



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Efeito de BJcuL, uma Lectina Purificada do Veneno de
***Bothrops jararacussu*, na Ativação de Células de Linhagem**
Monocítica

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientadora: Selene Elífilio Esposito

Co-orientadora: Andréa Novais Moreno Amaral

CURITIBA
ABRIL 2014



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Efeito de BJcuL, uma Lectina Purificada do Veneno de
Bothrops jararacussu, na Ativação de Células de Linhagem
Monocítica**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientadora: Selene Elífilio Esposito

Co-orientadora: Andréa Novais Moreno Amaral

CURITIBA

ABRIL 2014

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

N469e
2014 Netipanyj, Marcela Ferreira Dias
Efeito de BJcuL, uma lectina purificada do veneno de *Bothrops jararacussu*,
na ativação de células de linhagem monocítica / Marcela Ferreira Dias
Netipanyj ; orientadora, Selene Elíbio Esposito ; co-orientadora, Andréa Novais
Moreno Amaral. – 2014.
53 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2014
Bibliografia: f. 42-53

1. Bothrops. 2. Lectinas. 3. Venenos. I. Elíbio-Esposito, Selene Lobo.
II. Moreno, Andréa Novais. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed. – 610



PUCPR

GRUPO MARISTA

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - *Stricto Sensu*

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos vinte e cinco dias do mês de abril de 2014, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação “Efeito de BJcuL, uma Lectina Purificada do Veneno de Bothrops jararacussu, na Ativação de Células de Linhagem Monocítica” apresentada por **MARCELA FERREIRA DIAS NETIPANYJ** para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profa. Dra. Selene Elifio Esposito PUCPR – Presidente	
Profa. Dra. Patricia Maria Stuelp Campelo PUCPR	
Profa. Dra. Guilhermina Rodrigues Noletto UFPR	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profa. Dra. Selene Elifio Esposito

Conceito: APROVADA

Profa. Dra. Patricia Maria Stuelp Campelo

Conceito: APROVADA

Profa. Dra. Guilhermina Rodrigues Noletto

Conceito: APROVADA

Conceito Final: APROVADA

Observações da Banca Examinadora:

A banca aprovou a candidata mediante a realização das conexões superadas.

Profa. Dra. Selene Elifio Esposito
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

Dedicatória

*Dedico este trabalho
aos meus amados avós José e Iracema
e ao meu amado esposo Rodrigo,
que me apoiaram incondicionalmente nesta trajetória.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Selene Elíbio Esposito, pela simplicidade na arte de ensinar, obrigada pelo aceite em minha orientação, pela confiança, por agregar valores científicos que foram pilares deste trabalho, e acima de tudo obrigada pela amizade.

À Professora Doutora Andréa Novais Moreno-Amaral que possibilitou o início deste trabalho aceitando-me em sua equipe. Agradeço imensamente pelas contribuições científicas.

À Professora Doutora Patrícia Maria Stuelp-Campelo, pelas contribuições no decorrer deste trabalho e em minha formação docente, muitíssimo obrigada.

À Lidiane Maria Boldrini Leite, sempre disposta a auxiliar no trabalho de citometria de fluxo e a compartilhar boas conversas.

Ao Professor Doutor Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa pelas contribuições científicas.

Ao Professor Doutor Edvaldo Trindade da Silva pelo auxílio na marcação de superfície celular.

À equipe do Laboratório Experimental Multiusuário, Irenice, Ligia, Jane e Elaine, que tornaram o desenvolver da etapa experimental mais leve inclusive pelas conversas no café.

À todo o grupo de pesquisa, pela troca de conhecimento, auxílio no cultivo celular, amizade, e principalmente por tornarem esta etapa agradável e por vezes até divertida. Em especial a Caroline Tiemi Egoshi pelas marcações de superfície celular.

À Capes pelo suporte financeiro.

À PUCPR pela infraestrutura.

À minha família por respeitar incondicionalmente minhas escolhas, em especial aos meus avós, que sempre me apoiaram e incentivaram desde a graduação, à minha mãe pelo seu colo sempre a disposição nos momentos difíceis, à minha irmã Gabriela que me acompanhou por alguns finais de semana na parte experimental de cultivo celular, obrigada minha pequena e grande amiga.

Ao meu esposo Rodrigo pela sua imensa compreensão e apoio, particularmente nos vários finais de semana que pacientemente me acompanhou participando ativamente dos ensaios celulares, muitíssimo obrigada meu amor.

À Deus, que permitiu esta caminhada e que nos momentos de dificuldade acalmou minha mente e coração. Obrigada pela realização deste sonho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	I
SUMÁRIO.....	II
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS GERAIS DO SISTEMA IMUNE	1
1.2 IMUNIDADE INATA E MACRÓFAGOS.....	5
1.3 MACRÓFAGOS CLASSICAMENTE ATIVADOS	7
1.4 LECTINAS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA	11
1.5 BJCUL.....	14
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS	17
2.1 HIPÓTESE	17
2.2 OBJETIVO GERAL	17
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. METODOLOGIA	18
3.1 ESTUDO PRÉ-ANALÍTICO.....	18
3.1.1 OBTENÇÃO DA LECTINA BJCUL	18
3.1.2 BIOTINILAÇÃO DA LECTINA.....	18
3.1.3 MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR MONOCÍTICA HUMANA .	19
3.2 ESTUDO EXPERIMENTAL.....	19
3.2.1 DIFERENCIAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR MONOCÍTICA.....	19
3.2.2 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DA LECTINA NA SUPERFÍCIE CELULAR	20
3.2.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR	21

3.2.4	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCÍTICA.....	21
3.2.5	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	22
3.2.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DA ATIVAÇÃO CELULAR	22
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4.	RESULTADOS	24
4.1	INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR	24
4.2	AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE BJCUL NA SUPERFÍCIE CELULAR	27
4.3	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR.....	29
4.4	ANÁLISE DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA	29
4.5	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO... 30	
4.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DA ATIVAÇÃO CELULAR	32
5.	DISCUSSÃO.....	34
6.	CONCLUSÃO	40
7.	REFERÊNCIAS	41

RESUMO

A lectina purificada do veneno de *Bothrops jararacussu* (BJcuL) é classificada como uma lectina tipo-C, com especificidade para D-Galactose. Estudos indicam seu envolvimento na ativação de respostas imunes, mais especificamente na resposta de neutrófilos. Macrófagos são células de grande plasticidade que atuam em diferentes eventos para a preservação da integridade tecidual do organismo, garantindo que uma resposta imune apropriada não ceda lugar a imunopatologias. No sentido de avaliar a ação de BJcuL em macrófagos, testou-se no presente trabalho a ação da lectina em células de linhagem monocítica U937. O objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade de BJcuL na ativação de macrófagos. Para avaliar a capacidade da lectina em promover diferenciação celular, as células foram incubadas com a lectina (2,5 µg/ml) por 24 horas. Os resultados revelam que BJcuL não promoveu diferenciação da linhagem celular. A capacidade da lectina em se ligar a superfície de macrófagos foi confirmada por microscopia de fluorescência, para tal análise foi utilizado o programa MetaViewerV 2.0.117, que possibilitou a visualização da interação difusa de BJcuL biotinilada (20 µg/ml) à superfície de macrófagos. No entanto quando a lectina foi pré-incubada com seu carboidrato específico (D-Gal - 100 nM) a ligação célula-lectina foi anulada, revelando que a interação é específica para ligantes glicosilados na superfície celular. BJcuL não apresentou toxicidade sobre macrófagos, mantendo uma viabilidade de aproximadamente 100% para todas as concentrações testadas. A ativação celular foi verificada pelo aumento da atividade fagocítica das células pré-sensibilizadas com BJcuL (2,5 µg/ml), que mantiveram o padrão de estimulação de LPS (50 ng/ml) e INF-γ (150 U). A atividade microbicida foi confirmada com o aumento da produção de H₂O₂ após 12 horas de estímulo com INF-γ (150U), BJcuL (2,5 µg/ml), INF-γ + BJcuL (150 U + 2,5 µg/ml); BJcuL exerceu um aumento significativo em relação ao controle. Quando foi analisada a expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos após estímulo com LPS (25 ng/ml) e BJcuL (2,5 µg/ml), verificou-se aumento para todos os marcadores em relação ao controle RPMI, sendo um aumento mais significativo para a expressão de CD86 (99%),HLA-DR (74%). Os resultados permitem concluir que BJcuL apresenta potencial ativador sobre macrófagos derivados da linhagem celular monocítica U937.

ABSTRACT

The lectin purified from *Bothrops jararacussu* (BJcuL) is classified as a C - type lectin with specificity for D-galactose. Studies indicate its involvement in the activation of immune responses, specifically the response of neutrophils. To assess the action of BJcuL in macrophages, we tested in the present study the action of the lectin in monocytic cell line U937. Macrophages are cells of plasticity that operate in different events for the preservation of tissue integrity of the body, ensuring that an appropriate immune response not give rise to immunopathology. The objective of this study was to evaluate the ability of BJcuL in macrophage activation. To evaluate the ability of the lectin to promote cell differentiation, the cells were incubated with lectin (2,5 mg/ml) for 24 hours. The results reveal that BJcuL not promoted differentiation of cell lineage. The ability of lectins to bind to the surface of macrophages was confirmed by fluorescence microscopy for such analysis 2.0.117 MetaViewerV the program, which enabled the visualization of the diffuse interaction of biotinylated BJcuL (20 µg/ml) on the surface of macrophages. However, when the lectin was preincubated with its specific carbohydrate (D-Gal - 100 nM) to cell - binding lectin has annulled, showing that the interaction is specific for glycosylated cell surface ligands. BJcuL showed no toxicity while maintaining a viability of about 100% for all concentrations tested. The activation was verified by an increase in phagocytic activity of cells pre-sensitized with BJcuL (2,5 mg/ml), which remained the standard LPS stimulation (50 ng/ml) and IFN- γ (150 U). The microbicidal activity was confirmed with the increased production of H₂O₂ after 12 hours of stimulation with INF- γ (150 U), BJcuL (2,5 mg/ml), INF- γ + BJcuL (150 U + 2,5 g/ml) or RPMI only 2%; BJcuL had a significant increase over the control. When we analyzed the expression of molecules involved in antigen presentation after stimulation with LPS (25 ng/ml) and BJcuL (2,5 g/ml), there was increase for markers compared to RPMI, being more significant increase for the CD86 (99%) e HLA-DR (74%). The results indicate that BJcuL presents activator of macrophages derived from monocytic cell line U937 potential.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAM** – Alternative Activated Macrophage – Macrófagos Alternativamente Ativados
- ADP** – Adenosina Difosfato
- APCs** – Antigen-Presenting Cell – Células Apresentadoras de Antígenos
- ArtinM** – *Artocarpus heterophyllus*
- BJcuL** – Lectina purificada do veneno de *Bothrops jararacussu*
- ConA** – Concavalina A
- CTL** – C-type Lectin – Lectina tipo-C
- CTLs** – Cytotoxic T Lymphocytes – Linfócitos T Citotóxicos
- CRD** – Carbohydrate Recognition Domain – Domínio de Reconhecimento de Carboidrato
- DCFH-DA** – 2,7- dichlorofluorescein-diacetate – diacetato de diclorofluoriceína
- D-GAL** - D-Galactose
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DVL** – *Dioclea violaceae* lectin
- EDTA** – Ácido Etilenodiaminotetracético
- EROS** - Espécies Reativas de Oxigênio
- FITC** – Isotiocianato de Fluoresceína
- Gln-Pro-Asp** – Glicina-Prolina-Aspartato
- HLA** – Human Leucocyte Antigen – Antígeno Leucocitário Humano
- IL-4** – Interleucina 4
- IFN- γ** - Interferon- γ
- KML** – Korean Mistletoe Lectin – Lectina Mistletoe Coreana
- LPS** – Lipopolissacarídedo

MHC – Major Histocompatibility Complex – Complexo Principal de Histocompatibilidae

ML – Mistletoe Lectin – Lectina mistletoe (família)

MTT – Brometo de 3-(4,5 dimetiliazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium

NADPH – Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate – Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NF-KB - Nuclear Factor - Kappa B – Fator Nuclear kappa B

NK – células *Natural Killer*

PAMP - Pathogen Molecular Associate Pattern – Padrão Molecular Associado ao Patógeno

PBS – Solução Salina Fosfatada Tamponada

PCL – *Polygonatum cyrtoneura* Lectin – Lectina *Polygonatum cyrtoneura*

PHA – *Phaseolus vulgaris*

PKC – Protein Kinase C – Proteína Quinase C

PMA – Forbol 12-miristato 13-acetato

PRRs – Pattern Recognition Receptor

PSA – *Pisum sativum*

ROS – Reactive Oxygen Species – Espécies Reativas de Oxigênio

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

ScL – *Synadenium carinatum* Lectin

SFB – Soro Fetal Bovino

SVLs – Snake Venom Lectins – Lectinas de Veneno de Serpente

TCR – T Cell Receptor – Receptor de Célula T

TLR – Toll Like Receptor – Receptor Ligado ao Toll

TNF- α – Tumor Necrosis Factor-alpha – Fator de Necrose Tumoral

U937 – Linhagem Celular Monocítica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Células e moléculas do sistema imune inato e adaptativo	2
Figura 2: Maturação da célula T0 em Th1 e Th2	4
Figura 3: Citocinas produzidas por células imunes podem originar macrófagos com fisiologia distinta	6
Figura 4: O processamento da informação nos diferentes estágios da fagocitose	8
Figura 5: Moléculas envolvidas na apresentação de antígeno	10
Figura 6: Análise da capacidade de BJcuL e PMA na indução da diferenciação celular	25
Figura 7: Análise da capacidade de PMA na indução da expressão de CD14	26
Figura 8: Análise das alterações morfológicas induzidas por PMA	27
Figura 9: Marcação de superfície de células U937 com BJcuL biotinilada	28
Figura 10: Análise da viabilidade celular pelo método do MTT	29
Figura 11: Avaliação da atividade fagocítica por macrófagos	30
Figura 12: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio	31
Figura 13: Avaliação da expressão de CD80 (A), CD86 (B), HLA-ABC (C) e HLA-DR (D) na superfície de macrófagos	32

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DO SISTEMA IMUNE

O sistema imune é constituído por células e moléculas, que atuam de modo integrado para manter o equilíbrio do organismo. A função primordial do sistema imune é distinguir entre o próprio do indivíduo do que não lhe é próprio, sendo capaz de mobilizar um conjunto de mecanismos que lhe permitam ter capacidade para resistir às agressões de agentes patogênicos, sejam eles bactérias, fungos, parasitas, vírus, toxinas ou células alteradas do próprio corpo, como por exemplo, as células neoplásicas (BONILLA et al., 2010; TURVEY et al., 2010).

O sistema imune pode ser classificado didaticamente em duas "linhas de defesa": imunidade inata e adaptativa (Figura 1). A imunidade inata representa a primeira linha de defesa do organismo e compreende quatro tipos de barreiras defensivas: mecânica (pele e mucosas), química (temperatura, pH baixo e mediadores químicos), microbiológica (flora normal) e celular. As células envolvidas na imunidade inata são os fagócitos, células dendríticas, mastócitos, basófilos, eosinófilos, *natural killer* (NK) e os linfócitos (células T), todas são derivadas de uma célula tronco hematopoética comum da medula óssea (TURVEY et al., 2010)

Os fagócitos são subdivididos em dois tipos de células principais: neutrófilos e macrófagos. Ambas as células compartilham a função de fagocitar os microrganismos. Além das suas propriedades fagocíticas, neutrófilos contêm grânulos citoplasmáticos que, quando secretados, auxiliam na eliminação de patógenos, estes grânulos podem ser classificados como primários e secundários. Os grânulos primários contêm várias enzimas microbidas, proteinases e hidrolases ácidas e os grânulos secundários, fosfatase alcalina, colagenase, lactoferrina e lisozima (MAYADAS et al., 2014). Ao contrário dos neutrófilos (que são células de vida curta), os macrófagos são células de vida longa que não só desempenham um papel na fagocitose, mas estão também envolvidos na

apresentação de antígenos à células T. Como os neutrófilos e macrófagos, as células dendríticas degradam os patógenos que capturam, mas sua principal função é a apresentação de antígenos às células T (DALE *et al.*, 2008). Os mastócitos possuem grânulos em seu citoplasma e estão envolvidos na resposta contra parasitas. Basófilos e eosinófilos parecem estar envolvidos em processos inflamatórios alérgicos, enquanto que as células NK reconhecem e matam células infectadas por vírus ou células tumorais (JANEWAY *et al.*, 2002; TURVEY *et al.*, 2010).

