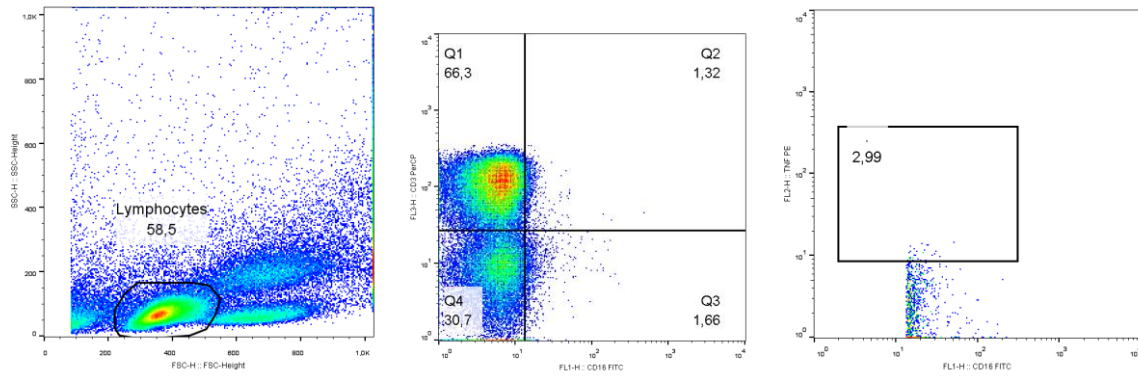
N1 - Con-A



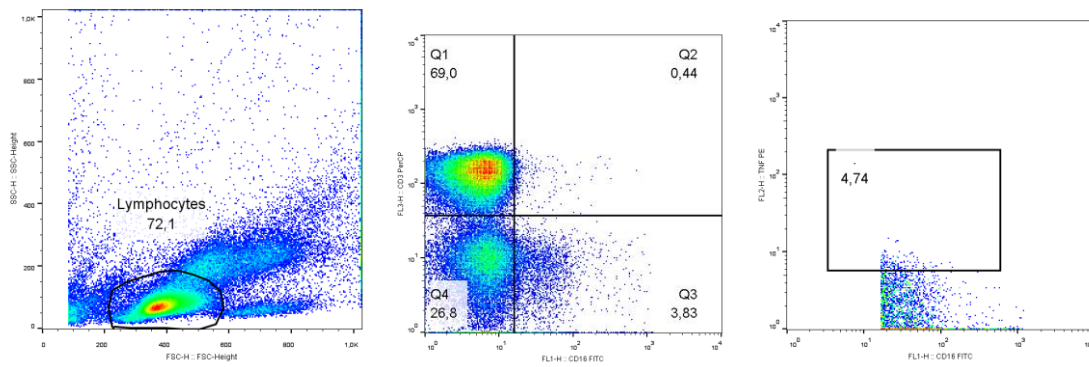
N1 - LPS



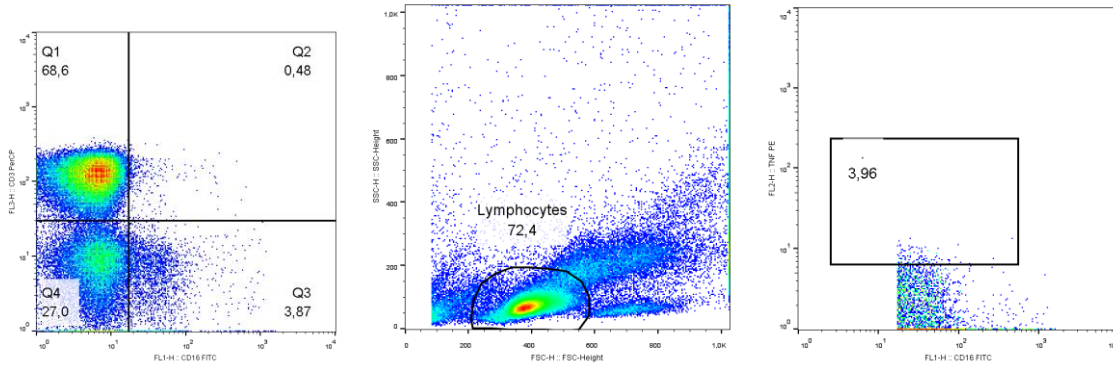
N1 - PMA



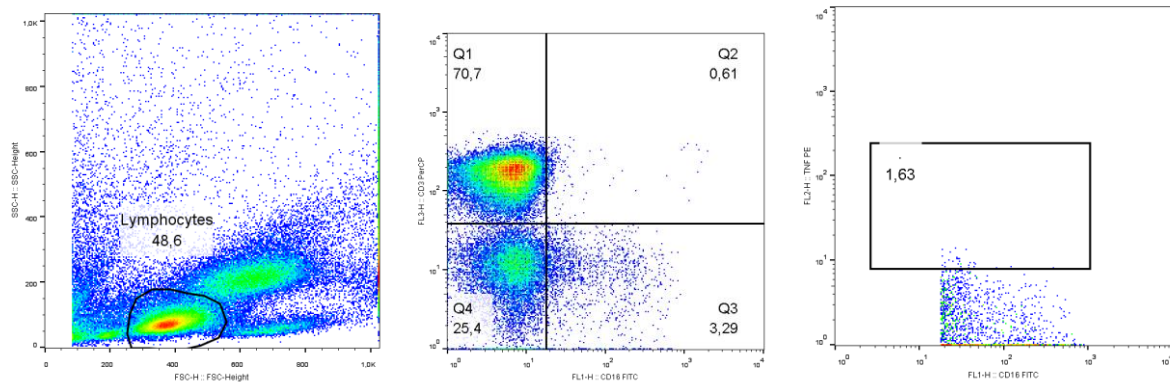
N1 - BjuL 5 µg/mL



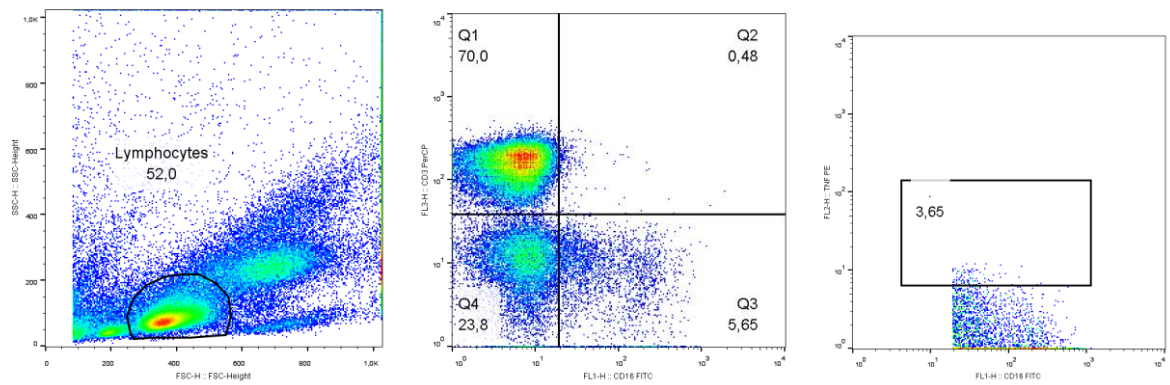
