UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

EDNA MARIA GUIMARÃES GOMES

COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS EQUINOS E HUMANOS

BRASÍLIA

2018

EDNA MARIA GUIMARÃES GOMES

COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS EQUINOS E HUMANOS

Trabalho de conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientador Prof. Dr. Wagner Fontes

BRASÍLIA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Maria Guimarães Gomes, Edna
d COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS EQUINOS E HUMANOS - Revisão de Literatura/ Edna Maria Guimarães Gomes; orientador Wagner Fontes - Brasília, 2018.
48 p.

Monografia (Graduação - Medicina Veterinária) -- Universidade de Brasília, 2018.

1. Neutrófilos. 2. Fagocitose. 3. EDTA. 4. Heparina. 5.Ativação. 6.Morfologia. 6.Equino I. Fontes, Wagner, orient. II. Título.

CESSÃO DE DIREITOS

Nome do Autor: Edna Maria Guimarães Gomes
Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Comparação Morfológica e Funcional de Neutrófilos Equinos e Humanos – Revisão de Literatura
Ano: 2018

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. A autora reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora.

Edna Maria Guimarães Gomes

FOLHA DE APROVAÇÃO

EDNA MARIA GUIMARÃES GOMES

COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS EQUINOS E HUMANOS

Trabalho de conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do grau de Médico Veterinário.

APROVADO EM: 13 / JUN 2018.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Wagner Fontes
Universidade de Brasília
Presidente

Carlos André Ornelas Ricart
Universidade de Brasília
Membro Interno

Adriano Rios da Silva
Faculdade Icesp de Brasília

Dedico este trabalho ao Dr. Érito Pereira da Cunha pelo apoio incondicional para a realização do meu sonho. Sem você nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida e à espiritualidade amiga dos animais por me indicar esse caminho.

Aos meus filhos pela paciência e compreensão.

Aos meus pais agradeço a vida.

Ao meu orientador, Wagner Fontes, pela paciência, confiança e apoio.

Aos colegas da graduação: Greiciane, André Parente, Thayara e Camila pelas horas agradáveis de estudo.

À Isabelle pelo apoio durante e na conclusão deste trabalho.

Aos colegas da 30ª Delegacia que muito ajudaram com apoio, troca de plantões, para que eu não perdesse nenhuma aula. Eliana o conselho amoroso durante aqueles três anos.

À Fernanda Marques, Médica Veterinária, pela amizade, confiança e aprendizado.

A todos que torceram por essa conquista.

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.

Chico Xavier

COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS EQUINOS E HUMANOS

Resumo:

Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas a partir da corrente sanguínea ao local da infecção ou dano tecidual, durante o processo inflamatório. Após a ativação por bactérias ou outros mediadores pró-inflamatórios como LPS e TNF, os neutrófilos executam várias funções como quimiotaxia, fagocitose, produção e liberação de ROS, enzimas proteolíticas e proteínas contidas nos grânulos. O LPS é uma molécula produzida por bactérias Gram-negativas, que estimula a produção de citocinas, geração de ROS, expressão de β-integrinas e L-selectinas, realização de fagocitose e inibição da apoptose, ao passo que o TNF é uma citocina pró-inflamatória, que aumenta a adesão do leucócito no endotélio e estimula a secreção de quimiocinas e induz a ativação do neutrófilo para a liberação de ROS e enzimas proteolíticas. Embora grande parte dos estudos utilize o EDTA para a coleta de sangue equino e o uso de heparina ser mais frequente para coleta de sangue humano, a influência do anticoagulante utilizado na coleta sobre os resultados dos testes realizados com neutrófilos equinos e humanos é pouco estudada. O presente trabalho propõe a comparação do uso de heparina e EDTA para a obtenção de neutrófilos de humanos e de equinos quanto ao rendimento, viabilidade, morfologia e resposta ao LPS e TNF. Os neutrófilos foram separados com Percoll, quantificados em câmara de Neubauer, avaliados quanto à capacidade fagocitária por microscopia e capacidade oxidativa pelo teste Nitroazul de tetrazólio (NBT) após ativação com LPS e TNF. A viabilidade não foi afetada pelo anticoagulante utilizado em nenhuma comparação. O EDTA aparentemente afetou a morfologia de neutrófilos equinos e aumentou o rendimento celular equino em relação à heparina ($p<0,05$). A produção de ROS em neutrófilos humanos não foi afetada pelo anticoagulante, mas em equinos, o EDTA aumentou o burst oxidativo provocado pelos ativadores LPS e TNF. A quantidade de células fagocitando no controle e no ativado foi maior mediante utilização de heparina ($p<0,01$), ocorrendo o mesmo na quantidade de leveduras fagocitadas por cada neutrófilo ($p<0,05$). Em síntese, esse trabalho demonstra que há vantagem no uso de EDTA para ativação e na quantidade obtida de neutrófilos equinos. E que neutrófilos equinos coletados com heparina apresentam maior capacidade fagocitária.

Palavras-chave: neutrófilos, fagocitose, EDTA, heparina, ativação, morfologia, equino.

MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL COMPARISON BETWEEN EQUINE AND HUMAN NEUTROPHILS

Abstract:

Neutrophils are the first cells recruited from the bloodstream to the site of infection or tissue damage during the inflammatory process. After activation by bacteria or other pro-inflammatory mediators such as LPS and TNF, neutrophils perform various functions such as chemotaxis, phagocytosis, production and release of ROS, proteolytic enzymes, and proteins contained in the granules. LPS is a molecule produced by Gram-negative bacteria, which stimulates cytokine production, ROS generation, β-integrin and L-selectin expression, phagocytosis and inhibition of apoptosis, whereas TNF is a pro-inflammatory cytokine that increases leukocyte adhesion to the endothelium and stimulates the secretion of chemokines and induces neutrophil activation for the release of ROS and proteolytic enzymes. Although most studies use EDTA for equine blood collection and the use of heparin is more frequent for human blood collection, the influence of the anticoagulant used in the collection on the results of the tests performed with equine and human neutrophils is little studied. The present work proposes the comparison of the use of heparin and EDTA to obtain human and equine neutrophils in terms of yield, viability, morphology and response to LPS and TNF. Neutrophils were separated with Percoll, quantified in a Neubauer's chamber, evaluated for phagocytic capacity by microscopy and oxidative capacity by Nitro Tetrazolium Blue Chloride (NBT), after activation with LPS and TNF. Viability was not affected by the anticoagulant used in any comparison. EDTA apparently affected the morphology of equine neutrophils and increased equine cellular yield in relation to heparin ($p < 0.05$). The production of ROS in human neutrophils was not affected by the anticoagulant, but in horses, EDTA increases the oxidative burst caused by the LPS and TNF activators. The number of phagocytic cells in the control and in the activated conditions was higher with the use of heparin ($p < 0.01$), as was the amount of yeast phagocytosed by each neutrophil ($p < 0.05$). In summary, this work demonstrates that there is an advantage in the use of EDTA for activation and in the number of equine neutrophils obtained. And that equine neutrophils collected with heparin present greater phagocytic capacity.

Abstract: neutrophils, phagocytosis, EDTA, heparin, activation, morphology, equine

ÍNDICE DO TEXTO

1. INTRODUÇÃO 13

1.1. Neutrófilos 13
1.2 Lipossacarídeo (LPS). 14
1.3 O TNF 15
1.4 Nitroblue tetrazolium (NBT) 16
1.5 Anticoagulantes EDTA e HEPARINA 17
1.6 Capacidade fagocitária e bactericida 18
1.7 Doenças importantes em equinos com envolvimento de neutrófilos. 19

2. OBJETIVO 22

3. METODOLOGIA 23

3.1 Delineamento experimental. 23
3.2 Coleta de sangue 23
3.3 Separação dos Neutrófilos 24
3.4 Contagem de neutrófilos, avaliação da viabilidade e pureza 26
3.5 Ativação dupla com LPS e TNF 27
3.6 Avaliação da Ativação (Testes de NBT) 28
3.7 Fagocitose 28
3.8 Preparo para proteômica. 29
3.9 Análise estatística 29

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 31

4.1 Separação de neutrófilos, viabilidade e pureza 31
4.2 Produção de espécies reativas de oxigênio 34
4.3 Teste de ativação celular por NBT qualitativo 38
4.3 Fagocitose 39

5. CONCLUSÃO 41

6. REFERÊNCIA 43

LISTA DE FIGURAS

Figure 1.Neutrófilo equino realizando fagocitose de leveduras. Aumento de 100x (Fonte: Arquivo pessoal) 19
Figure 2. Neutrófilos separados entre o gradiente de 58% e 68% para equinos, formando um halo de neutrófilos entre os eritrócitos ao fundo e células mononucleadas e plasma sobre o gradiente de 58%. Fonte: Arquivo pessoal 25
Figure 3. Contagem de células separadas com anticoagulante EDTA. Aumento de 100x. Fonte: Arquivo pessoal..... 27
Figure 4. Contagem de fungos na câmara de Neubauer. Aumento de 100x.Fonte: Arquivo Pessoal.....29
Figure 5. Representação da viabilidade celular (± erro padrão) em neutrófilos humanos e equinos separados com diferentes anticoagulantes. Em amarelo, heparina e em vermelho EDTA) 31
Figure 6. Avaliação da pureza de neutrófilos humanos e equinos (± erro padrão) separados com diferentes anticoagulantes (heparina em amarelo, e EDTA em laranja).32
Figure 7. A) Neutrófilos equinos coletados com heparina (aumento de 100X). B) Coletados com EDTA (aumento de 100X). C) Neutrófilos humanos coletados com heparina (aumento de 100X) e D) Coletados com EDTA (aumento de 100X).....33
Figure 7. Comparação entre a quantidade de neutrófilos equinos e humanos na suspensão (± erro padrão) com o diferentes anticoagulantes. (Heparina em amarelo e EDTA em laranja). *p<0,05.....34
Figure 9. Teste de NBT quantitativo. Média das leituras (8 indivíduos) da absorbância dos níveis de formazan por espectrofotometria. Comp. de onde de 350 –790 nm.Análise de neutrófilos humanos nas condições quiescentes e ativados, obtidos com EDTA ou Heparina 35
Figure 10. Teste de NBT quantitativo. Média das leituras de absorbância dos níveis de formazam pelo Método de espectrofotometria. Comprimento de onde de 610 a 630. Análise de neutrófilos humanos nas condições EDTA, quiescente heparina e LPS + TNF heparina. 35
Figure 11. Teste de NBT quantitativo. Média das leituras (8 indivíduos) da absorbância dos níveis de formazan por espectrofotometria.Comprimentos de onda de 350 –790 nm. Análise de neutrófilos equinos nas cond. quiescentes e ativados,obtidos com EDTA ou Heparina 36
Figure 12. Teste de NBT quantitativo.Média das leituras de absorbância dos níveis de formazam pelo Método de espectrofotometria.Comprimento de onde de 380 a 430. Análise de neutrófilos equinos nas condições de EDTA e heparina e LPS + TNF EDTA - LPS + TNF heparina.....37
Figura 13. Resultados do teste NBT em lâmina. Neutrófilos equinos e humanos coletados com EDTA e heparina nas condições Controle (quiescente) e ativados com LPS+TNF submetidos ao teste de NBT em lâmina e corados com safranina. As setas pretas indicam a formação de cristais de formazan.....38
*Figure 14. Compilação dos resultados dos testes de fagocitose de Saccaromyces cerevisaiae por neutrófilos humanos e equinos.*A) Porcentagem de neutrófilos humanos e equinos fagocitando leveduras (± erro padrão) em condições controle e após ativação dupla com LPS+TNF com ambos anticoagulantes. B) Leveduras fagocitadas por neutrófilos humanos e equinos em condições controle e após ativação duplas com LPS+TNF com EDTA e heparina. *p<0,05 **p<0,01. 39

SIGLAS E ABREVIAÇÕES

CD14: Marcador de Monócitos e Macrófagos

DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

DTT: Ditiotreitol

EDTA: Ácido etilenodiaminoteracético

FMO: Falência Múltipla de Órgãos

HBSS: Solução Balanceada de Sais

LPB: Proteína Ligadora de LPS

LPS: Lipossacarídeo

$NADP^+$: forma oxidada do dinucleotídeo nicotinamida-adenina

NADPH: forma reduzida do dinucleotídeo nicotinamida-adenina

NBT: *Nitroblue Tetrozolium*

NK: Célula Natural Killer

ROS: *Reactive Oxygen Species*

SARA:Síndrome da Angústia Respiratória

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

TACE: Enzima TNF-alpha Converting Enzyme

TEAB: *Tetraethylammonium bromide*

TLR-4: Receptor Toll-Like

TNF-alpha: Fator de Necrose Tumoral Alfa

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neutrófilos

A primeira defesa do corpo contra patógenos ou lesões nos tecidos é o sistema imune inato. Uma vez que as respostas imunes excessivas podem ser prejudiciais, existem mecanismos anti-inflamatórios para controlar a resposta pró-inflamatória e prevenir lesões (Lawrence et al., 2002).

Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa do organismo, sendo as primeiras células a chegarem ao local da inflamação, atraídas por citocinas (Lauterbach et al., 2008). Possuem grânulos específicos que 33333participam da fagocitose e eliminação de patógenos ou debris teciduais (Botha et al., 1995). Eles são produzidos na medula óssea, onde necessitam, em média, de duas semanas para completar a fase de maturação (Kavoussi and Ross, 2007). O processo de ativação dos neutrófilos durante a inflamação consiste em várias etapas, entre elas a liberação de radicais superóxido, cujo processo é desencadeado por meio de citocinas pró-inflamatórias.

Uma dessas citocinas é o TNF-alfa (fator de necrose tumoral), produzido principalmente por macrófagos e células NK (Tchorzewski et al., 1993), que desencadeia a ativação de moléculas de adesão endoteliais, as quais proporcionam o rolamento, adesão e migração dos neutrófilos para os sítios de inflamação. O TNF-alfa também estimula neutrófilos a produzir outras citocinas e espécies reativas de O_2 (Takahashi, 2001).

Os neutrófilos tornam-se ativados migrando, fagocitando o patógeno e liberando espécies reativas de oxigênio através da montagem e ativação do complexo NADPH oxidase. A hiperatividade de neutrófilos, decorrente da inflamação aguda prolongada e sistêmica, implica em injúria severa, onde se verifica uma liberação extracelular inapropriada de ânion superóxido e enzimas proteolíticas, podendo promover dano a tecidos saudáveis e desencadear doenças autoimunes, SARA (Síndrome da Angústia Respiratória Aguda, ou *ARDS, Acute Respiratory Distress Syndrome*), sepse ou até FMO (Falência Múltipla de Órgãos, ou *MOF, Multiple Organ Failure*).

Neste projeto, inicialmente propõe-se um estudo comparativo da separação de neutrófilos de equino e humano com EDTA e heparina, bem como de neutrófilos quiescentes e estimulados com LPS e TNF-alfa, nessa ordem, avaliando-se a diferença em relação à viabilidade, pureza, quantidade de neutrófilos na suspensão, atividade fagocitária e produção de ROS. Foi também realizado o preparo das amostras para análise proteômica, a qual será concluída posteriormente (por limitações de prazo) a fim de

determinar quais proteínas variam e quais são constantes entre neutrófilos quiescentes e neutrófilos submetidos à estimulação dupla por LPS e TNF-alfa, bem como diferenças entre humanos e equinos quanto às vias envolvidas na resposta.

1.2 Lipossacarídeo (LPS)

Os lipopolissacarídeos (LPS) são moléculas de estrutura extremamente complexa encontrados exclusivamente na monocamada externa da membrana externa das bactérias Gram-negativas (Downey and Han, 1998). Possuem duas regiões com estrutura e genética bem distintas. Uma região hidrofílica, constituída por uma sequência de polissacarídeos e pelo antígeno O; e outra hidrofóbica, chamada de lipídeo-A. Essa região é estruturalmente mais conservada entre as classes de bactérias (Cruz-Machado, 2010). As regiões de lipídeo-A encontradas nas enterobactérias são chamadas também de endotoxinas por apresentarem atividade citotóxica em células animais. (Karunaratne et al., 1992). Já a porção hidrofílica é variável em diferentes bactérias Gram-negativas.

Durante a infecção bacteriana, o lipopolissacarídeo (LPS) é um dos agentes ativadores dos neutrófilos realizando a função de quimioatraente, sinalizando o caminho seguido pelas células efetoras até o local da infecção. Tem sido implicado na patogênese da sepse e choque séptico, induzindo células mielóides e não-mielóides a produzirem proteínas que alteram padrões hemodinâmicos e hematológicos observados na sepse e choque séptico. A maior causa de mortalidade em equinos é a liberação, na circulação, do lipídeo A, componente tóxico da molécula de LPS (Laskoski et al., 2012).

Nos neutrófilos, o LPS é um potente ativador, promovendo produção de citocinas (Cassatella, 1995), geração de ROS, expressão de β-integrinas e L-selectinas, realização de fagocitose (Soler-rodriguez et al., 2018) e inibição da apoptose (Hachiya et al., 1995), respostas funcionais que variam com a concentração de LPS e o tempo de exposição. Alguns estudos mostraram que a ativação de neutrófilos por LPS é intensificada, quando realizada em meio plasmático, em que a proteína ligadora de LPS (LBP) e septina facilitam a resposta de neutrófilos ao LPS via CD14 e TLR-4 (Jersmann et al., 1998), favorecendo a ativação *in vitro* mesmo em concentrações mais baixas de LPS. De fato, Soler et al, 2000 evidenciaram que neutrófilos incubados com concentrações menores ou iguais a 100ng/mL de LPS requerem a presença de plasma no meio de incubação para que a ativação ocorra nessa concentração devido à presença de LBP. Além disso, a

ativação de neutrófilos, sem a presença de plasma, na concentração de 100ng/ml, só foi observada quando os neutrófilos eram incubados em tempo muito prolongado.

Existem muitas lacunas na via de sinalização por LPS nos neutrófilos. Conexões entre TLR-4 (receptor Toll-like) e outras proteínas na cascata desencadeadas por LPS ainda não foram totalmente elucidadas. Além disso, modificações pós-traducionais que podem ocorrer nessa via ainda não foram totalmente explicadas. Isso leva à necessidade de mais estudos com o intuito do entendimento dos mecanismos de ativação desse ativador de neutrófilos, que possui grande relevância clínica (Jersmann et al., 1998).

1.3 O TNF-alfa

O TNF-alfa – fator de necrose tumoral, é um mediador inicial importante nas respostas biológicas às endotoxinas. O TNF existe em duas formas, solúvel e ligado à membrana celular. A forma solúvel é liberada das células após a clivagem enzimática do seu precursor ligado à membrana. A enzima responsável por esse processo é a TACE (do inglês, *TNF-alpha-converting enzyme*). Ambas as formas são biologicamente ativas. As células que expressam na membrana ou secretam TNF são principalmente os macrófagos, monócitos, linfócitos, mastócitos, granulócitos, fibroblastos, células NK (Natural Killer) e células epiteliais (Tchorzewski et al., 1993). Ele pode desencadear a ativação dos neutrófilos, sendo um dos mais precoces e potentes mediadores da resposta inflamatória, participando diretamente da sensibilização do sistema imunológico. Ele potencializa a expressão de moléculas de aderência, induz a desgranulação, libera componentes lisossômicos, potencializa a fagocitose e a oxidação de ROS (por ativação do sistema NADPH oxidase) (Dewas et al., 2003), dessa forma contribuindo para a erradicação da infecção, amplificando a atividade bactericida em neutrófilos. Em modelos animais, a administração intravenosa de altas doses de TNF-alfa causa hipotensão, taquicardia, taquipnéia, acidose lática, hemoconcentração, hiperpotassemia e hiperglicemia seguida de hipoglicemia. Em humanos, baixas doses de TNF-alfa causam alguns dos sinais e sintomas de sepse, incluindo hipotensão, febre, anorexia, rigidez e cefaleia. Administrado em baixas doses, o TNF-alfa causa neutrofilia; em altas doses, causa neutropenia em humanos saudáveis (Faleiro et al., 2011). Em humanos o TNF-alfa participa de diversos processos patológicos, como DPOC-Doença pulmonar obstrutiva crônica, onde encontra-se em níveis elevados no escarro dos pacientes (Brown et al., 2003a), artrite reumatoide e mieloma múltiplo. A DPOC, também chamada de DIVA - Doença inflamatória das vias

aéreas ou ORVA – Obstrução recorrente das vias aéreas, é definida numa desregulação da homeostase das células inflamatórias no lúmen das vias aéreas levando a excessivo acúmulo de muco nas vias aéreas. Impede a troca gasosa das células pulmonares e a manifestação da doença se dá por uma desordem inflamatória quando o epitélio pulmonar é sensibilizado, na maioria das vezes por alérgenos e há lesão na mucosa, ocorre ativação da cascata inflamatória com liberação de células de defesa e mediadores químicos, produzindo edema, hipersecreção e broncoconstrição. Nos equinos, a DIVA pode ocorrer em todas as idades, enquanto que a ORVA é mais comum em cavalos mais velhos, estabulados e de regiões mais frias (FILHO et al., 2008).

A artrite reumatóide é uma doença crônica, sistêmica, autoimune, de etiologia desconhecida, que envolve predominantemente as articulações sinoviais, acarretando deformidades e destruição delas. Agentes biológicos que inibem o TNF-α são considerados eficazes na redução da atividade e no retardamento do dano estrutural articular na Artrite Reumatóide, em especial nas formas refratárias aos tratamentos convencionais (Faleiro et al., 2011). Avaliou-se os níveis circulantes de TNF-α no sangue periférico e sua concentração na medula óssea de pacientes com a neoplasia mieloma múltiplo e verificou-se que o TNF apresenta concentrações medulares significativamente mais elevadas. E ainda as altas concentrações circulantes de TNF-α nessa doença, se encontram associadas a pior prognóstico (Serra, 2010a). Também são encontrados níveis elevados desta citocina, tanto séricos como peritoneais, em equinos com cólica (Edwards, 1991).

Escolheu-se a ativação dupla por LPS e TNF pois mimetiza a ativação natural que ocorre nos casos de cólica e laminite equina.

1.4 Teste do *nitroblue tetrazolium* (NBT)

A ativação de neutrófilos pode ser medida segundo a liberação de ROS. Uma das formas de se avaliar a liberação de ROS pelo neutrófilo é por meio do teste do *Nitroblue tetrazolium*-NBT (Görg, 2004). Quando o NBT entra em contato com ROS se precipita em formazan, alterando sua estrutura química. Essa alteração resulta em uma mudança de cor, passando do tom amarelado para o azul escuro, o que se torna perceptível à microscopia óptica permitindo análise qualitativa da distribuição dos grânulos de NBT

corados (Neves, 2007). Também é possível realizar a análise quantitativa por espectrofotometria, observando-se a absorbância do formazan (Peixoto et al., 2002)

Em humanos já está comprovado que o metabolismo oxidativo dos neutrófilos sofre influência direta do anticoagulante utilizado (Freitas et al., 2008). Nos equinos, o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, avaliado no teste do NBT, fica subestimado quando o sangue é colhido com EDTA, pelo efeito quelante deste anticoagulante que compromete a produção de superóxido em neutrófilos estimulados com extrato bacteriano. Na proporção de 1,8mg/mL sangue, o EDTA pode ser utilizado com vantagens em relação à heparina na prova de redução espontânea do NBT. A heparina nos testes espontâneo e estimulado apresentou maior destruição celular, formação de precipitado e de agregados celulares do que as tratadas com EDTA. A maior quantidade de precipitado é devida à formação do complexo de NBT com a heparina e fibrinogênio antes de o NBT ser absorvido pelos neutrófilos (Silva et al., 2010).

1.5 Anticoagulantes EDTA e HEPARINA

A heparina pertence à família de moléculas de glicosaminoglicanos (GAG) (Brown et al., 2003a). É sintetizada exclusivamente em mastócitos (Brown et al., 2003a), possui propriedades anti-inflamatórias e tem sido usada com sucesso em doenças inflamatórias como asma, cistite intersticial e colite ulcerativa. Ela pode inibir o recrutamento de células inflamatórias nos tecidos. (Brown et al., 2003a). A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é a quarta maior causa de morte em humanos no mundo e envolve o recrutamento excessivo e a ativação de neutrófilos no pulmão. A heparina mostra-se capaz de se ligar e inibir a elastase liberada pelos neutrófilos na DPOC, limitando os danos aos tecidos provocado(Silva)s por essa enzima (Brown et al., 2003b). Esse efeito inibitório é independente da atividade anticoagulante da heparina (Serra, 2010b).

Além disso, a heparina é capaz de inibir a ligação da interleucina-8 aos neutrófilos e inibir a adesão de neutrófilos às células endoteliais vasculares, tanto in vitro (Brown et al., 2003a), quanto in vivo (Downey and Han, 1998) como também inibir a desgranulação de neutrófilos e o *burst* oxidativo (Brown et al., 2003a). Mais investigações sobre o uso de heparina e seus derivados podem trazer novas propostas terapêuticas para doenças inflamatórias que envolvem o recrutamento e a ativação de neutrófilos.

EDTA em concentrações acima de 1,5 mg/mL de sangue provoca alterações na membrana dos eritrócitos de humanos, modificando sua morfologia e desencadeando o

processo de hemólise osmótica. Vários autores relataram agregação de eritrócitos, plaquetas e, principalmente, leucócitos, associada à presença de EDTA (Lombarts et al., 1999).

O anticoagulante utilizado durante a coleta de sangue interfere diretamente com o rendimento e ativação de neutrófilos isolados, possivelmente por alteração dos níveis de cálcio. Avaliando o efeito de diferentes anticoagulantes na separação de neutrófilos humanos a partir de sangue total, observaram que o EDTA forneceu o maior número de neutrófilos isolados/mL de sangue, quando comparado com citrato e heparina. (Freitas et al., 2008).