A imunidade adaptativa se desenvolve quando a imunidade inata é ineficaz na eliminação de agentes infecciosos e a infecção é estabelecida. As principais funções da resposta imune adaptativa são o reconhecimento da presença de antígenos específicos, a geração de vias imunológicas efetoras que eliminem patógenos ou células infectadas por patógenos, e o desenvolvimento de memória imunológica que pode rapidamente eliminar um patógeno específico em infecções subsequentes. Atuando nesta linha de defesa estão as células T, que são ativadas através da ação de células apresentadoras de antígenos (APCs) e as células B (BONILLA *et al.*, 2010).

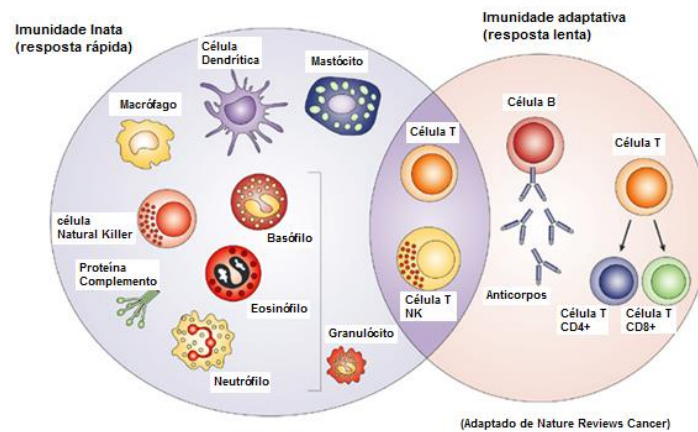


Figura 1: Células e moléculas do sistema imune inato e adaptativo. A função de resposta imune inata como a primeira linha de defesa contra a infecção, é desempenhada por fatores solúveis, como proteínas do complemento, e diversos componentes celulares, incluindo granulócitos (basófilos, eosinófilos e neutrófilos), mastócitos, macrófagos, células dendríticas e as células NK (natural killer). A resposta imune adaptativa é caracterizada por um desenvolvimento mais lento, se manifesta aumentando a especificidade antigênica e é caracterizada pela memória imunológica. É constituída por anticorpos, células B, linfócitos T CD4 + e CD8 +.

As células T derivam de células-tronco hematopoéticas da medula óssea e, após a migração, amadurecem no timo. Estas células expressam um receptor de ligação ao antígeno na sua membrana, conhecido como o receptor da célula T (TCR) enquanto que as APCs expressam proteínas de superfície celular, conhecido como o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I ou II, responsáveis por apresentar o antígeno à célula T. Este processo de apresentação de antígenos estimula as células T *naive* para maturação em células T citotóxicas (CD8⁺) ou células T *helper* (Th) (células CD4⁺) representados na figura 2 (BERNINK *et al.*, 2013).

As células T CD8⁺ são estimuladas por MHC de classe I e estão envolvidas na destruição de células infectadas por agentes patogênicos. Sua expansão clonal produz células efetoras que aumentam a liberação de perforina (proteína que causa lise de células-alvo), granzima e granulicina (substâncias que induzem a apoptose das células alvo). Após a resolução da infecção a maioria das células efetoras morrem e são eliminadas pelos fagócitos. No entanto, algumas são mantidas como células de memória que podem ser rapidamente reativadas em células efetoras em encontros subsequentes com o mesmo antígeno (BONILLA *et al.*, 2010).

As células T CD4⁺ (Th) desempenham um papel importante no estabelecimento e na maximização da resposta imune. Elas não exercem atividade citotóxica ou fagocítica, nem matam células infectadas ou patógenos, mas orquestram a resposta imune direcionando outras células para execução dessas tarefas. São ativadas pela interação do TCR a moléculas MHC de classe II. Podendo assim gerar dois tipos de resposta: Th1 ou Th2 (JIANG *et al.*, 2013).

A resposta Th1 é caracterizada pela a produção de interferon-gama (IFN- γ) pela célula T, o qual aciona atividades bactericidas de macrófagos, e outras citocinas que induzem as células B a fazer opsonização e neutralização através de anticorpos. A resposta Th2 é caracterizada pela liberação de citocinas

(interleucina – 4, 5 e 13), que estão envolvidas na ativação e/ou recrutamento de imunoglobulina E (IgE), anticorpo produzido por células B. Como as células T citotóxicas a maioria das células Th irão morrer após a sua ação na resolução da infecção, permanecendo algumas células de memória (BONILLA *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2013).

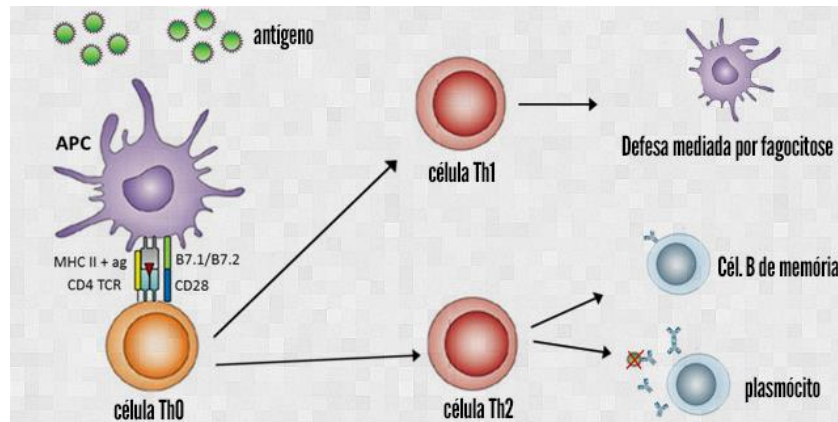


Figura 2: Maturação da célula T0 em Th1 e Th2. Células Th0 sofrem maturação em resposta ao antígeno. Para se diferenciarem em linfócitos T citotóxicos (CD8+) devem receber dois sinais diferentes. Primeiro, eles devem reconhecer o antígeno apresentado por APCs expressando MHC-I e, segundo, eles devem ser estimulados por IL-2. Linfócitos T auxiliares (CD4+) interagem com APCs expressando MHC classe II, além de receber o estímulo de IL-4. Como resultado desses dois sinais, os linfócitos T0 maturam em um LT ativo que vai lisar as células-alvo que carregam o mesmo antígeno, no caso da resposta Th1 ou irão estimular plasmócitos na produção de anticorpos, no caso da resposta Th2. Adaptado de Abbas, et. al. Cellular and Molecular Immunology. 3rd Ed., p. 292.

As células B, que também atuam na imunidade adaptativa, surgem de células tronco hematopoéticas da medula óssea e sofrem maturação na própria medula. A ativação das células B *naive* é acionada pelo antígeno e normalmente envolve o auxílio de células Th; uma vez ativadas as células B se diferenciam em células plasmáticas (plasmócitos) ou células de memória. O papel dos plasmócitos é produzir e secretar anticorpos, que auxiliam na eliminação de microrganismos ligando-se a eles e tornando-os alvo para os fagócitos. As células B de memória são capazes de responder rapidamente a uma segunda exposição ao mesmo antígeno reforçando assim a resposta imune (BONILLA *et al.*, 2010).

1.2 IMUNIDADE INATA E MACRÓFAGOS

Macrófagos são células diferenciadas que se originam como monócitos do sangue. Apresentam alta plasticidade, o que garante sua diversidade de funções. Os macrófagos podem responder a estímulos endógenos que são gerados rapidamente após lesão ou infecção, tipicamente produzidos por células do sistema imune inato e podem exercer um marcado, porém transitório efeito sobre a fisiologia dos macrófagos. Podem também responder a sinais que são produzidos por células antígeno-específicas, estes sinais são mais focados e prolongados do que estímulos da imunidade inata (DALE *et al.*, 2008).

Estudos sugerem três subpopulações de macrófagos (Figura 3), cada uma com uma fisiologia distinta, geradas por sinais da imunidade inata ou adaptativa. A primeira população trata de macrófagos ativados classicamente que são produto da resposta imune mediada por células. Macrófagos ativados classicamente são protótipos de células efetoras imunes, que matam patógenos intracelulares pela produção de radicais de oxigênio e nitrogênio. Elas também secretam uma bateria de citocinas inflamatórias que ajudam a orquestrar e ampliar a resposta imune Th1. Os macrófagos classicamente ativados são importantes componentes da defesa do hospedeiro, mas também atuam como potentes mediadores da inflamação (EDWARDS *et al.*, 2006).

A segunda população é composta por macrófagos alternativamente ativados, que surgem em resposta a interleucina 4 (IL-4), produzida durante a resposta imune adaptativa pelas células Th2 ou durante a resposta imune inata por eosinófilos. Basófilos e mastócitos também são importantes fontes de início da produção de IL-4 (BRANDT *et al.*, 2000). A IL-4 estimula a conversão intracelular de arginina em ornitina, um precursor de poliaminas e de colágeno, contribuindo assim para a produção da matrix extracelular, e assim promovendo a cicatrização de feridas (KREIDER *et al.*, 2007). Estes macrófagos estão envolvidos também no

crescimento tumoral, angiogênese e imunossupressão (GORDON, 2003; KZHYSKOWSKA *et al.*, 2006).

A terceira população é a de macrófagos regulatórios, que são gerados em resposta a estímulos inatos ou adaptativos da resposta imune, incluindo complexos imunes e prostaglandinas (MOSSER *et al.*, 2008a). Embora as respostas ao estresse não sejam considerados parte da imunidade inata, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal pode exercer efeitos marcantes sobre os macrófagos. Os glicocorticóides são liberados pelas células adrenais em resposta ao estresse e podem inibir a defesa do hospedeiro mediada pelos macrófagos e funções inflamatórias através da inibição da transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias e diminuindo a estabilidade do RNAm, dando origem a uma população de macrófagos regulatórios (GORDON, 2003; KZHYSKOWSKA *et al.*, 2006).

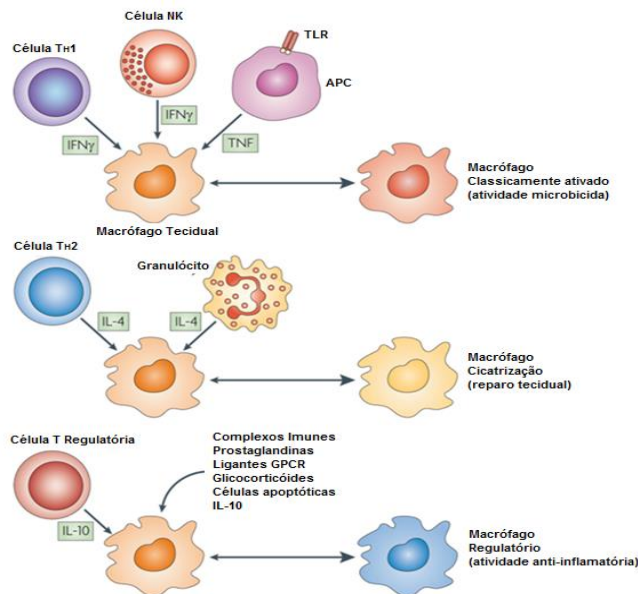


Figura 3: Citocinas produzidas por células imunes podem originar macrófagos com fisiologia distinta. Macrófagos classicamente ativados surgem em resposta ao IFN- γ . Macrófagos que agem no reparo tecidual surgem em resposta a IL-4. Macrófagos regulatórios surgem em resposta a vários estímulos. Adaptado de Mosser and Edwards. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol, 2008.

1.2.1 MACRÓFAGOS CLASSICAMENTE ATIVADOS

Os estímulos necessários para a polarização de macrófagos classicamente ativados são interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF). TNF é produzido por APCs e IFN- γ pode ser produzido por células *natural killer* (NK). A produção de IFN- γ em células NK é geralmente transitória, o que impede a sustentação da manutenção dessa população de células pelo sistema imune inato, essa resposta é reforçada através da produção de IFN- γ por células T auxiliares (Th1) (DALE *et al.*, 2008).

Estas células são caracterizadas por sua capacidade microbicida e tumoricida, secretando elevados níveis de mediadores e citocinas pró-inflamatórias (MACKANESS, 1977; O'SHEA *et al.*, 2008). Possuem receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que reconhecem moléculas simples e padrões regulares de estruturas celulares conhecidas como “Padrões Moleculares Associados aos Patógenos” (PAMPs), que estão presentes em muitos microrganismos, e incluem estruturas como oligossacarídeos ricos em manose, peptídeoglicano e lipopolissacarídeos da parede celular bacteriana. Este reconhecimento permite discriminar o que é próprio e não-próprio (JANEWAY *et al.*, 2002).

A presença de agentes patogênicos no organismo desencadeia a resposta de macrófagos que podem iniciar o processo de fagocitose (Figura 4), fenômeno caracterizado por uma série de passos que incluem primeiramente o reconhecimento de PAMPs pelos PRRs e ligação ao agente patogênico. Em seguida ocorre a geração de sinais que induzem o remodelamento do citoesqueleto através da polimerização e o prolongamento de filamentos de actina sob a membrana no local de contato que envolvem a partícula, o que possibilita o englobamento das membranas celulares ao redor da partícula puxando-a em direção ao centro da célula, formando então um vacúolo endocítico conhecido como fagossoma. O fagossoma torna-se acidificado possibilitando assim, a morte da maioria dos patógenos. Para auxiliar no processo de fagocitose, os macrófagos

contam com a presença de lisossomas, os quais contêm enzimas, proteínas e peptídeos que podem mediar uma resposta intracelular antimicrobiana. O fagossoma fusiona com um ou mais lisossomas produzindo o fagolisossoma, onde o conteúdo lisossomal é liberado para destruir o patógeno (UNDERHILL *et al.*, 2002).