N1 - BjuL 10 µg/mL



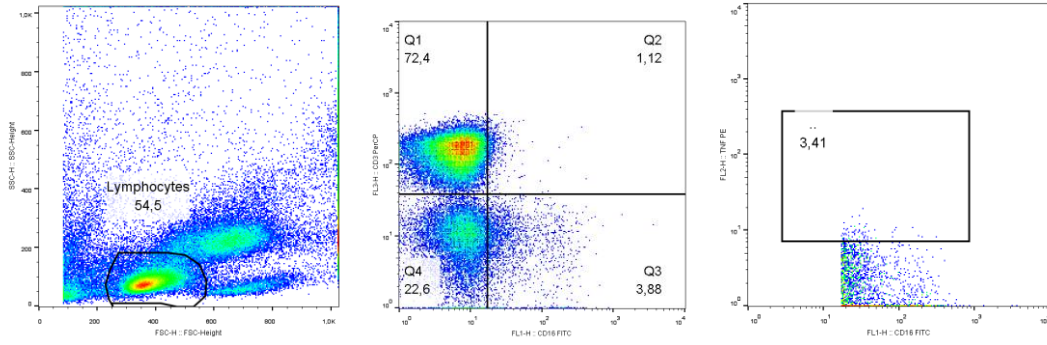
N2 - RPMI



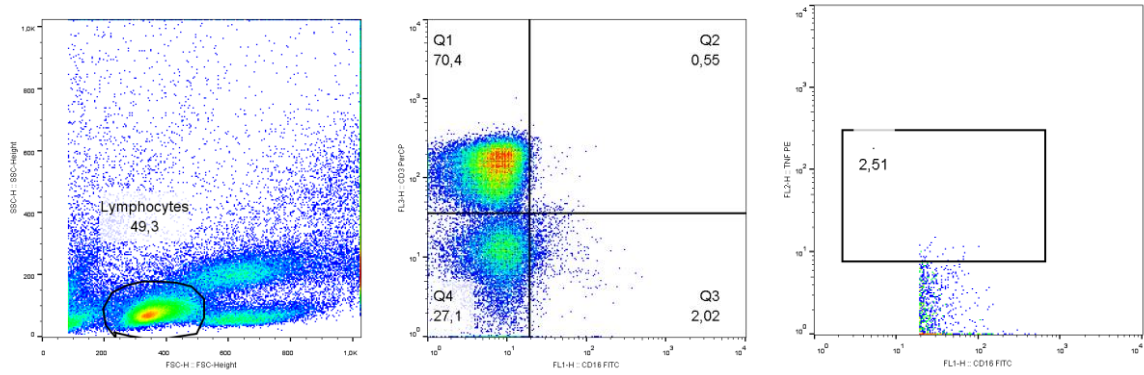
N2 - Con-A



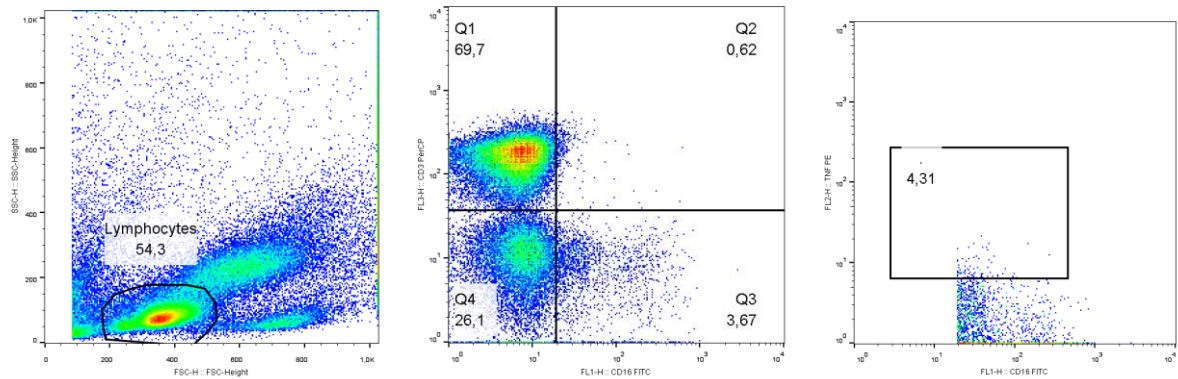
N2 – LPS



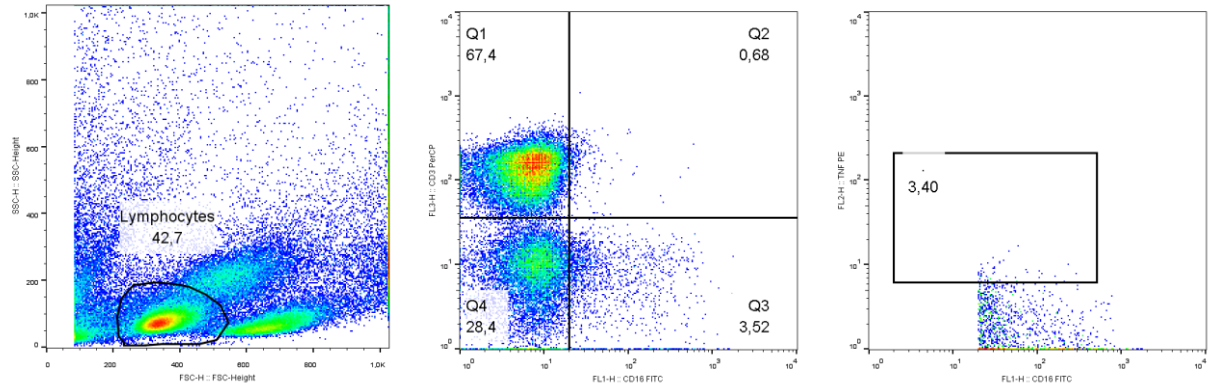
N2 – PMA