A escolha do anticoagulante adequado é fundamental não somente para os exames hematológicos, mas alguns parâmetros imunológicos também sofrem interferência por estes fármacos (WALENCIK E WITESKA). Sendo assim, ainda é necessário esclarecer alguns pontos acerca do efeito de anticoagulantes sobre a função de neutrófilos.

1.6 Capacidade fagocitária e bactericida

A ativação do sistema imune inato é uma estratégia contra infecções por bactérias, fungos e vírus, resultando no recrutamento de células específicas principalmente neutrófilos e macrófagos. Eles atuam de forma coordenada contra o invasor, com dois princípios destrutivos como geração de espécies reativas de oxigênio pela ativação do complexo NADPH oxidase e liberação de enzimas hidrolíticas, como por exemplo a elastase, através da desgranulação (Santos, 2007). A fagocitose, quimiotaxia e a liberação de enzimas pelos neutrófilos são mecanismos independentes de oxigênio, diferentemente da produção de espécies reativas de oxigênio que é dependente de oxigênio (Neves, 2007). Os patógenos são inicialmente englobados num vacúolo derivado da membrana plasmárica, levando à formação e maturação do fagossomo nos neutrófilos. Os neutrófilos e os macrófagos são fagócitos que englobam (Fig.1) patógenos e debris teciduais. Eles apresentam receptores especializados que reconhecem seus alvos. Existem diferenças na formação e maturação dos fagossomos entre macrófagos e neutrófilos, além disso, o modo de entrada do patógeno tem maior probabilidade de influenciar seu destino, o que pode ser muito diferente nessas células (Lee et al., 2003). No entanto, alguns mecanismos moleculares da fagocitose em neutrófilos ainda não são bem conhecidos.

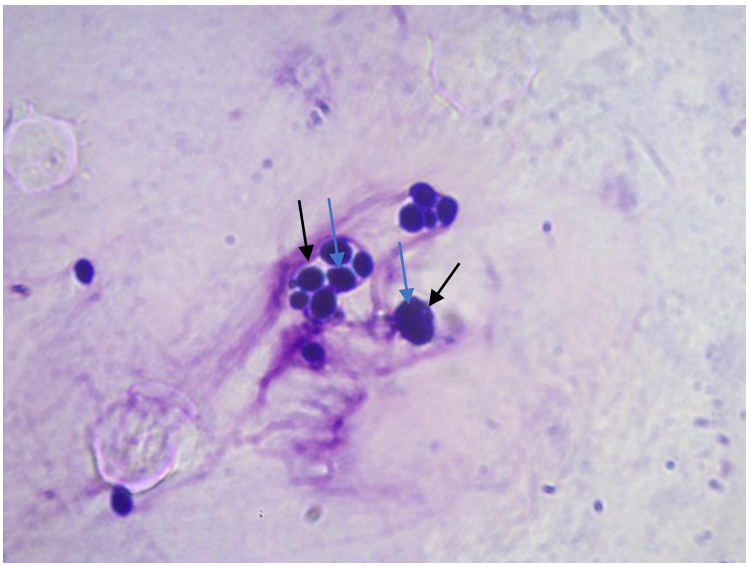


Figura 1. Neutrófilo equino realizando fagocitose de leveduras. Aumento de 100x (Fonte: Arquivo pessoal). Setas pretas indicam o limite do citoplasma dos neutrófilos. Setas vermelhas indicam as células da levedura Saccaromyces cerevisiae.

1.7 Doenças importantes em equinos com envolvimento de neutrófilos

Os neutrófilos estão envolvidos na resposta inflamatória e presentes na maioria das doenças com caráter inflamatório (Ian R. Tizard, 2009). O recrutamento de neutrófilos ao tecido inflamado é parte essencial da resposta imune inata e as citocinas produzidas pelas células imunes são liberadas no foco inflamatório e capazes de ativar leucócitos em órgãos distantes da lesão original, seja por sua difusão para a circulação ou pela migração reversa de neutrófilos já ativados no tecido (Buckley et al., 2006). Quando isso acontece de forma desregulada a resposta inflamatória pode se tornar excessiva ou persistente e mediar a disfunção e danos ao tecido normal (Lawrence et al., 2002).

A infiltração de leucócitos tem sido implicada na patogênese de laminite aguda em equinos (Lima et al., 2013). É um processo inflamatório que afeta as lâminas do casco e a patologia que mais leva à morte ou eutanásia em equinos. (Vilares et al., 2017). Vários estudos realizados no período de desenvolvimento da laminite induzida demonstraram uma ativação inflamatória sistêmica, e não apenas local, com a presença de citocinas inflamatórias circulantes (Laskoski et al., 2012) e espécies reativas de oxigênio, além de infiltração leucocitária tecidual, observada principalmente em ensaios de imunohistoquímica (Lima et al., 2013). A inflamação sistêmica pode ter origem nas endotoxinas, que foram detectadas no início da doença (Faleiros et al., 2008), ou injúria

tecidual como observada no quadro de abdômen agudo. As evidências de envolvimento inflamatório na fase de desenvolvimento da laminite permitem associar a doença com a falência de múltiplos órgãos no homem, onde a resposta inflamatória sistêmica leva à injúria de locais distantes do sítio da infecção. As substâncias lesivas dos leucócitos aos tecidos liberadas na fase inicial de desenvolvimento da laminite são como as MMPs, mieloperoxidase e espécies reativas de oxigênio. A laminite é uma das principais complicações observadas em casos de cólica em que ocorre lesões de reperfusão. Em trabalho realizado com dezesseis equinos adultos os quais foram divididos em dois grupos, sendo um grupo de 9 equinos submetidos à distensão do cólon menor por meio de um balão de látex implantado cirurgicamente no lúmen e inflados a uma pressão de 40mm Hg por 4h e o outro grupo de 7 equinos com balão implantado e não inflado. A mucosa não foi afetada pela distensão do lúmen e as lesões foram restritas à camada seromuscular. Doze horas após desinflar o balão no grupo submentido à distensão, foram examinados quanto a hemorrgia, edema, infiltração de neutrófilos, mieloperoxidase (MPO) e hemoglobina. No final do experimento foram coletadas amostras do pulmão e examinadas quando ao acúmulo de neutrófilos e MPO. Foi observado acúmulo de neutrófilos, edema e aumento de MPO na camada seromuscular em ambos os grupos, sendo maior no grupo em que houve distensão. Por meio de avaliação histológica observaram que houve acúmulo de neutrófilos nas amostras de pulmão, sendo maior no grupo da distensão, o que leva evidências de que nas lesões de reperfusão haja ativação sistêmica de neutrófilos com subsequente migração de neutrófilos aos pulmões. (Faleiros R.R., Macoris D.G., Alves G.E., Souza D.G., 2008).

As endotoxinas têm sido implicadas como componente principal do choque séptico/endotóxico ou do choque circulatório (Astiz et al., 1995). O tratamento com lipopolissacarídeos pode facilitar a subsequente liberação dos grânulos azurofílicos induzida por ativação. Estudos in vitro em neutrófilos isolados demonstraram que o TNF-alfa pode estimular diretamente os neutrófilos, iniciando a explosão respiratória e a liberação das enzimas lisossomais.

Como a liberação sistêmica LPS e de TNF é encontrada sistematicamente em situações patológicas equinas como doenças intestinais estranguladas, choque séptico e a laminite (Ceusters et al., 2012), bem como em humanos em condições de choque séptico, os anticoagulantes utilizados na coleta de sangue interferem na resposta de neutrófilos à ativação e são descritas diferenças relevantes entre as respostas de neutrófilos de

diferentes espécies animais, optou-se por avaliar a influência de três fatores (espécie, anticoagulante e ativação) nos neutrófilos. Espera-se contribuir para a uniformização dos métodos de isolamento de células, bem como para estudos de novos alvos terapêuticos seletivos para a regulação da atividade de neutrófilos em processos inflamatórios, entre eles a laminite que causa grande perda econômica, uma vez que os equinos são particularmente sensíveis e expostos a respostas inflamatórias excessivas, evoluindo com uma importante estimulação dos neutrófilos polimorfonucleares (PMNs).

2. OBJETIVO

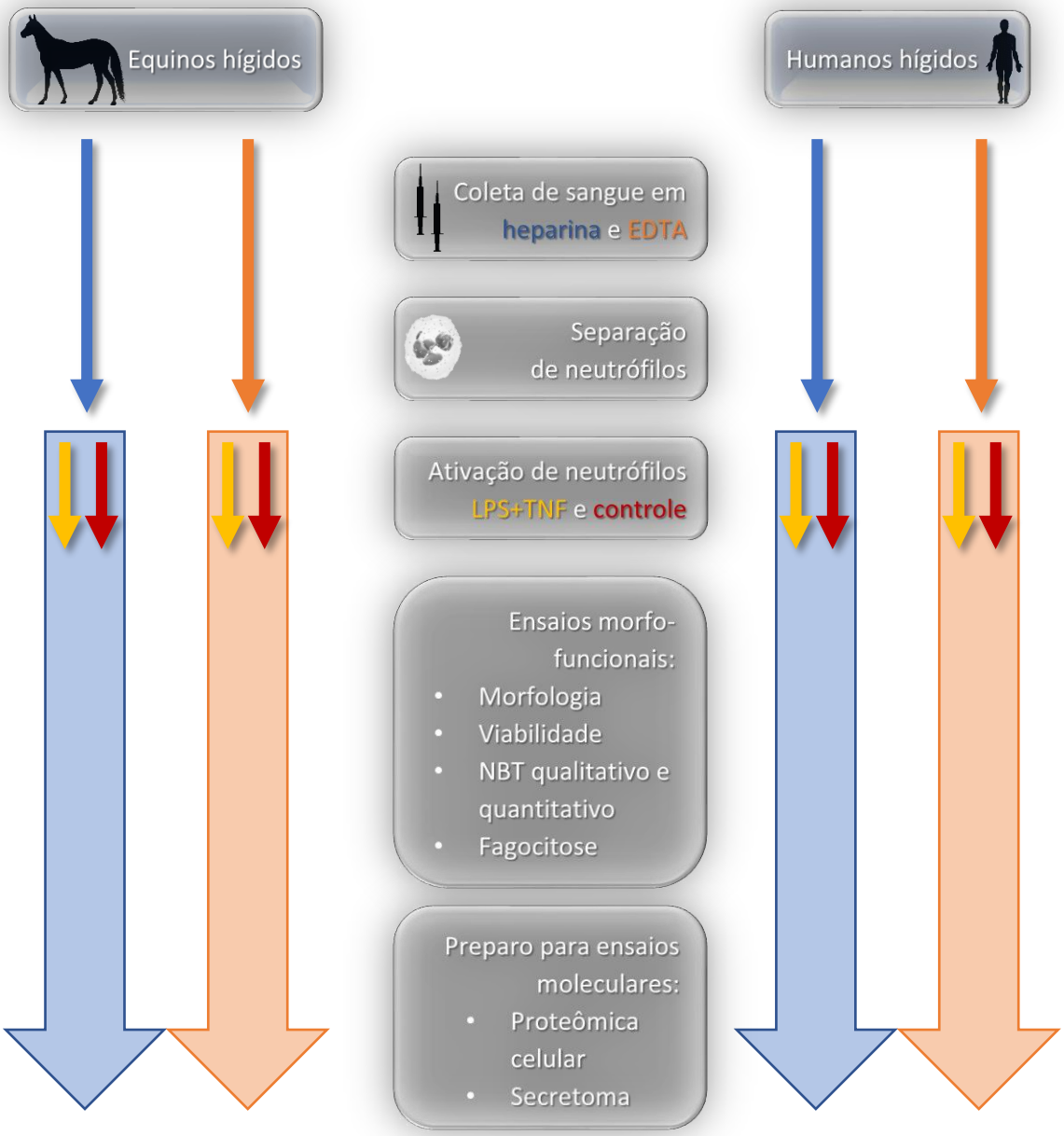
O **objetivo geral** deste trabalho é comparar o uso de heparina e EDTA para a obtenção de neutrófilos humanos e de equinos quanto ao rendimento, viabilidade, morfologia, fagocitose e resposta ao LPS e TNF.

Para tanto, foram definidos como objetivos específicos:

- Comparação do uso de heparina e EDTA para a obtenção de neutrófilos de humanos e de equinos quanto ao rendimento, viabilidade, morfologia e resposta a ativadores;
- Obtenção de neutrófilos de humanos e de equinos comparáveis quanto aos parâmetros a serem avaliados nas etapas subsequentes;
- Avaliação da influência da ativação por LPS e TNF na morfologia e viabilidade de neutrófilos equinos e humanos;
- Avaliação da influência da ativação por LPS e TNF na produção de ROS por neutrófilos equinos e humanos;
- Avaliação da influência da ativação por LPS e TNF na capacidade fagocitária de neutrófilos equinos e humanos;
- Preparo para o estudo da influência da ativação por LPS e TNF no perfil proteico intracelular e secretado de neutrófilos equinos e humanos;

3. METODOLOGIA

3.1 Delineamento Experimental



3.2 Coleta de sangue

Foi coletado sangue de oito indivíduos voluntários, do sexo masculino, com idade entre 19 e 25 anos, que preencheram e assinaram o TCLE aprovado pelo comitê de ética (protocolo CEP 1254038) e a ficha de anamnese, na qual constam a ausência de histórico de doenças crônicas, alérgicas, inflamatórias e infecto contagiosas, não fumantes, não-alcoolatras e que não estavam fazendo uso de medicamentos. E também de oito equinos,

na faixa etária de 5 a 10 anos, do sexo masculino, da raça Brasileiro de Hipismo, sem histórico de doenças crônicas, infecto contagiosas, alérgicas, inflamatórias e que não faziam uso de medicamentos. Os equinos fazem parte do plantel do 1º Regimento de Cavalaria da Guarda dos Dragões da Independência. O trabalho também foi aprovado pelo CEUA (Protocolo nº 88/2017).

