

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA – ESEF

João Roberto Fernandes

O uso de glicoproteínas lectínicas de latex *Euphorbia milii var. milii* (coroa-de-cristo) , e de folhas de *Mikania laevigata* (guaco) como marcadoras de leucócitos de sangue periférico de ratos, após sessões de exercício de força ou de exercício aeróbio.

Porto Alegre, Dezembro de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA – ESEF

João Roberto Fernandes

O uso de glicoproteínas lectínicas de latex *Euphorbia milii* var. *milii* (coroa-de-cristo) , e de folhas de *Mikania laevigata* (guaco) como marcadoras de leucócitos de sangue periférico de ratos, após sessões de exercício de força ou de exercício aeróbio.

Monografia apresentada à Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como pré- requisito para a conclusão do curso de Licenciatura em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Ronei Silveira Pinto

Co-orientadora: Prof. Dra. Magdolna Maria Vozári

Hampe

Porto Alegre, Dezembro de 2011

João Roberto Fernandes

O uso de glicoproteínas lectínicas de latex *Euphorbia milii var. milii* (coroa-de-cristo) , e de folhas de *Mikania laevigata* (guaco) como marcadoras de leucócitos de sangue periférico de ratos, após sessões de exercício de força ou de exercício aeróbio.

Conceito Final:

Aprovado em _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____-UFRGS

Orientador – Prof.Dr. Ronei Silveira Pinto – UFRGS

Co-Orientadora – Profa. Dra. Magdolna Maria Vozári Hampe - UFRGS

Resumo

Lectinas são (glico) proteínas capazes de se ligar com especificidade e reversivelmente a carboidratos sem modificá-los. Devido à interação proteína-carboidrato, as lectinas tem larga aplicação no estudo de fenômenos biológicos e no esclarecimento de alterações na constituição de glicoconjugados da superfície de células em diferentes condições. Os objetivos deste trabalho foram: 1 – o possível uso da lectina como marcadora de leucócitos de sangue periférico de ratos após o exercício físico; 2 – o percentual de linfócitos, monócitos e neutrófilos circulantes após sessões agudas de exercício físico. A lectina de *Mikania laevigata* foi isolada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 e de troca iônica, a partir de extratos aquosos das folhas do vegetal. A lectina de *Euphorbia milli* foi isolada por cromatografia de afinidade em coluna de ultrogel AcA44 a partir de exudatos de látex. As frações lectínicas foram marcadas com Fluoresceína Isotiocianato (FITC), segundo técnica de THE e FELTKAMP (1970). Ratos Wistar foram os animais de experimentação, com protocolo de exercício, consistindo em três adaptações com tempo e carga reduzidas, seguido de uma sessão de treino de força com 10 repetições, com carga mínima de 70% do peso corporal do animal ou, exercício aeróbio moderado de 20 minutos em esteira. O sangue dos animais foi coletado em EDTA em distintos tempos após o exercício. Após fixação com Formaldeído 2%, os eritrócitos foram lisados com Triton X-100 - 0,1% em PBS, seguido de incubação com lectina-FITC. O percentual de leucócitos marcados foi avaliado por Citometria de Fluxo. Os resultados mostraram que as lectinas ligam-se a células do sistema imune. Lectina-Mikania-FITC apresentou um alto

poder de ligação às células, tanto dos grupos exercício como dos grupos controles, não apresentando diferença significativa entre os grupos. Lectina-Euphorbia-FITC apresentou diferenças significativas entre alguns grupos controle x esteira e controle x força ($p < 0,05$). Assim sendo, as duas lectinas tem potencial para futuros estudos como marcadoras de células imunes e em especial a Lectina-Euphorbia-FITC.

Sumário

1. Introdução.....	09
2. Revisão de literatura.....	10
2.1 Sistema imunológico e exercício.....	10
2.2 Lectinas.....	13
3. Objetivo.....	16
3.1 Objetivo geral.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4.Problemas de pesquisa e hipótese	17
5.Materiais e métodos.....	17
5.1 Tratamento animal.....	17
5.2 Tamanho amostral.....	18
5.3 Divisão dos grupos.....	18
5.4 Protocolo de exercício aeróbio.....	19
5.5 Protocolo de exercício de força.....	19
5.6 Tratamento animal após a sessão aguda de exercício físico.....	20
5.7 Isolamento e purificação de lectinas de <i>Euphorbia milii</i> e <i>Mikania laevigata</i>	20

5.8 Marcação de lectinas com Fluoresceína Isotiocianato.....	21
5.9 Determinação do número e percentual de linfócitos, monócitos e neutrófilos circulantes em sangue periférico de ratos	21
5.10 Determinação do número e percentual de linfócitos, monócitos e neutrófilos de sangue periférico de ratos marcados com lectínas	22
5.11 Análise estatística	22
6. Considerações éticas.....	22
7. Local de execução.....	22
8. Resultados.....	23
8.1 Percentuais de linfócitos circulantes.....	23
8.2 Percentuais de monócitos circulantes.....	24
8.3 Percentuais de neutrófilos circulantes.....	25
8.4 Percentuais de linfócitos circulantes marcados com lectina –FITC de <i>Mikania laevigata</i>	26
8.5 Percentuais de monócitos circulantes marcados com lectina –FITC de <i>Mikania laevigata</i>	27
8.6 Percentuais de neutrófilos circulantes marcados com lectina –FITC de <i>Mikania laevigata</i>	28
8.7 Percentuais de linfócito circulantes marcados com lectina –FITC de <i>Euphorbia milii</i>	29

8.8 Percentuais de monócito circulantes marcados com lectina –FITC de <i>Euphorbia milii</i>	30
8.9 Percentuais de neutrófilo circulantes marcados com lectina –FITC de <i>Euphorbia milii</i>	31
9 Discussão.....	32
12 Conclusões.....	34
13. Bibliografia.....	36

1. Introdução

Dentre as estratégias atuais para a terapia de doenças uma das mais destacadas é o exercício físico. Praticado com regularidade, o exercício físico, vem apresentando diversos progressos, sociais, psicológicos e biológicos, em pacientes com diversas patologias.

Muitos estudos apontam os benefícios de sessões de exercícios sobre o sistema imunológico, entretanto, restam ainda muitas dúvidas em descobrir quais as modalidades, intensidade e volume são as mais indicadas para cada caso.

A literatura apresenta modelos de periodização para o cálculo de intensidade e volume de exercício, mas também são necessárias análises bioquímicas para a plena compreensão da melhoria imunológica no exercício.

Uma alternativa para estas análises envolvem as (glico)proteínas denominadas lectinas. Proteínas de origem, em sua maioria, vegetal, as lectinas tem afinidade de ligação a células, incluindo as do sistema imune. Esta característica nos permite presumir uma possível aplicação das mesmas como marcadoras de células imunes em processos inflamatórios. O látex de *Euphorbia milii* var. *milii* e as folhas de *Mikania laevigata* (coroa-de-cristo e guaco) plantas típicas de nossa região, contem uma grande quantidade de lectinas, o que torna a obtenção de suas lectinas acessível financeiramente.

Valendo-se das lectinas como possíveis marcadoras de células imunes, foi analisada a ligação das lectinas citadas a células imunes de ratos, após o exercício agudo de força ou aeróbio, em diferentes tempos de recuperação, além da possível variação do percentual de células imunes circulantes.

