

**Ativação clássica aumenta macropinocitose e fagocitose de trombócitos de
galinha *in vitro***

FREDERICO NOLASCO CERQUEIRA

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Campos dos Goytacazes, RJ

Novembro - 2022

Ativação clássica aumenta macropinocitose e fagocitose de trombócitos de galinha *in vitro*

FREDERICO NOLASCO CERQUEIRA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia. Área de concentração: Biologia Celular.

Orientador: Dr. Renato Augusto DaMatta

Campos dos Goytacazes, RJ

Novembro – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA
UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

C416 Cerqueira, Frederico Nolasco.

Ativação clássica aumenta macropinocitose e fagocitose de trombócitos de galinha *in vitro* / Frederico Nolasco Cerqueira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

49 f. : il.
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2022.

Orientador: Renato Augusto Damatta.

1. Trombócitos . 2. LPS. 3. Macropinocitose . 4. Fagocitose . 5. NADH. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

Ativação clássica aumenta macropinocitose e fagocitose de trombócitos
de galinha *in vitro*

FREDERICO NOLASCO CERQUEIRA

Dissertação apresentada ao
Centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para a obtenção do
título de mestre em Biociências
e Biotecnologia. Área de
concentração: Biologia Celular.

Aprovado em 29 de novembro de 2022.

Comissão examinadora:



INFORMAÇÕES DO DOCUMENTO
Documento capturado em 25/01/2023 13:37:06 (HORÁRIO DE BRASÍLIA - UTC-3)
por MARCO CESAR CUNEGUNDES GUIMARÃES (CIDADÃO)
Valor Legal: COPIA SIMPLES | Natureza: DOCUMENTO DIGITALIZADO
Conferência: DOCUMENTO CAPTURADO SEM CONFERÊNCIA

A disponibilidade do documento pode ser conferida pelo link: <https://e-docs.es.gov.br/d/2023-801/M3S>

Marco Cesar Cunegundes Guimarães – UFES

Glauber Monteiro Dias - UENF

Milton M. Kanashiro - UENF

Renato Augusto DaMatta – UENF

Orientador

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Renato Augusto DaMatta. Muito obrigado por todo o ensinamento, confiança, dedicação e paciência. Tenho imenso respeito e gratidão, e sempre vou te levar como exemplo profissional e de vida.

Ao Prof. Sergio Henrique Seabra, que foi imprescindível durante todo trabalho, seja com ajuda ou com sua contagiante energia motivadora.

Aos meus colegas de laboratório. Pedro Souto Rodrigues e Felipe Figueirôa Moreira, pela constante ajuda nos experimentos e ensinamentos. Tâmara Carolina Gomes Ribeiro que começou junto comigo a vida acadêmica, sempre me aconselhando e ouvindo minhas reclamações. Renata Vasconcelos Moreira Freitas, Taymara Sabino Tavares Jorge, Milena de Farias Azeredo, Eliane Irani Barbosa Pegado, Lícia da Silva Paula, Maicley Ferreira Pereira, Ana Carolina de Pádua Alpino Pereira, Saulo Augusto Alves da Cruz, Ana Beatriz Miranda de Sá, Marcos Roberto Dias Campos, Lara Manhães Rezende, Maria Eduarda Fernandes de Souza, Marcela Firme do Amaral, Ruan Gomes Botelho, Daniel Areias da Silva Raquita, Giulia Madeira Rios, Eron Ewaldo Von Linsingen Netto. Pessoas incríveis que sou muito grato de ter conhecido e ter trabalhado.

Aos professores, alunos, técnicos e servidores do LBCT por toda assistência para a realização desse trabalho.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT), ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia (PPGBB), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos meus amigos de fora da UENF, que mesmo não estando ativamente durante o trabalho sempre me incentivaram. Em especial Guilherme Machado Ribeiro Silva, Carlos Frederico Rangel de Almeida Ribeiro e Lucas Ferreira Lopes, meus colegas de mestrado de outras áreas de pesquisa.

Aos meus pais José Luiz Gomes Cerqueira e Zilá Ramos Nolasco Cerqueira, que são meus alicerces. Sempre fazendo o máximo possível para me ajudar. Aos meus irmãos David Nolasco Cerqueira e Maria Luiza Nolasco Cerqueira, por todo o carinho e compreensão. Amo vocês.