Para a obtenção dos neutrófilos, o sangue coletado de cada indivíduo foi dividido em duas alíquotas logo após a coleta. A aspiração do sangue foi feita de forma suave, utilizando-se um scalp 21G. Primeiro acoplou-se uma seringa sem anticoagulante para obtenção de 5 mL de sangue venoso periférico transferido imediatamente para um tubo estéril com anticoagulante EDTA K3, modelo K50-1304S, jateado na parede do tubo na concentração de 1,2mg/mL sangue. Em seguida, uma seringa heparinizada, na concentração de 10 UI/mL (Santos, 2007) foi acoplada ao scalp para a coleta de mais 5 mL de sangue. Todo o volume coletado foi transferido e colocado delicadamente sobre os gradientes de percoll descritos. Realizou-se todo o processo com o máximo de cuidado possível a fim de evitar a ativação dos neutrófilos por choques mecânicos ou térmicos e pelo contato com superfícies de vidro.

Em humanos já está comprovado que o metabolismo oxidativo dos neutrófilos sofre influência direta do anticoagulante utilizado e a heparina é o anticoagulante de escolha na maioria dos trabalho com leucócitos. O Conselho Internacional para padronização em hematologia recomenda o EDTA como anticoagulamente para hemograma. Segundo (Cannell, 1993) é recomendado o EDTA como anticoagulante de escolha na coleta de amostras para contagem e dimensionamento de células sanguíneas. Nas espécies domésticas o EDTA é o anticoagulante de escolha para a realização de hemograma (Monti, P.; Archer, 2016). No entanto o metabolismo oxidativo dos neutrófilos pode ficar subestimado quando a coleta é feita com EDTA (Freitas et al., 2008). Buscou-se comparar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos separados com EDTA e Heparina em equinos e humanos, considerando fatores ainda não descritos na literatura, como a remoção do anticoagulante residual em etapas de lavagem, bem como a reposição de íons potencialmente removidos pelos mesmos.

3.3 Separação dos neutrófilos

Dos 5 mL de sangue obtidos em cada coleta, 2 mL foram usados para a obtenção de plasma e 3 mL para a separação de neutrófilos. Para separar os neutrófilos, foram

utilizados dois gradientes de percoll (Görg, 2004) em concentrações de 60% e 70% em HBSS para sangue humano, segundo protocolo adaptado por Aquino e 58% e 68% para sangue equino (Neves, 2007). O percoll é composto de partículas de sílica inertes, não tóxicas, que não aderem a membranas, sendo adequado para purificação de células e organelas. Além disso, apresenta baixa toxicidade para as células e permite bom rendimento de neutrófilos. As duas camadas de Percoll são depositadas lentamente em um tubo de fundo cônico, sendo a mais densa na camada inferior. Depois que os dois gradientes foram preparados, 3mL de sangue total foram acrescentados cuidadosamente sobre os gradientes. O material foi centrifugado por 37 minutos, a 1.800 rotações por minuto, a 25°C. Após essa primeira centrifugação, observa-se uma sequência de componentes separados que se inicia com o plasma (amarelo), um halo de células mononucleares, o gradiente de 60% ou 58%, um halo de neutrófilos, gradiente de 70% ou 68% e hemácias no fundo do tubo, como ilustrado na figura abaixo (Santos, 2007).

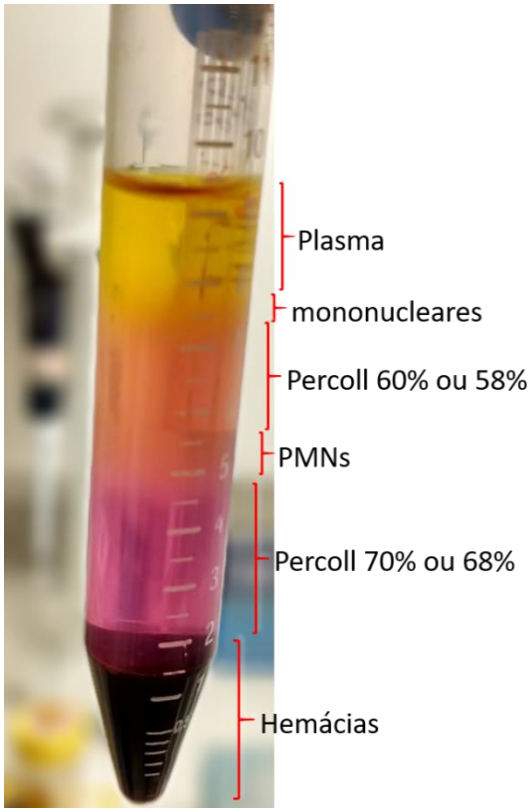


Figura 1. Neutrófilos separados entre o gradiente de 58% e 68% para equinos, formando um halo de neutrófilos entre os eritrócitos ao fundo e células mononucleadas e plasma sobre o gradiente de 58%. Fonte: Arquivo pessoal

A partir desse ponto, o experimento foi conduzido com as amostras colocadas no gelo para preservar a integridade e evitar ativação das células, visto que todo o

experimento demora em média de 5 a 6 horas. As camadas contendo o plasma, o halo de mononucleares e o primeiro gradiente de percoll foram retiradas, a fim de diminuir as contaminações com demais células. Já o halo de neutrófilos é retirado em um volume de aproximadamente 4 mL, juntamente com o percoll que o circunda e foram feitas duas lavagens com 7mL com HBSS 1X, para retirar o excesso de Percoll, removendo também os demais componentes plasmáticos, bem como o anticoagulante utilizado. Seguiu-se centrifugação a 1.600 rotações por minuto, 5 minutos, a 4°C. Nos casos em que houve contaminação persistente com eritrócitos, realizou-se hemólise com 3mL de água milli-Q gelada por 25 segundos e restauração da osmolaridade com 3mL de HBSS 2X (Santos, 2007). Os neutrófilos de cada espécie e cada condição anticoagulante foram submetidos à contagem e avaliação de viabilidade e pureza e, a seguir, divididos em dois grupos: controle e ativado e ressuspendidos com uma solução de plasma autólogo 50% em HBSS.

3.4 Contagem dos neutrófilos, avaliação de viabilidade e pureza.

Foi retirada uma alíquota de 5 µL do pellet celular nas duas condições (EDTA e heparina) para a contagem e avaliação da viabilidade e uma alíquota de 6 µL para a análise da pureza e morfologia (EDTA e heparina). As alíquotas para análise de pureza e morfologia foram aplicadas em lâminas e coradas com o kit panótico, obtendo-se imagens que permitem a diferenciação entre neutrófilos e outros tipos celulares (avaliação da pureza das células isoladas), além da avaliação da morfologia dos neutrófilos. As alíquotas para contagem e análise de viabilidade foram diluídas em 45 µL da solução de Tripan. Aplicou-se 10 µL dessa suspensão de células devidamente homogeneizadas em uma câmara de Neubauer para contagem das células (Fig.3). Após a contagem de células viáveis e não viáveis foi corrigido o volume de forma a se obter a concentração final de 6600 células/µL em uma solução de 50% plasma autólogo em HBSS com cálcio e magnésio.

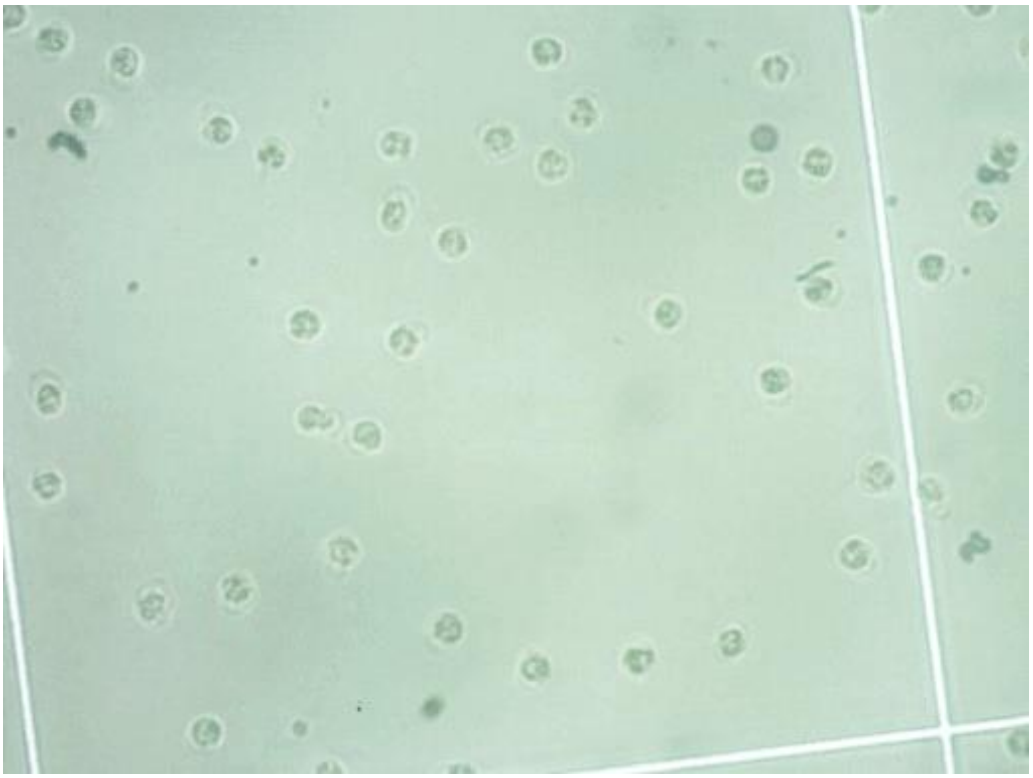


Figura 2. Imagem de neutrófilos em câmara de Neubauer para contagem de células separadas com anticoagulante EDTA. Aumento de 40x. Fonte: Arquivo pessoal

3.5 Ativação Dupla com LPS e TNF

As amostras que apresentaram rendimento superior a 10^6 células, viabilidade superior a 95% e pureza superior a 97% foram submetidas ao processo de ativação. Foi adicionado o ativador LPS de forma a se obter a concentração final de 100ng/mL, as células foram incubadas a 37°C, sob agitação (thermomixer a 300 rpm) por 20 minutos. Após esse tempo foi adicionado o ativador TNF para a concentração final de 10 ng/mL e novamente as células foram incubadas por mais 20 minutos. O grupo controle foi submetido às mesmas etapas, porém no lugar dos ativadores foi adicionado HBSS com cálcio e magnésio.

Ao final desta etapa foram obtidas amostras em oito condições: controle EDTA, LPS+TNF EDTA, controle heparina, LPS+TNF heparina, tanto para células humanas quanto equinas.

3.6 Avaliação da ativação (testes de NBT)

A produção de ROS foi avaliada pela produção de radical superóxido, detectável pelo teste do NBT, aqui realizado tanto por microscopia quanto por espectrofotometria. As ativações foram feitas na presença de plasma e analisadas pelo método de NBT qualitativo (lâmina) e quantitativo (espectrofotométrico), em que se verificou a ocorrência da ativação, sua intensidade, a proporção de células ativadas, a intensidade de ativação das células e o padrão de distribuição dos cristais de formazan. Após a ativação por 40 minutos, alíquotas contendo 36 µL de cada suspensão de células foram transferidas a uma placa de 96 poços, incubadas com 20 µL da solução de NBT. Foram retirados da placa 6 µL de cada condição para confecção das lâminas para a análise qualitativa e tanto a lâmina quanto a placa foram levadas a uma segunda incubação realizada por mais 20 minutos, totalizando 60 minutos de incubação na presença dos ativadores. As lâminas foram fixadas com etanol e coradas com safranina, por 5 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas cuidadosamente e postas para secagem em temperatura ambiente. As amostras foram então analisadas utilizando microscópio óptico. Foram consideradas como ativadas as células que apresentavam detecção de pigmentos de formazan ao redor do núcleo. Também foram observados os padrões de distribuição dos cristais de formazan intracelulares. As amostras na placa foram analisadas por leitura de absorbância na faixa de comprimentos de onda de 350 a 790 nm, de forma a permitir a compensação de eventual ruído de leitura em alguns comprimentos de onda específicos gerado pela presença de células em suspensão.