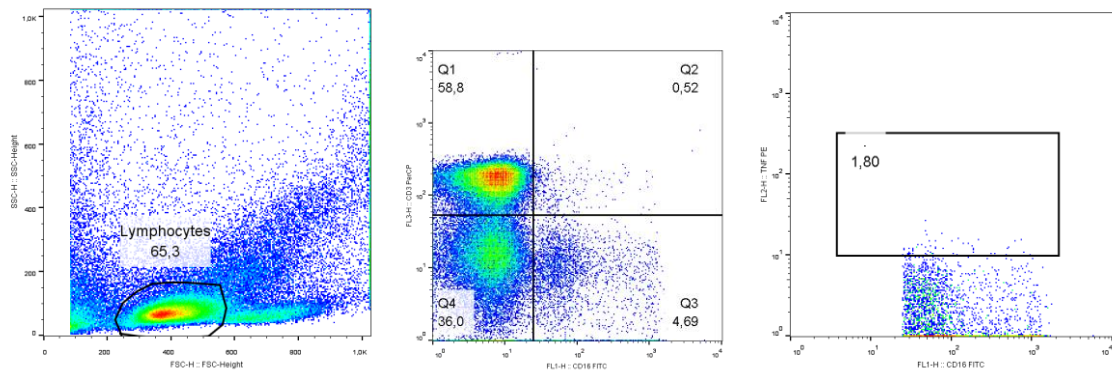
N2 - BjuL 5 µg/mL



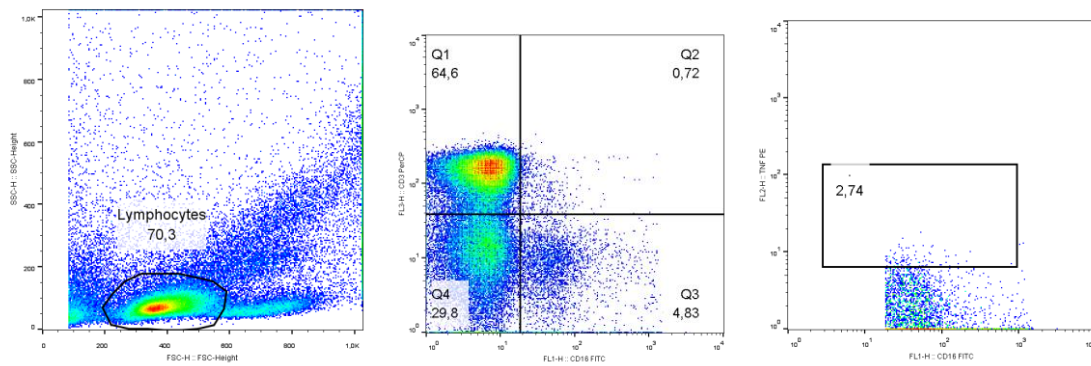
N2 - BjuL 10 µg/mL



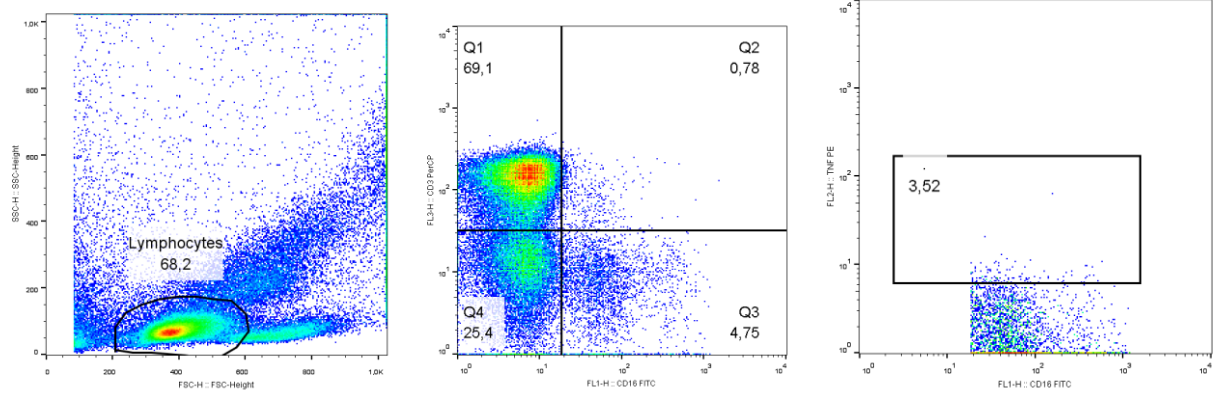
N3 - RPMI



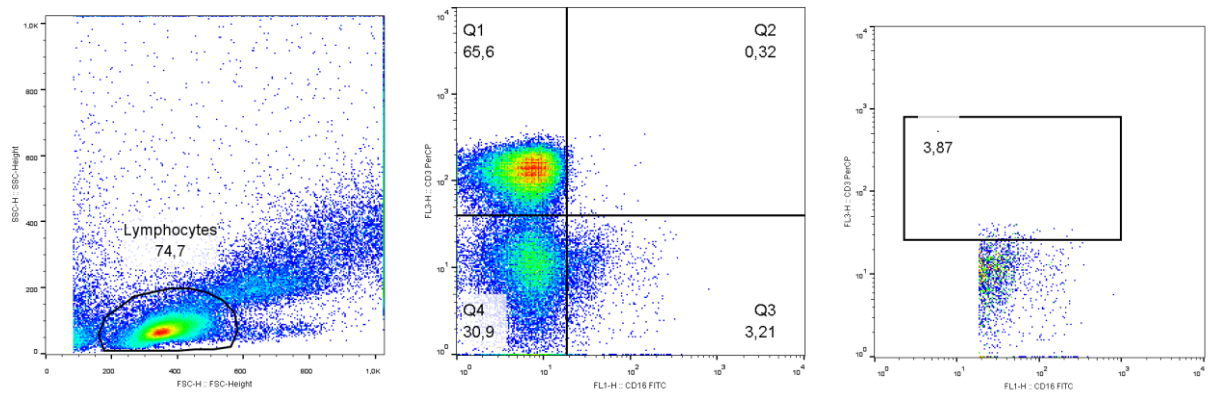
N3 - Con-A



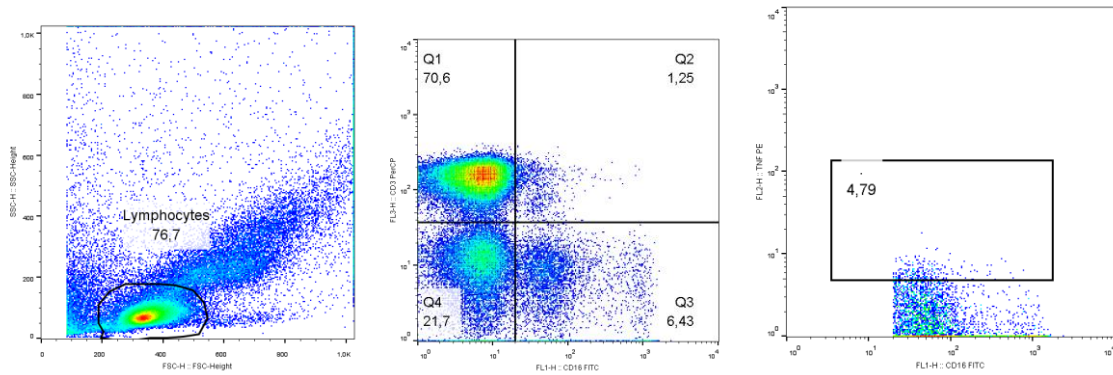