2. Revisão de Literatura

2.1 Sistema imunológico e exercício físico

O sistema imunológico é responsável pela remoção de células mortas, remoção de detritos celulares, memória imunológica e combate a microorganismo. Podemos dividir as funções imunológicas em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata pode ser definida como uma barreira composta de células e moléculas especializadas presentes em todos os indivíduos indiferentes de prévio contato. (MEDZTHIOV et. al.,2000) Contrapondo, temos a imunidade adaptativa Trata-se de uma resposta dos organismos a patógenos ou proteínas estranhas, que foram reconhecidos como tais, fagocitados e apresentados pelos macrófagos, como antígenos, ao sistema imunológico como possíveis causadores de alguma desordem imunológica. A resposta imune adaptativa caracteriza-se como auto-limitada e com memória especializada para patógenos específicos, contrariando a resposta inata que é geral e muitas vezes inespecífica. (CRUVINEL et. al., 2010)

Dentre principais células do sistema imunológico podemos destacar três delas, linfócitos, monócitos e neutrófilos. Elas têm a sua origem na medula óssea, nas células hematopoiéticas pluripotentes ou células tronco, logo após diferenciando-se em células indiferenciadas, ou progenitoras, linfóides e mielóides. Células linfóides diferenciam-se em pró-linfócitos e células linfóides dendríticas. Células mielóides diferenciam-se, como produto final, em plaquetas, eritrócitos, basófilos, neutrófilos, eusínófilos, monócitos, células dendríticas e mastócitos. (PARHAM, 2001)

Os linfócitos apresentam-se no sangue e nos tecidos linfóides tipicamente com metabolismo pouco ativado. Contudo, basta um estímulo para que este seja ativado, levando-os a secretar citocinas envolvidas na resposta imune. Podemos classificar os linfócitos em tipo T e em tipo B. Linfócitos que amadurecem no timo, a partir de seus “CD” (clusters de membrana), diferenciando-se em T CD 4+ e T CD 8+. Os T CD 4+ ou “T helpers” são células que reconhecem o antígeno apresentado pelos macrófagos e o sinalizam para o sistema imunitário. Os T CD 8+ são células citotóxicas, sendo assim, ao reconhecer uma célula possivelmente infectada por agente patógeno, sinaliza a célula T CD 8+ induzindo-a à apoptose ou ao rompimento. (CRUVINEL et. al., 2010). Já os linfócitos do tipo B são responsáveis pela produção de anticorpos, atuando como células de memória no sistema imunológico. Os linfócitos são fortemente estimulados por Interleucina do tipo 2 (IL-2), Concanavalina A (ConA) além de estímulos inflamatórios locais (PERES et. al., 2005)

Os monócitos são células circulantes que possuem a capacidade de se diferenciar em macrófagos no tecido e tem como principais funções a fagocitose, a apresentação de antígenos. (BOSCOLO et. al., 2004) e a secreção de citocinas. (LEANDRO et. al. 2007). Monócitos-macrófagos já foram utilizados em diversos trabalhos (SCHAUN et. al., 2010; SILVEIRA et. al. 2006; KIZAKI et. al. 2000) como possíveis marcadores e objetos de estudo em sua relação com o exercício. Uma possibilidade de análise do impacto do exercício em macrófagos é através do ensaio de fagocitose de Zymosan. Consiste em separar e aderir os monócitos-macrófagos em meio de cultura seguido de adição de partículas contendo o fungo *Saccharomyces cerevisiae*

e posterior contagem no interior das células do número de partículas fagocitadas. Foi encontrada diferença significativa nos grupos pré e pós exercício, ocorrendo um aumento na fagocitose no grupo pós exercício. (SILVEIRA et. al.; 2006).

Neutrófilos são células prioritariamente fagocíticas e responsivas ao sistema de complemento do sistema imune. Diferentes dos macrófagos, que também são prioritariamente fagócitos, os neutrófilos não possuem a capacidade de apresentar antígenos, contudo podem reconhecer e responder a estes antígenos (PARHAN, 2001). São extremamente sensíveis a citocinas inflamatórias tendo rápida mobilização para sítios inflamatórios. Em condições normais, os neutrófilos são eliminados dos tecidos normais por apoptose. (BRINKMANN et. al. 2004).

O exercício físico tem forte influência em fatores neuroendócrinos, imunológicos e metabólicos por exemplo na secreção de adrenalina, nora - adrenalina, hormônio do crescimento e cortisol, influenciando diversas respostas multifatoriais a estes estímulos. Dentre as células mais responsivas a estes estímulos encontram-se as células imunológicas. (KRAUSE et al., 2008). Um exemplo é um aumento no número de linfócitos e leucócitos, possivelmente decorrente da liberação de catecolaminas provocando o recrutamento de linfócitos dos linfonodos e do baço. Entretanto, após o exercício pode ocorrer uma imunossupressão, decorrente da migração de células imunológicas para o sítio inflamatório, causando uma leucopenia transitória (DOHI et al. 2003). Esta diminuição de leucócitos circulantes tende a retornar aos níveis basais, após 24 horas (PEDERSEN, et al., 1998)

Ainda existe a dúvida quanto à melhor modalidade, intensidade e volume de exercícios necessários para um incremento no sistema imunológico, já se sabe que exercícios moderados podem melhorar os mecanismos de defesa, contrapondo o exercício intenso que poderia enfraquecê-lo (ANGELI et. al., 2004; NOBREGA et. al., 2005). Contudo uma possível adaptação oriunda do treinamento venha a suprir essa momentânea queda do desempenho do sistema imunológico,

Alguns exercícios caracterizam-se por uma necessidade de alta intensidade, gerando um maior processo inflamatório e estendendo o período de recuperação. O dano muscular, decorrente do exercício, está intimamente ligado a fase excêntrica do movimento, sendo responsável pelo rompimento dos sarcômeros nas miofibrilas, requisitando um maior número de células para responder ao processo inflamatório. (CHEUNG etl al. 2003).

A busca por marcadores e sinalizadores inflamatórios no exercício permitiu-nos postular se alguma proteína de origem vegetal e em grande disponibilidade, capaz de ligar-se as células participantes em processos inflamatórios poderia servir para o este propósito, surgindo assim à possibilidade do uso de lectinas para este fim.

2.2 Lectinas

Lectinas são (glico) proteínas, com pelo menos um sítio de ligação não catalítico, capazes de reconhecer e se ligar com especificidade e de maneira reversível a sítios de carboidratos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). O primeiro trabalho descrevendo lectinas foi realizado em 1888 por Stillmark, ao

estudar extratos de *Ricinus communis* (mamona), encontrando um composto capaz de aglutinar eritrócitos, assim assinalando o princípio das pesquisas envolvendo lectinas (KENNEDY et al, 1995).

A distribuição destas (glico) proteínas, (a grafia deve-se ao fato de que certas lectinas apresentam uma porção glicídica em sua constituição), é muito variada, sendo encontradas em seres unicelulares (IMBERT et al., 2004), vegetais (LEITE et al., 2006) e animais (MOURA et al., 2006).

Lectinas possuem diversos papéis biológicos importantes como ação fungicida, antimicrobiana e inseticida (FREIRE et. al., 2002). Também é citada com ação antibactericida (SANTI-GADELHA et al., 2006) e inibição de crescimento tumoral (PETROSSIAN et al., 2007). Esta ação antimicrobiana das lectinas presentes em plantas faz parte de um sistema imune inato destes seres (YE; NG, 2001).

Uma das principais características das lectinas é a capacidade de ligar-se seletivamente e reversivelmente a carboidratos, tendo seu nome “lectina” oriundo da palavra latina “*lectus*”, que significa selecionado (SHARON; LIS, 2002). Sendo assim, as lectinas de forma excelente são usadas na detecção, isolamento de glico-proteínas na caracterização histológica e citológica de células normais e transformadas no estudo de processos inflamatórios e imunológico, devido à ligação específica das mesmas aos carboidratos dos glico conjugados. (DRESCH et al., 2008). Lectinas diferem de anticorpos anticarboidratos no que tange a sua origem. As lectinas são proteínas de origem não-imunológica (VAN DAMME et. al., 1996). Outra característica

significante das lectinas é a sua ligação a carboidratos sem alterar a estrutura do ligante, portanto elas são diferentes de enzimas (LIENER et al. 1986).

Baseado nas características acima citadas podemos detectar em um ensaio de aglutinação de eritrócitos a presença ou não de lectinas em uma amostra. O ensaio é realizado a partir de uma diluição seriada da amostra contendo lectina e posterior adição de uma solução de eritrócitos, entre 2% a 4%. A avaliação é feita tendo o valor inverso da maior diluição em que se observa a atividade hemoaglutinante (SANTOS et. al., 2005). Contudo outros agentes podem causar a hemoaglutinação, sendo necessários experimentos com o carboidrato inibidor de afinidade da lectina utilizada garantindo que o elemento hemoaglutinante seja realmente a lectina (WU et al., 2006).

Diferentes trabalhos têm mostrado que as lectinas funcionam como proteínas bioativas em processos inflamatórios (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2000; GUSTAFSSON *et al.*, 2011). Nosso laboratório vem trabalhando no isolamento, caracterização e estudo das propriedades biológicas de novas lectinas. Dentre elas a lectina extraída do látex da *Euphorbia milii* var. *milli* (coroa-de-cristo)(EML), apresentou efeito quimiotático para neutrófilos, sendo a sua migração dose-dependente e o efeito inibido por D-galactose (Gal), e tendo ainda como inibidor da atividade lectínica a N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) (DIAS-BARUFFI et al., 2000).