3.7 Fagocitose

A capacidade fagocitária foi avaliada em função do número de células realizando fagocitose e do número de leveduras fagocitadas por cada célula. Utilizou-se 0,001 g do fungo *Saccharomyces cerevisiae* para a preparação da cultura (Bombarda et al., 2009), solubilizada em 500 µL de HBSS 1X com Ca^+ e Mg^+ e submetida a vórtex de 2 minutos. Para avaliar o total de leveduras obtidas, 45 µL de solução de azul de Tripan foram adicionados a 5 µL da suspensão de leveduras e contados em câmara de Neubauer (Fig.4). Após a contagem, a suspensão de leveduras foi ajustada para 33335 leveduras/µL. A seguir, acrescentam-se 10 µL da suspensão de leveduras a 10 µL da suspensão de neutrófilos (6600 células/µL) em cada uma das oito condições, obtendo-se a proporção

de 5 leveduras por neutrófilo. Os neutrófilos foram adicionados às leveduras após terem permanecido por 40 minutos em contato com os ativadores, sendo incubados com as leveduras por 20 minutos a 37 °C. Após esse processo, foram preparadas lâminas e coradas pelo método panóptico rápido, para posterior contagem em microscópio óptico de células que realizam fagocitose e do número de leveduras no interior de cada célula realizando fagocitose.

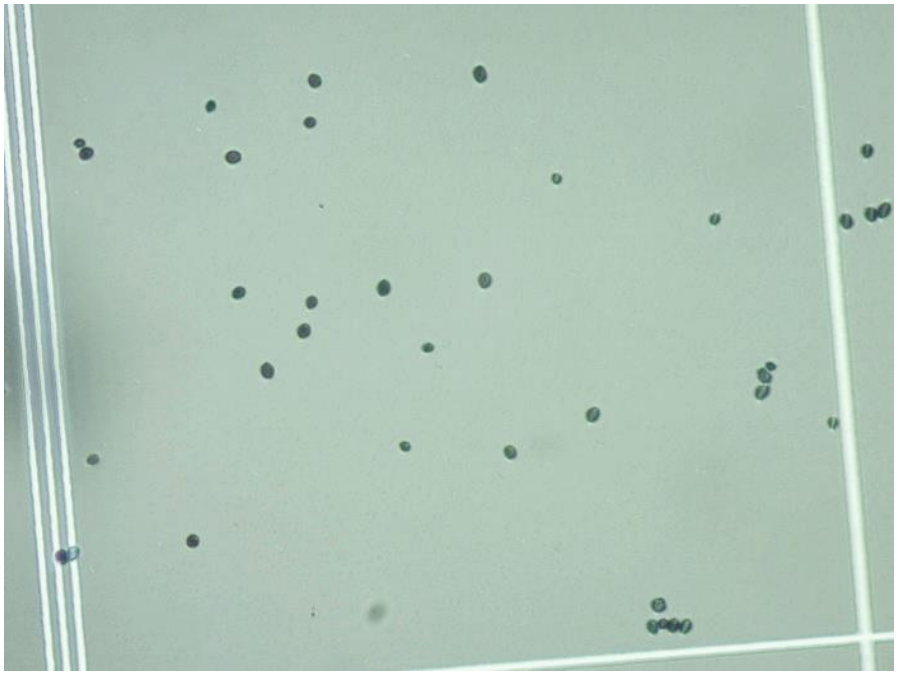


Figura 3. Contagem de fungos na câmara de Neubauer. Aumento de 40x.Fonte: Arquivo Pessoal

3.8 Preparo para proteômica

As células restantes, após a retirada de alíquotas para os testes de NBT e fagocitose, foram centrifugadas e submetidas à lise celular, solubilização e desnaturação de proteínas para futura análise do proteoma. O sobrenadante foi submetido ao mesmo procedimento e ambos foram conservados a -80°C para posterior análise proteômica dos extratos celulares e do secretoma, respectivamente. As células foram lavadas com HBSS, centrifugadas e submetidas à lise celular por incubação em tampão contendo TEAB 20mmol/L, SDS 2%, DTT 1%, inibidores de protease e de fosfatase e armazenadas a -80 °C, para posterior digestão para análise por espectrometria de massas. As alíquotas do sobrenadante foram incubadas em igual volume de tampão contendo TEAB 40mmol/L, SDS 4%, DTT 2%, inibidores de protease e de fosfatase. Tanto os extratos celulares

quanto do sobrenadante foram aquecidos a 80 ^{o}C, sob agitação (thermomixer a 1000 rpm) por 10 minutos e submetidos a 15 ciclos de cavitação por ultrassom de 30 s intercalados por intervalos de 30 s em gelo. O extrato obtido será mantido a -80 °C até a etapa seguinte de análise. A análise proteômica do extrato celular e do secretoma teve apenas os respectivos extratos preparados no presente trabalho, não sendo sua análise parte integrante deste projeto devido às limitações de tempo para execução. As análises serão realizadas em projeto posterior, que dará continuidade a este.

3.9 Análise estatística

Foram analisadas amostras de 8 indivíduos de cada espécie (8 replicatas biológicas), uma vez que tal valor foi definido em estudo de potência estatística anterior (Neves, 2007). Para a análise de pureza foram contadas 100 células analisando as características morfológicas, visualizadas com aumento de 100x em óleo de imersão, onde espera-se obter uma pureza acima de 97% de neutrófilos. Para o teste de fagocitose, foram contados o número de neutrófilos quiescentes e em atividade fagocitária, bem como a quantidade de leveduras fagocitadas, em cada uma das condições: controle EDTA, LPS+TNF EDTA, controle heparina, LPS+TNF heparina (equino e humano). Para a avaliação do teste do NBT em lâmina, foram realizadas as contagens do número de neutrófilos ativados. Para a avaliação do teste de NBT por espectrofotometria, foram analisados os valores de absorbância em cada um dos comprimentos de onda. Os dados foram tabulados por meio do programa *Microsoft Excel.* Para os dados de contagem celular foram calculadas as médias entre as replicatas e o erro padrão da média (EPM). Para os dados de espectrofotometria, após os cálculos de média e EPM foram geradas curvas de absorbância em função do comprimento de onda e calculada a área sob a curva de forma a agrupar os valores de absorbância. Os dados foram testados para a hipótese nula de ausência de variação entre as condições utilizando a análise de variância *ANOVA-One way* seguido do pós-teste de Tukey no software PAST 3. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Separação de Neutrófilos

A viabilidade dos neutrófilos foi avaliada por meio da contagem de células vivas e mortas na câmara de Neubauer. Ao final do processo de separação foram obtidos neutrófilos com viabilidade média de 99% para equinos e 97% para humanos separados com EDTA. Os neutrófilos equinos e humanos separados com heparina apresentaram viabilidade média de 95% e 96% respectivamente. A literatura não reporta relação entre viabilidade celular e anticoagulante utilizado na coleta, entretanto a ausência de diferença significativa obtida neste trabalho indica que a escolha do anticoagulante não interfere na viabilidade celular de neutrófilos humanos ou de equinos (Fig.5).

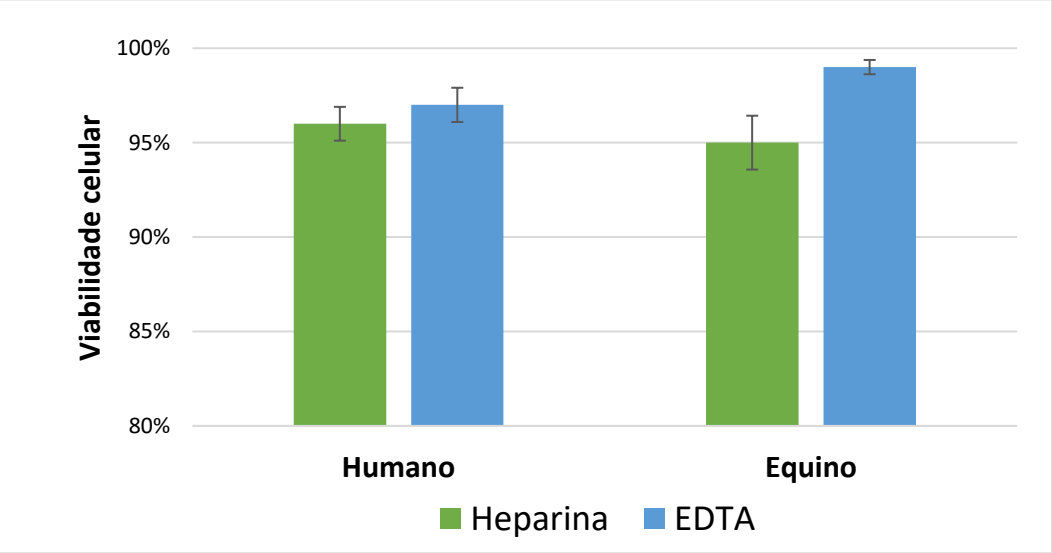


Figura 4. Representação da viabilidade celular (± erro padrão) em neutrófilos humanos e equinos separados com diferentes anticoagulantes. Em amarelo, heparina e em vermelho EDTA)

A análise de pureza das células coletadas com EDTA no grupo humano revelou 93% de neutrófilos, enquanto que as células coletadas com heparina apresentaram 96%. Já no grupo equino, observou-se 98% de neutrófilos separados com EDTA e 95% de neutrófilos separados com heparina. Não houve diferença significativa entre os dois grupos.

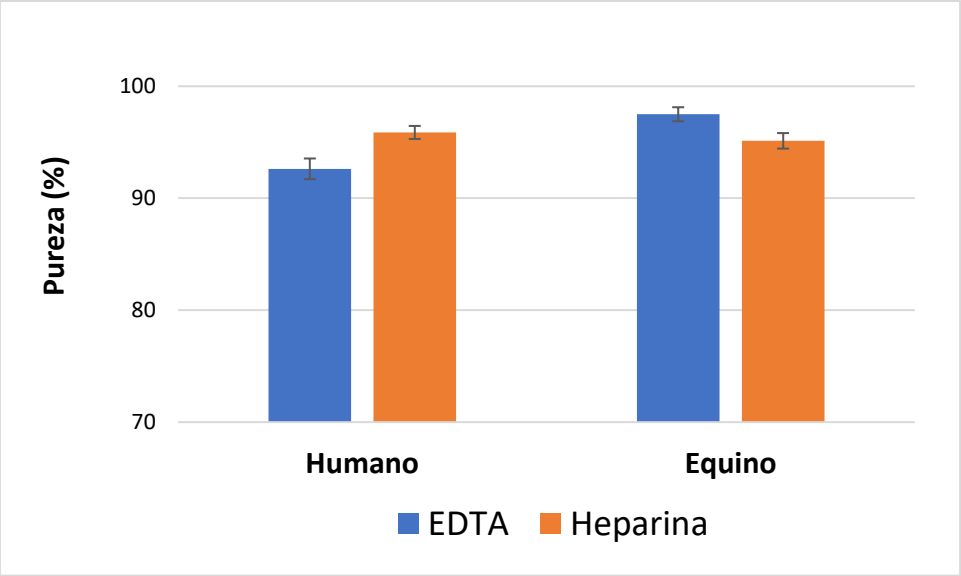


Figura 5. Avaliação da pureza de neutrófilos humanos e equinos (± erro padrão) separados com diferentes anticoagulantes (heparina em amarelo, e EDTA em laranja).

As diferenças morfológicas dos neutrófilos comparando-se as duas espécies e os dois anticoagulantes podem ser observadas na figura 7. Os neutrófilos humanos apresentaram núcleo mais compactado e citoplasma mais visível que os neutrófilos equinos, sem diferença óbvia entre os dois anticoagulantes no grupo humano. Já os neutrófilos de equinos (7A e 7B) manifestaram diferentes morfologias em função do anticoagulante. Enquanto os neutrófilos equinos coletados com heparina se assemelharam aos neutrófilos humanos em ambas condições quanto ao volume celular e evidência de citoplasma, mas não quanto à segmentação nuclear, maior em equinos, como descrito em (Harvey, 2012), os neutrófilos equinos coletados com EDTA expressaram núcleo mais frouxo, maior volume celular e citoplasma de contorno menos definido. A literatura não descreve relação ou mudanças morfológicas em neutrófilos equinos ou humanos em consequência do uso de anticoagulantes. Aqui demonstra-se um efeito aparente do EDTA sobre a morfologia de neutrófilos equinos. Tal efeito provavelmente baseia-se em eventos moleculares específicos desencadeados pelo EDTA provavelmente mediados por proteínas. Dessa forma espera-se que os futuros dados comparativos e detalhados do estudo proteômico sejam suficientes para estabelecer os princípios moleculares da diferença observada.