À minha companheira Fernanda Silva Mesquita Carrozzino Werneck, pessoa mais importante que foi minha força motriz desde o início até a conclusão desse trabalho. Muito obrigado.

Sumário	Página
Lista de abreviaturas	I
Lista de figuras	III
Resumo.....	IV
Abstract.....	V
1. Introdução	6
2. Revisão bibliográfica	7
2.1. Endocitose.....	7
2.1.1. Fagocitose	8
2.1.2. Macropinocitose	11
2.2. Trombócitos.....	13
2.3. Avaliação do metabolismo energético por FLIM.....	17
3. Objetivos	18
3.1. Objetivo geral	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
3.2.1- Verificar a capacidade fagocítica e atividade macropinocítica de trombócitos de galinhas ativadas ou não com LPS e MC.	18
3.2.2- Avaliar o metabolismo energético pelo tempo de emissão da fluorescência do NADH de trombócitos de galinhas ativadas ou não com LPS e MC.	18
4. Materiais e Métodos	19
4.1. Galinhas	19
4.2. Obtenção dos trombócitos.....	19
4.3. Produção do meio condicionado de baço de galinha (MC)	19
4.4. Ativação das células.....	20
4.5. Coloração com Giemsa e contagem diferencial de células	20
4.6. Atividade macropinocítica por espectrofotômetro.....	20
4.7. Atividade macropinocítica por Microscopia óptica	20
4.8. Bactérias.....	21
4.9. Atividade fagocítica	21
4.10. Avaliação do metabolismo energético por FLIM.....	21
4.11. Análise dos resultados.....	21
5. Resultados	22
5.1. Purificação de cultura de trombócitos <i>in vitro</i>	22
5.2. Ensaios de macropinocitose de trombócitos e monócitos	22
5.3. Ativação de trombócitos aumenta atividade macropinocítica	27
5.4. Ativação de trombócitos aumenta atividade fagocítica	28

5.5. Ativação torna os trombócitos glicolíticos	30
6. Discussão	33
7. Conclusão	37
8. Perspectivas	38
9. Referências bibliográficas	38

Lista de abreviaturas

ACK - *Ammonium-chloride-potassium*/Tampão de lise

CDR - *Circular dorsal ruffles*/Perturbações circulares do dorso membranar

CLIC/GEEC - *Clathrin independent carrier/GPI-enriched endocytic compartment*/Carregadores independentes de clatrina com compartimentos enriquecidos por proteínas glicosilfosfatidilinositol ancoradas

ConA - Concanavalina A

CR - Receptor do sistema complemento

DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco

FITC – *Fluorescein isothiocyanate*/Isotiocianato de fluoresceína

FLIM - *Fluorescence lifetime imaging microscopy*/Microscopia de imagem de tempo de vida de fluorescência

GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*/Fator de estimulador de colônia de macrófagos granulócitos

G-CSF - *Granulocyte colony-stimulating factor*/Fator de estimulador de colônia de granulócitos

Hank - Solução de sais balanceada de Hank

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

IFN- α - Interferon-alfa

IFN- γ - Interferon-gamma

iNOS - *Inducible nitric-oxide synthases*/Óxido nítrico sintase indutível

LPS - Lipopolissacarídeo

LTD - Ácido lipoteicóico

MC - Meio condicionado por células de baço ativada com ConA

MHC - *Major histocompatibility complex*/Complexo principal de histocompatibilidade

M-CSF - *Macrophages colony-stimulating factor*/Fator de estimulador de colônia de macrófagos

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NO - Óxido nítrico

PAMP - *Pathogen-associated molecular pattern*/Padrões moleculares associadas à patógenos

PBS - Tampão fosfato salino

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PRR - Receptores de reconhecimento de padrões