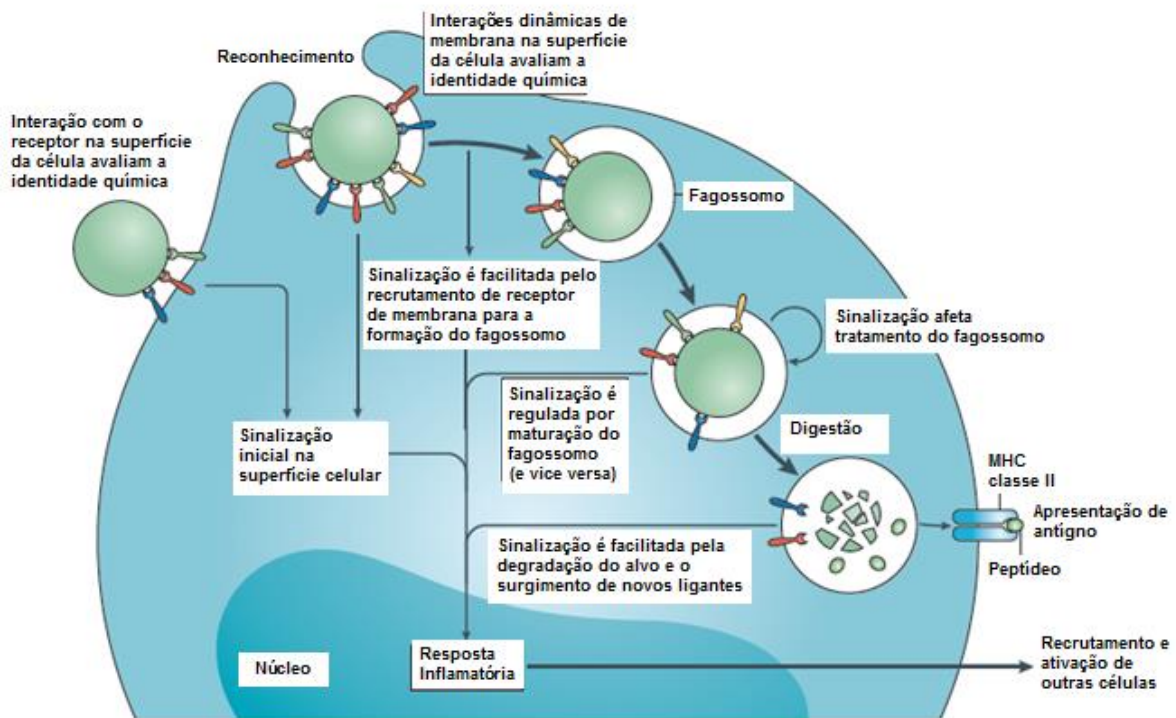


Figura 4: O processamento da informação nos diferentes estágios da fagocitose. A fagocitose tem início com a ligação do alvo e sua internalização que depende do remodelamento do citoesqueleto através de filamentos de actina. Após a internalização, o alvo é digerido no fagolisossoma e os peptídeos formados podem então ser apresentados a células T por moléculas do MHC. Adaptado de Hunderhill and Goodridge. Information processing during phagocytosis. Nat Rev Immunol, 2013.

Além da fagocitose, em resposta ao reconhecimento de moléculas não-próprias, os macrófagos intensificam o consumo de oxigênio, gerando ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2); esta produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é conhecida como *burst* respiratório. O *burst* respiratório resulta da ativação da enzima NADPH-oxidase que produz grande quantidade O_2^- , que por sua vez gera H_2O_2 pela reação com a enzima superóxido

dismutase. H_2O_2 e Cl^- são convertidos em hipoclorito (OCl^-) e H_2O pela enzima mieloperoxidase. O produto imediato da reação, $\text{O}_2^{\cdot-}$, parece não atravessar a parede celular das bactérias, já o H_2O_2 gerado no fagolisossomo é capaz de entrar na célula bacteriana e agir como precursor na formação de OCl^- , que exerce a atividade microbicida (UNDERHILL *et al.*, 2002).

A resposta imune inata mediada por macrófagos classicamente ativados pode seguir com a apresentação de antígenos (Figura 5), etapa realizada por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As moléculas do MHC são classificadas como classe I (denominado antígeno leucocitário humano HLA-A, B e C) que são encontrados em todas as células nucleadas, ou classe II (denominado HLA-DP, DQ e DR) que são encontradas somente em certas células do sistema imune, incluindo macrófagos, células dendríticas e células B. As moléculas de MHC classe I coletam peptídeos derivados das proteínas sintetizadas no citosol e apresentam os fragmentos de proteínas virais na superfície celular, enquanto as moléculas de MHC Classe II ligam peptídeos derivados das proteínas nas vesículas intracelulares e, portanto, exibem peptídeos derivados de patógenos residentes nas vesículas dos macrófagos ou que foram internalizados (BONILLA *et al.*, 2010).

Atuando neste contexto, além das moléculas MHC, proteínas da família B7, CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), são expressas nas APCs e células T e fornecem o principal sinal co-estimulatório para sustentar e aumentar a resposta de célula T através da interação com o receptor CD28 das células T (MCCOY *et al.*, 1999). Embora outros membros da família B7 possam fornecer co-estímulo, evidências apoiam um papel dominante para CD86 na resposta primária da célula T (LENSCHOW *et al.*, 1996). Na ativação de células dendríticas, macrófagos e células B, a expressão de CD86 pode ser induzida rapidamente e geralmente em níveis mais altos que CD80.

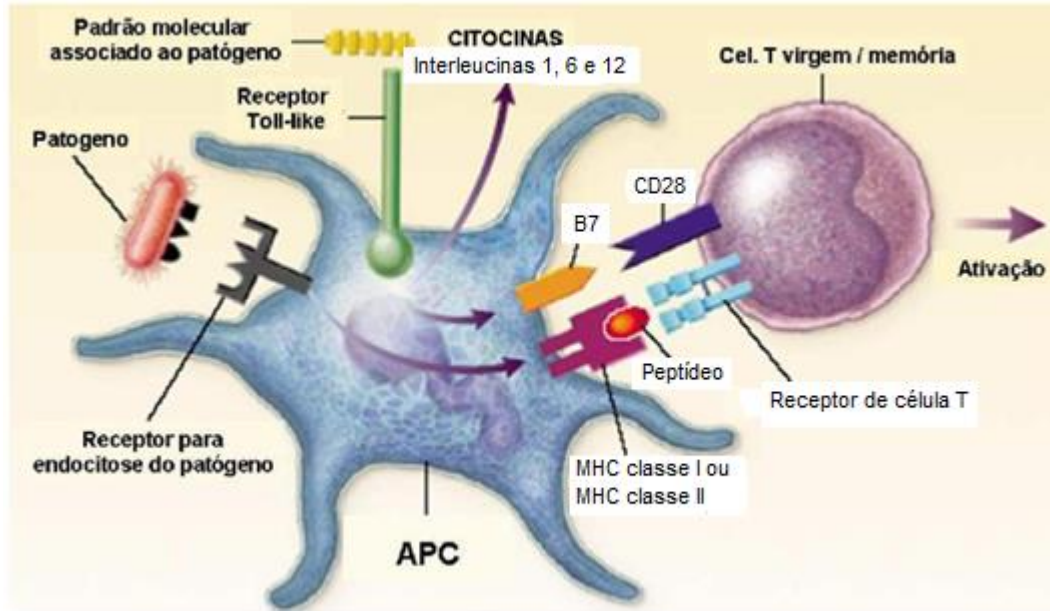


Figura 5: Moléculas envolvidas na apresentação de antígeno. Para que a apresentação de antígenos ocorra é essencial que a molécula de MHC esteja conduzindo o peptídeo, bem como é fundamental a presença de moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86).

Assim, verifica-se que os macrófagos são células de grande plasticidade, que atuam em diferentes eventos para preservação da integridade tecidual e do organismo como um todo, formando uma rede regulatória própria e muito controlada, para garantir que uma resposta imune apropriada não ceda lugar a progressão de imunopatologias.

1.3 LECTINAS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas encontradas em uma gama diversificada de organismos. Elas consistem de um grande grupo de moléculas, com a capacidade de se ligarem especificamente, de forma reversível e não covalente a carboidratos. Sua atividade ligante reside em um segmento polipeptídico, designado como Domínio de Reconhecimento de Carboidrato (CRD) (KISHORE *et al.*, 1997; SHARON *et al.*, 2004), que confere a elas uma gama de especificidade a carboidratos diferentes (WEIS *et al.*, 1991). A interação de uma lectina com glicoconjugados apropriados da superfície dos monócitos/macrófagos, induz não apenas a ativação celular, mas também é capaz de alterar o padrão de secreção de citocinas aumentando o impacto da ligação da lectina. Essa resposta pode modular parâmetros imunitários *in vivo* e *in vitro* (CEBO *et al.*, 2002).

Até o momento, diversos tipos de CRDs foram descritos, cada um compartilhando um padrão invariável e altamente conservado de resíduos de aminoácidos. Com isso, é possível dividir a maioria das lectinas animais em cinco classes principais, com base nos alinhamentos das sequências de aminoácidos (POWELL *et al.*, 1995; WEIS *et al.*, 1998).

- Lectinas tipo C: requerem cálcio para a ligação com o carboidrato, CRD conservado, possuem especificidade variável a carboidratos, como manose, galactose, fucose, entre outros. Na presença de cálcio, iniciam uma ampla gama de processos biológicos, tais como adesão, endocitose, e neutralização de patógenos. Estas proteínas podem ainda ser classificadas em sete grupos (I a VII) com base em suas características estruturais (WEIS *et al.*, 1998; DRICKAMER, 1999).
- Lectinas do tipo S ou Galectinas: independem de cálcio, possuem CRD conservado e ligação a β -galactosídeos. São estudadas intensivamente devido ao seu desempenho no papel de adesão, regulação do crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (HIRABAYASHI *et al.*, 1991; PERILLO *et al.*, 1998; KILPATRICK, 2002).

- Lectinas tipo P: altamente específicas para manose-6-fosfato; possuem CRD homólogo, mas ainda não bem definido.
- Lectinas tipo I: com CRD semelhante ao domínio de imunoglobulina, com ligação variável a carboidratos definido. Entre as lectinas tipo I ligantes de ácido siálico estão as Siglecs (superfamília das lectinas de ácido siálico vinculado à Imunoglobulina). Onze subclasses diferentes de Siglecs foram descritas e são expressas em várias células como molécula de adesão de macrófagos (Siglec-1), expressão de CD22 em células B (Siglec-2), linhagem mielomonocítica (Siglec-3), oligodendrócitos (Siglec-4), entre outros (ANGATA *et al.*, 2002).
- Pentaxinas: com motivo estrutural pentamérico e ligação variável como galactose e monossacarídeos fosforilados e sulfatados. São encontradas em muitas espécies de vertebrados, e são classificadas tanto pela preferência por fosforilcolina (CRP) ou fosfoetanolamina (SAP) (KILPATRICK, 2002).

Verifica-se assim que as lectinas desempenham importantes papéis em processos imunológicos. Em especial no processo inflamatório, a ligação inicial de leucócitos ao endotélio é mediada por selectinas, lectinas tipo-C que se ligam primariamente a antígenos sialyl-Lewis. O tráfego de leucócitos em direção ao foco inflamatório também pode ser diretamente influenciado por interações lectina-ligante. Por se ligar a estruturas de carboidratos na superfície de vários microrganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus, as colectinas, lectinas tipo-C componentes do surfactante pulmonar, podem promover ativação do complemento ou funcionar como opsoninas, estimulando a fagocitose da bactéria opsonizada (HARTSHORN *et al.*, 1998) (ALMKVIST *et al.*, 2004). As galectinas (ligantes de lactosídeos) são lectinas endógenas envolvidas em processos desde o recrutamento de leucócitos, promoção da adesão celular ao endotélio, transmigração e quimiotaxia até fagocitose e ativação do *burst*

respiratório, agindo principalmente sobre monócitos, macrófagos e neutrófilos (RABINOVICH *et al.*, 2002).

Da mesma maneira, lectinas exógenas de origem vegetal tem demonstrado importante atividade imunomodulatória que são iniciadas pela interação com moléculas de glicanas presentes na superfície de células do sistema imune.

Estudos recentes relatam a ação da DvL (*Dioclea violaceae* Lectin) na indução de edema, aumento da permeabilidade vascular e infiltração de neutrófilos (DE ALENCAR *et al.*, 2013). Outras são reconhecidas como potentes agentes já empregados em diferentes modelos experimentais de controle de infecção parasitária (AFONSO-CARDOSO *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA *et al.*, 2013). Além disso, lectinas tais como ConA (*Canavalia ensiformis*), PCL (lectina *Polygonatum cyrtonema*) de origem chinesa e as lectinas MLs do visco (*mistletoe lectins*) de origem europeia, exibem potencial anti-tumoral relacionado com apoptose, autofagia e imunomodulação (ZHANG *et al.*, 2012).

Testes *in vitro* e *in vivo* demonstraram que lectinas do extrato de visco de origem coreana e chinesa (*Viscum album coloratum* e *Viscum articulatum*, respectivamente), apresentaram propriedades imunomodulatórias e antitumorais. A lectina do visco de origem coreana (Korean Mistletoe Lectin – KML), possui uma estrutura, conhecida como cadeia-B que promove a ativação de células NK e produção de citocinas e mediadores inflamatórios por macrófagos (YOON *et al.*, 2003; KANG *et al.*, 2008). Macrófagos estimulados com KML resultam no aumento da expressão de TLR-4, acompanhado do aumento na produção de TNF- α (PARK *et al.*, 2010). A lectina do visco de origem chinesa (Chinese Mistletoe Lectin – CML) estimulou células humanas mononucleares a aumentarem TNF- α e IL-6 (LU *et al.*, 2011).

Estudos revelam que respostas Th1 podem ser estimuladas através de ensaios *in vitro* por diferentes lectinas vegetais, dentre elas: ConA; PHA-e e PHA-L (*Phaseolus vulgaris*); PSA (*Pisum sativum*); WGA (*Triticum vulgaris*) e ArtinM (*Artocarpus heterophyllus*). Estas lectinas mostraram a capacidade de induzir

células de baço de origem murina a produzir IL-12 e IFN- γ (MURAILLE *et al.*, 1999; DE MELO *et al.*, 2010). Adicionalmente, a resposta Th2 também pode ser estimulada como demonstrada em estudo com a lectina ScLL (*Synadenium carinatum*), mostrou uma redução de sequelas associadas com doença inflamatória crônica em modelos animais (ROGERIO *et al.*, 2007).

1.4 BJCUL

Venenos de serpentes das famílias Viperidae e Elapidae contêm um complexo de moléculas farmacologicamente ativas, incluindo enzimas e proteínas sem atividade enzimática, tais como lectinas tipo-C, ligantes de galactose na sua maioria, podendo também ser encontradas lectinas ligantes de manose (ZHA *et al.*, 2001). (HIRABAYASHI *et al.*, 1991; NIKAI *et al.*, 2000).

Com base na estrutura e propriedades funcionais as lectinas de veneno foram classificadas em lectinas tipo-C verdadeiras (CTL) e lectinas tipo-C *like* (CTL-*like*). As CTL contém CRD carregado negativamente e apresenta uma forma côncava que acomoda a molécula de galactose e o íon cálcio. Estas características permitem provavelmente a interação das SVLs (Snake Venom Lectins) com o grupo hidroxila da galactose e o íon cálcio modulando, conseqüentemente a função biológica destas lectinas. Por outro lado, um CRD incompleto conduz a uma ausência da atividade verdadeira da lectina, exemplo destas são as CTL-*like*, que exercem outras atividades biológicas, estando fortemente relacionadas com a ativação da coagulação sanguínea, uma vez que podem se ligar a fatores de coagulação e receptores de plaquetas (CLEMETSON *et al.*, 2005; LU *et al.*, 2005).

As serpentes do gênero *Bothrops*, são amplamente encontradas do sul ao nordeste brasileiro, Bolívia, Paraguai e norte da Argentina (CAMPBELL *et al.*, 1989). No Brasil são responsáveis por aproximadamente 70% dos casos de

acidentes ofídicos em humanos, sendo letais em 0,3% dos casos. O veneno de *Bothrops jararacussu* é composto de uma mistura de proteínas e peptídeos bioativos, especialmente enzimas que são responsáveis por lesões locais e sistêmicas que caracterizam o envenenamento botrópico (KASHIMA *et al.*, 2004).