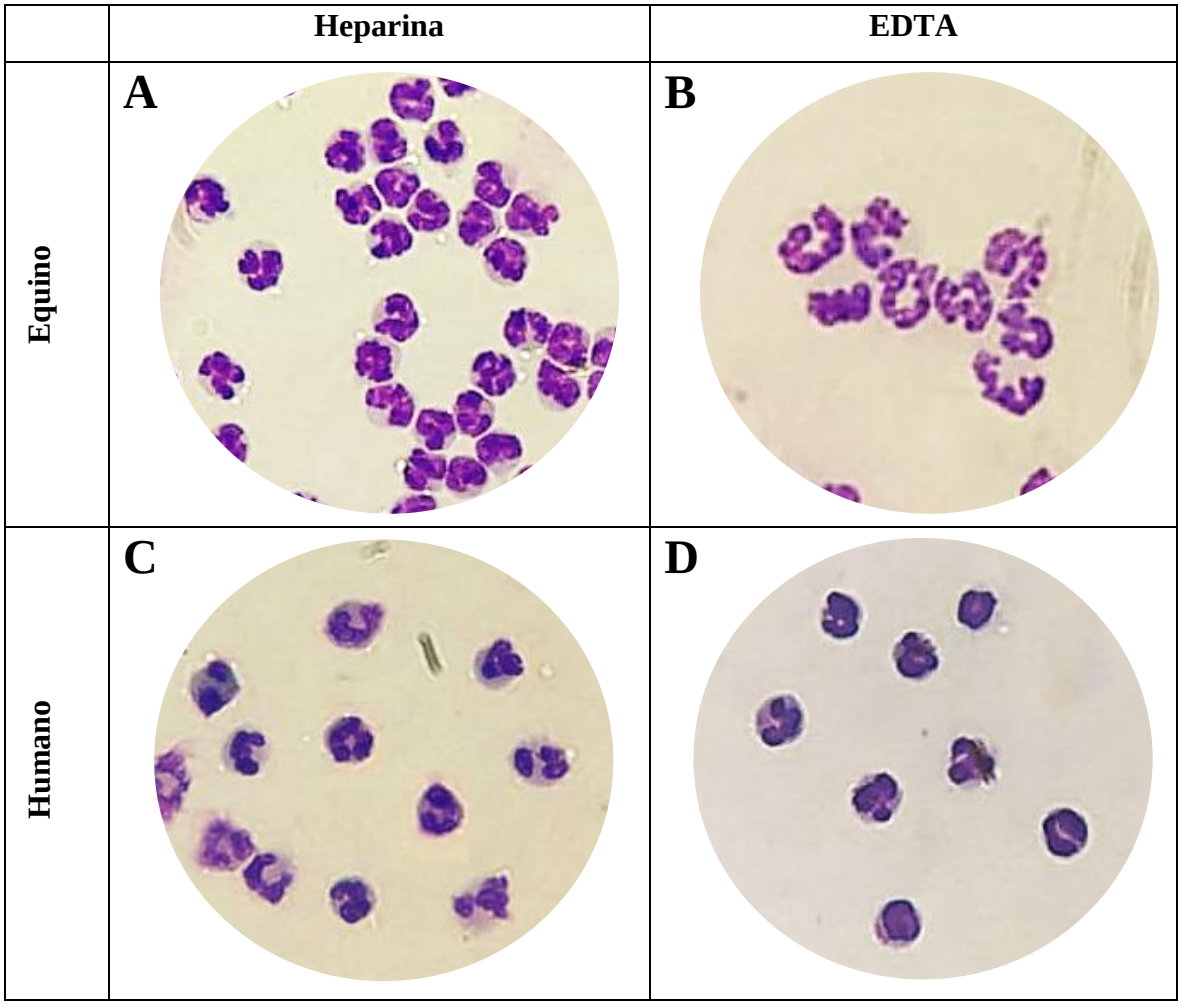


Figura 6. A) Neutrófilos equinos coletados com heparina (aumento de 100X). B) Coletados com EDTA (aumento de 100X). C) Neutrófilos humanos coletados com heparina (aumento de 100X) e D) Coletados com EDTA (aumento de 100X).

No grupo equino, a quantidade média de neutrófilos encontrada por experimento foi de 8,60E06 com heparina e 2,03E07 com EDTA ($p<0,05$) e nos humanos 9,71E06 (heparina) e 9,92E06 (EDTA), neutrófilos suficientes para realizar os experimentos propostos (extração de proteínas, fagocitose e NBT). Enquanto o rendimento de neutrófilos humanos não sofreu influência do anticoagulante, o rendimento de PMNs na suspensão mostrou-se significativamente maior em neutrófilos equinos separados com EDTA em comparação à heparina ($p<0,05$) (Figura 8). Segundo Souza et al, 2017, a heparina é o anticoagulante mais indicado para contagens de células sanguíneas em mamíferos porque preserva a morfologia celular. No presente estudo discorda-se de tal indicação em relação ao grupo equino, em função do rendimento de células obtidas. A diferença morfológica

observada não apresenta evidências claras de qual anticoagulante preservaria melhor a morfologia.

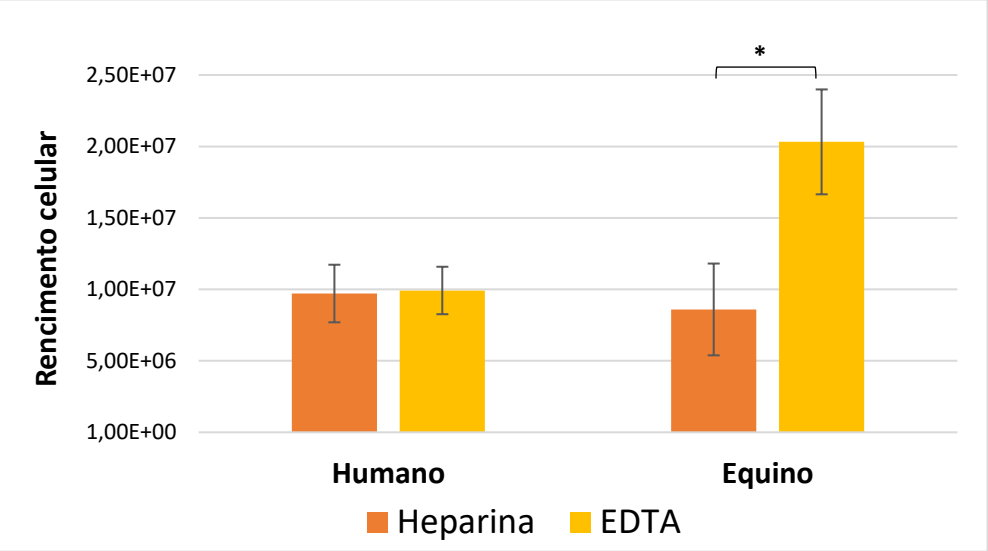


*Figura 7. Comparação entre a quantidade de neutrófilos equinos e humanos na suspensão (± erro padrão) com o diferentes anticoagulantes. (Heparina em amarelo e EDTA em laranja). *p<0,05.*

4.2 Produção de espécies reativas de oxigênio

A capacidade oxidativa de neutrófilos foi avaliada em função da produção de espécies reativas de oxigênio, medida indiretamente pela produção de formazan no teste de NBT. A análise em espectrofotômetro revelou influência significativa dos ativadores LPS + TNF ($p<0,05$) na produção de ROS em comparação com o controle, em neutrófilos humanos coletados com ambos anticoagulantes (Figuras 9 e 10). Logo a capacidade oxidativa de neutrófilos humanos não se altera em função do anticoagulante utilizado na coleta. Já em estudo realizado com sangue total a ativação celular induzida por LPS foi dependente do anticoagulante utilizado, estando de acordo com relatos prévios na literatura mostrando que a indução de TNF- e outras citocinas pelo LPS em sangue total é significativamente mais forte na presença de heparina em comparação com o EDTA (Brunialti et al., 2002). Observou-se que a faixa de comprimentos de onda compreendida entre 610 e 630 nm apresentou menor interferência do espalhamento de luz causado pelo material particulado e evidenciou melhor as diferenças entre as condições, tendo sido utilizada para o cálculo de área sob a curva (Figura 10).

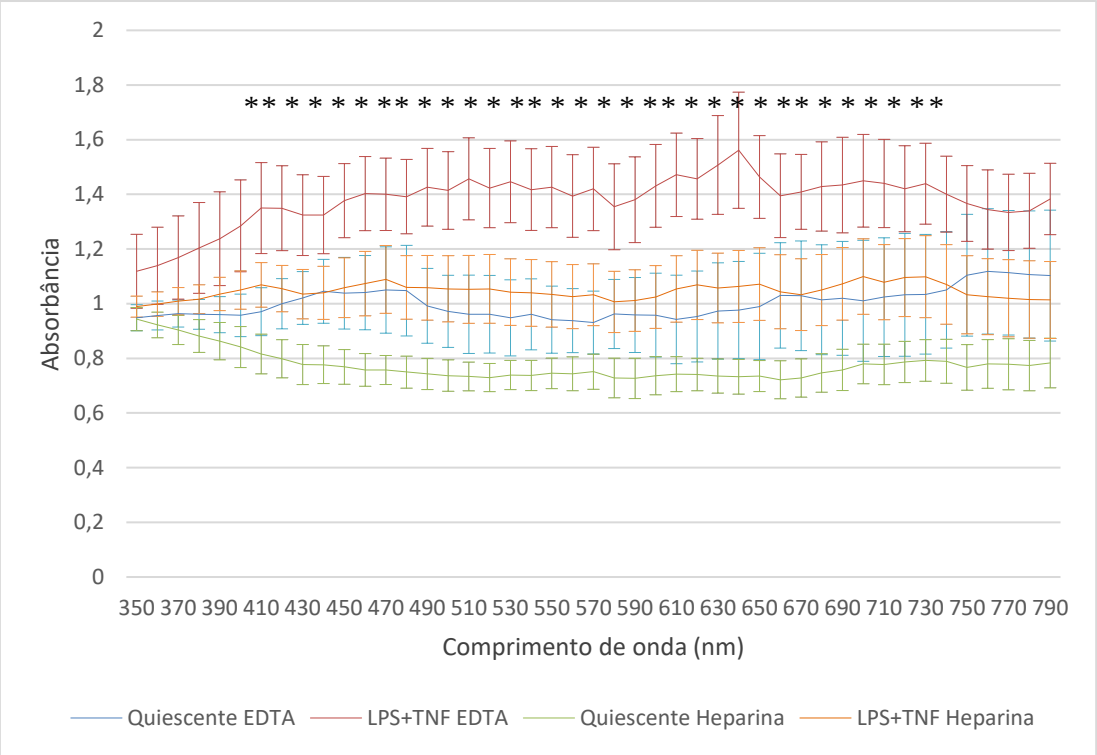


Figura 8. Teste de NBT quantitativo em neutrófilos humanos. Média das leituras (de 8 indivíduos) da absorbância por espectrofotometria de neutrófilos incubados com NBT. Comprimento de onde de 350 –790 nm. Análise de neutrófilos humanos nas condições quiescentes e ativados com LPS+TNF, obtidos com EDTA ou Heparina.

** ANOVA p-value <0.05*

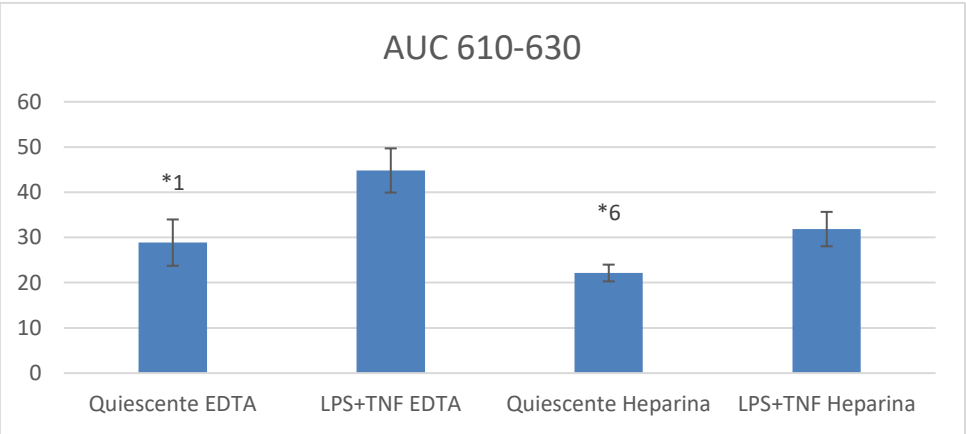


*Figura 9. Teste de NBT quantitativo em neutrófilos humanos. Área sob a curva das leituras de absorbância dos níveis de formazam pelo método de espectrofotometria. Comprimentos de onde de 610 a 630. Análise de neutrófilos humanos nas condições quiescente e ativados com LPS+TNF, obtidos com EDTA ou heparina. *1 significativamente diferente de LPS+TNF EDTA; *6 significativamente diferente de LPS+TNF Heparina*

Sobre a capacidade oxidativa de neutrófilos equinos, além das diferenças significativas entre as condições quiescente e LPS + TNF em função da presença dos ativadores (Figuras 11 e 12) foi encontrada diferença significativa entre as condições LPS + TNF heparina e LPS + TNF EDTA, em que os neutrófilos coletados com EDTA apresentaram maior burst oxidativo ($p<0,05$), porém não foi possível determinar se o

EDTA aumenta ou a heparina diminui a produção de ROS em neutrófilos equinos ativados.