GUSTAFSON et al.(2011) mostraram a ligação de lectinas, como a Concanavalina A (ConA) à manose (Man) e à glicose (Gli) presentes na membrana plasmática de macrófagos. A lectina de *Mikania laevigata* (MLL), específica para Gli e Man, que vem sendo estudada em nosso laboratório,

poderia servir, bem como, a lectina de *Euphorbia milii*, para o estudo de possíveis marcadoras em alterações qualitativas e quantitativas dos glicoconjugados das membranas dos linfócitos, monócitos e neutrófilos migrantes para o sítio inflamatório causado pelo dano muscular após exercícios físicos.

3. Objetivo

3.1 Objetivo Geral:

Foram avaliados os efeitos de uma sessão de exercício aeróbio ou exercício de força sobre variáveis imunológicas em ratos Wistar machos adultos e comparadas entre os grupos exercício e controle.

3.2 Objetivos específicos:

- 1- Verificar as alterações percentuais nos leucócitos circulantes em sangue periférico de ratos nos exercícios aeróbio e força, em diferentes tempos de recuperação (6, 24 e 48 horas).
- 2- Identificar o possível uso de lectinas de *Euphorbia milii* e *Mikania laevigata* como marcadoras de recuperação após exercício físico em células do sistema imunológico (linfócitos, monócitos e neutrófilos).

4. Problemas de Pesquisa e hipóteses

Após constatar, com base nesta revisão de literatura, que o exercício físico, conforme sua intensidade e volume podem alterar a atividade e número de células do sistema imunológico surge à questão: é possível identificar um

possível processo inflamatório baseado na marcação de células imunológicas com lectinas em diferentes modelos de exercício?

Hipóteses:

H1: As lectinas em estudo, por se tratarem de moléculas bio-ativas, proteínas que reconhecem especificamente carboidratos da superfície celular teriam uma efetiva ligação na superfície das células do sistema imune.

H2: Os animais do exercício de força poderiam, ter uma ligação mais significativa de seus leucócitos às lectinas, comparados ao exercício aeróbio.

H3: Após 48 h, os percentuais de linfócitos, monócitos e neutrófilos circulantes retornariam aos níveis basais do grupo controle.

5. Materiais e métodos

5.1 Tratamento Animal

Foram utilizados para esse trabalho ratos Wistar machos, adultos (entre 60 e 90 dias de vida) provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os animais foram mantidos sob um ciclo de claro/escuro 12h/12h e temperatura ambiente a 23°C, recebendo *ad libitum*, água e dieta comercial padrão para ratos de laboratório. A água fornecida aos animais foi trocada com frequência, impedindo o desenvolvimento de microorganismos. Os animais ficaram em caixas (no máximo quatro por caixa) de propileno (41x34x16 cm), as mesmas foram armazenadas em uma sala

destinada ao tratamento e manipulação de animais, no biotério do Departamento de Bioquímica.

5.2 Tamanho Amostral

De acordo com a proposição de Callegari-Jacques (2003) e considerando $\alpha=0,05$ e $\beta=0,20$, foram utilizados cinco animais em todos os parâmetros avaliados. Esses números estão de acordo com a literatura científica, como pode ser observado nos artigos publicados com protocolos idênticos ou semelhantes ao que foi utilizado neste trabalho, e nos quais foram encontradas diferenças significativas para as variáveis analisadas (KARAGOUNIS *et al.*, 2010; LEAL JUNIOR *et al.*, 2010; MARKERT *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2010).

Foram necessários para esse trabalho um total de 35 animais (três grupos em três diferentes tempos de sacrifício).

5.3 Divisão dos Grupos

Os animais foram divididos em três grupos para os experimentos: Controle (C), Exercício Aeróbico (A) e Exercício de Força (F). Foram utilizados 15 animais em cada grupo, tendo um $n=5$ por grupo. Esse modelo foi repetido três vezes para que tivéssemos amostras para os diferentes tempos de sacrifício dos animais. Os animais foram sacrificados por decapitação, sem anestesia, em três diferentes tempos, após a sessão de exercício (6, 24, 48 h). O grupo controle foi composto por animais que não foram submetidos a nenhum dos protocolos de exercício.

5.4 Protocolo de Exercício Aeróbico

O grupo (A) que realizou exercício aeróbio, passou por um processo de três dias de adaptação em uma esteira motorizada adaptada para animais, na qual a velocidade e o tempo de duração foram aumentados gradualmente. No quarto dia foi realizada a sessão aguda de exercício de 20 min. a 60% do VO_2 máx (CECHETTI, 2007) tendo como base a média de VO_2 de animais de experimentos anteriores. Os animais que se recusaram a correr foram gentilmente incentivados, com um bastão de vidro ou suaves toques em suas costas, para que o fizessem.

5.5 Protocolo de Exercício de Força

O grupo (F) que foi submetido ao exercício de força, utilizou um protocolo adaptado, ao descrito por ILHA (2008). Os animais foram estimulados a subir uma rampa de madeira forrada com borracha com 1 m. de comprimento. A inclinação da rampa foi de 30° e no topo havia uma sala escura onde o animal pode repousar por um intervalo de cerca de 2 min. No primeiro dia de adaptação, os animais reconheceram a rampa, sem nenhum tipo de peso atrelado a suas costas. No segundo dia, um suporte sem sobrecarga foi colocada no dorso do animal e foi fixado em um cabo de aço que estava atrelado a uma abraçadeira presa ao peito do animal. No terceiro dia de adaptação, foi colocada no animal uma sobrecarga equivalente a 15% da massa corporal do mesmo. Já na sessão aguda de exercício, foi colocada uma sobrecarga equivalente a 75% do peso corporal e o animal teve de realizar 10 subidas.

5.6 Tratamento animal após a sessão aguda de exercício físico

Tão logo foi finalizada a sessão de exercício pertinente, os animais foram decaptados e seu sangue foi coletado em tubos Falcons com anticoagulante EDTA para análise imediata. Não foi utilizada anestesia prévia dos animais, visto que os anestésicos comumente usados poderiam promover alterações nas amostras, interferindo nas técnicas utilizadas para a avaliação de ligações lectínicas a células imunológicas.

De acordo com o guia de severidade de procedimentos, os animais foram submetidos a procedimentos de grau leve, caracterizados desse modo a provável não experiência de dor, sofrimento ou desconforto pelos animais utilizados. Foram procedimentos que não acarretaram prejuízos no bem-estar ou nas condições gerais dos animais (PROPESQ-Comissões-CEUA).

5.7 Isolamento e purificação de lectinas de *Euphorbia milii* e *Mikania laevigata*

Com o objetivo de analisar a ligação das lectinas em estudo às células imunes, foi necessário o isolamento e purificação das mesmas. O processo iniciou-se com a coleta das folhas de *Mikania laevigata* (MLL) e o látex da *Euphorbia milii var. millii* (EML) A MLL foi isolada em coluna de Sephadex G-50 e de troca iônica a partir extratos aquosos das folhas do vegetal segundo protocolo do laboratório. A EML foi purificada a partir de exudatos de látex, em colunas de Ultrogel AcA 44, conforme descrito por DIAS-BARUFFI (2000).

5.8 Marcação de Lectinas com Fluoresceína Isoitocianato

Lectinas em estudo foram marcadas com FITC (Fluoresceína Isoitocianato) segundo técnica de THE e FELTKAMP (1970). A marcação foi confirmada após retirada de uma alíquota e visualização em microscópio de

fluorescência, e a não perda da atividade lectínica durante o processo da marcação foi por teste de hemoaglutinação de suspensão de eritrócitos de coelho a 2%.

5.9 Determinação do número e percentual de linfócitos, monócitos e neutrófilos circulantes de sangue periférico de ratos

As amostras de sangue dos grupos exercícios e controle foram coletas, fixadas em formaldeído 10% por 10 minutos. Em seguida os eritrócitos foram lisados com solução de Triton a 0,11% em solução fosfato-salino pH 7,2 por 30 minutos. Após a lise dos eritrócitos, as células imunes fixadas foram contados utilizando um Citômetro de Fluxo, modelo FACS Calibur (Becton-Dickinson), sendo adquiridos 5000 eventos. Todos os procedimentos foram realizados a temperatura ambiente. A quantificação destes eventos foi realizada no software Quest Cell, onde foram marcadas as populações, utilizando como base para a localização das mesmas, tamanho da célula por sua granulosidade.

5.10 Determinação do número e percentual de linfócitos, monócitos e neutrófilos circulantes de sangue periférico de ratos, marcados com Lectina-FITC

Utilizando os processos anteriormente descritos de fixação de leucócitos e lise de eritrócitos, as amostras foram incubadas por 30 minutos com 20µL de solução contendo MLL-FITC ou EML-FITC e em seguida as células marcadas foram contadas em Citometria de Fluxo. Soluções de D-Gli 0,2M e de D-Gal 0,2M em PBS, foram usadas, para inibir, respectivamente, a atividade lectínica da MLL-FITC e da EML-FITC, com fins de controle negativo da especificidade da ligação lectínica. As Lectinas-FITC, foram incubadas com os respectivos

inibidores a temperatura ambiente (20°C), durante 30 minutos antes da adição às células.