A lectina purificada do veneno de serpente *Bothrops jararacussu* (BJcuL) é tipicamente uma lectina tipo-C, que possui em sua estrutura uma sequência de 135 resíduos de aminoácidos e caracteriza-se como uma molécula composta de duas subunidades de ~15kDa (CARVALHO *et al.*, 1998; DE CARVALHO *et al.*, 2002; KASSAB *et al.*, 2004). A sequência Gln-Pro-Asp na posição 96-98 é essencial para a ligação com galactose. BJcuL não é capaz de promover a agregação de plaquetas humanas ou mesmo interromper a agregação induzida por ADP ou trombina, reforçando sua classificação como CTL, incapaz de se associar a receptores de plaquetas. Em modelos murinos foi capaz de produzir edema, aumento de permeabilidade vascular (PANUNTO *et al.*, 2006) e diretamente induzir infiltração leucocitária em células endoteliais de vênulas pós-capilar, criando uma superfície adesiva para a migração de leucócitos (ELIFIO-ESPOSITO *et al.*, 2007). A lectina foi capaz de modular a resposta de neutrófilos como verificado pela alteração na morfologia para uma forma polarizada, aumento da taxa de migração, do *burst* respiratório, fagocitose e aumento do volume lisossomal (ELIFIO-ESPOSITO *et al.*, 2011). Todos estes relatos indicam que BJcuL pode estar envolvida no processo inflamatório e na ativação de respostas imunes, no entanto, os mecanismos envolvidos ainda não estão compreendidos. A imunorreatividade de BJcuL com soro antibotrópico comercial indica que pode haver a neutralização da atividade biológica desta proteína durante o tratamento com soro. Com todos esses efeitos, BJcuL pode ser considerada um agente imunomodulador.

Imunomoduladores são usados na prática clínica para estimular e normalizar a atividade do sistema imune, podendo corrigir imunodeficiências (GANJU *et al.*, 2003). A maioria dos agentes imunomoduladores exerce seu papel

na manutenção do sistema imune por aumentar a atividade da célula T, diminuindo ou bloqueando a atividade supressora, bem como estimulando células NK e atuando na produção de interferon. Também induzem a produção de citocinas específicas por células alvo ativadas (GABIUS, 2001).

A imunomodulação por produtos naturais pode fornecer uma alternativa para a quimioterapia convencional em uma variedade de doenças, em particular quando o mecanismo de defesa do hospedeiro tiver que ser ativado ou quando uma imunossupressão seletiva é desejada, em situações como doença autoimune.

Neste sentido, a compreensão as vias envolvidas na modulação, relacionada a ação da BJcuL sobre macrófagos pode levar a descobertas promissoras e potenciais aplicações farmacológicas desta lectina.

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que BJcuL é capaz de provocar alterações na resposta funcional de macrófagos da linhagem celular monocítica humana U937.

2.2 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar o potencial imunomodulador *in vitro* de BJcuL em macrófagos derivados da linhagem celular monocítica humana U937.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se BJcuL promove a diferenciação celular da linhagem monocítica U937.
- Analisar o efeito de BJcuL sobre a viabilidade celular.
- Avaliar a ativação celular pela produção de espécies reativas de oxigênio, fagocitose e expressão de marcadores da resposta imunológica.

3. METODOLOGIA

3.1 ESTUDO PRÉ-ANALÍTICO

3.1.1 Obtenção da Lectina BJcuL

O veneno bruto de *Bothrops jararacussu* foi cedido pelo Instituto Butantan-SP, na forma de pool liofilizado. BJcuL foi purificada por uma etapa cromatográfica única, conforme protocolo descrito previamente por ELIFIO-ESPOSITO *et al* (2007). Resumidamente, 100 mg de veneno bruto foram suspensos em tampão CTBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,5) até a concentração final de 20 mg/ml. A solução foi aplicada em uma coluna contendo 5 ml de gel de agarose-D-galactose (Pierce, EUA) equilibrada com o mesmo tampão e permaneceu em agitação por 4 horas a 4°C. Após a eluição do material não retido com CTBS a fração adsorvida ao gel, contendo a lectina, foi eluída com 100 mM de lactose em CTBS e dialisada contra água destilada, até a remoção completa do carboidrato. O teor de açúcar total na água de diálise foi estimado pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS M., 1956) e a concentração de proteína das frações eluídas da coluna foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A fração purificada foi liofilizada e armazenada a -20°C.

3.1.2 Biotinilação da Lectina

O método de biotinilação de BJcuL seguiu aquele descrito por ELIFIO-ESPOSITO (2007). A lectina purificada foi diluída em PBS, com concentração final de 2 mg/ml, e então incubada com 125 µl de solução de Sulfo-NHS-Biotina (10 mM; Pierce Chemical Co). Após 40 minutos de incubação no escuro, a lectina foi transferida para um tubo Centricon YM3 (Amicon Division) e foram feitas sete ultrafiltrações em água destilada, com rotação a 535 x g por aproximadamente 80

minutos cada, a 4°C. A amostra final de BJcuL biotinilada foi coletada e aliqüotada em tubo eppendorf, sendo armazenada a -20° C até o uso.

3.1.3 Manutenção da Linhagem Celular Monocítica Humana

As células U937 (ATCC CRL-1593.2) foram doadas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz–Rio de Janeiro) e mantidas em cultura com meio RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino + 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina em estufa a 37°C, contendo 5% de CO₂. O repique foi realizado a cada três dias de cultivo. A cada repique as células foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo uso do corante Azul de Tripán e contagem em câmara de Neubauer para padronização do número de células (1 x 10⁴/ml).

3.2 ESTUDO EXPERIMENTAL

3.2.1 Diferenciação da Linhagem Celular Monocítica

A indução da diferenciação celular foi realizada em placas de 96 poços (100 µl/poço) ou 6 poços (1000 µl/poço), com suspensões de 1x10⁵ células/ml tratadas com *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) a 10 e 20 nM ou BJcuL 2,5 e 20,0 µg/ml em RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) e 100 UI/ml de penicilina + 0,1 mg/ml de estreptomicina – Gibco, por 24 horas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período o sobrenadante foi retirado e foi adicionado meio RPMI 2% SFB com troca a cada 24 horas, durante 48 horas. Este período é essencial para que as células diferenciadas retornem ao seu estado de repouso (*resting*). A diferenciação celular foi avaliada pela análise morfológica por

microscopia de luz (OLYMPUS – IX70) e em citômetro de fluxo (FACSCalibur – BD Bioscience), com avaliação do tamanho, granulosidade, auto-fluorescência e ainda marcação com anticorpo anti-CD14 (BD Bioscience). Neste caso a fluorescência foi ajustada pelo uso do controle isotópico A análise dos parâmetros foi realizada utilizando-se o programa WinMDI versão 2.9.

Para todos os ensaios de ativação celular descritos a seguir as células diferenciadas com PMA 20 nM foram desaderidas pela adição de solução de tripsina (0,25%) e EDTA (1 mM) e transferidas para tubos de citometria de fluxo.

3.2.2 Avaliação da Interação da Lectina na Superfície Celular

A ligação da lectina na superfície celular foi avaliada por microscopia de fluorescência. Para tal as células diferenciadas com PMA 20 nM (80 µl; 5×10^3 células/ml) foram depositadas sobre lamínulas de vidro acondicionadas em placa de 24 poços e mantidas por uma hora em estufa à 37°C contendo 5% de CO₂, para promover uma adesão inicial à lamínula. Após este período foram adicionados 500 µl de meio RPMI contendo 10% SFB e as células permaneceram em cultivo por mais três dias. O sobrenadante foi então retirado e as células aderidas à lamínula foram fixadas com solução de paraformaldeído 2% por 30 minutos, a 22 °C, seguindo-se lavagens com solução tampão PBS, PBS contendo glicina 0,1 M e novamente com PBS. As células foram incubadas por uma hora com BJcuL biotinizada (20 µg/ml) ou com a lectina biotinizada pré-incubada por 45 minutos com D-galactose 100 mM (ligante específico de BJcuL) ou somente com PBS (controle negativo). Para revelação da interação da lectina na superfície celular as células foram incubadas com estreptavidina-FITC 100 µg/ml (Sigma-Aldrich) por 45 minutos. Foram novamente submetidas a lavagens com PBS e água milliQ. Por fim, as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com fluoromount-G contendo DAPI (SouthernBiotech). As lâminas foram fotografadas em um scanner de lâminas MIRAX Scan (Carl Zeiss TM).

3.2.3 Análise da Viabilidade Celular

A viabilidade das células tratadas com BJcuL foi analisada pelo teste de MTT (MOSMANN, 1983). Após a diferenciação com PMA 20 nM em placa de 96 poços as células foram incubadas com diferentes concentrações da lectina (1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 µg/ml) por 24 horas a 37°C em 5% CO₂. Foram adicionados a cada poço 10 µl de MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-dipheniltetrazolium bromide; Sigma, 5 mg/ml) seguindo-se nova incubação por 3 horas a 37°C em 5% de CO₂. O sobrenadante foi retirado e a cada poço foram adicionados 100 µl de DMSO (Sigma) para solubilização dos cristais formados. A absorbância da solução foi quantificada a 550 nm em leitor de microplaca (ThermoPlate – TP Reader). A faixa de concentrações de BJcuL foi escolhida com base nos trabalhos anteriores que mostraram o efeito da lectina na migração de leucócitos (ELIFIO-ESPOSITO *et al.*, 2007) e ativação de neutrófilos (ELIFIO-ESPOSITO *et al.*, 2011).

3.2.4 Avaliação da Capacidade Fagocítica

A atividade fagocítica das células diferenciadas foi medida pela incorporação de esferas fluorescentes (FluoSpheres® polystyrene Invitrogen - Molecular Probes) mensurada por citometria de fluxo. Após a diferenciação das células em placas de 6 poços, foram adicionados os estímulos BJcuL (2,5 µg/ml), LPS (50 ng/ml) e IFN-γ (150 U) que permaneceram em incubação por 12 e 24 horas. As células foram transferidas para tubos de citometria e lavadas com PBS por centrifugação a 416 x g por 10 minutos. Foram então incubadas durante 3 horas com as esferas fluorescentes, na ausência de luz a 22 °C. Após esta incubação, as células foram lavadas por centrifugação com PBS a 416 x g por 10 minutos por três vezes e fixadas com 250 µl de FixFACs (azida sódica 1% e

formadeído 1% em PBS). As células permaneceram nesta solução até o momento da análise.

3.2.5 Determinação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

A indução da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) pelo tratamento com BJcuL foi medida por citometria de fluxo usando a sonda 2',7'-dichlorfluorescein-diacetate (DCFH-DA) que permite detectar e quantificar a produção intracelular de H₂O₂. DCFH-DA é hidrolisada por esterases para DCFH, esta molécula não fluorescente fica retida dentro da célula e sofre oxidação, emitindo então fluorescência. Após a diferenciação das células em placa de 6 poços foram adicionados os estímulos BJcuL 2,5 µg/ml, IFN-γ 150U, BJcuL 2,5 µg/ml + Interferon 150U, ou somente meio RPMI 2% SFB (controle), que permaneceram por 12 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após o período de incubação por 12 horas os estímulos foram retirados e foi adicionado 1 ml de LPS 50 ng/ml ou somente meio RPMI 2% que permaneceram por 36 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂ (MOSSER *et al.*, 2008b). As células foram transferidas para tubos de citometria e lavadas por centrifugação com PBS e o sobrenadante foi descartado. As células foram incubadas por 30 minutos a 22 °C ao abrigo de luz com 100 µl (10 µM) de sonda DCFH-DA (SIGMA-ALDRICH). Após incubação as células foram lavadas por centrifugação com 1 ml de PBS, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 250 µl de FixFACs, permanecendo nesta solução até o momento da análise.

3.2.6 Análise da Expressão de Marcadores da Ativação Celular

Após diferenciação celular com PMA 200 nM em placa de 6 poços as células foram desaderidas, transferidas para tubos de citometria e lavadas com

PBS por centrifugação por 10 minutos a 416 x *g*. Em seguida foram incubadas com BJcuL (2,5 µg/ml) e LPS (25 ng/ml) durante 24 horas à 37°C em 5% de CO₂. As células foram incubadas por 45 minutos a 22 °C com os seguintes marcadores: anti-HLA-DR PE; anti HLA-ABC FITC; anti-CD80 FITC; anti-CD86 PE (5 µl anticorpo + 45 µl tampão PBS). Após este período as células foram lavadas por centrifugação a 416 x *g* por 10 minutos com PBS e ressuspensas em 250 µl de FixFACs para análise em citômetro de fluxo. Todos os reagentes foram adquiridos da BD Bioscience.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados quantitativos estão representados como média e desvio padrão, obtidos de dosagens em triplicata de pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística de variância foi realizada pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney para comparação entre grupos, finalizando com correção de Bonferroni. Para tal procedimento foi utilizado como ferramenta o programa estatístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 13.0 para Windows.

4. RESULTADOS

4.1 INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR

As células da linhagem monocítica humana U937 são derivadas do fluido pleural de pacientes com linfoma histiocítico difuso. Normalmente crescem em suspensão no meio de cultura, mas podem ser induzidas a diferenciar por diferentes efetores. Ao diferenciar estas células perdem o potencial proliferativo, e exibem características morfológicas de macrófagos ativados (GARCIA *et al.*, 1999).

A diferenciação altera a morfologia celular, sendo mais evidente o desenvolvimento de prolongamentos citoplasmáticos e aumento do número de grânulos que conferem como consequência, também aumento da autofluorescência. Visando compreender os efeitos de BJcuL sobre as células da linhagem monocítica humana U937 foi avaliado inicialmente a capacidade da lectina em induzir a diferenciação celular. A análise por citometria de fluxo revelou que as células tratadas com diferentes concentrações de BJcuL não mostraram diferenças no tamanho, granulosidade (Figura 6A) e intensidade de fluorescência (Figura 6B) em relação ao controle, indicando que a lectina nessas concentrações e condições de cultivo não estimulam a diferenciação celular.

O Phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA) é um ativador específico dos grupos A e B da proteína quinase C (PKC). Ésteres de forbol como o PMA afetam as PKCs por mimetizar o diacilglicerol, um ligante natural e ativador desta enzima, resultando na ativação de outros fatores e processos que levam a inibição do crescimento e a diferenciação celular. Já foi demonstrado que o tratamento com concentrações entre 1 a 100 nM de PMA gera alterações nas características morfológicas de U937, tais como diminuição na razão citoplasma/núcleo, citoplasma pálido com aumento da granulosidade acompanhado de aumento de vacuolização citoplasmática (HATTORI T, 1983). Com base nessa informação

determinamos as condições adequadas de diferenciação pelo PMA para posterior análise da capacidade de modulação de BJcuL sobre macrófagos.

Verifica-se que PMA, nas concentrações de 10 e 20 nM, leva a alterações no tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (Figura 6A) e aumento da fluorescência (Figura 6B), com maior incremento nas células tratadas com PMA 20 nM.