N3 – LPS



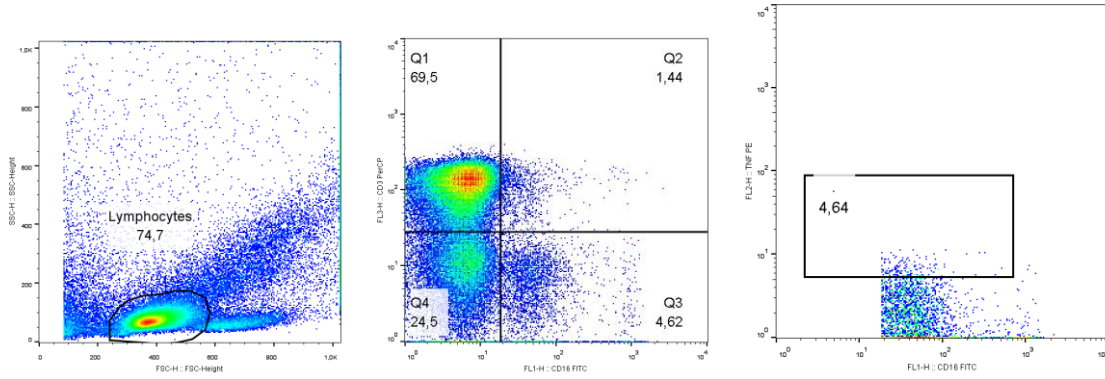
N3 – PMA



N3 - BjuL 5 µg/mL

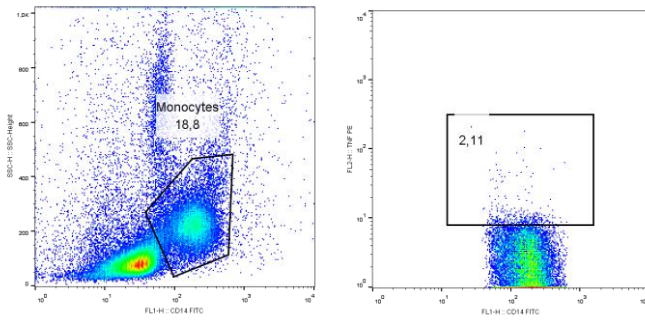


N3 - BjuL 10 µg/mL

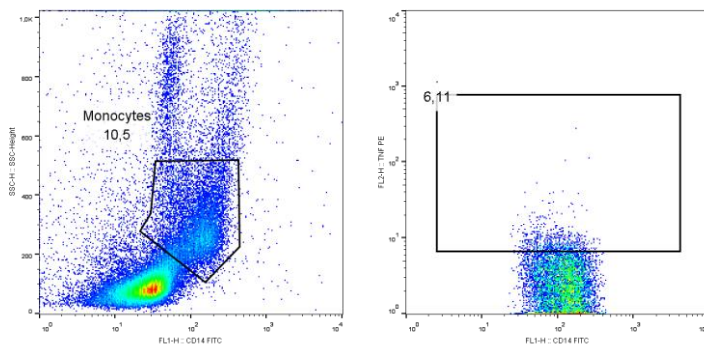


CD14⁺

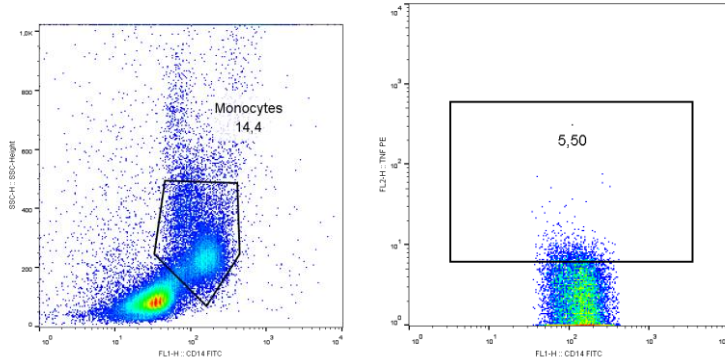
N1 - RPMI