5.11. Análise estatística

A análise estatística foi feita no programa Graphpad Prism 5.0 para Windows. Para o teste de normalidade utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk. Visto que os dados eram paramétricos, utilizamos ANOVA de duas vias, com a utilização do pós-teste de Bonferroni para a análise entre os diferentes tempos de recuperação.

6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais conforme a lei nº 11.794/2008, as diretrizes da Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental, aprovadas pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, bem como o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (publicação do NIH Nº 80-23, revisado em 1996) e as normas do “Canadian Council on Animal Care (CCAC). O projeto do qual faz parte este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (nº do projeto 21206) no dia 26/09/2011.

7. LOCAL DE EXECUÇÃO

A parte experimental deste trabalho de conclusão de curso foi realizada nos laboratórios do Departamento de Bioquímica, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cujos laboratórios possuem a infra-estrutura para o trabalho com animais de experimentação, além dos equipamentos, vidrarias e reagentes necessários

para a sua execução deste trabalho. A elaboração do trabalho teórico e escrita foi realizada na própria Escola de Educação Física.

8. RESULTADOS

8.1 Percentuais de linfócitos circulantes

A figura 1 apresenta o percentual de linfócitos em sangue periférico de ratos submetidos a diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Diferença significativa: entre os grupos Força e Esteira 48 h ($p < 0,05$). Os demais grupos não apresentaram diferença significativa.

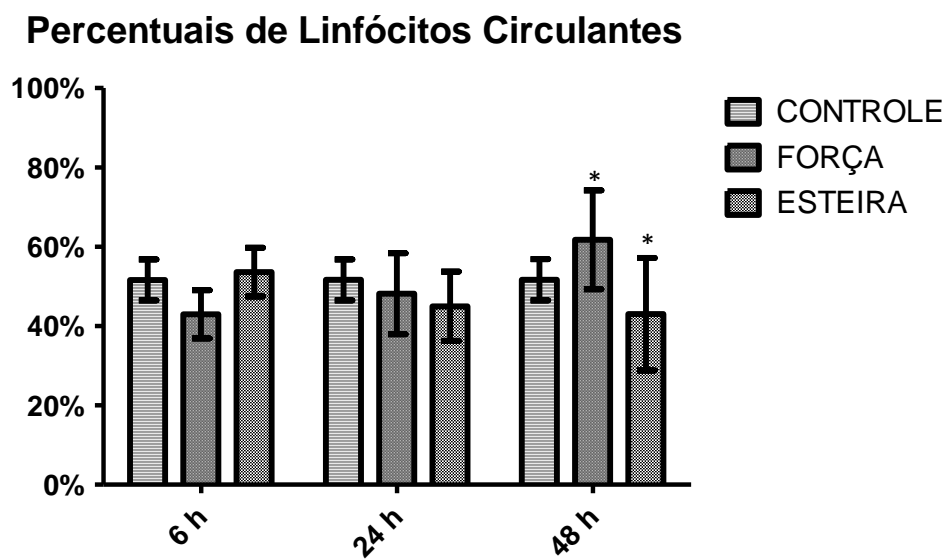


Figura 1. Percentuais de linfócito em sangue periférico de ratos com diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Diferença significativa: entre os grupos Força e Esteira 48 h ($p < 0,05$)

8.2 Percentuais de monócitos circulantes

A figura 2 apresenta o percentual de monócitos em sangue periférico de ratos submetidos a diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Diferença significativa: entre os grupos Força e Esteira 48 h ($p < 0,001$). Os demais grupos não apresentaram diferença significativa.

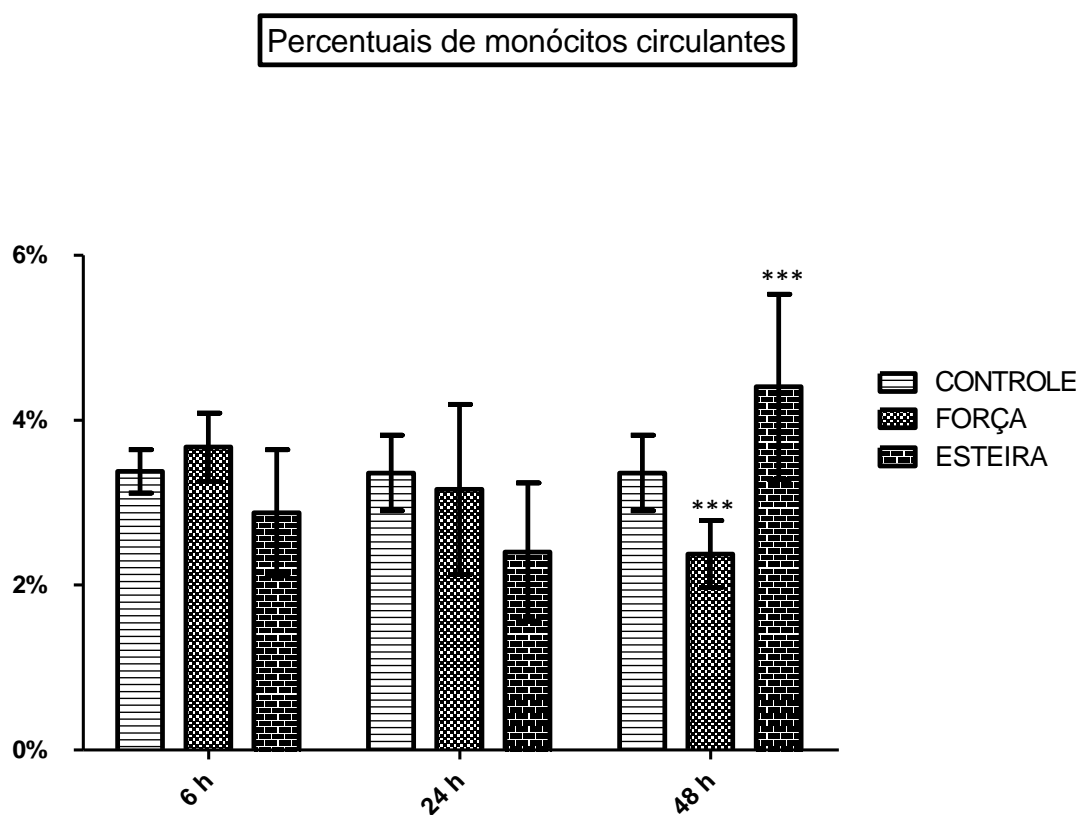


Figura 2. Percentuais de monócito em sangue periférico de ratos com diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Diferença significativa: entre os grupos Força e Esteira 48 h ($p < 0,001$)

8.3 Percentuais de neutrófilos circulantes

A figura 3 apresenta o percentual de neutrófilos em sangue periférico de ratos submetidos a diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Diferença significativa: entre os grupos Esteira e controle 48 h ($p < 0,05$). Os demais grupos não apresentaram diferença significativa.