Rab - *Ras analog in brain*/Proteína relacionada a Ras

RNA - Ácido ribonucleico

SFB - Soro fetal bovino

TLR - *Toll-like receptor*/Receptores do tipo Toll

VN - Vermelho neutro

WGA - *Wheat germ agglutinin*/Aglutinina de germe de trigo

Lista de figuras	Página
Figura 1 - Diferentes tipos de endocitose.	8
Figura 2 - Formação do fagossomo pela fagocitose em 4 etapas.	11
Figura 3 - Mecanismo da macropinocitose.	13
Figura 4 - Porcentagem de trombócitos, monócitos e outros tipos celulares após centrifugação em diferentes porcentagens de Percoll e adesão em lamínulas por 1 h.	22
Figura 5 – Absorbância (433 nm) de lisado de cocultivo de trombócitos e monócitos após incubação por 1 h com diferentes concentrações de vermelho de neutro (VN).	23
Figura 6 – Porcentagem de trombócitos que apresentaram macropinosomo(s) contendo vermelho neutro (VN) após incubação por 1 h com diferentes concentrações de VN.	24
Figura 7 – Trombócitos com e sem a presença de macropinosomos contendo vermelho neutro (VN) visualizados por contraste interferencial de Nomarski.	25
Figura 8 – Monócitos e trombócitos com e sem a presença de macropinosomos contendo vermelho neutro (VN) visualizados por contraste interferencial de Nomarski.	26
Figura 9 – Porcentagem de trombócitos com macropinosomos contendo vermelho neutro (VN) categorizados por número de vacúolos positivos após incubação por 1 h com diferentes concentrações.	26
Figura 10 – Porcentagem de trombócitos ativados ou não com macropinosomos contendo vermelho neutro (VN).	27
Figura 11 – Porcentagem de monócitos ativados ou não com macropinosomos contendo vermelho neutro (VN).	28
Figura 12 – Bactéria fagocitada por trombócito.	29
Figura 13 – Fagocitose de bactérias por trombócitos ativados ou não.	30
Figura 14 – Trombócitos ativados ou não por 30 min com lipopolissacarídeo (LPS) e meio condicionado de células do baço ativadas com ConA (MC).	31
Figura 15 – Trombócitos ativados ou não por 1 h com lipopolissacarídeo (LPS) e meio condicionado de células do baço ativadas com ConA (MC).	32
Figura 16 – Intensidade de sinal de NADH livre de trombócitos.	33

Resumo

Trombócitos são células sanguíneas presentes nos vertebrados não mamíferos com atividade homóloga a plaquetas de mamíferos, atuando na hemostasia e coagulação sanguínea. No entanto, trombócitos têm sido descritos como imunologicamente ativos, ressignificando o papel biológico dessas células. Objetivando entender o possível papel imunológico de trombócitos, analisamos a capacidade endocítica e estado metabólico dessas células ativadas. Trombócitos foram obtidos do sangue periférico de galinhas utilizando centrifugação em Percoll e ativados com lipopolissacarídeo e meio condicionado por células de baço ativadas com ConA (fonte de Interleucinas-4 e 6, interferon-gamma e Fator estimulador de colônia de granulócito macrófago). Atividades endocíticas dos trombócitos foram realizadas com vermelho neutro (macropinocitose) e bactérias (fagocitose), e o metabolismo energético analisado pela presença de NADH livre. O uso de diferentes porcentagens de Percoll resultou em cultivos similares de trombócitos com uma purificação de 80%, contendo a presença de outras células sanguíneas, principalmente, monócitos. Trombócitos não ativados macropinocitaram vermelho neutro, avaliados por microscopia e espectrometria, apresentando cerca de 35% de células macropinocíticas com quantidade variada de vacúolos contendo vermelho neutro. Essas células também foram capazes de fagocitar bactérias, mas em número reduzido (0,5%). A ativação dos trombócitos aumentou para 75% a quantidade de células macropinocíticas, e 15 vezes mais bactérias foram internalizadas. Essa ativação induziu metabolismo glicolítico em trombócitos avaliado pelo tempo de duração da fluorescência de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH). O aumento da endocitose e a alteração metabólica dos trombócitos ativados sugere um papel imunológico efetor dessas células.

Palavras chave: Trombócitos, LPS, macropinocitose, fagocitose, NADH.

Abstract

Thrombocytes are blood cells present in non-mammalian vertebrates with homologous activity to mammalian platelets, acting in hemostasis and blood clotting. However, thrombocytes have been described as immunologically active, redefining the biological role of these cells. Aiming to understand the possible immunological role of thrombocytes, we analyzed the endocytic capacity and metabolic state of these activated cells. Thrombocytes were obtained from peripheral blood of chickens using Percoll centrifugation and activated with lipopolysaccharide and conditioned medium by ConA-activated spleen cells (source of Interleukins-4 and 6, interferon-gamma and granulocyte macrophage colony-stimulating factor). Endocytic activities of thrombocytes were carried out with neutral red (macropinocytosis) and bacteria (phagocytosis), and energy metabolism analyzed by the presence of free NADH. The use of different percentages of Percoll resulted in similar cultures of thrombocytes with a purification of 80%, containing the presence of other blood cells, mainly monocytes. Non-activated thrombocytes macropinocytotic neutral red, evaluated by microscopy and spectrometry, showing about 35% of macropinocytotic cells with varied amount of vacuoles containing neutral red. These cells were also capable of phagocytizing bacteria, but in reduced numbers (0.5%). Thrombocyte activation increased the amount of macropinocytotic cells to 75%, and 15 times more bacteria were internalized. This activation induced glycolytic metabolism in thrombocytes as measured by the duration of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) fluorescence. The increase in endocytosis and the metabolic alteration of activated thrombocytes suggests an effector immunological role of these cells.