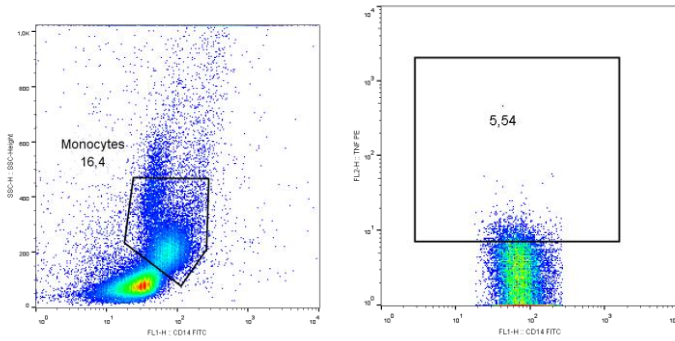
N1 - Con-A



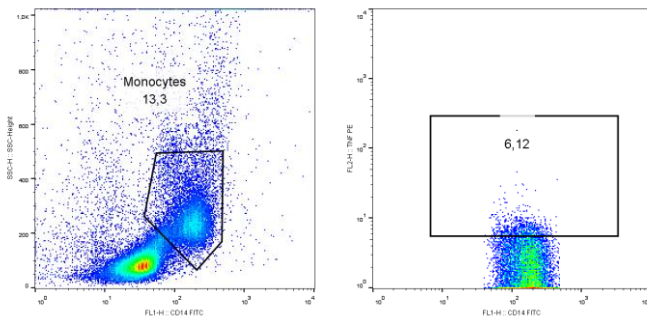
N1 - LPS



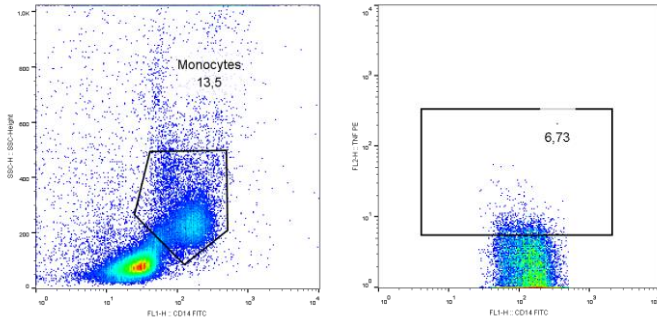
N1 - PMA



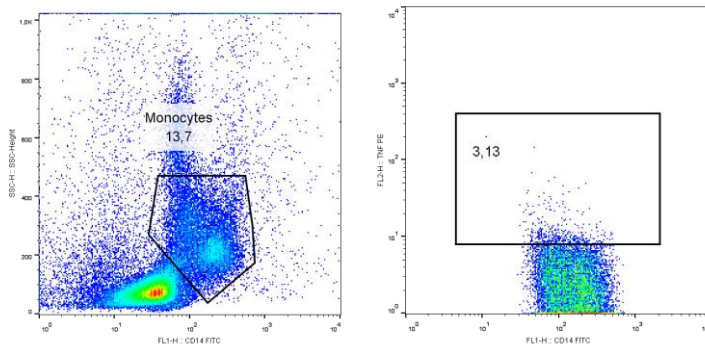
N1 - BjuL 5 µg/mL



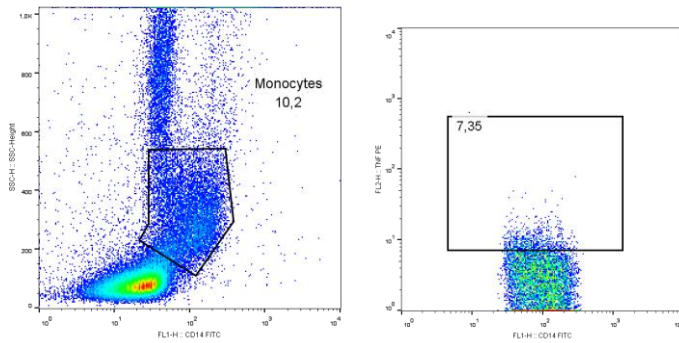