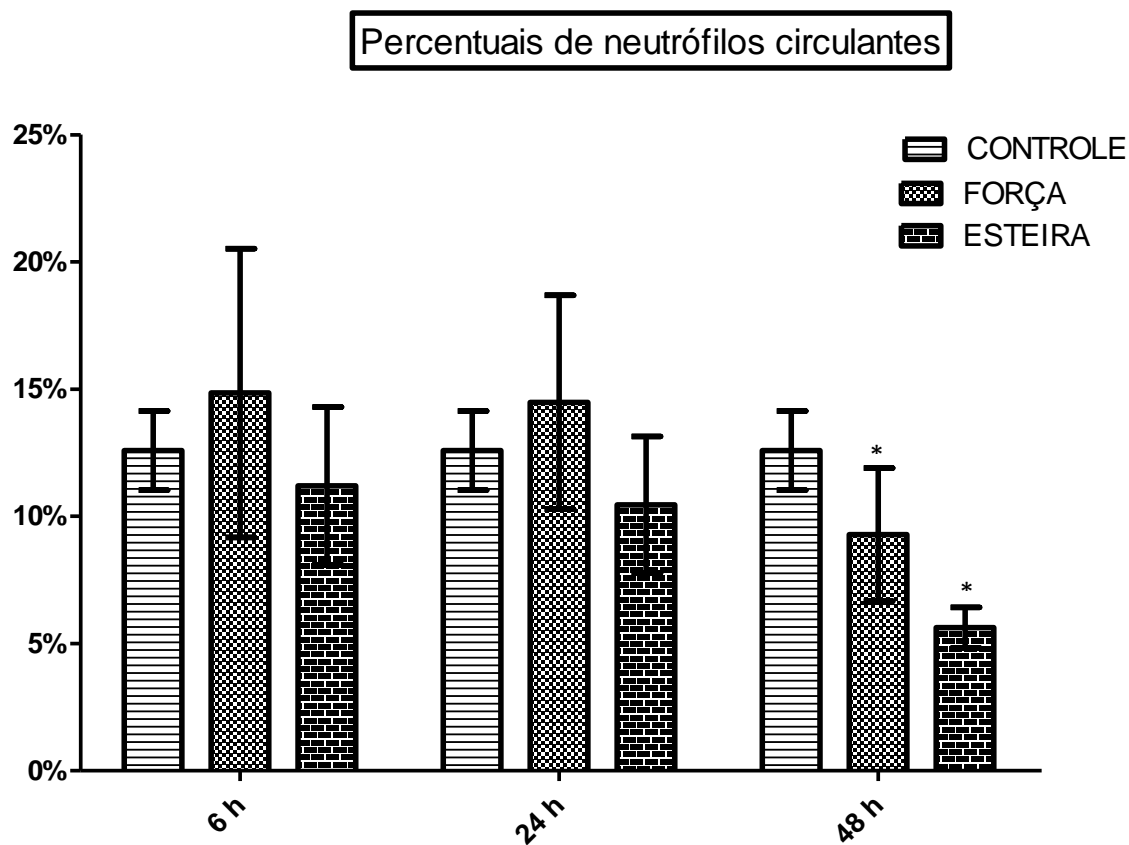


Figura 3. Percentuais de neutrófilos em sangue periférico de ratos com diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação.

Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo.

Diferença significativa: Esteira e Controle 48 h ($p < 0,05$)

8.4 Percentuais de linfócitos circulantes marcados com lectina –FITC de *Mikania laevigata*

Figura 4. Percentuais de linfócitos marcados com lectina-FITC *Mikania laevigata* em sangue periférico de ratos submetidos a diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Não houve diferença significativa entre os diferentes grupos.

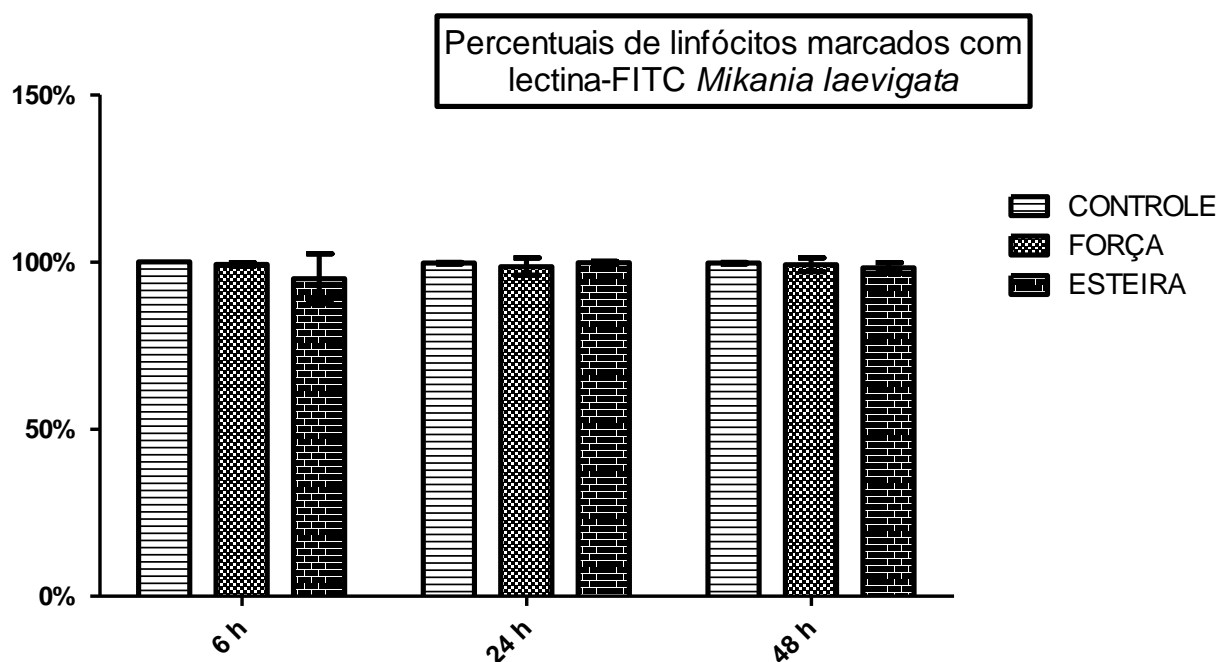


Figura 4. Percentuais de linfócitos marcados com lectina-FITC *Mikania laevigata* em sangue periférico de ratos com diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Não houve diferença significativa.

8.5 Percentuais de monócitos circulantes marcados com lectina –FITC de *Mikania laevigata*

Figura 5. Percentuais de monócitos marcados com lectina-FITC *Mikania laevigata* em sangue periférico de ratos submetidos a diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Não houve diferença significativa entre os diferentes grupos.

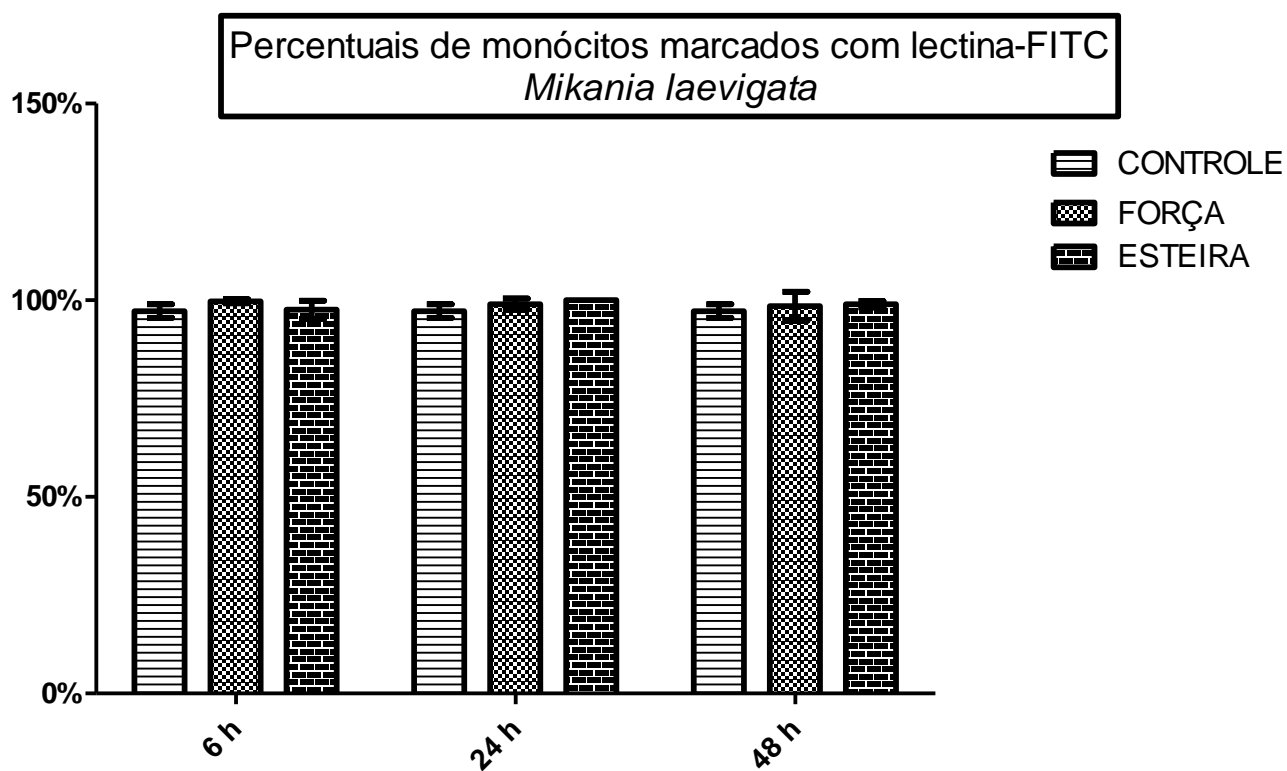


Figura 5. Percentuais de monócitos marcados com lectina-FITC *Mikania laevigata* em sangue periférico de ratos com diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Não houve diferença significativa.