Keywords: Thrombocytes, LPS, macropinocytosis, phagocytosis, NADH.

1. Introdução

Trombócitos são células nucleadas presentes no sistema circulatório de vertebrados não mamíferos que atuam na hemostasia (Edmonds, 1968). Essas células possuem também um possível papel no sistema imunológico (Chang & Hamilton, 1979), assim como seus homólogos nos mamíferos, as plaquetas (Svoboda *et al.*, 2014). Mais recentemente, uma série de artigos apresentou evidências do envolvimento imunológico de trombócitos analisando a expressão de transcritos após ativação com bactérias, vírus (Ferdous & Scott, 2015) e produtos bacterianos (Ferdous *et al.*, 2008; 2016) ressignificando o papel dessas células na resposta inflamatória.

A endocitose é um mecanismo celular multivariado que as células utilizam para internalizar partículas, fluidos e solutos extracelulares pela membrana plasmática formando vacúolos no citoplasma (Doherty & McMahon, 2009). Macropinocitose e fagocitose são exemplos de endocitose (Li *et al.*, 2020) que estão intimamente ligadas à função imunológica (Marsh & Helenius, 2006). Macrófagos são células imunológicas altamente especializadas que possuem grande capacidade macropinocítica e fagocítica após sua ativação com lipopolissacarídeo (LPS) e interferon-gama (IFN- γ) (Condon *et al.*, 2018). Trombócitos foram descritos tendo grande capacidade fagocítica (Glick *et al.*, 1964; Chang & Hamilton, 1979; Nagasawa *et al.*, 2012) e macropinocítica (Roland & Birrenkott, 1998), mas a capacidade fagocítica é limitada (DaMatta *et al.*, 1998a). No entanto, após ativação, essas células expressam transcritos relativos à resposta imune (Ferdous *et al.*, 2008; 2016; Ferdous & Scott, 2015), que pode possibilitar aumento das capacidades endocíticas dessas células no contexto da resposta imune.

Desse modo trombócitos de galinha foram utilizados *in vitro* para avaliar se sua ativação, utilizando LPS e meio condicionado contendo citocinas, aumentaria a capacidade macropinocítica de vermelho neutro (VN), e fagocítica de bactérias. Essa possível modulação poderá indicar um papel mais ativo dessas células no sistema imunológico de aves.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Endocitose

Endocitose é a capacidade das células de captar material externo através da invaginação da membrana plasmática formando um novo compartimento celular envolto por membrana biológica (Doherty & McMahon, 2009). As células são capazes de efetuar a regulação de várias cascatas de sinalização pela endocitose (Hoeller *et al.*, 2005), e alguns vírus (Marsh & Helenius, 2006) e protozoários (de Carvalho *et al.*, 2015) patogênicos conseguem ultrapassar a membrana plasmática e infectar células hospedeiras utilizando as vias endocíticas. Existem diferentes mecanismos de endocitose, como: endocitose mediada por clatrina, endocitose dependente de caveolina, endocitose tipo CLIC/GEEC (CLIC, *clathrin independent carrier*) e (GEEC, *GPI-enriched endocytic compartment*), endocitose dependente de flotilina, CDRs (*circular dorsal ruffles*), fagocitose e pinocitose (Figura 1).