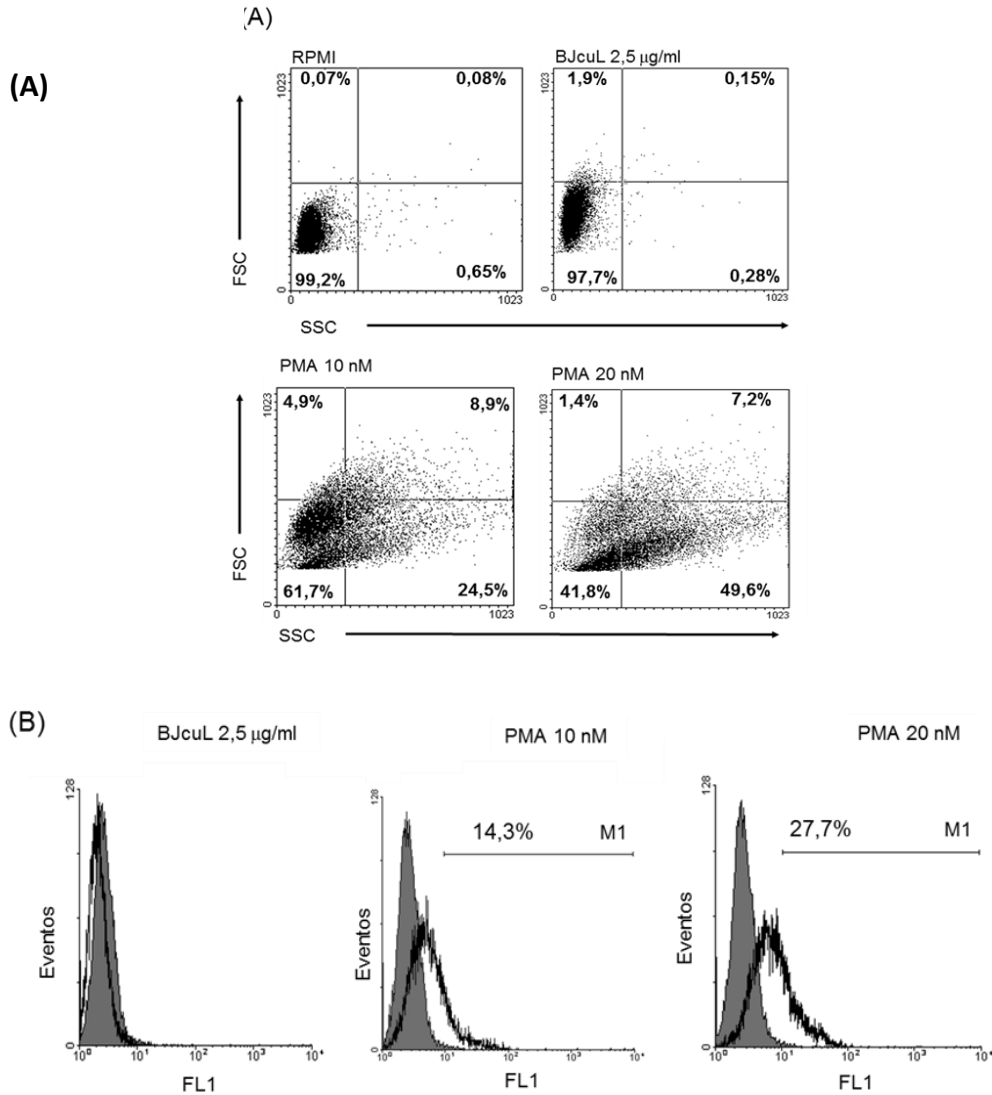


Figura 6: Análise por citometria de fluxo da capacidade de BJcuL e PMA em induzir a diferenciação celular. As células foram tratadas com BJcuL (2,5 µg/ml), PMA (10 e 20 nM) ou somente RPMI, como descrito em material e métodos. (A) Dotplot indicando tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), (B) Histograma de auto-fluorescência (FL1) pelo tratamento com BJcuL e PMA (linha) em comparação as células não tratadas (cinza). n=9.

A confirmação da diferenciação dos monócitos com PMA foi realizada pela análise da indução da expressão de CD14 (Figura 7), descrito como uma molécula de diferenciação com papel importante para resposta de monócitos e macrófagos (MARTIN *et al.*, 1994). Da mesma forma que no resultado anterior verifica-se que as células tratadas com PMA 10 nM tiveram aumento da expressão de CD14 quando comparadas ao controle, este aumento foi ainda mais significativo com PMA 20 nM.

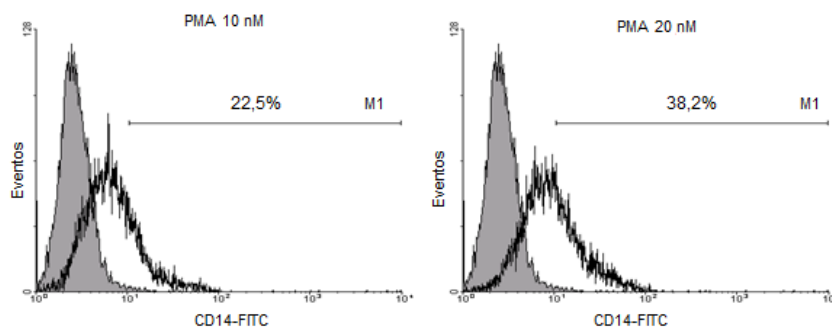


Figura 7: Análise por citometria de fluxo da capacidade de PMA em induzir diferenciação celular. As células foram tratadas com PMA 10 e 20 nM ou somente RPMI, conforme descrito em material e métodos. Para revelar a diferenciação, as células foram imunomarcadas com anticorpo anti-CD14. O histograma revela marcação das células com anticorpo anti-CD14 (linha) em comparação as células não marcadas (cinza). n=9.

A diferenciação também foi verificada por análise morfológica acompanhada de contagem celular como mostra a Figura 8. Observa-se que as células tratadas apenas com RPMI 2% permaneceram arredondadas e em sua grande maioria em suspensão. O tratamento com PMA nas concentrações de 10 e 20 nM induziu modificações fenotípicas como presença de prolongamentos da membrana e aquisição de forte aderência pela maioria das células (Figura 8A). Na contagem celular verifica-se que o tratamento com PMA 20 nM promoveu a diferenciação de um maior número de células, apesar de levar à um grande decréscimo no número total de células (Figura 8B). Esses resultados em conjunto

reforçam a escolha de PMA 20 nM para a diferenciação celular no decorrer do trabalho.

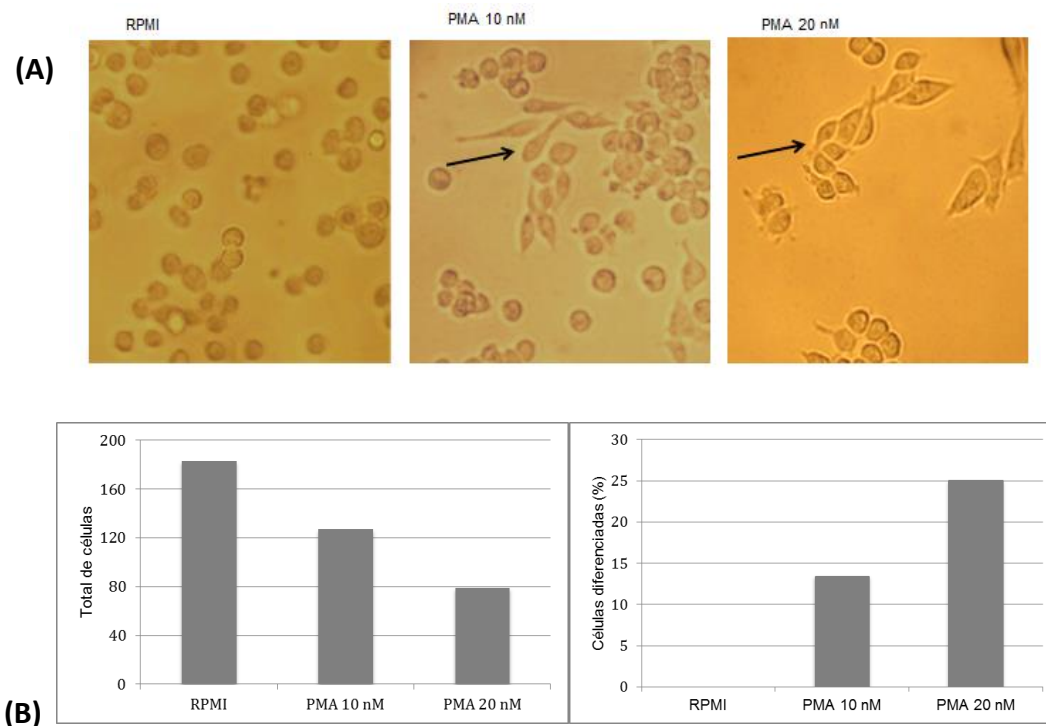


Figura 8: Análise por microscopia de luz da alteração morfológica induzida pelo tratamento com PMA. Após incubação das células U937 com RPMI 2% SFB, PMA 10 ou 20 nM as células ($1 \times 10^5/\text{ml}$) foram incubadas por 24h, 37° à 5% CO_2 com os estímulos, seguido de 48h de incubação com RPMI 2% SFB. A) Registro das células por microscopia invertida. As setas indicam células que adquiriram aderência e prolongamento citoplasmático (diferenciadas). A análise foi realizada em microscópio óptico com aumento de 100X. B) Contagem total de células por campo microscópico e contagem diferencial indicando a porcentagem de células diferenciadas em relação ao total de células para cada condição de ensaio, representação de um único ensaio.

4.2 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE BJcuL NA SUPERFÍCIE CELULAR

A verificação da interação da lectina na superfície celular foi observada por microscopia de fluorescência (Figura 9). Para tal análise foi utilizado o programa MetaViewerV 2.0.117, que possibilitou a visualização da interação de BJcuL biotinizada à superfície de macrófagos (Figura 9 D, E e F), mostrada para intensa

marcação verde (FITC) nas células tratadas. Verifica-se que para as células controle não há qualquer indício de marcação não específica (Figura 9 A, B e C). Quando a lectina foi pré-incubada com seu carboidrato específico (D-Gal) a ligação célula-lectina foi anulada (Figura 9 G, H e I), revelando que a interação é específica para ligantes glicosilados na superfície celular.

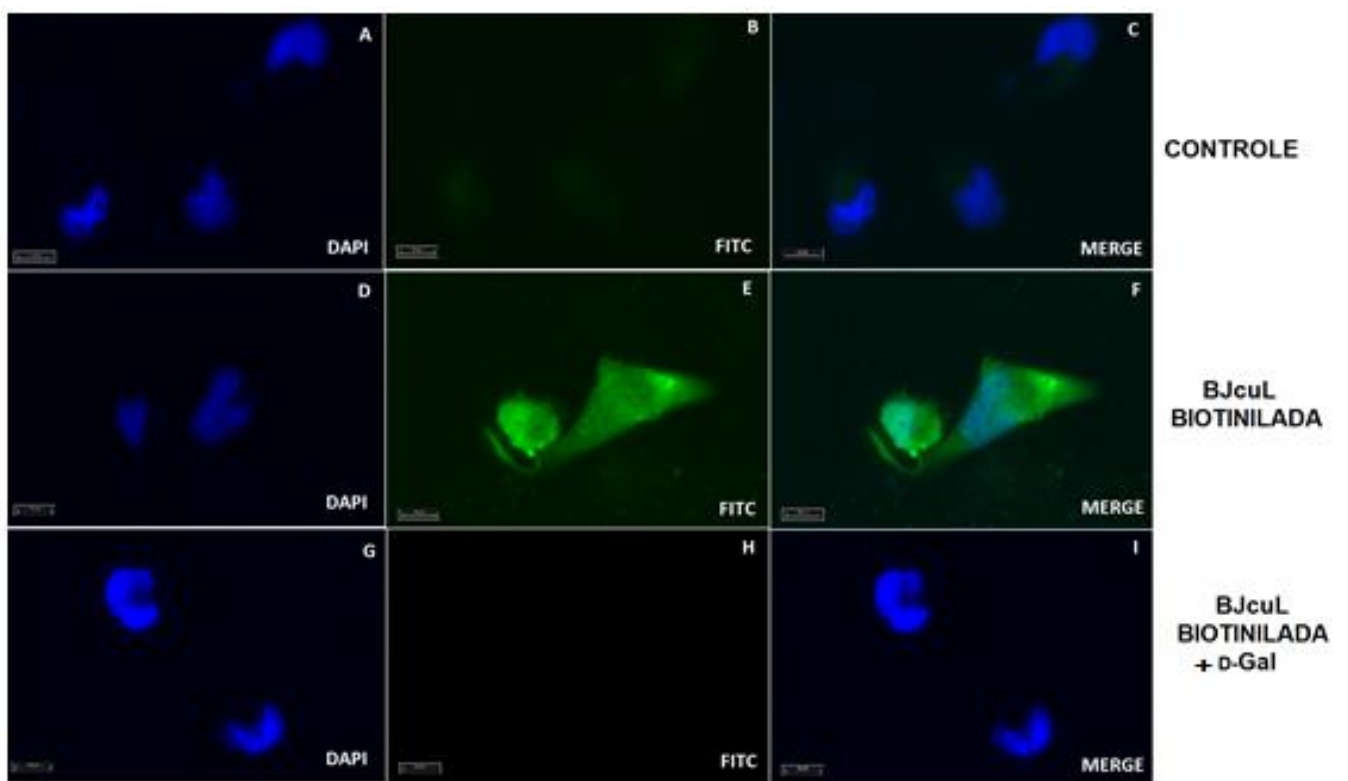


Figura 9: Marcação de superfície de células U937 com BJcuL biotinilada. As células aderidas sobre lamínulas de vidro foram fixadas com paraformaldeído 2% e incubadas com PBS (controle), com a lectina biotinilada 20 $\mu\text{g/ml}$ e com a lectina biotinilada incubada previamente com D-galactose (100 mM), seguida da incubação com Estreptavidina-FITC 100 $\mu\text{g/ml}$ (em verde). As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com meio de montagem Fluoromount-G contendo DAPI, que marca o núcleo da célula em azul. (A, B, C) Células controle, (D, E, F) Células incubadas com a BJcuL biotinilada e (G, H, I) Células incubadas com a lectina biotinilada previamente incubada com D-Gal.

4.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a citotoxicidade da BJcuL sobre células diferenciadas foi utilizado o método direto de MTT. Os resultados apresentados (Figura 10) revelaram que BJcuL concentrações de 1,25 a 20 µg/ml não apresentou toxicidade sobre as células quando comparados ao controle, mantendo uma viabilidade de aproximadamente 100%.

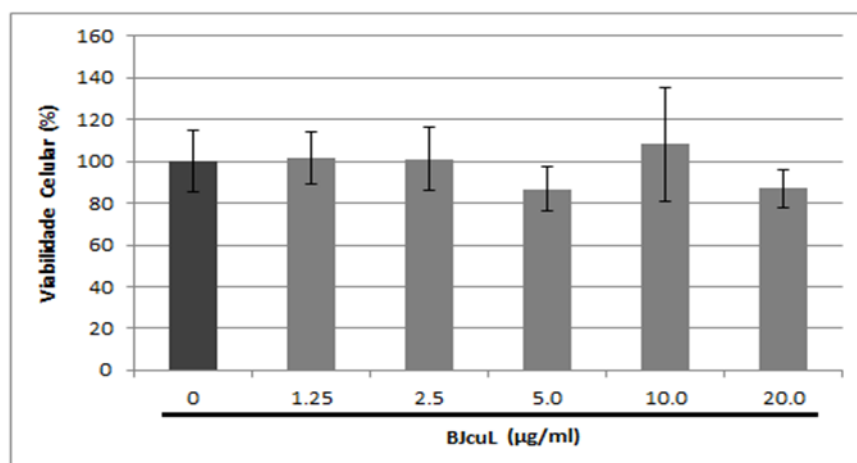


Figura 10: Análise da viabilidade celular pelo método de MTT. As células (1×10^5 ml) previamente tratadas com PMA (20 nM) foram incubadas em placa de 96 poços na presença de BJcuL ou apenas RPMI completo (controle). Após 24 horas de incubação foi adicionado MTT e incubadas por mais 4 horas. A leitura foi feita por leitor de microplaca 550nm e o resultado está apresentado como porcentagem em relação ao controle (100%). Análise estatística feita pelo Teste Mann-Whitney (n=9).

4.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA

Macrófagos classicamente ativados possuem marcada atividade fagocítica. O processo de fagocitose foi avaliado após incubação dos macrófagos com BJcuL

(2,5 µg/ml), LPS (50 ng/ml), IFN-γ (150U) ou somente RPMI 2% em diferentes tempos, seguido de incubação com esferas fluorescentes. A Figura 11 revela que no tempo de 12 horas de incubação com os estímulos houve um aumento significativo na atividade fagocítica. Na análise de 24 horas fica visível a diminuição da atividade fagocítica quando comparado com o tempo de 12 horas. No entanto, BJcuL manteve o padrão de estimulação de LPS e IFN-γ, independente do tempo de estímulo.