8.6 Percentuais de neutrófilos circulantes marcados com lectina –FITC de *Mikania laevigata*

Figura 6. Percentuais de neutrófilos marcados com lectina-FITC *Mikania laevigata* em sangue periférico de ratos submetidos a diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Não houve diferença significativa.

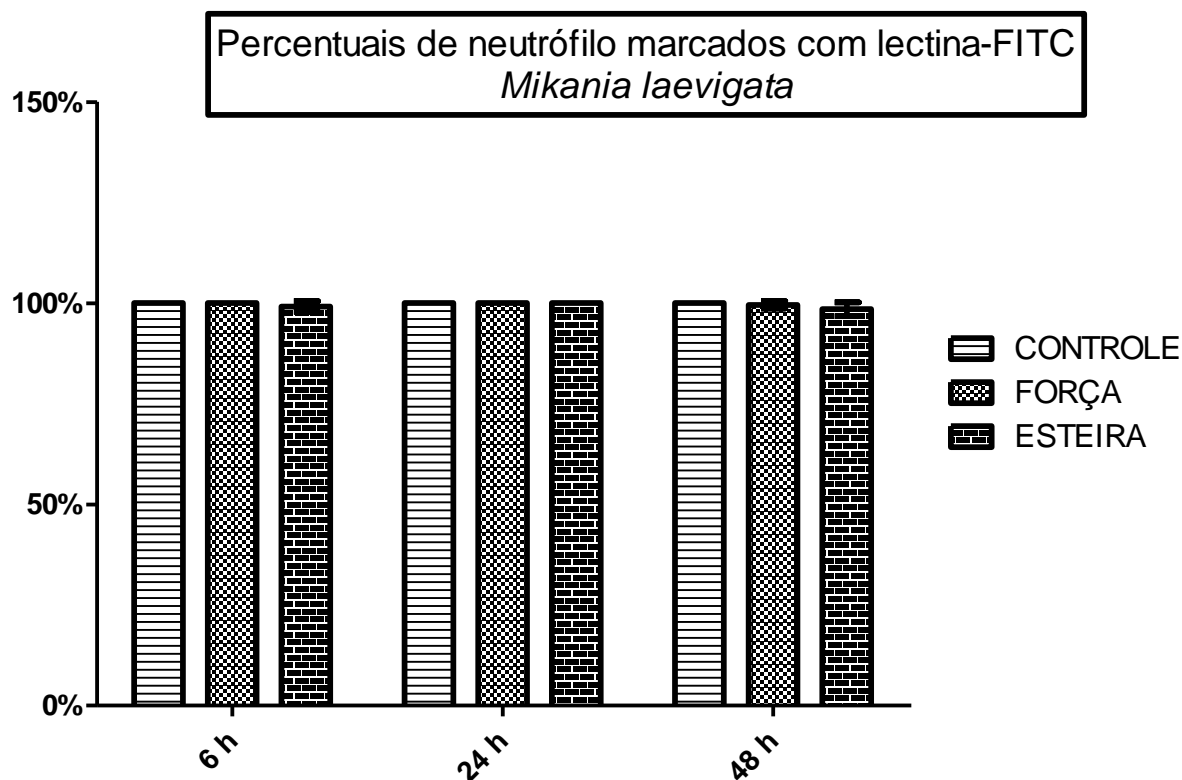


Figura 6. Percentuais de neutrófilo marcados com lectina-FITC *Mikania laevigata* em sangue periférico de ratos com diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Não houve diferença significativa.

8.7 Percentuais de linfócitos circulantes marcados com lectina –FITC de *Euphorbia milii*

Figura 7. Percentuais de linfócitos marcados com lectina-FITC *Euphorbia milii* em sangue periférico de ratos submetidos a diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Diferença altamente significativa ($p < 0,001$) nos grupos Força Controle (em todos os intervalos) e Esteira Controle (em todos os intervalos).

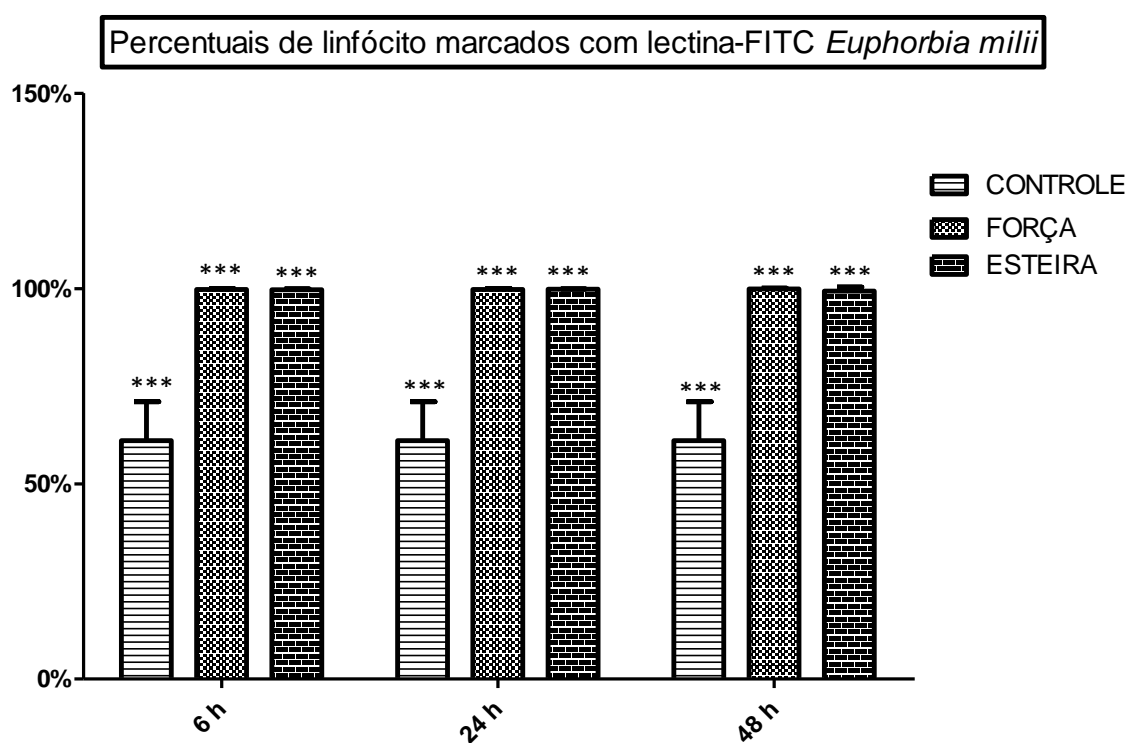


Figura 7. Percentuais de linfócito marcados com lectina-FITC *Euphorbia milii* em sangue periférico de ratos com diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Diferença altamente significativa ($p < 0,001$) nos grupos Força Controle (em todos os intervalos) e Esteira Controle (em todos os intervalos)

8.8 Percentuais de monócitos circulantes marcados com lectina –FITC de *Euphorbia milii*

Figura 8. Percentuais de monócitos marcados com lectina-FITC *Euphorbia milii* em sangue periférico de ratos submetido a diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Diferença altamente significativa ($p<0,001$) entre os grupos Força e Controle (em todos os intervalos) e, Esteira e Controle (em todos os intervalos)