A endocitose mediada por clatrina pode ser relacionada como o inverso da exocitose (Doherty & McMahon, 2009). A clatrina é uma proteína importante para a formação de vacúolos responsáveis pelo fluxo de moléculas dentro da célula. Vacúolos revestidos de clatrina concentram moléculas e são direcionados para organela destino (Schmid & McMahon, 2007). A endocitose dependente de caveolina ocorre pela internalização de macromoléculas por caveolas, que são pequenas invaginações na membrana plasmática (Stang *et al.*, 1997) que medem em média 60 nm de diâmetro (Parton & Richards, 2003). As caveolas são revestidas geralmente pela proteína caveolina, contendo colesterol e esfingolípídeos (Marechal *et al.*, 2001). A endocitose do CLIC/GEEC são curvaturas na membrana plasmática, independente das proteínas de revestimento clatrina e caveolina, que se destacam em vacúolos endossomais com várias proteínas ancoradas por Glicosilfosfatidilinositol (GPI). A endocitose mediada por flotilina utiliza as proteínas flotilina-1 e flotilina-2, (proteínas associadas a membrana e ligadas a microdomínios lipídicos), para o processo de endocitose (Doherty & McMahon, 2009). As CDRs são estruturas formadas por F-actina e cortactina que ocorrem quando algumas células são estimuladas por fatores de crescimento (Mellström *et al.*, 1988), sendo associadas com a captação de partículas por macropinocitose (Brunk *et al.*, 1976).

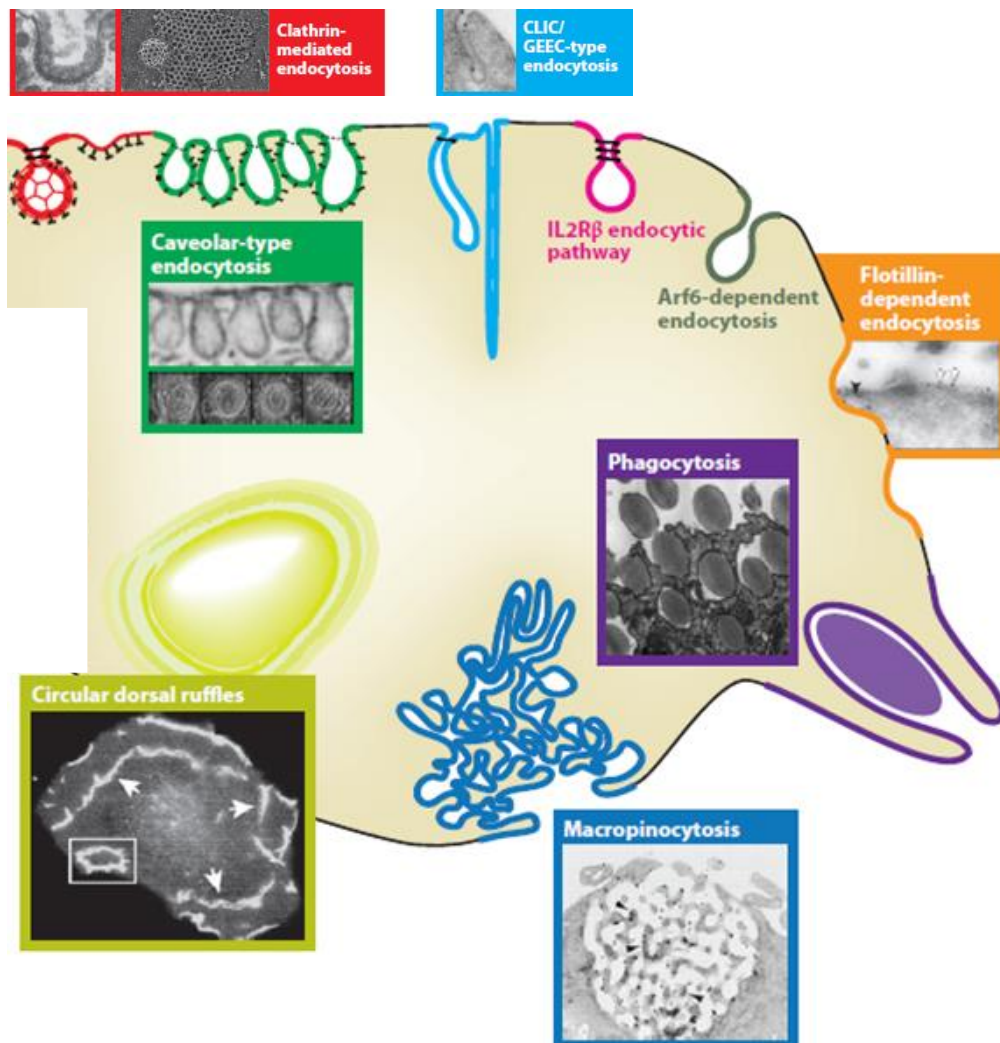


Figura 1 – Diferentes tipos de endocitose – O esquema representa diferentes tipos de endocitose descobertos pela microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de fluorescência. Podemos observar no esquema a pinocitose mediada por clatrina (vermelho), endocitose mediada por caveolina (verde), endocitose do tipo CLIC/GEEC (azul), estruturas associadas a endocitose dependente de flotilina (laranja) fagocitose (roxo), macropinocitose (azul marinho) e CDRs (amarelo). Adaptado de Doherty & McMahon (2009).