N1 - BjuL 10 µg/mL



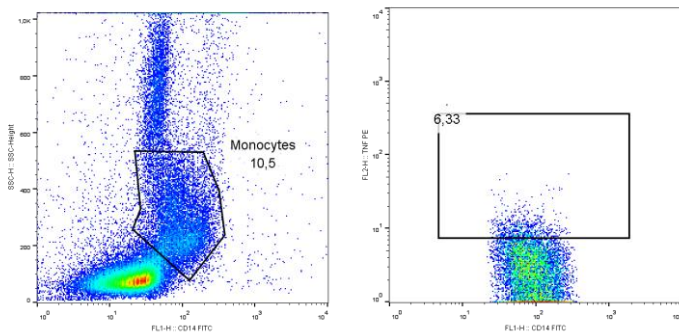
N2 - RPMI



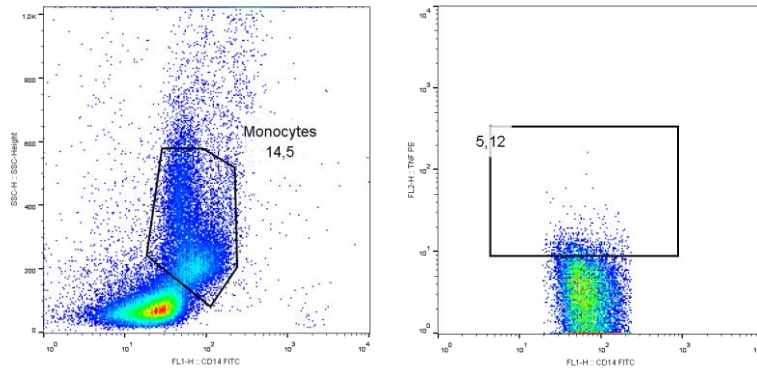
N2 - Con-A



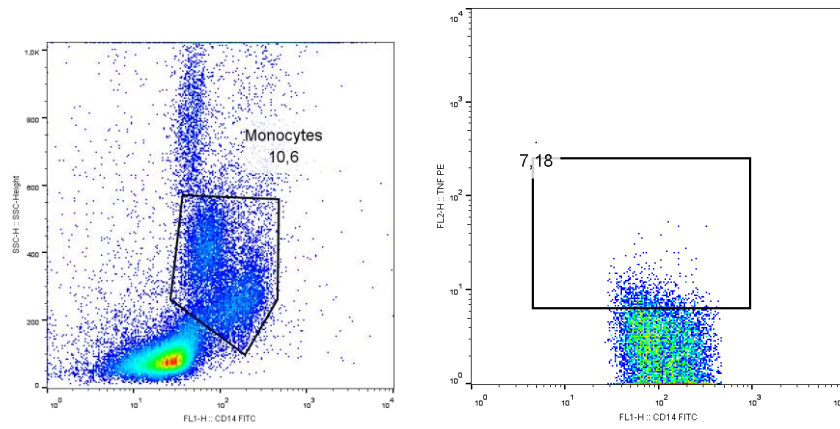
N2 - LPS



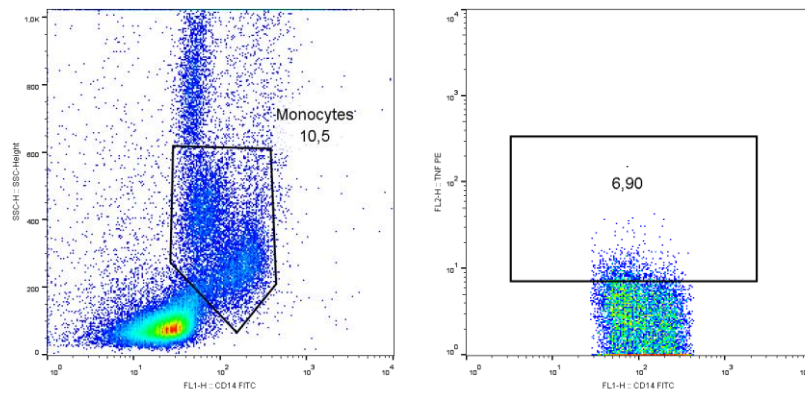
N2 - PMA