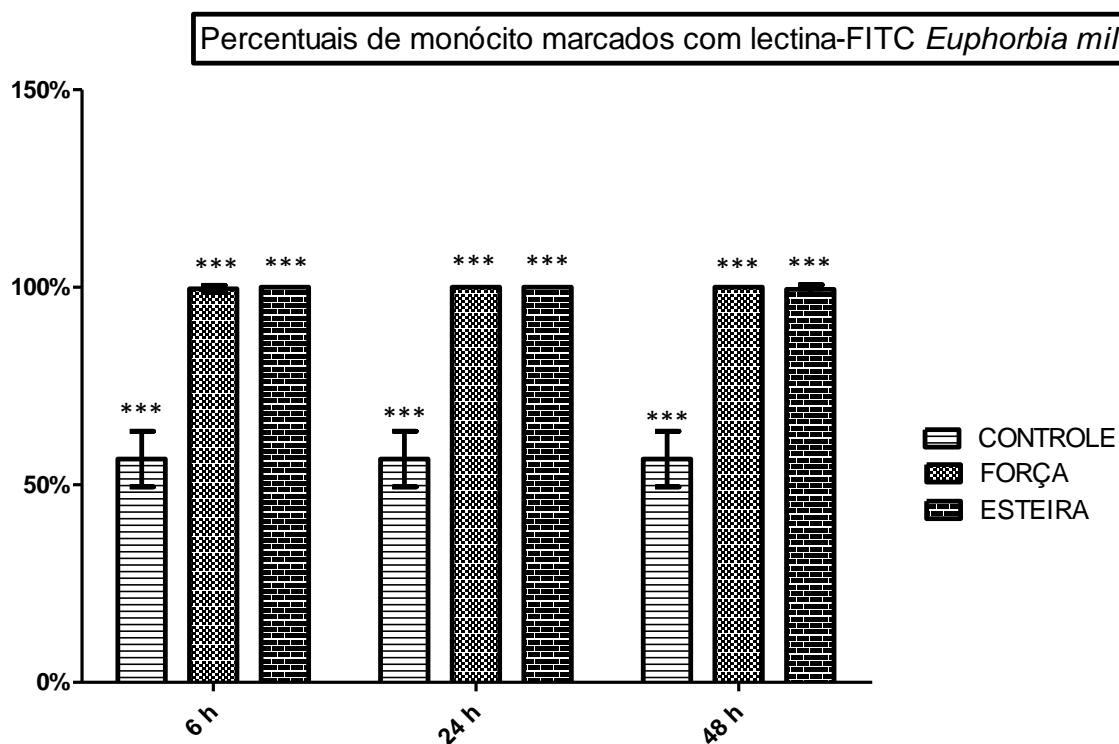


Figura 8. Percentuais de monócito marcados com lectina-FITC *Euphorbia milii* em sangue periférico de ratos com diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Diferença altamente significativa ($p<0,001$) nos grupos Força Controle (em todos os intervalos) e Esteira Controle (em todos os intervalos)

8.9 Percentuais de neutrófilos circulantes marcados com lectina-FITC de *Euphorbia milii*

Figura 9. Percentuais de neutrófilos marcados com lectina-FITC *Euphorbia milii* em sangue periférico de ratos submetidos a diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação. Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Diferença altamente significativa ($p<0,001$) entre os grupos Força e Controle 48h; muito significativa ($p<0,01$) entre os grupos Força e Controle 24h e significativa entre os grupos Força e Controle 6h. O Grupo Esteira controle apresentou diferença muito significativa no tempo 48h ($p<0,01$) e 6h ($p<0,05$).

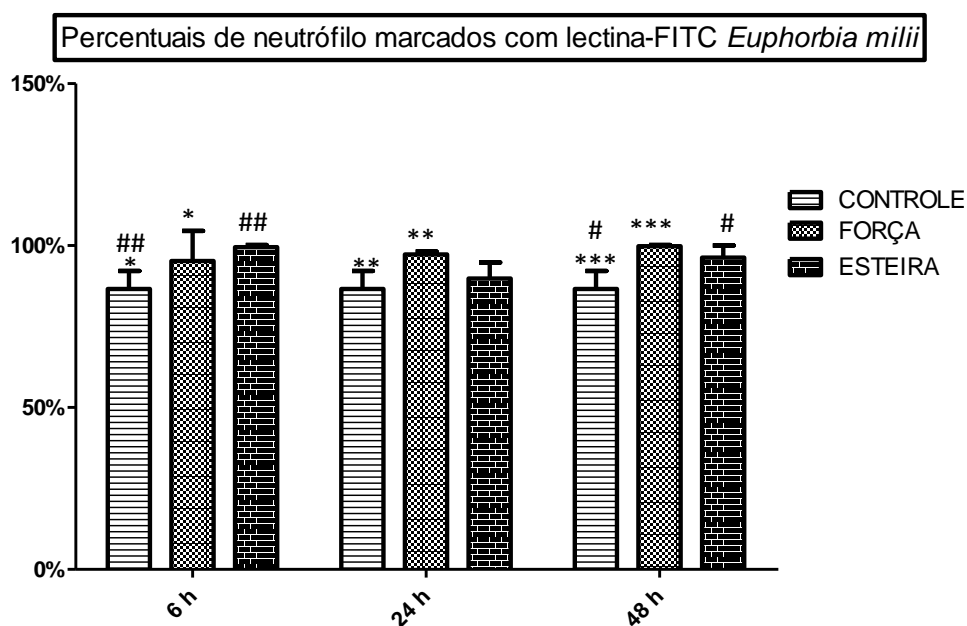


Figura 9. Percentuais de neutrófilo marcados com lectina-FITC *Euphorbia milii* em sangue periférico de ratos com diferentes modelos de exercício e diferentes tempos de recuperação.

Os resultados estão expressos como média e DP para n=5 (animais) por grupo. Diferença altamente significativa ($p<0,001$) nos grupos Força Controle 48h; muito significativa ($p<0,01$) no grupo Força Controle 24h e significativa no grupo Força Controle 6h. O Grupo Esteira controle apresentou diferença muito significativa no tempo 48h ($p<0,01$) e 6h ($p<0,05$).

9. Discussão dos resultados apresentados

Os resultados encontrados com relação ao percentual de células imunes circulantes apresentaram diferenças significativas apenas em 48 horas. Linfócitos (Controle x Esteira), Monócitos (Força x Esteira) e Neutrófilos (Força x Esteira) apresentaram diferenças significativas. Estes dados caracterizam que o exercício físico do grupo força não se caracterizou como um exercício de intensidade moderada com bases nos parâmetros imunológicos.

O exercício físico de atividade leve é referido como 20% a 50 % VO_{2max} , moderado de 50% a 70% VO_{2max} e intenso acima de 80% do VO_{2max} . (LEANDRO et. al., 2007). Considerando o perfil dos leucócitos do grupo força está altamente alterado podemos caracteriza-lo como exercício mais intenso quando comparado ao grupo aeróbio.

Os linfócitos circulatórios do grupo Força em relação ao grupo Esteira em 48 horas mostra que ainda existe uma sinalização decorrente de um processo inflamatório em andamento. Este dado é confirmado pelo percentual, significativo ($p < 0,001$), em relação ao grupo esteira em monócitos circulantes.

Indo ao encontro destes dados, os neutrófilos apresentam uma diferença significativa ($p < 0,05$) no aumento de células circulante do grupo controle em relação ao grupo Esteira, configurando assim, um processo de transição entre o estado inflamatório e possivelmente retornado ao estado controle pelo grupo esteira. Conforme descrito por BICUDO & VAISBERG (2002) os neutrófilos apresentam, um segundo pico, de aumento, algumas horas após o exercício. É possível, por se tratar de um exercício de menor intensidade, que a diminuição de neutrófilos anteceda este segundo pico pós exercício. A necessidade de um

n amostral maior poderia apresentar mais alguma diferença significativa. Entretanto permanece a dúvida se o grupo força também não estaria se encaminhando para uma diminuição dos neutrófilos que antecederia o aumento do número dos mesmos. Também resta a dúvida, se o exercício esteira, por ser menos intenso, não apresentaria este pico e seu futuro retorno aos níveis do grupo controle.

As células imunes marcadas com o composto Lectina-FITC de *Mikania laevigata* não apresentaram diferença significativa em nenhum dos grupos estudados. Contudo, todos os grupos apresentaram um máximo índice de ligação da lectina-FITC com todas as células imunes. Sendo assim, esta lectina tem potencial para ser usada na marcação de células imunes em distintas condições fisiológicas e patológicas. No entanto é necessário um maior ajuste das condições experimentais, como ajuste de concentração, para seu uso.

As células imunes, dos diferentes grupos de ratos em estudo, marcadas com lectina-FITC de *Euphorbia milii* apresentaram resultados com diferenças significativas. Os linfócitos e monócitos apresentaram, nos dois grupos exercício diferenças significativas ($p < 0,001$) com relação ao grupo controle em todos os tempos. Assim sendo pode-se afirmar que as diferenças na marcação dos linfócitos e monócitos foi exercício depende. Os neutrófilos do grupo exercício força apresentaram diferenças significativas com aumento destas significâncias ao longo do tempo, em relação ao grupo controle: 6h ($p < 0,05$), 24h ($p < 0,02$) e 48h ($p < 0,001$). Estes dados sugerem um possível uso desta lectina como sinalizadora na marcação de neutrófilos em processos inflamatórios. O grupo esteira apresentou diferença significativa nos grupos 6h ($p < 0,05$) e 48h ($p < 0,01$). É possível que a menor intensidade do grupo esteira

seja um dos fatores da diminuição da ligação da lectina os neutrófilos. Sendo assim também podemos complementar a idéia inicial de que o exercício esteira é menos intenso e gera um menor processo inflamatório.