2.1.1. Fagocitose

A fagocitose, na defesa imunológica de metazoários, é um processo celular que reconhece grandes partículas ($\geq 5 \mu\text{m}$) e as internalizam em vacúolos que fundem com lisossomos formando fagolisossomos onde o material fagocitado é digerido (Naik & Harrison, 2013, Levin *et al.*, 2016). Macrófagos, células dendríticas e neutrófilos são as células que apresentam grande capacidade fagocítica sendo reconhecidas como fagócitos profissionais (Lancaster *et al.*, 2019). Essas células possuem mecanismos específicos para o processo de identificação e engolfamento

de partículas em vacúolos chamadas de fagossomos (Figura 2). Os receptores de membrana das células fagocíticas que identificam partículas que podem ser fagocitadas são divididos em receptores não opsônicos e receptores opsônicos. Os receptores não opsônicos, como lectinas tipo C (Dambuza & Brown, 2015) e receptor tipo Toll (TLR), identificam alvos moleculares nos patógenos (Kawai & Akira, 2011). Já os receptores opsônicos detectam proteínas próprias do hospedeiro, conhecidas como opsoninas, os principais são: anticorpos e proteínas específicas do sistema complemento (Flannagan *et al.*, 2012).

Esses receptores são responsáveis pela primeira etapa da fagocitose, que consiste na identificação da partícula que será internalizada. Os receptores não opsônicos conseguem reconhecer padrões moleculares associadas à patógenos (PAMPs), sendo conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (Uribe-Querol & Rosales, 2020). Os receptores de lectinas do tipo C são exemplos de moléculas PAMPs que conseguem detectar esses padrões e iniciar o processo de fagocitose (Li & Underhill, 2020). Alguns exemplos são a lectina-1, que pode identificar polissacarídeos de levedura (Herre *et al.*, 2004), e receptor MINCLE (*Macrophage inducible Ca²⁺-dependent lectin receptor*), que pode identificar dimicolato de trealose (TDM) presente na parede celular de algumas micobactérias (Ishikawa *et al.*, 2009). Os receptores opsônicos conseguem reconhecer porções específicas de moléculas próprias, que podem desencadear a ativação da fagocitose e outros processos. Os receptores Fcγ são glicoproteínas que conseguem identificar com especificidade a parte Fc (Fragmentos cristalizáveis) dos anticorpos IgG (Imunoglobulina G) (Rosales & Uribe-Querol, 2013) que após o contato forma o complexo antígeno-anticorpo que inicia o processo fagocítico (Rosales & Uribe-Querol, 2013). Existem também os receptores que identificam moléculas do sistema complemento, que pode ser dividido em três grupos, CR1 e CR2, CR3 e CR4, e CR1g (*Complement receptor*) (Dustin, 2016). Receptores auxiliares são responsáveis por facilitar a adesão da partícula que será internalizada, podendo remover outras moléculas da membrana do fagócito abrindo espaço na membrana para a ligação da receptor-anticorpo (Freeman *et al.*, 2016).

A segunda etapa do processo de fagocitose consiste na internalização da partícula identificada. A internalização da partícula se inicia com a polimerização da actina do citoesqueleto cortical resultando na formação de pseudópodes (projeção da membrana plasmática) ao redor da partícula e concomitante invaginação da

membrana plasmática (Flannagan *et al.*, 2012). Os receptores Fcγ após a ligação com o anticorpo, ativam quinases da família Src que fosforilam as tirosinas ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), assim ativam a tirosina Syk (*spleen tyrosine kinase*) que fosforila diversos substratos ativando diferentes respostas celulares (Rosales, 2007). O receptor CR3 é considerado o mais eficiente em se tratando de fagocitose iniciada pelo sistema complemento (Rosales, 2007), no qual, diferente dos outros processos, foi mostrado que a partícula afunda na membrana celular sem a formação de pseudópodes (Aderem & Underhill, 1999). Ademais, existe o envolvimento do citoesqueleto de actina e microtúbulos, diferente dos receptores Fcγ que recrutam somente os filamentos de actina (Allen & Aderem, 1996).