Tais achados não estão de acordo com (Silva et al., 2010), pois segundo ele o metabolismo oxidativo dos neutrófilos equinos, avaliado no teste do NBT, fica subestimado quando o sangue é colhido com EDTA, pelo efeito quelante deste anticoagulante sobre o cálcio, comprometendo a produção de superóxido em neutrófilos estimulados com extrato bacteriano. Essa divergência de resultados provavelmente se dá em razão das diferenças metodológicas, uma vez que Silva et al. não realizaram isolamento de neutrófilos, lavagem e reposição de cálcio e magnésio, procedimentos executados neste estudo.

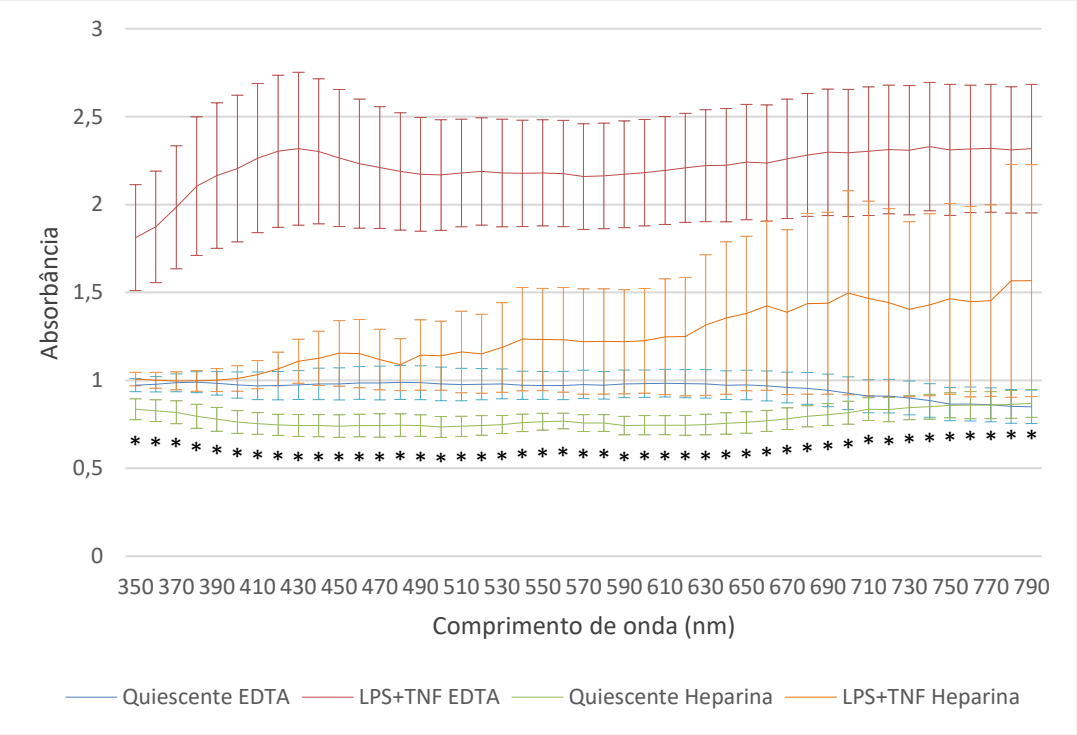


*Figura 10. Teste de NBT quantitativo em neutrófilos equinos. Média das leituras (de 8 animais) da absorbância por espectrofotometria de neutrófilos incubados com NBT. Comprimentos de onda de 350 –790 nm. Análise de neutrófilos equinos nas condições quiescentes e ativados, obtidos com EDTA ou Heparina. * ANOVA p-value <0.05*

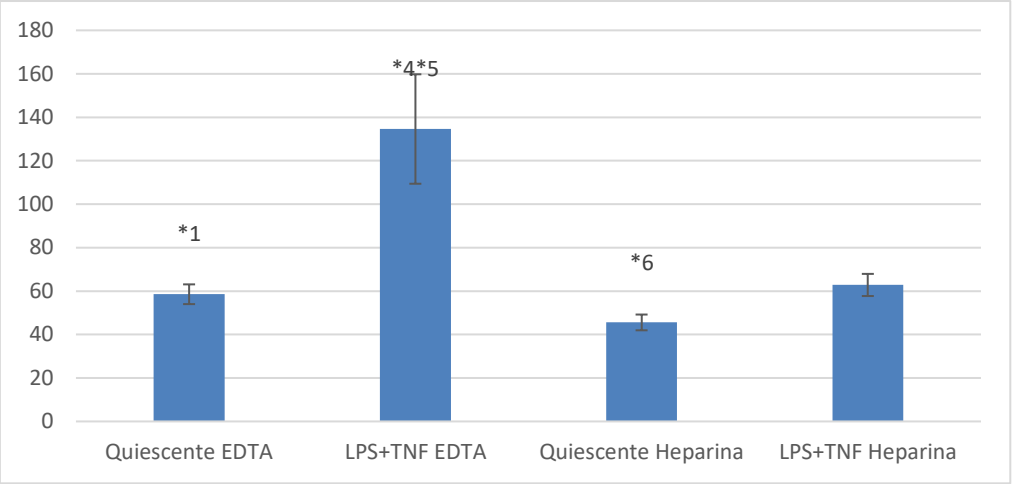


*Figura 12. Teste de NBT quantitativo em neutrófilos equinos. Área sob a curva das leituras de absorbância dos níveis de formazam pelo método de espectrofotometria. Comprimentos de onde de 380 a 430. Análise de neutrófilos equinos nas condições quiescente e ativados com LPS+TNF, obtidos com EDTA ou heparina. *1 significativamente diferente de LPS+TNF EDTA; *5 significativamente diferente de LPS+TNF Heparina*6 significativamente diferente de LPS+TNF Heparina*

4.3 Teste de ativação celular por NBT qualitativo.

A avaliação do teste do NBT por microscopia óptica permite observar a localização de cristais de formazan consequentes a ROS produzidas pelos neutrófilos incubados com LPS+TNF, em estímulo duplo. Observou-se na microscopia óptica que o depósito de pigmentos de formazam insolúveis depois da ativação com com LPS + TNF no citoplasma, foram predominantemente ao redor do núcleo, comprovando a ativação celular e que os neutrófilos quiescentes não apresentaram depósito de formazan como demonstrado nas figuras (13).

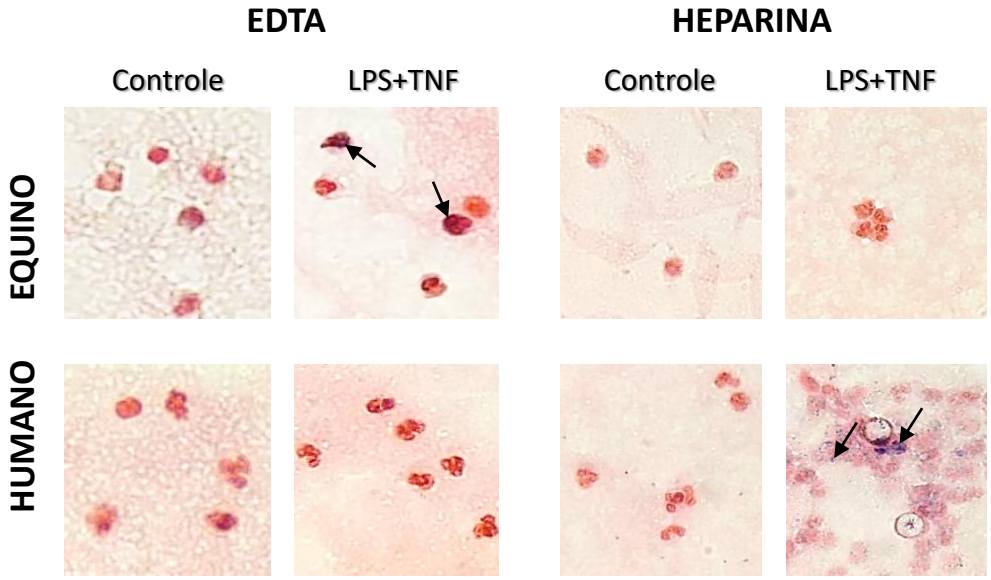


Figura 13. Resultados do teste NBT em lâmina. Neutrófilos equinos e humanos coletados com EDTA e heparina nas condições Controle (quiescente) e ativados com LPS+TNF submetidos ao teste de NBT em lâmina e corados com safranina. As setas pretas indicam a formação de cristais de formazan.

4.4 Fagocitose

A capacidade fagocitária do neutrófilo é o meio utilizado para a destruição do agente microbiano que conseguiu ultrapassar as barreiras físicas e químicas epiteliais (Lee et al., 2003). A eliminação de micro-organismos foi avaliada em função do número de células realizando fagocitose e do número de leveduras fagocitadas por cada célula. No grupo humano, não foram observadas diferenças significativas entre as condições. Pode-se observar que no grupo equino, a quantidade de células fagocitando no controle e no ativado foi maior ($p<0,01$) quando as células foram obtidas com heparina (Figura 14A). O mesmo ocorre em relação a quantidade de leveduras fagocitadas por cada neutrófilo, em que as células coletadas com heparina apresentaram maior eficiência ($p<0,05$) em número de leveduras fagocitadas (Figura 14B).

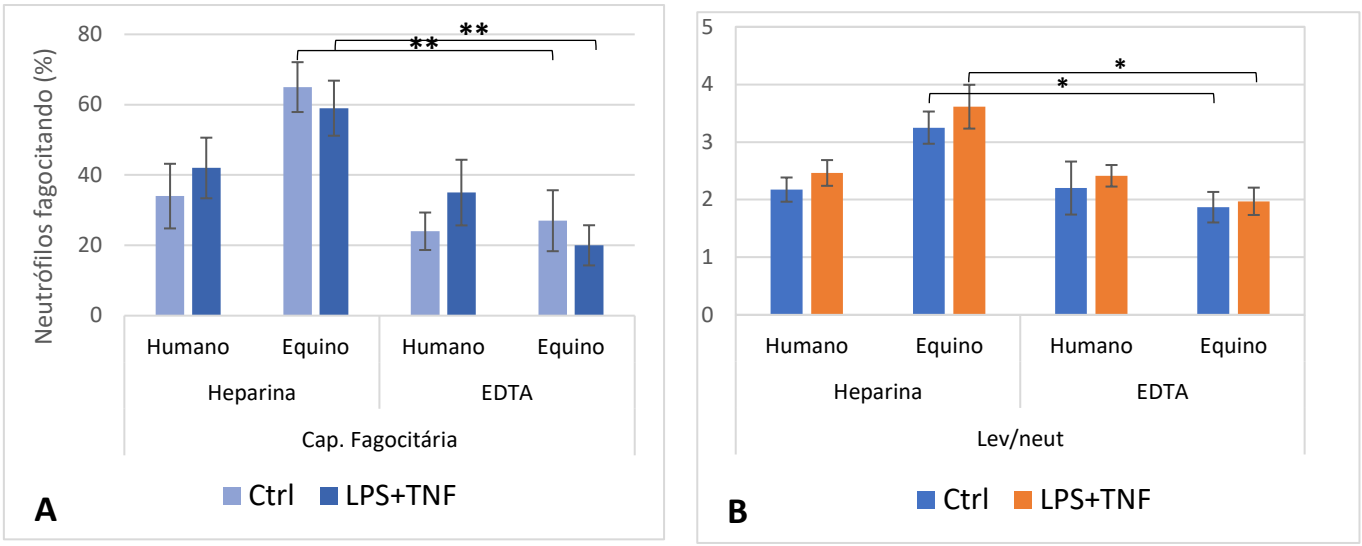


Figure 1411. Compilação dos resultados dos testes de fagocitose de Saccaromyces cerevisaiae por neutrófilos humanos e equinos.

*A) Porcentagem de neutrófilos humanos e equinos fagocitando leveduras (± erro padrão) em condições controle e após ativação dupla com LPS+TNF com ambos anticoagulantes. B) Leveduras fagocitadas por neutrófilos humanos e equinos em condições controle e após ativação dupla com LPS+TNF, em células obtidas com EDTA e heparina. *p<0,05 **p<0,01.*

Diferente do esperado, neutrófilos equinos coletados com EDTA apresentaram menor capacidade fagocitária e quantidade de leveduras fagocitadas por cada neutrófilo. A diferença observada pode ser tanto devido a um estímulo pela heparina, quanto por uma inibição pelo EDTA. Nesse contexto (Jain and Dhawedkar, 1991), reporta uma redução significante da fagocitose em neutrófilos equinos obtidos com EDTA na presença de complemento, estando esse presente no plasma utilizado nos ensaios deste trabalho.

Apesar de o rendimento celular ser significamente maior com uso de EDTA em equinos (Figura 8), para otimização da fagocitose de neutrófilos equinos, a heparina mostrou-se preferível.

5. CONCLUSÃO

Os neutrófilos são células do sistema imune que representam a primeira linha de defesa contra micro-organismos, que romperam as barreiras epiteliais e entraram no tecido ou na circulação. A resposta dos neutrófilos a esse estímulo é a produção de ROS, a migração, a desgranulação de enzimas altamente tóxicas para a maioria dos micro-organismos invasores, a fagocitose e a produção de uma série de mediadores inflamatórios.