Sendo a intensidade do exercício de força maior que o esteira, também o processo inflamatório muscular maior, ocasionando variação no afluxo de células imunes para a região lesada, com possível variação de percentual das mesmas na corrente circulatória. Além de possíveis modificações na exposição dos glicoconjugados da parte externa das membranas plasmáticas acessíveis a ligação das lectinas, o que justificaria a diferença da ligação de lectina EML aos neutrófilos nos dois grupos exercício.

12. Conclusões

Este trabalho está em fase de produção, visto que são necessários maiores estudos acerca da relação lectinas - células imunes. Sendo assim observamos que o modelo de exercício de força utilizado é adequado para o treino de animais. Os níveis de linfócitos circulantes permaneceram altos e a migração de monócitos para o tecido muscular aumentou no grupo força, conseqüentemente, caracterizando-se com uma sessão de exercício, acima da intensidade moderada. Também apresenta uma forma de indução inflamatória sem o uso de fármacos. O exercício esteira já é utilizado no treinamento aeróbio de ratos, valendo-se do modelo atual.

Estes modelos deverão ser mantidos para estudos futuros, porém com alguma possível mudança na intensidade e volume dos exercícios visando o estudo crônico com estes exercícios. Igualmente devemos analisar marcadores

inflamatórios clássicos com TNF α e IL-6 buscando correlacionar com nossos possíveis parâmetros inflamatórios.

Nosso interesse não se restringe as células imunes circulantes, mas também nas células migrantes do sangue para o tecido muscular. Amostras de gastrocnêmio e sóleo foram retiradas dos animais deste experimento e acondicionadas para futuras análises citológicas buscando células imunes no tecido muscular valendo-se da marcação com lectinas.

As lectinas mostraram-se muito eficazes na marcação celular, mas há a necessidade de experimentos com concentrações lectínicas diferentes, com a lectina-FITC MLL para fins de uso em células imunes. A lectina-FITC EML mostrou ser eficiente para o uso como marcadora de células imunes de ratos submetidos às condições de diferentes exercício.

Como considerações finais, acreditamos que os modelos de exercício analisados e a marcação com lectinas apresentam plena reprodutibilidade e pode vir a apresentar significativos resultados tanto em exercício agudo como em exercício crônico.

13. Bibliografia

- ANGELI, A. MINETTO, M. DOVIO, A.; PACCOTTI, P. The overtraining syndrome in athletes: a stress-related disorder. **Journal of endocrinological investigation**, v. 27, n. 6, p. 603-12, jun 2004.
- BRINKMANN, V. REICHARD, U. GOOSMANN, C. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, 5 mar 2004
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. Porto Alegre: ARTMED, 2003.
- CECHETTI, F. RHOD, A. SIMÃO, F. *et al.* Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation. **Brain research**, v. 1157, p. 121-5, 2007.
- CHEUNG, K. HUME, P. A.; MAXWELL, L. Treatment Strategies and Performance Factors. **Sports Medicine**, v. 33, n. 2, p. 145-164, 2003.
- COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis** v. 11, p. 295-300, 2000.
- DERESZ, L. F. LAZZAROTTO, A. R.; MANFROI, W. C. O estresse oxidativo e o exercício físico em indivíduos HIV positivo. **Revista Brasileira De Medicina**, v. 13, p. 275-279, 2007.
- DIAS-BARUFFI, M. SAKAMOTO, M. ROSSETTO, S. VOZÁRI-HAMPE, M M; ROQUE-BARREIRA, M. C. Neutrophil migration and aggregation induced by euphorbin, a lectin from the latex of *Euphorbia milii*, var. *milii*. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 49, n. 12, p. 732-6, 2000.
- DRESCH, R. R. ZANETTI, G. D. LERNER, C. B. *et al.* ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugata*: isolation, characterization and chemotactic activity. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 148, n. 1, p. 23-30, 2008.
- DOHI, K. KRAEMER, W. J. MASTRO, A. M. Exercise increases prolactin-receptor expression on human lymphocyte. **J Appl Physiol** v.94, p. 518-524, 2003
- FREIRE, M. G. M. *et al.* Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry** v.40, p. 61-68, 2002.

GUSTAFSSON, A. SJÖBLOM, M. STRINDELIUS, L. et al. Pichia pastoris-produced mucin-type fusion proteins with multivalent O-glycan substitution as targeting molecules for mannose-specific receptors of the immune system. **Glycobiology**, v. 46, n. 0, 2011.

IMBERT, A. et al. Structures of the lectins from Pseudomonas aeruginosa: insights into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 2, p. 221-228, 2004.

ILHA, J. ARAUJO, R. T. MALYSZ, T. et al. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. **Neurorehabilitation and neural repair**, v. 22, n. 4, p. 355-66, 2008.

KARAGOUNIS, L. G. YASPELKIS, B. B. REEDER, D. W. et al. Contraction-induced changes in TNF α and Akt-mediated signalling are associated with increased myofibrillar protein in rat skeletal muscle. **European journal of applied physiology**, v. 109, n. 5, p. 839-48, 2010.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 219-30, 1995.

KIZAKI, T. HAGA, S. SAKATA, I. et al. Swimming training prevents generation of suppressor macrophages during acute cold stress. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 32, n. 1, p. 143-8, jan 2000.

KRAUSE, S. JR, L. P. O. SILVEIRA, E. M. S. et al. MRP1 / GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells? **Cell Biochemistry and function**, n. April 2006, p. 23-32, 2007.

LEAL JUNIOR, E. C. P. LOPES-MARTINS, R. A. B. DE ALMEIDA, P. et al. Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. **European journal of applied physiology**, v. 108, n. 6, p. 1083-8, 2010.

LEITE, Y .F. M. M. et al. Purification of a lectin from the marine red alga Gracilaria ornata and its effect on the development of the cowpea weevil Callosobruchus maculatus (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 137-145, 2005.

MARKERT, C. MERRICK, M. KIRBY, T.; DEVOR, S. Nonthermal Ultrasound and Exercise in Skeletal Muscle Regeneration. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 86, n. 7, p. 1304-1310, 2005.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate immunity. **The New England journal of medicine**, v. 343, n. 5, p. 338-44, 3 ago 2000.

MOURA, R. M. et al. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania promastigotes*. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 145, n. 4, p. 517-523, 2006.

NAVALTA, J. W. MCFARLIN, B. K.; LYONS, T. S. Does exercise really induce lymphocyte apoptosis? **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 2, p. 478-88, jan 2010.

NOBREGA, A. C. L. DA. The subacute effects of exercise: concept, characteristics, and clinical implications. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 33, n. 2, p. 84-7, abr 2005.

PERES, C. M. OTTON, R.; CURI, R. Modulation of lymphocyte proliferation by macrophages and macrophages loaded with arachidonic acid. **Cell biochemistry and function**, v. 23, n. 6, p. 373-81 .

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347-52, 1995.

PARHAM, P. **O Sistema Imune**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.

PEDERSEN, B. K. ROHDE, T.; OSTROWSKI, K. Recovery of the immune system after exercise. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 162, n. 3, p. 325-32, mar 1998.

PETROSSIAN, K.; BANNER, L. R.; OPPENHEIMER, S. B. Lectin binding and effects in culture on human cancer and non-cancer cell lines: Examination of issues of interest in drug design strategies. **Acta Histochemica**, v. 109, n. 6, p. 491-500, 2007.

SANTOS, A. F. S. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v. 39, p. 975–980, 2005.

SANTI-GADELHA, T. et al. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 4, p.1050-1055, 2006.

SCHAUN, M. I. DIPP, T. ROSSATO, J. DA S. *et al.* The effects of periodized concurrent and aerobic training on oxidative stress parameters, endothelial function and immune response in sedentary male individuals of middle age. **Cell biochemistry and function**, v. 29, n. 7, p. 534-42, out 2011.

SITOHY, M.; DOHEIM, M.; BADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 971-979, 2007.

THAKUR, A. et al. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*: Lectin from *Ganoderma lucidum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 9, p. 1404-1412, 2007.

THE, T.H. e FELTKAMP, T.E.W. THE e Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. II.A reproducible method. **Immunology**, n.18, p. 875, 1970

VAN DAMME, E. J. M. et al. The NeuAc(α -2,6)-GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark type-2 ribosome-inactivating protein with an unusual specificity and structure. **European Journal of Biochemistry**, v. 235, p. 128-137, 1996

WU, J. H. et al. Carbohydrate recognition factors of the lectin domains present in the *Ricinus communis* toxic protein (ricin). **Biochimie**, V. 88, N. 2, P. 201-217, 2006.