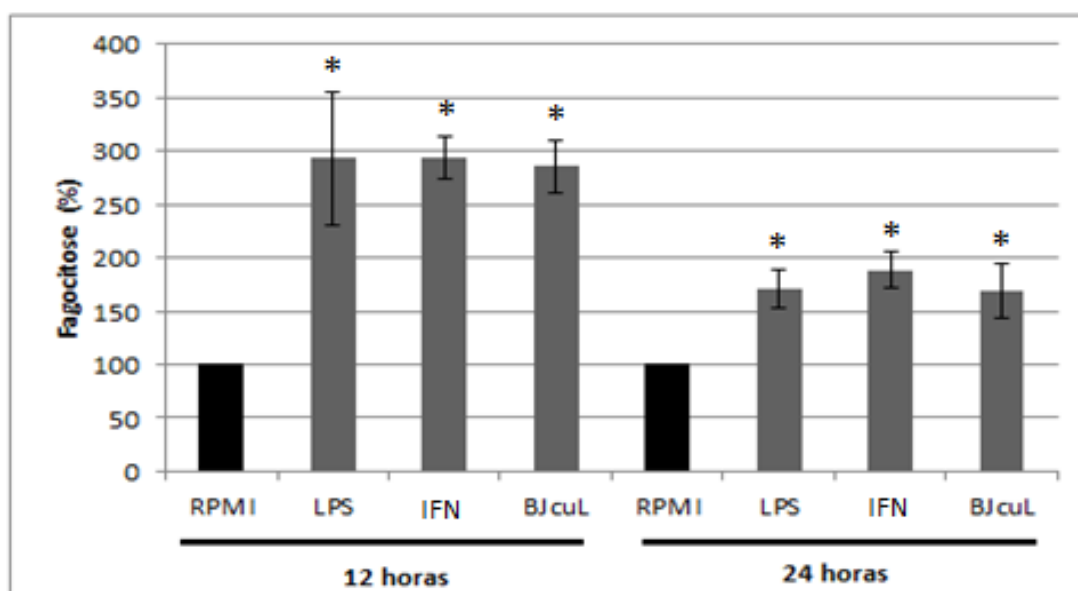


Figura 11: Avaliação de fagocitose por macrófagos (1×10^5 /ml) previamente diferenciados com PMA (20 nM) e incubadas com BJcuL (2,5 µg/ml), LPS (50 ng/ml), Interferon-γ (150 U) ou apenas RPMI 2% (controle negativo) por 12 e 24 h, seguida de 3 horas de incubação com esferas fluorescentes, em estufa umidificada a 37°C e 5% CO₂. As células foram lavadas 3 vezes por centrifugação e ressuspendidas em FixFacs para posterior análise por citometria. (*) diferença significativa, em relação ao controle de cada grupo para $p < 0,05$. Teste Mann-Whitney (n=6).

4.5 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Sabe-se que uma das funções exercidas por macrófagos classicamente ativados é a atividade microbicida desempenhada por um processo de rápido

consumo de oxigênio conhecido como “*burst respiratório*”, onde há produção de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MACMICKING *et al.*, 1997). Desde que foi observado anteriormente que a pré-exposição de células U937 a IFN- γ modifica a resposta dessas células ao LPS, especificamente na produção de ânion superóxido (ROUX-LOMBARD *et al.*, 1986), analisou-se o efeito da pré-incubação com IFN- γ na indução de H_2O_2 mediada por LPS. Os níveis intracelulares de H_2O_2 foram avaliados após 12h de estímulo com IFN- γ (150U), BJcuL (2,5 μ g/ml), ou somente meio RPMI 2%. Em alguns ensaios as células foram submetidas ainda a incubação por 36 horas com LPS (50 ng/ml). A Figura 12 revela que na ausência de LPS BJcuL aumenta a produção de H_2O_2 estando associada ou não ao INF- γ . Quando as células são submetidas ao tratamento com LPS após o estímulo com BJcuL ocorre um decréscimo significativo na produção de H_2O_2 que também afeta a resposta estimulatória do IFN- γ .

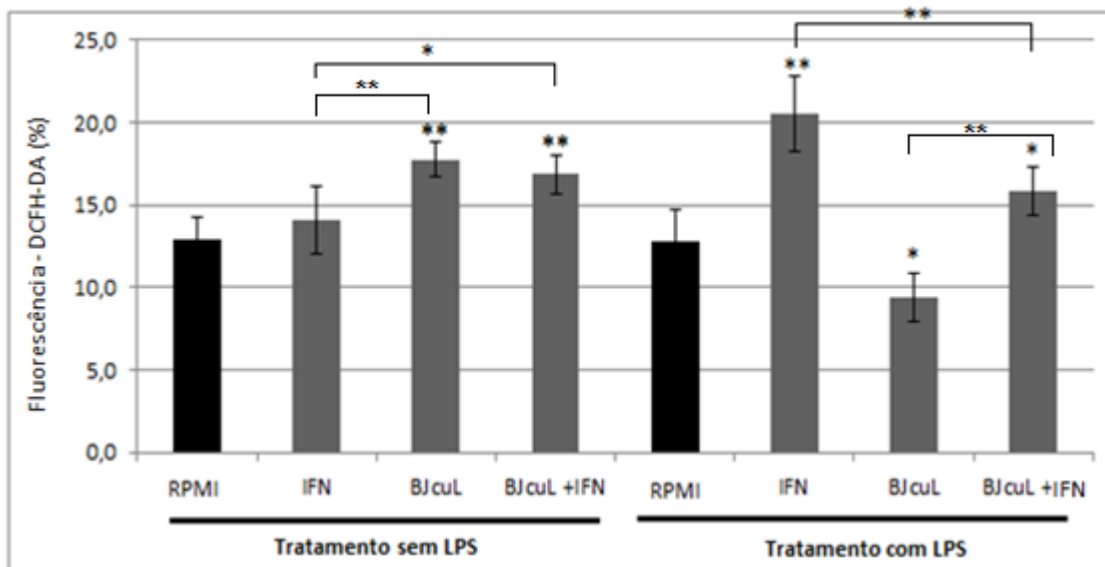


Figura 12: A avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio foi realizada com as células diferenciadas (1×10^5 /ml) e incubadas com Interferon 150 U, BJcuL 2,5 μ g/ml, BJcuL 2,5 μ g/ml + Interferon 150 U ou somente RPMI 2% (controle) por 12 horas em estufa à 37°C e 5% CO_2 , seguido de incubação com LPS ou somente RPMI 2% por 36 horas na mesma condição anterior. As células foram ainda incubadas com a sonda DCFH-DA por 45 minutos, lavadas por centrifugação, fixadas

com FixFacs e analisadas por citometria de fluxo. (*) diferença significativa, em relação ao controle de cada grupo para $p < 0,05$. Teste Mann-Whitney e (**)= $p < 0,012$ Correção de Bonferroni (n=6).

4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DA ATIVAÇÃO

4.7 CELULAR

A expressão de moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86) e moléculas de apresentação de antígenos (HLA-DR e HLA-ABC) representam um estado ativo da célula. A figura 13 revela aumento discreto da expressão de todos os marcadores após estímulo com LPS e BJcuL quando comparadas ao controle (RPMI).

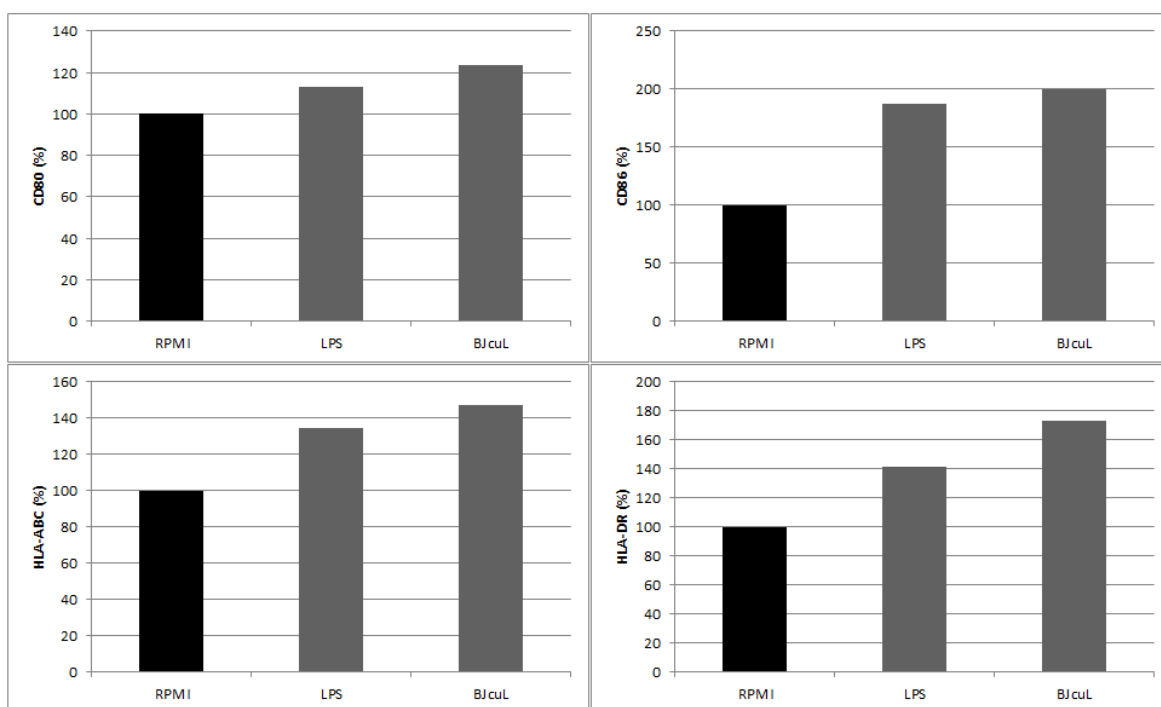


Figura 13: Avaliação da expressão de CD80 (A), CD86 (B), HLA-ABC (C) e HLA-DR (D) na superfície de macrófagos, realizada por citometria de fluxo. As células (1×10^5 /ml) foram incubadas durante 24 horas com os respectivos estímulos: RPMI 2%, PMA 20 nM, LPS 25 ng/ml, BJcuL 2,5

µg/ml. Para revelar a presença dos marcadores na superfície celular as células foram imunomarcadas com os anticorpos: anti-HLA-DR PE; anti HLA-ABC FITC; anti-CD80 FITC; anti-CD86 PE, fixadas e analisadas por citometria de fluxo. Resultados correspondem ao incremento de fluorescência (%) em relação ao controle de células não marcadas, normalizado pelo valor das células tratadas somente com RPMI.

5. DISCUSSÃO

Os venenos de serpentes contém uma grande variedade de moléculas com alta diversidade de funções biológicas, resultantes de um longo processo evolutivo que garantiu uma mistura heterogênea de substâncias bastante tóxica e eficaz (KOH *et al.*, 2006). Por mais que o interesse inicial nos venenos venha pela compreensão de como combater os efeitos do envenenamento em humanos, a descoberta e caracterização de inúmeras toxinas isoladas mostrou que os venenos representam uma interessante fonte de moléculas com efeitos farmacológicos muito específicos, o que pode levar ao descobrimento e desenvolvimento de novas drogas terapêuticas (KOH *et al.*, 2012). Aproximadamente 90% dos constituintes do veneno das serpentes do gênero *Bothrops* são protéicos, destacando-se os componentes enzimáticos (SOUSA *et al.*, 2001; PANFOLI *et al.*, 2010) e não enzimáticos, como desintegrinas (SWENSON *et al.*, 2004) e lectinas do tipo C (NAVDAEV *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2005), todos com importante papel no envenenamento, mas também com relevante potencial terapêutico (GOMES *et al.*, 2010).

Lectinas tipo-C derivadas do veneno botrópico, assim como de outras fontes, podem afetar processos relacionados ao sistema imune inato (SIERRA *et al.*, 2005; WILLMENT *et al.*, 2008; JIN *et al.*, 2012). Já foi demonstrado que BJcuL, uma típica lectina de veneno botrópico, apresenta capacidade de ligar-se a superfície de neutrófilos, sem provocar alteração na viabilidade celular, promovendo a migração e ativação destas células (ELIFIO-ESPOSITO *et al.*, 2011). No presente trabalho, nossos resultados também demonstram que BJcuL não é citotóxica para macrófagos derivados de monócitos da linhagem monocítica humana U937, também associou-se a ligantes alvo na superfície celular, além de demonstrar efeitos sobre a ativação celular.

A interação de BJcuL a ligantes de membrana é difusa, ocorrendo em toda a superfície celular e parece ser dependente do reconhecimento do carboidrato

específico, como demonstrado pela inibição gerada pela pré-incubação da lectina com D-galactose (Figura 9).

Em macrófagos existe uma ampla variedade de glicoproteínas de membrana (KREIPE *et al.*, 1986; DONG *et al.*, 1997) que agem como receptores, incluindo os PRR (do inglês *pattern recognition receptors*), tais como os TLRs (*toll-like receptors*) (RABINOVICH *et al.*, 2012) que são importantes não só na indução da imunidade inata, mas também para o desenvolvimento da imunidade adaptativa (QIAN *et al.*, 2013). Está bem estabelecido que estímulos M1 como LPS e IFN- γ , através de receptores TLR4, IFN- α ou IFN- β (IFNAR) e receptores IFN- γ , induzem a ativação de fatores de transcrição NF- κ B (p65 e p50), AP-1, IRF3 e STAT1, o que leva a transcrição dos genes M1, e conseqüentemente a geração de macrófagos clássicos, caracterizados por uma resposta inflamatória (BISWAS *et al.*, 2010). Lectinas exógenas tem sido descritas por interagir com diferentes PRRs em macrófagos e outras células do sistema imunológico (SOUZA *et al.*, 2013) possivelmente por diferentes vias. A lectina KML (Korean mistletoe lectin) aumentou a expressão de PRRs como dectina-1 e TLR2, mas não aumentou TLR4 (LEE *et al.*, 2007). SBA (Soybean agglutinin), ConA (Concavalina A) e membros da família de lectinas PHA estimularam somente TLRs extracelulares (2/6, 4 e 5) provavelmente devido a falta de acesso intracelular. Interessantemente SBA estimulou somente TLR4, ConA estimulou TLR2/6 e PHA-L estimulou TLR2/6, 4 e 5. Como cada família de lectina exibe especificidade por diferentes ligantes, estes resultados sugerem que a ação das lectinas é codificada pelo reconhecimento de uma sequência de carboidratos com conseqüente apresentação destes aminoácidos a diferentes TLRs (UNITT *et al.*, 2011).

Nossos resultados indicam que a interação de BJcuL com ligantes na superfície de células U937 não é capaz de desencadear as importantes alterações fenotípicas observadas na diferenciação celular de monócitos, fenômeno este induzido por sinais finamente regulados agindo sobre a expressão gênica. Os mecanismos regulatórios envolvidos nestes processos ainda não estão totalmente

descritos, mas estudos já demonstraram que a diferenciação leva a uma maior expressão de proteínas envolvidas em vias biológicas relevantes para as funções macrofágicas, como a fagocitose e vias de apresentação de antígeno (MINAFRA *et al.*, 2011).

A linhagem celular monocítica humana U937 tem sido amplamente utilizada como modelo para o estudo de mudanças em eventos intracelulares que acontecem durante a diferenciação de monócitos. A diferenciação das células U937 pode ser induzida pelo tratamento com ésteres de forbol, como o PMA (ROVERA *et al.*, 1979; LARSSON *et al.*, 1988), que tem efeito pleiotrópico sobre células dessa linhagem (HASS *et al.*, 1989). O PMA altera a expressão gênica pela ativação da proteína quinase C (*Protein Kinase C-PKC*) (PEDRINACI *et al.*, 1990) e a modulação da atividade de fatores transcricionais que ligam elementos reguladores, como NF- κ B (GHOSH *et al.*, 1990). Neste processo a expressão de receptores de adesão são alterados, aumentando o número de membros da família de β 2-integrinas (CD11/CD18) que tem um papel fundamental na interação leucócito-endotélio durante reações imunes e inflamatórias. Estas moléculas são responsáveis pelo estabelecimento de firme adesão e migração transendotelial característicos da diferenciação celular (ARNAOUT, 1990; WRIGHT *et al.*, 1990).