A terceira etapa do processo de fagocitose é caracterizado pela formação do fagossomo que é um grande vacúolo contendo a partícula internalizada. A composição lipídica da membrana do fagossomo é alterada (Levin *et al.*, 2016) e o citoesqueleto de actina remodela seu formato (Freeman & Grinstein, 2014). O fagossomo sofre um processo de maturação, que consiste na combinação de fusões e fissões com outros endossomos, até a posterior fusão com lisossomos resultando na formação do fagolisossomo, constituindo a última etapa do processo de fagocitose (Canton, 2014). Endossomos iniciais se fusionam ao fagossomo recém formado regulado pela enzima GTPase Rab5 (*Ras analog in brain*) (Levin *et al.*, 2016), que recruta a molécula EEA1 (early endosome antigen 1) que vai formar uma conexão entre os endossomos iniciais e vacúolos endocíticos (Christoforidis *et al.*, 1999). Com a maturação a enzima Rab7, que regula a fusão do fagossomo com endossomos tardios, substitui Rab5 (Rink *et al.*, 2005). Ocorre também um acúmulo de moléculas na membrana como, V-ATPases, que acidificam o lúmen do fagossomo (Marshansky & Futai, 2008), e LAMPs (*lysosomal-associated membrane proteins*) (Canton, 2014).

A formação do fagolisossomo é o último estágio da maturação do fagossomo, onde ocorre a fusão de lisossomos (Levin *et al.*, 2016). O fagolisossomo é extremamente microbicida, por possuir um pH ácido, em função do acúmulo de V-ATPases na membrana (Marshansky & Futai, 2008), consegue produzir ROS (*reactive oxygen species*), que são gerados pela NADPH oxidase que reduz oxigênio molecular (Babior, 2004), além de conter diversas enzimas hidrolíticas (Kinchen & Ravichandran, 2008).

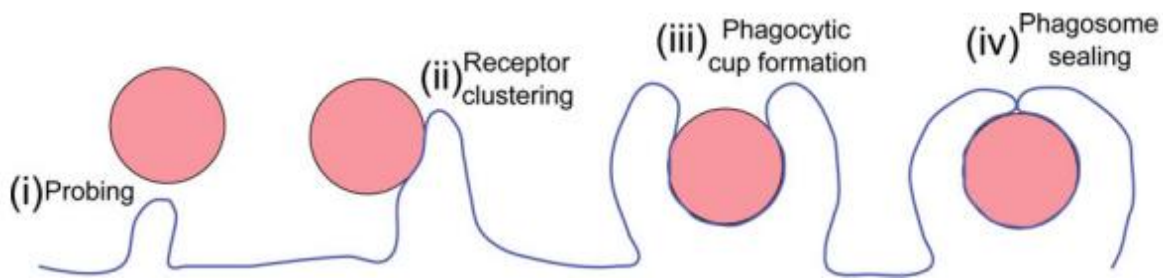


Figura 2. Formação do fagossomo pela fagocitose em 4 etapas. (i) Identificação, (ii) ligação por receptor, (iii) formação dos pseudópodes, e (iv) formação do fagossomo. Traduzido de Levin *et al.* (2016).