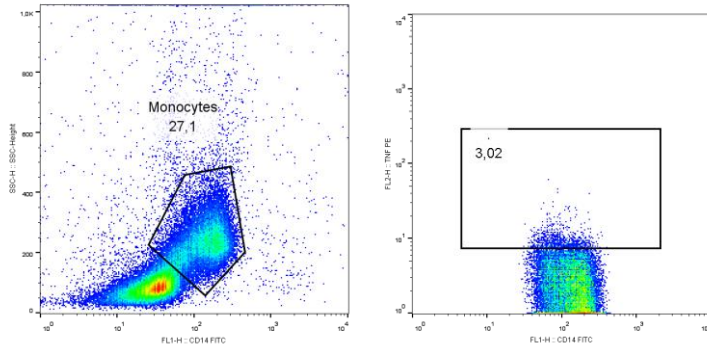
N2 - BjuL 5 µg/mL



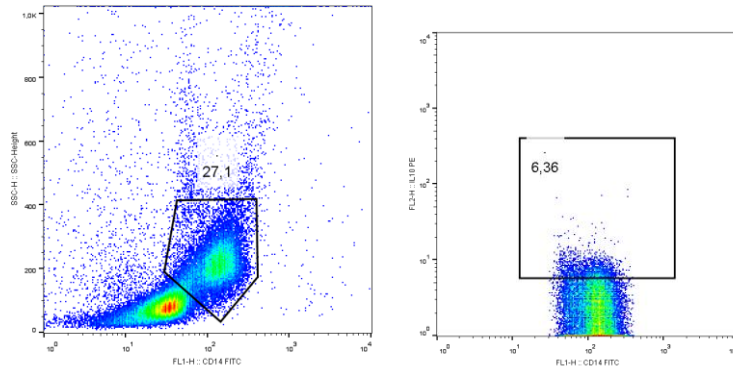
N2 - BjuL 10 µg/mL



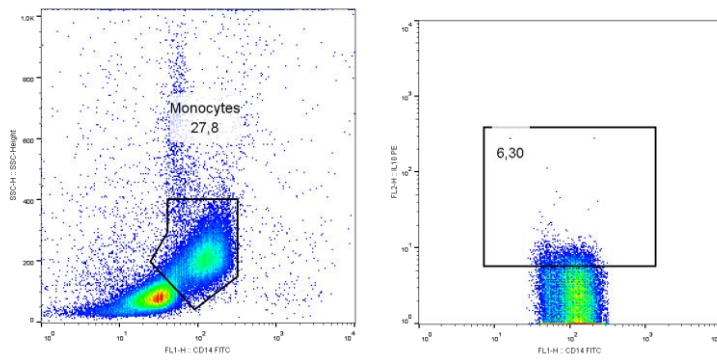
N3 - RPMI



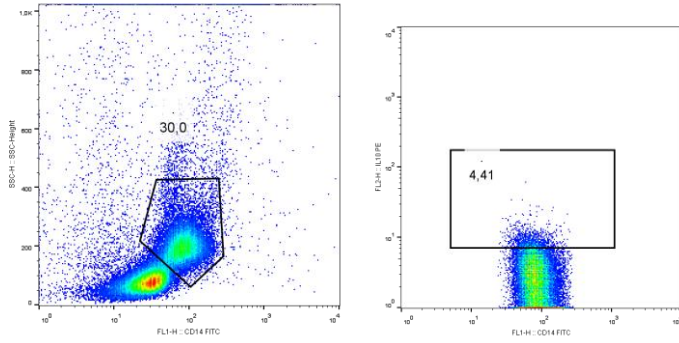
N3 - Con-A



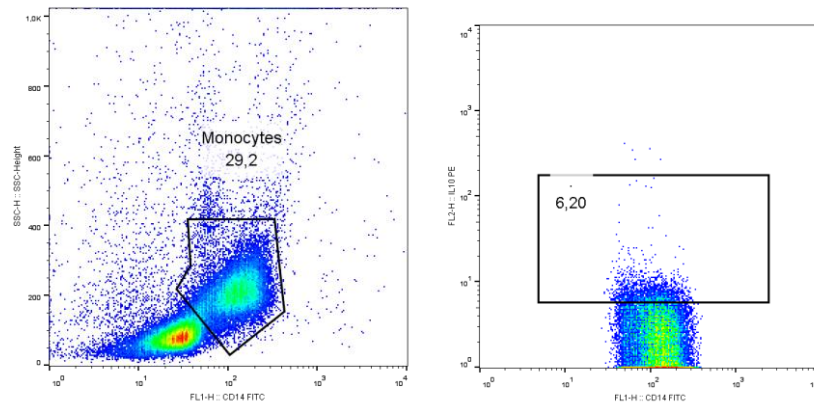
N3 - LPS



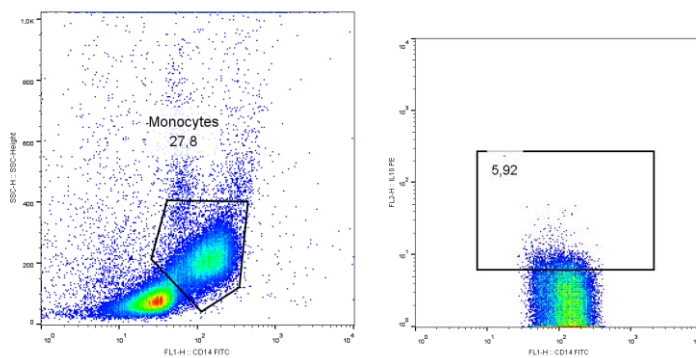
N3 – PMA



N3 - BjuL 5 µg/mL



N3 - BjuL 10 µg/mL



8.12 – Artigo Publicado

Effect of BjcL, a lectin isolated from *Bothrops jararacussu*, on human peripheral blood mononuclear cells.