Um importante marcador da diferenciação de monócitos é o antígeno CD14, uma glicoproteína de 55 KDa ancorada a glicofosfatidilinositol (GPI), expressa em células de linhagem mielo-monocítica, incluindo macrófagos. É um receptor para o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 1993) (LANDMANN *et al.*, 2000). No presente trabalho a análise da expressão deste marcador foi feita para se confirmar as condições ótimas para diferenciação da linhagem celular U937. As células tratadas com 10 e 20 nM de PMA desenvolveram aderência, aumento de prolongamento citoplasmático acompanhado de aumento da expressão de CD14, mas de forma mais acentuada na maior concentração (Figura 7), mesmo que a marcação positiva para CD14 ou a presença de prolongamentos citoplasmáticos (Figura 8) não tenha atingido um

grande número absoluto de células, a concentração de 20 nM de PMA foi estabelecida no decorrer do trabalho para promover a diferenciação celular em todos os ensaios subsequentes.

A avaliação do efeito de BJcuL sobre a viabilidade das células U937 diferenciadas foi feito pelo teste do MTT, que mede a ação de enzimas mitocondriais e conseqüentemente, o estado metabólico celular. Os resultados mostraram que BJcuL não exerceu qualquer alteração na metabolização do MTT pelas células em todas as concentrações testadas (Figura 10). Esse efeito é controverso se verificarmos sua ação sobre células de carcinoma gástrico humano MKN45 e AGS, que se mostraram suscetíveis ao tratamento com 2,5 µg/ml de BJcuL com perda de viabilidade de aproximadamente 80% (NOLTE *et al.*, 2012). Essa diferença pode ser devido a alteração no padrão de glicosilação que ocorre nas células de carcinoma gástrico humano MKN45 e AGS. A glicosilação é a modificação pós-traducional mais comum em proteínas e estima-se que 50% de todas as proteínas intracelulares e de membrana de mamíferos sejam glicosiladas, em processos que variam de acordo com a resposta fisiológica (COMELLI *et al.*, 2006; GARCIA-VALLEJO *et al.*, 2006; BAX *et al.*, 2007) ou patológica (BROCKHAUSEN, 1999; HAKOMORI, 2002; KOIKE *et al.*, 2004; OHTSUBO *et al.*, 2006). Sabe-se que células tumorais apresentam variação na sua composição oligosacáridica de superfície celular (HAKOMORI, 1989), o que pode permitir que a associação de ligantes extracelulares como BJcuL possa desencadear fenômenos celulares distintos.

Uma vez diferenciados os macrófagos podem ser ativados de diversas maneiras e programados em subtipos funcionais distintos (GORDON, 2003; TAYLOR *et al.*, 2003; GORDON *et al.*, 2005). Macrófagos classicamente ativados têm papel fundamental no início da inflamação, fagocitose, aumento dos níveis de citocinas inflamatórias, produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e ativação da resposta imune adquirida (AUFFRAY *et al.*, 2009). Sendo células com alta plasticidade podem potencialmente responder tanto à estímulos endógenos

quanto exógenos. Interferon- γ (IFN- γ) e lipopolissacarídeo (LPS) são reconhecidos como ativadores da função macrófágica e foram utilizados no presente trabalho como controles positivos. Um dos mais importantes efeitos do IFN- γ em macrófagos é a ativação do “burst” respiratório (DECKER *et al.*, 2002), enquanto que a exposição ao LPS resulta na ativação do fator de transcrição NF-kB, que coordena um programa de expressão gênica que sustenta a resposta imune de macrófagos.

A ação de BJcuL como agente exógeno na ativação de macrófagos pode ser verificada pelo aumento da resposta fagocítica de forma bem expressiva após incubação por 12 e 24 horas (Figura 11). O efeito de estimulação microbida da lectina foi reforçado pelo aumento significativo na produção de H₂O₂ nas células submetidas ao tratamento por 12 horas com BJcuL, maior do que o encontrado para o tratamento com IFN- γ (Figura 12). Paralelamente verifica-se que a lectina não exerce efeito ativador em presença de LPS, mas ao contrário, leva a uma diminuição na produção de peróxido de hidrogênio para valores significativamente menores do que em células não tratadas. Este resultado pode sugerir que o efeito de BJcuL seja de modulação negativa.

Foi observado que linhagens de U937, obtidas de diferentes laboratórios, exibiram diferenças na expressão de proteínas relacionadas à ativação celular quando tratadas com IFN- γ ou LPS, (LACHMAN *et al.*, 1978; FENTON *et al.*, 1988), (UCLA *et al.*, 1990). Foi sugerido que tais diferenças poderiam refletir o estado de diferenciação das sub-linhagens depois de um grande número de gerações (SHARIF *et al.*, 2007). Alterações na expressão de proteínas de importantes vias de ativação dos macrófagos poderiam explicar porque no presente trabalho as células responderam positivamente aos controles positivos no ensaio de fagocitose, mas para a produção de H₂O₂ tanto IFN- γ quanto LPS sozinhos foram incapazes de induzir aumento, em comparação ao controle sem tratamento.

A ativação de macrófagos também desencadeia um importante fenômeno responsável pela integração da imunidade inata com a adaptativa. Nossos resultados demonstraram que BJcuL provocou um discreto aumento na expressão de proteínas envolvidas no processo de apresentação de antígenos (Figura 13). Esta atividade é desempenhada por proteínas especializadas que são codificadas por genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), expressas na superfície celular (MANTEGAZZA *et al.*, 2012) e em humanos são chamadas de antígeno leucocitário humano e os genes definidos sorologicamente (HLA-A, HLA-B, HLA-C) compõe os genes MHC classe I, enquanto (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ) compõe os genes do MHC classe II (WALDBURGER *et al.*, 2001). Monócitos expressam MHC-I, mas durante a diferenciação a expressão de MHC-I é inibida enquanto MHC-II é induzida (BARCLAY *et al.*, 1997).

As proteínas da família B7, B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), são expressas nas APCs e fornecem o principal sinal coestimulatório para sustentar a apresentação de antígenos. Embora outros membros da família B7 possam fornecer coestímulo, evidências apoiam um papel dominante para CD86 na resposta primária da célula T (LENSCHOW *et al.*, 1996). Na ativação de células dendríticas, macrófagos e células B, a expressão de CD86 pode ser induzida rapidamente e geralmente em níveis mais altos que CD80. Nossos resultados corroboram com estas afirmações, verificando uma expressão acentuada de CD86 e HLA-ABC, bem como um aumento mais discreto de CD80 e HLA-DR.

Avanços da glicobiologia já permitiram comprovar que a interação carboidrato-lectina tem papel fundamental nas respostas imunológicas, com maior contribuição resultante do estudo de lectinas vegetais. Sabe-se, por exemplo, que várias lectinas exercem atividades imunomoduladoras que são iniciadas pela sua interação com radicais glicosilados presentes sobre a superfície das células do sistema imunológico, muitos deles apresentando beta-galactosídeos. Tal interação pode modular positivamente a transdução de sinal, para a produção de certas citocinas (SOUZA *et al.*, 2013) e induzir respostas imunes do tipo Th1 e Th2,

eficazes contra tumores ou infecções microbianas. Notadamente sobre monócitos e macrófagos, a lectina ArtinM isolada de *Artocarpus heterophyllus*, induziu a produção tanto de IL-10 quanto IL-12 de macrófagos murinos (PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2001) enquanto que ConA levou a maior produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IFN- γ (REIS *et al.*, 2008), da mesma forma que a lectina de *Phytolacca americana* (STANILOVA *et al.*, 2005), dentre outras.

Nossos resultados mostraram que BJcuL pode agir de modo semelhante, apresentando uma diversidade de funções na modulação de células diferenciadas da linhagem U937, induzindo respostas clássicas de macrófagos ativadas, tais como a fagocitose, mas também modulação diferenciada na produção de peróxido de hidrogênio em ausência ou presença de LPS. Estes processos parecem ser desencadeados após a interação da lectina a proteínas glicosiladas contendo galactose na superfície celular. O reconhecimento do seu ligante na superfície celular, das vias intracelulares acionadas e dos seus produtos de ativação e secreção são fundamentais para qualquer especulação sobre sua ação e potencial terapêutico. Os resultados do presente trabalho abrem a possibilidade de um estudo mais aprofundado para compreender o mecanismo imunomodulador da lectina que poderá comprovar seu potencial como agente imunofarmacológico.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que BJcuL apresenta potencial imunomodulatório *in vitro* sobre macrófagos derivados da linhagem celular monocítica U937. A lectina foi capaz de promover a modulação da produção de espécies reativas de oxigênio, aumento da taxa de fagocitose e de expressão de marcadores da resposta imunológica. BJcuL não promoveu diferenciação celular e não foi tóxica nas concentrações testadas.

7. REFERÊNCIAS

AFONSO-CARDOSO, S. R.; SILVA, C. V.; FERREIRA, M. S.; SOUZA, M. A. Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in murine macrophages. **Exp Parasitol**, v. 128, n. 1, p. 61-7, 2011.

ALMKVIST, J.; KARLSSON, A. Galectins as inflammatory mediators. **Glycoconj J**, v. 19, n. 7-9, p. 575-81, 2004.

ANGATA, T.; BRINKMAN-VAN DER LINDEN, E. I-type lectins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 294-316, 2002.

ARNAOUT, M. A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. **Blood**, v. 75, n. 5, p. 1037-50, 1990.

AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 669-92, 2009.

BARCLAY, N. A.; BROWN, M. H.; BIRKELAND, M. L. **The Leukocyte Antigen**. San Diego-USA: 1997.

BAX, M.; GARCIA-VALLEJO, J. J.; JANG-LEE, J.; NORTH, S. J.; GILMARTIN, T. J.; HERNANDEZ, G.; CROCKER, P. R.; LEFFLER, H.; HEAD, S. R.; HASLAM, S. M.; DELL, A.; VAN KOOYK, Y. Dendritic cell maturation results in pronounced changes in glycan expression affecting recognition by siglecs and galectins. **J Immunol**, v. 179, n. 12, p. 8216-24, 2007.

BERNINK, J.; MJOSBERG, J.; SPITS, H. Th1- and Th2-like subsets of innate lymphoid cells. **Immunol Rev**, v. 252, n. 1, p. 133-8, 2013.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nat Immunol**, v. 11, n. 10, p. 889-96, 2010.

BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive immunity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S33-40, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRANDT, E.; WOERLY, G.; YOUNES, A. B.; LOISEAU, S.; CAPRON, M. IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils. **J Leukoc Biol**, v. 68, n. 1, p. 125-30, 2000.

BROCKHAUSEN, I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1473, n. 1, p. 67-95, 1999.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. London: 1989.

CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Isolation and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Biochem Mol Biol Int**, v. 44, n. 5, p. 933-938, 1998.

CEBO, C.; VERGOTEN, G.; ZANETTA, J. P. Lectin activities of cytokines: functions and putative carbohydrate-recognition domains. **Biochim Biophys Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 422-34, 2002.

CLEMETSON, K. J.; LU, Q.; CLEMETSON, J. M. Snake C-type lectin-like proteins and platelet receptors. **Pathophysiol Haemost Thromb**, v. 34, n. 4-5, p. 150-5, 2005.

COMELLI, E. M.; SUTTON-SMITH, M.; YAN, Q.; AMADO, M.; PANICO, M.; GILMARTIN, T.; WHISENANT, T.; LANIGAN, C. M.; HEAD, S. R.; GOLDBERG, D.; MORRIS, H. R.; DELL, A.; PAULSON, J. C. Activation of murine CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. **J Immunol**, v. 177, n. 4, p. 2431-40, 2006.

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 935-45, 2008.

DE ALENCAR, N. M.; MOTA, M. R.; RODRIGUES, N. V.; MARTINS, J. L.; DO NASCIMENTO, K. S.; ASSREUY, A. M.; CAVADA, B. S. Neutrophil-infiltrated paw edema induced by mannose-binding *Dioclea violacea* lectin. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 1, p. 220-5, 2013.

DE CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Primary structure characterization of *Bothrops jararacussu* snake venom lectin. **J Protein Chem**, v. 21, n. 1, p. 43-50, 2002.

DE MELO, C. M.; DE CASTRO, M. C.; DE OLIVEIRA, A. P.; GOMES, F. O.; PEREIRA, V. R.; CORREIA, M. T.; COELHO, L. C.; PAIVA, P. M. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytother Res**, v. 24, n. 11, p. 1631-6, 2010.

DE OLIVEIRA, P. S.; REGO, M. J.; DA SILVA, R. R.; CAVALCANTI, M. B.; GALDINO, S. L.; CORREIA, M. T.; COELHO, L. C.; PITTA, M. G. Cratylia mollis 1, 4 lectin: a new biotechnological tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 induction and generation of immunological memory. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 263968, 2013.

DECKER, T.; STOCKINGER, S.; KARAGHIOSOFF, M.; MULLER, M.; KOVARIK, P. IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. **J Clin Invest**, v. 109, n. 10, p. 1271-7, 2002.

DONG, S.; HUGHES, R. C. Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). **Glycoconj J**, v. 14, n. 2, p. 267-74, 1997.

DRICKAMER, K. C-type lectin-like domains. **Curr Opin Struct Biol**, v. 9, n. 5, p. 585-90, 1999.

DUBOIS M., G. K., HAMILTON JK., REBERS PA., SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, 1956.

EDWARDS, J. P.; ZHANG, X.; FRAUWIRTH, K. A.; MOSSER, D. M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **J Leukoc Biol**, v. 80, n. 6, p. 1298-307, 2006.

ELIFIO-ESPOSITO, S.; 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 the Venom of Bothrops jararacussu can adhere to extracellular matrix proteins and induce the rolling of leukocytes. **J Venom Anim**

Toxins Incl Trop Dis, v. 13, p. 782-799, 2007.

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

FENTON, M. J.; VERMEULEN, M. W.; CLARK, B. D.; WEBB, A. C.; AURON, P. E. Human pro-IL-1 beta gene expression in monocytic cells is regulated by two distinct pathways. **J Immunol**, v. 140, n. 7, p. 2267-73, 1988.

GABIUS, H. J. Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: case studies for the mistletoe lectin and galectin-1. **Biochimie**, v. 83, n. 7, p. 659-66, 2001.

GANJU, L.; KARAN, D.; CHANDA, S.; SRIVASTAVA, K. K.; SAWHNEY, R. C.; SELVAMURTHY, W. Immunomodulatory effects of agents of plant origin. **Biomed Pharmacother**, v. 57, n. 7, p. 296-300, 2003.

GARCIA-VALLEJO, J. J.; VAN DIJK, W.; VAN HET HOF, B.; VAN DIE, I.; ENGELSE, M. A.; VAN HINSBERGH, V. W.; GRINGHUIS, S. I. Activation of human endothelial cells by tumor necrosis factor-alpha results in profound changes in the expression of glycosylation-related genes. **J Cell Physiol**, v. 206, n. 1, p. 203-10, 2006.

GARCIA, A.; SERRANO, A.; ABRIL, E.; JIMENEZ, P.; REAL, L. M.; CANTON, J.; GARRIDO, F.; RUIZ-CABELLO, F. Differential effect on U937 cell differentiation by targeting transcriptional factors implicated in tissue- or stage-specific induced integrin expression. **Exp Hematol**, v. 27, n. 2, p. 353-64, 1999.

GHOSH, S.; BALTIMORE, D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. **Nature**, v. 344, n. 6267, p. 678-82, 1990.

GOMES, A.; BHATTACHARJEE, P.; MISHRA, R.; BISWAS, A. K.; DASGUPTA, S. C.; GIRI, B. Anticancer potential of animal venoms and toxins. **Indian J Exp Biol**, v. 48, n. 2, p. 93-103, 2010.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 1, p. 23-35, 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 12, p. 953-64, 2005.