Patologias como doenças gastrointestinais, laminite e obstrução recorrente das vias respiratórias envolvem recrutamento e estimulação de neutrófilos com liberação de ROS e MPO, cujas atividades oxidantes podem levar a dano tecidual e, na maioria das vezes, levar à morte ou eutanásia de equinos, acarretando sérios prejuízos econômicos. Quanto aos neutrófilos humanos, o estudo dos mecanismos da estimulação de neutrófilos é essencial na perspectiva de terapias em doenças inflamatórias.

O uso de anticoagulante para a coleta é fundamental para a manutenção dos componentes do sangue e do estado quiescente de neutrófilos para realização de experimentos. A escolha do anticoagulante interfere em alguns parâmetros imunológicos e hematológicos, sendo necessário esclarecer vários pontos acerca do efeito do anticoagulante sobre as funções e características dos neutrófilos equinos e humanos. Tendo em vista a preferência do uso de EDTA para coleta de sangue equino e maior frequência do uso de heparina para a coleta de sangue humano, este trabalho objetivou caracterizar a influência do anticoagulante sobre rendimento, viabilidade, morfologia, capacidade fagocitária e resposta aos ativadores LPS e TNF dos neutrófilos, bem como o preparo de amostras para o estudo do perfil proteico intracelular e secretado de neutrófilos equinos e humanos coletados com heparina e EDTA e ativados com LPS e TNF.

Os resultados apresentados demostraram que a escolha do anticoagulante não afetou a viabilidade em nenhuma condição e que portanto para tal quesito a escolha de EDTA ou heparina para as duas espécies é viável. Os mecanismos que levam à diferença morfológica constatada em neutrófilos equinos com o uso de EDTA comparado à heparina precisam ser esclarecidos e serão abordados pelas análises moleculares dos resultados proteômicos.

Este trabalho também demonstra que há vantagem no uso de EDTA em relação à quantidade de neutrófilos equinos obtida, para ativação de neutrófilos equinos quanto à produção de ROS e que neutrófilos equinos coletados com heparina apresentam maior capacidade fagocitária. Sendo assim, observam-se influências opostas em diferentes funções dos neutrófilos, o que novamente nos remete à necessidade de estudos moleculares para melhor compreensão de tais mecanismos.

REFERÊNCIAS

Astiz, M., Rackow, E., Still, J., Howell, S., Cato, A., Eschen, K., et al. (1995). Pretreatment of normal humans with monophosphoryl lipid A induces tolerance to endotoxin: A prospective, double-bljnd, randomized, controlled lrial. *Crit. CareMedicine* 23, 9–17.

Bombarda, J., Melo, J. C., and Souza, E. R. De (2009). Exercício abaixo do limiar anaeróbio aumenta as atividades fagocítica e microbicida de neutrófilos em ratos Wistar. 9–15.

Botha, A. J., Moore, F. A., Moore, E. E., Kim, F. J., Banerjee, A., and Peterson, V. M. (1995). Postinjury activation: neutrophil priming An early vulnerable and window. *Sugery* 118, 358–65. Available at: https://ac.els-cdn.com/S0039606005803459/1-s2.0-S0039606005803459-main.pdf?_tid=a59ecf8b-401f-4b97-8c70-1b7d6e10d274&acdnat=1529835790_8a24cb92cb5ef745705f0356502ceaaf.

Brown, R. A., Lever, R., Jones, N. A., and Page, C. P. (2003a). Effects of heparin and related molecules upon neutrophil aggregation and elastase release in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 139, 845–853. doi:10.1038/sj.bjp.0705291.

Brown, R. A., Lever, R., Jones, N. A., and Page, C. P. (2003b). Effects of heparin and related molecules upon neutrophil aggregation and elastase release in vitro. 845–853. doi:10.1038/sj.bjp.0705291.

Brunialti, M. K. C., Kallás, E. G., Freudenberg, M., Galanos, C., and Salomão, R. (2002). Influence of EDTA and Heparin on Lipopolysaccharide Binding and Cell Activation, Evaluated at Single-Cell Level in Whole Blood. *Clin. Cytom.* 50, 14–18. doi:10.1002/cyto.10049.

Buckley, C. D., Ross, E. A., McGettrick, H. M., Osborne, C. E., Haworth, O., Schmutz, C., et al. (2006). Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J. Leukoc. Biol.* 79, 303–311. doi:10.1189/jlb.0905496.

Cannell, B. L. (1993). Recommendations of the International Council for Standardization in Hematology for Ethylenediaminetetraacetic Acid Anticoagulation of Blood for Blood Cell Counting and Sizing. *Lab. Hematol.*, 467–471. doi:10.5220/0004989901990208.

Ceusters, J. D., Serteyn, D. A., Minguet, G., De, G. D. R., Romainville, J., Deby-dupont, G. P., et al. (2012). Veterinary Immunology and Immunopathology An in vitro whole blood model to test the effects of different stimuli conditions on the release of myeloperoxidase and elastase by equine neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 150, 221–227. doi:10.1016/j.vetimm.2012.09.008.

Cruz-Machado, S. da S. (2010). Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFKB. *Rev. da Biol.* 4, 40–43. doi:10.7594/revbio.04.08.

Dewas, C., Dang, P. M.-C., Gougerot-Pocidalo, M.-A., and El-Benna, J. (2003). TNF- Induces Phosphorylation of p47phox in Human Neutrophils: Partial Phosphorylation of p47phox Is a Common Event of Priming of Human Neutrophils by TNF- and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J. Immunol.* 171, 4392–4398. doi:10.4049/jimmunol.171.8.4392.

Downey, J. S., and Han, J. (1998). [Frontiers in Bioscience, 3, d468-476, April 29, 1998] CELLULAR ACTIVATION MECHANISMS IN SEPTIC SHOCK Jocelyn S. Downey and Jiahuai Han. 468–476.

Edwards, G. B. e. ai. (1991). Identificalion oflumor necrosis faclor in lhe periloneal fluid ofhorses wilh colic. in *[n: EQUlNECOLlC SYMPOSIUM, 1991, Georgia. Proceedings... Alhens: Georgia Center for Conlinuing Education*, 38.

Faleiro, L. R., Araujo, L. H. R., and Varavallo, M. A. (2011). A terapia anti-TNF-a na artrite reumatóide. *Semin. Ciências Biológicas e da Saúde* 32, 77–94. doi:10.5433/1679-0367.2011v32n1p77.

Faleiros, R. R., Macoris, D. G., Alves, G. E. S., Souza, D. G., Teixeira, M. M., and Moore, R. M. (2008). Local and remote lesions in horses subjected to small colon distension and decompression. *Can. J. Vet. Res.* 72, 68–76.

Faleiros R.R., Macoris D.G., Alves G.E., Souza D.G., T. M. M. & M. R. M. (2008). *Local and remote lesions in horses subjected to small colon distension and decompression*.

FILHO, D. Z., DE SOUSA, W. A., MEIRA, F. Q., PEREIRA, D. M., and ROSA, E. P. (2008). Doença pulmonar obstrutiva crônica. *Rev. Científica Eletônica Med. Veterinária* 6, 8.

Freitas, M., Porto, G., Lima, J. L. F. C., and Fernandes, E. (2008). Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clin. Biochem.* 41, 570–575. doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.12.021.

Görg, a (2004). 2-D electrophoresis: Principles and Methods. GE Healthcare Handbook. 27–32.

Hachiya, O., Takeda, Y., Miyata, H., Watanabe, H., Yamashita, T., and Sendo*, and F. (1995). Inhibition Spontaneous Neutrophil by Bacterial and Lipopolysaccharide In Vitro Human of Apoptosis Results Retardation by LPS of Spontaneous Neutrophil Apopto- sis In Vitro We examined the effects of LPS on spontaneous apoptosis of human neutrophils in vit. 39, 715–723.

Harvey, J. W. (2012). *Veterinary Hermatology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*.

Ian R. Tizard (2009). Imunologia Veterinária, uma introdução.

Jain, N. C., and Dhawedkar, R. G. (1991). C RATIVE Original Article Phagocytosis of Opsonised Fluorescent Platelets by Neutrophils to Detect Antiplatelet Antibody. *Comp. Haematol. Int.* 82, 77–82.

Jersmann, H. P., Rathjen, D. A., and Ferrante, A. (1998). Enhancement of lipopolysaccharide-induced neutrophil oxygen radical production by tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 66, 1744–1747. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529106.

Kavoussi, B., and Ross, B. E. (2007). The neuroimmune basis of anti-inflammatory acupuncture. *Integr. Cancer Ther.* 6, 251–257. doi:10.1177/1534735407305892.

Laskoski, L. M., Valadão, C. A. A., Vasconcelos, R. O., Faleiros, R. R., Mendes, H. M. F., Ferrucci, D., et al. (2012). Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) ecalprotectina no tecido laminar de equinos após obstrução jejunal, tratados ou não com hidrocortisona. *Pesqui. Vet. Bras.* 32, 817–823. doi:10.1590/S0100-736X2012000900001.

Lauterbach, M., O'Donnell, P., Asano, K., and Mayadas, T. N. (2008). Role of TNF priming and adhesion molecules in neutrophil recruitment to intravascular immune complexes. *J. Leukoc. Biol.* 83, 1423–1430. doi:10.1189/jlb.0607421.

Lawrence, T., Willoughby, D. A., and Gilroy, D. W. (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 787–795. doi:10.1038/nri915.

Lee, W. L., Harrison, R. E., and Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* 5, 1299–1306. doi:10.1016/j.micinf.2003.09.014.

Lima, L. R., Mendes, H. M. F., Magalhães, J. F., Markowicz, L. C., Cavalcanti, C. B., Leme, F. O. P., et al. (2013). Avaliação clínica e hematológica de equinos submetidos ao modelo de laminite por oligofructose, tratados ou não com um

agente antagonista de receptores CXCR1/2. *Pesqui. Vet. Bras.* 33, 992–998. doi:10.1590/S0100-736X2013000800008.
Lombarts, A. J. P. F., Zijlstra, J. J., Peters, R. H. M., Thomasson, C. G., and Franck, P. F. H. (1999). Accurate platelet counting in an insidious case of pseudothrombocytopenia. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37, 1063–1066. doi:10.1515/CCLM.1999.155.
Monti, P.; Archer, J. (2016). *Quality assurance and interpretation of laboratory dataIn Villiers, E.; Ristic, J. BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology.*
Neves, A. C. D. (2007). Análise proteômica comparativa entre neutrófilos quiescentes e neutrófilos ativo por n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP).
Peixoto, A. P. C., Costa, J. N., Kohayagawa, A., Takahira, R, K., and Saito, M. E. (2002). Hemograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bovinos da raça Holandesa preta e branca - Influência dos fatores etários. *Rev. Bras. saúde e produção Anim.* 3, 16–20. Available at: http://www.rbspa1.ufba.br//viewarticle.php?id=68&layout=html.
Santos, K. C. dos (2007). ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA ENTRE NEUTRÓFILOS NÃO ATIVADOS E NEUTRÓFILOS ATIVADOS COM PMA, UM ANÁLOGO DO DIACILGLICEROL.
Serra, C. S. P. (2010a). Adiponectina e TNF-α no desenvolvimento de Mieloma Múltiplo.
Serra, C. S. P. (2010b). Adiponectina e TNF-α no desenvolvimento de Mieloma Múltiplo. 44.
Silva, A. C. R. A., Valadares, T. C., Almeida, B. F. M., and Ciarlini, P. C. (2010). Efeito Do Edta Sobre O Teste De Redução Do Tetrazólio Nitroazul (Nbt) Para Avaliação Do Metabolismo Oxidativo Dos Neutrófilos De Equinos Edta Effects on the Tetrazolium Nitroblue Test (Nbt) To the Equine. 124–127.
Silva, S. B. da ANÁLISE COMPARATIVA DE HEMOGRAMAS DE RATAS SUBMETIDOS AOS ANTICOAGULANTES EDTA (ÁCIDO ETILENODIAMINO TETRA-ACÉTICO) E HEPARINA. 2012.
Soler-rodriguez, A. M., Zhang, H., Henri, S., Qureshi, N., Niesel, D. W., Sheila, E., et al. (2018). Neutrophil Activation by Bacterial Lipoprotein Versus Lipopolysaccharide: Differential Requirements for Serum and CD14. doi:10.4049/jimmunol.164.5.2674.
Takahashi, T. et al (2001). Activation of Human Neutrophil by Cytokine-Activated Endothelial Cells.Circulation Research. 88:422-429.
Tchorzewski, H., Zeman, K., Kantorski, J., Paleolog, E., Kahan, M., Feldmann, M., et al. (1993). The effect of tumour necrosis factor-alpha (TNF- alpha) muteins on human neutrophils in vitro. *Mediators Inflamm.* 2, 41–48.
Vilares, H., FabioTeixeira, Souza, A., and Rodrigues, E. J. P. (2017). Revisão de Literatura: Laminite em Equinos. *Rev. Científica Intellectus*, 273–288.