HAKOMORI, S. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. **Adv Cancer Res**, v. 52, p. 257-331, 1989.

_____. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 16, p. 10231-3, 2002.

HARTSHORN, K. L.; CROUCH, E.; WHITE, M. R.; COLAMUSSI, M. L.; KAKKANATT, A.; TAUBER, B.; SHEPHERD, V.; SASTRY, K. N. Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. **Am J Physiol**, v. 274, n. 6 Pt 1, p. L958-69, 1998.

HASS, R.; BARTELS, H.; TOPLEY, N.; HADAM, M.; KOHLER, L.; GOPPELT-STRUBE, M.; RESCH, K. TPA-induced differentiation and adhesion of U937 cells: changes in ultrastructure, cytoskeletal organization and expression of cell surface antigens. **Eur J Cell Biol**, v. 48, n. 2, p. 282-93, 1989.

HATTORI T, P. M., BOUGNOUXP, CHANG ZL, HOFFMAN T. Differentiation of U937 Cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 72, p. 237-244, 1983.

HIRABAYASHI, J.; KUSUNOKI, T.; KASAI, K. Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*. Homologies with Ca²⁺-dependent-type lectins. **J Biol Chem**, v. 266, n. 4, p. 2320-6, 1991.

JANEWAY, C. A., JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JIANG, S.; DONG, C. A complex issue on CD4(+) T-cell subsets. **Immunol Rev**, v. 252, n. 1, p. 5-11, 2013.

JIN, X. K.; LI, W. W.; CHENG, L.; LI, S.; GUO, X. N.; YU, A. Q.; WU, M. H.; HE, L.; WANG, Q. Two novel short C-type lectin from Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, are induced in response to LPS challenged. **Fish Shellfish Immunol**, v. 33, n. 5, p. 1149-58, 2012.

KANG, T. B.; YOO, Y. C.; LEE, K. H.; YOON, H. S.; HER, E.; KIM, J. B.; SONG, S. K. Korean mistletoe lectin (KML-IIU) and its subchains induce nitric oxide (NO) production in murine macrophage cells. **J Biomed Sci**, v. 15, n. 2, p. 197-204, 2008.

KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; SOARES, A. M.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; GIULIATI, S.; FARIA, M., JR.; XAVIER, M. A.; FONTES, M. R.; GIGLIO, J. R.; FRANCA, S. C. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: l-gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. **Biochimie**, v. 86, n. 3, p. 211-9, 2004.

KASSAB, B. H.; DE 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 Expr Purif**, v. 35, n. 2, p. 344-52, 2004.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochim Biophys Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 187-97, 2002.

KISHORE, U.; EGGLETON, P.; REID, K. B. Modular organization of carbohydrate recognition domains in animal lectins. **Matrix Biol**, v. 15, n. 8-9, p. 583-92, 1997.

KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics--cardiovascular examples. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 497-506, 2012.

KOH, D. C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 24, p. 3030-41, 2006.

KOIKE, T.; KIMURA, N.; MIYAZAKI, K.; YABUTA, T.; KUMAMOTO, K.; TAKENOSHITA, S.; CHEN, J.; KOBAYASHI, M.; HOSOKAWA, M.; TANIGUCHI, A.; KOJIMA, T.; ISHIDA, N.; KAWAKITA, M.; YAMAMOTO, H.; TAKEMATSU, H.; SUZUKI, A.; KOZUTSUMI, Y.; KANNAGI, R. Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 21, p. 8132-7, 2004.

KREIDER, T.; ANTHONY, R. M.; URBAN, J. F., JR.; GAUSE, W. C. Alternatively activated macrophages in helminth infections. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 4, p. 448-53, 2007.

KREIPE, H.; RADZUN, H. J.; SCHUMACHER, U.; PARWARESCH, M. R. Lectin binding and surface glycoprotein pattern of human macrophage populations. **Histochemistry**, v. 86, n. 2, p. 201-6, 1986.

KZHYSHKOWSKA, J.; MAMIDI, S.; GRATCHEV, A.; KREMMER, E.; SCHMUTTERMAIER, C.; KRUSELL, L.; HAUS, G.; UTIKAL, J.; SCHLEDZEWSKI, K.; SCHOLTZE, J.; GOERDT, S. Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway. **Blood**, v. 107, n. 8, p. 3221-8, 2006.

LACHMAN, L. B.; MOORE, J. O.; METZGAR, R. S. Preparation and characterization of lymphocyte-activating factor (LAF) from acute monocytic and myelomonocytic leukemia cells. **Cell Immunol**, v. 41, n. 1, p. 199-206, 1978.

LANDMANN, R.; MULLER, B.; ZIMMERLI, W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. **Microbes Infect**, v. 2, n. 3, p. 295-304, 2000.

LARSSON, L. G.; IVHED, I.; GIDLUND, M.; PETTERSSON, U.; VENNSTROM, B.; NILSSON, K. Phorbol ester-induced terminal differentiation is inhibited in human U-937 monoblastic cells expressing a v-myc oncogene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 8, p. 2638-42, 1988.

LEE, J. Y.; KIM, J. Y.; LEE, Y. G.; BYEON, S. E.; KIM, B. H.; RHEE, M. H.; LEE, A.; KWON, M.; HONG, S.; CHO, J. Y. In vitro immunoregulatory effects of Korean mistletoe lectin on functional activation of monocytic and macrophage-like cells. **Biol Pharm Bull**, v. 30, n. 11, p. 2043-51, 2007.

LENSCHOW, D. J.; WALUNAS, T. L.; BLUESTONE, J. A. CD28/B7 system of T cell costimulation. **Annu Rev Immunol**, v. 14, p. 233-58, 1996.

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 haemostasis. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1089-98, 2005.

LU, T. L.; CHUANG, J. Y.; YANG, J. S.; CHIU, S. T.; HSIAO, N. W.; WU, M. C.; WU, S. H.; HSU, C. H. Production of Active Nonglycosylated Recombinant B-Chain of Type-2 Ribosome-Inactivating Protein from *Viscum articulatum* and Its Biological Effects on Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, p. 283747, 2011.

MACKANESS, G. B. Cellular immunity and the parasite. **Adv Exp Med Biol**, v. 93, p. 65-73, 1977.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 323-50, 1997.

MANTEGAZZA, A. R.; MAGALHAES, J. G.; AMIGORENA, S.; MARKS, M. S. Presentation of Phagocytosed Antigens by MHC Class I and II. **Traffic**, 2012.

MARTIN, T. R.; MONGOVIN, S. M.; TOBIAS, P. S.; MATHISON, J. C.; MORIARTY, A. M.; LETURCQ, D. J.; ULEVITCH, R. J. The CD14 differentiation antigen mediates the development of endotoxin responsiveness during differentiation of mononuclear phagocytes. **Journal of leukocyte Biology**, v. 53, 1994.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annu Rev Pathol**, v. 9, p. 181-218, 2014.

MCCOY, K. D.; LE GROS, G. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. **Immunol Cell Biol**, v. 77, n. 1, p. 1-10, 1999.

MINAFRA, L.; DI CARA, G.; ALBANESE, N. N.; CANCEMI, P. Proteomic differentiation pattern in the U937 cell line. **Leuk Res**, v. 35, n. 2, p. 226-36, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 958-69, 2008a.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Activation of murine macrophages. **Curr Protoc Immunol**, v. Chapter 14, p. Unit 14 2, 2008b.

MURAILLE, E.; PAJAK, B.; URBAIN, J.; LEO, O. Carbohydrate-bearing cell surface receptors involved in innate immunity: interleukin-12 induction by mitogenic and nonmitogenic lectins. **Cell Immunol**, v. 191, n. 1, p. 1-9, 1999.

NAVDAEV, A.; CLEMETSON, J. M.; POLGAR, J.; KEHREL, B. E.; GLAUNER, M.; MAGNENAT, E.; WELLS, T. N.; CLEMETSON, K. J. Aggretin, a heterodimeric C-type lectin from *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper), stimulates platelets by binding to $\alpha 2\beta 1$ integrin and glycoprotein Ib, activating Syk and phospholipase C γ 2, but does not involve the glycoprotein VI/Fc receptor gamma chain collagen receptor. **J Biol Chem**, v. 276, n. 24, p. 20882-9, 2001.

NIKAI, T.; KATO, S.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H. Amino acid sequence and biological properties of the lectin from the venom of *Trimeresurus okinavensis* (Himehabu). **Toxicon**, v. 38, n. 5, p. 707-11, 2000.

NOLTE, S.; DE CASTRO DAMASIO, D.; BAREA, A. C.; GOMES, J.; MAGALHAES, A.; MELLO ZISCHLER, L. F.; STUERP-CAMPELO, P. M.; ELIFIO-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. **Toxicon**, v. 59, n. 1, p. 81-5, 2012.

O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 477-87, 2008.

OHTSUBO, K.; MARTH, J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 855-67, 2006.

PANFOLI, I.; CALZIA, D.; RAVERA, S.; MORELLI, A. Inhibition of hemorrhagic snake venom components: old and new approaches. **Toxins (Basel)**, v. 2, n. 4, p. 417-27, 2010.

PANUNTO-CASTELO, A.; SOUZA, M. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SILVA, J. S. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, v. 11, n. 12, p. 1035-42, 2001.

PANUNTO, P. C.; DA SILVA, M. A.; LINARDI, A.; BUZIN, M. P.; MELO, S. E.; MELLO, S. M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 21-31, 2006.

PARK, H. J.; HONG, J. H.; KWON, H. J.; KIM, Y.; LEE, K. H.; KIM, J. B.; SONG, S. K. TLR4-mediated activation of mouse macrophages by Korean mistletoe lectin-C (KML-C). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 396, n. 3, p. 721-5, 2010.

PEDRINACI, S.; RUIZ-CABELLO, F.; GOMEZ, O.; COLLADO, A.; GARRIDO, F. Protein kinase C-mediated regulation of the expression of CD14 and CD11/CD18 in U937 cells. **Int J Cancer**, v. 45, n. 2, p. 294-8, 1990.

PERILLO, N. L.; MARCUS, M. E.; BAUM, L. G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **J Mol Med (Berl)**, v. 76, n. 6, p. 402-12, 1998.

POWELL, L. D.; VARKI, A. I-type lectins. **J Biol Chem**, v. 270, n. 24, p. 14243-6, 1995.

QIAN, C.; CAO, X. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1283, p. 67-74, 2013.

RABINOVICH, G. A.; RUBINSTEIN, N.; TOSCANO, M. A. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 274-84, 2002.

RABINOVICH, G. A.; VAN KOOYK, Y.; COBB, B. A. Glycobiology of immune responses. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1253, p. 1-15, 2012.

REIS, E. A.; ATHANAZIO, D. A.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H.; DE PAULO TEIXEIRA PINTO, V.; CARMO, T. M.; REIS, A.; TROCOLLI, G.; CRODA, J.; HARN, D.; BARRAL-NETTO, M.; REIS, M. G. Potential immunomodulatory effects of plant lectins in *Schistosoma mansoni* infection. **Acta Trop**, v. 108, n. 2-3, p. 160-5, 2008.

ROGERIO, A. P.; CARDOSO, C. R.; FONTANARI, C.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; SILVA, E. V.; KOYAMA, N. S.; BASEI, F. L.; SOARES, E. G.; CALIXTO, J. B.; STOWELL, S. R.; DIAS-BARUFFI, M.; FACCIOLI, L. H. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology**, v. 17, n. 8, p. 795-804, 2007.

ROUX-LOMBARD, P.; CRUCHAUD, A.; DAYER, J. M. Effect of interferon-gamma and 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on superoxide anion, prostaglandins E2, and mononuclear cell factor production by U937 cells. **Cell Immunol**, v. 97, n. 2, p. 286-96, 1986.

ROVERA, G.; O'BRIEN, T. G.; DIAMOND, L. Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor promoters. **Science**, v. 204, n. 4395, p. 868-70, 1979.

SHARIF, O.; BOLSHAKOV, V. N.; RAINES, S.; NEWHAM, P.; PERKINS, N. D. Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. **BMC Immunol**, v. 8, p. 1, 2007.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.

SIERRA, C.; LASCURAIN, R.; PEREYRA, A.; GUEVARA, J.; MARTINEZ, G.; AGUNDIS, C.; ZENTENO, E.; VAZQUEZ, L. Participation of serum and membrane lectins on the oxidative burst regulation in *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes. **Dev Comp Immunol**, v. 29, n. 2, p. 113-21, 2005.

SOUSA, J. R.; MONTEIRO, R. Q.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Proteolytic action of Bothrops jararaca venom upon its own constituents. **Toxicon**, v. 39, n. 6, p. 787-92, 2001.

SOUZA, M. A.; CARVALHO, F. C.; RUAS, L. P.; RICCI-AZEVEDO, R.; ROQUE-BARREIRA, M. C. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconj J**, v. 30, n. 7, p. 641-57, 2013.

STANILOVA, S. A.; DOBREVA, Z. G.; SLAVOV, E. S.; MITEVA, L. D. C3 binding glycoprotein from *Cuscuta europea* induced different cytokine profiles from human PBMC compared to other plant and bacterial immunomodulators. **Int Immunopharmacol**, v. 5, n. 4, p. 723-34, 2005.

SWENSON, S.; COSTA, F.; MINEA, R.; SHERWIN, R. P.; ERNST, W.; FUJII, G.; YANG, D.; MARKLAND, F. S., JR. Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. **Mol Cancer Ther**, v. 3, n. 4, p. 499-511, 2004.

TAYLOR, P. R.; GORDON, S. Monocyte heterogeneity and innate immunity. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 2-4, 2003.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S24-32, 2010.

UCLA, C.; ROUX-LOMBARD, P.; FEY, S.; DAYER, J. M.; MACH, B. Interferon gamma drastically modifies the regulation of interleukin 1 genes by endotoxin in U937 cells. **J Clin Invest**, v. 85, n. 1, p. 185-91, 1990.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 825-52, 2002.

UNITT, J.; HORNIGOLD, D. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. **Biochem Pharmacol**, v. 81, n. 11, p. 1324-8, 2011.

WALDBURGER, J. M.; SUTER, T.; FONTANA, A.; ACHA-ORBEA, H.; REITH, W. Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene. **J Exp Med**, v. 194, n. 4, p. 393-406, 2001.

WEIS, W. I.; KAHN, R.; FOURME, R.; DRICKAMER, K.; HENDRICKSON, W. A. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. **Science**, v. 254, n. 5038, p. 1608-15, 1991.

WEIS, W. I.; TAYLOR, M. E.; DRICKAMER, K. The C-type lectin superfamily in the immune system. **Immunol Rev**, v. 163, p. 19-34, 1998.

WILLMENT, J. A.; BROWN, G. D. C-type lectin receptors in antifungal immunity. **Trends Microbiol**, v. 16, n. 1, p. 27-32, 2008.

WRIGHT, S. D.; DETMERS, P. A.; AIDA, Y.; ADAMOWSKI, R.; ANDERSON, D. C.; CHAD, Z.; KABBASH, L. G.; PABST, M. J. CD18-deficient cells respond to lipopolysaccharide in vitro. **J Immunol**, v. 144, n. 7, p. 2566-71, 1990.

YOON, T. J.; YOO, Y. C.; KANG, T. B.; SONG, S. K.; LEE, K. B.; HER, E.; SONG, K. S.; KIM, J. B. Antitumor activity of the Korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells. **Arch Pharm Res**, v. 26, n. 10, p. 861-7, 2003.

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, n. 12, p. 1887-92, 2001.

ZHANG, X.; CHEN, L. X.; OUYANG, L.; CHENG, Y.; LIU, B. Plant natural compounds: targeting pathways of autophagy as anti-cancer therapeutic agents. **Cell Prolif**, v. 45, n. 5, p. 466-76, 2012.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W.; ULEVITCH, R. J. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. **Immunol Today**, v. 14, n. 3, p. 121-5, 1993.