2.1.2. Macropinocitose

A pinocitose foi descoberta e denominada por Lewis em 1931, compreendendo a captação não seletiva de partículas ou fluidos extracelulares em vacúolos citoplasmáticos proporcionada pela polimerização da actina (King & Kay, 2019). Com a microscopia eletrônica, pinossomas não resolvíveis por microscopia óptica foram descritos, renomeando o processo para macropinocitose como visto por Lewis, distinguindo de outros processos endocíticos que formam pinossomos (Swanson & King, 2019, Fawcett *et al.*, 1965). A macropinocitose consiste na captação de partículas entre 3-70 Kda (Li *et al.*, 2015) e formação de vacúolos com o tamanho de 0,2-5 μm denominadas macropinosomas (Lim & Gleeson, 2011), se diferencia da micropinocitose que compreende na captação de partículas menores de 3 Kda e posterior formação de vacúolos revestidas por clatrina ou pequenos vacúolos não revestidos (Araki, 1996). A macropinocitose é caracterizada pela rápida captação de solutos no fluido extracelular sendo importante para os processos de nutrição celular, sinalização, apresentação de antígenos e migração celular (Lim & Gleeson, 2011). O processo é iniciado pela polimerização da actina presente na membrana plasmática que forma pequenas extensões de membrana chamadas de *membrane ruffling* (Lim & Gleeson, 2011), e após a captação do soluto, as extensões de membrana se fecham em formato de “cálice”, formando vacúolos circulares no citoplasma celular chamadas de macropinosomo (Lim *et al.*, 2015) que irá digerir o conteúdo com a fusão com lisossomos e reciclar os vacúolos (Figura 3). Apesar de das diferenças é difícil distinguir a macropinocitose da fagocitose de forma inequívoca (Griffiths *et al.*, 2022).

Diferentes tipos celulares são capazes de realizar macropinocitose e esse processo pode ser o processo mais eficiente de captação de grande volume de fluido extracelular (Lin *et al.*, 2020). Organismos unicelulares como a ameba *Dictyostelium* utiliza a macropinocitose para a aquisição de nutrientes presentes no meio extracelular (Williams & Kay, 2018). Ademais, nematoides com *Caenorhabditis elegans* são usados como modelo de macropinocitose *in vivo* utilizando suas células de defesa, as *scavenger cells* (Fares & Greenwald, 2001). Em organismos vertebrados existem muitos estudos de macropinocitose utilizando células imunológicas, uma vez que o macropinosomo apresenta bastante semelhança com o fagolisossomo oriundo da fagocitose (Racoosin & Swanson, 1993).

Células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, os chamados fagócitos profissionais, apresentam altos índices de macropinocitose, internalizando grande volume de soluto extracelular (Norbury, 2006). Foi demonstrado que a eficiência da apresentação de antígenos via MHC (complexo principal de histocompatibilidade) das células dendríticas se dá pela sua alta capacidade macropinocítica (Sallusto *et al.*, 1995). Fagócitos profissionais como os macrófagos realizam a macropinocitose de forma constitutiva (Norbury *et al.*, 1995), e sua atividade é dependente do receptor CaSR (*Calcium-sensing receptor*) e cálcio extracelular (Canton *et al.*, 2016). Os iniciadores da macropinocitose são pequenas moléculas GATPases como Ras, Rac e Arf6 (*ADP ribosylation factor 6*) (Swanson *et al.* 2008). A melhora na atividade da micropinocitose está relacionada com a ativação de receptores tirosina quinases, como a EGFR (*epidermal growth factor receptor*) e PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) que aumentam a polimerização da actina da superfície celular (West *et al.* 1989; Haigler *et al.*, 1979), além de outros receptores como, o receptor de insulina e *colony stimulation factor 1 receptor* (CSF1R) (Griffiths *et al.*, 2022). Alguns ativadores clássicos de células imunes, como LPS aumentam a atividade macropinocítica dessas células em macrófagos (Condon *et al.*, 2018) e células dendríticas (West *et al.*, 2004). Células cancerígenas obtêm nutrientes para seu crescimento utilizando o processo de macropinocitose, sendo assim, entender esse processo pode possibilitar nova ferramenta para tratamento de câncer (Ha *et al.*, 2016). As vias metabólicas da macropinocitose não são bem conhecidas e não são exclusivas em cada tipo celular. A SNX5 (*sorting nexin 5*) foi mostrado como um possível regulador da taxa de macropinocitose em macrófagos, mas não mostrou o mesmo resultado em células dendríticas (Lim *et al.*, 2015). A PI3K (*phosphoinositide*

3-kinase) pode regular a macropinocitose em macrófagos pela oclusão dos macropinosomos (Araki, 1996). A macropinocitose pode ser considerado o método mais eficiente para uma célula absorver uma grande quantidade de fluidos extracelulares com grande impacto na fisiologia celular (Li *et al.*, 2020). Apesar de possível rota para tratamento de doenças, os estudos de macropinocitose são em sua maioria realizados *in vitro* pelo método de retirada e posterior adição de meio, que não ocorre naturalmente nos organismos (Griffiths *et al.*, 2022). Ensaios da capacidade endocítica pode ser um bom indicativo da atividade celular em células do sistema imunológico.

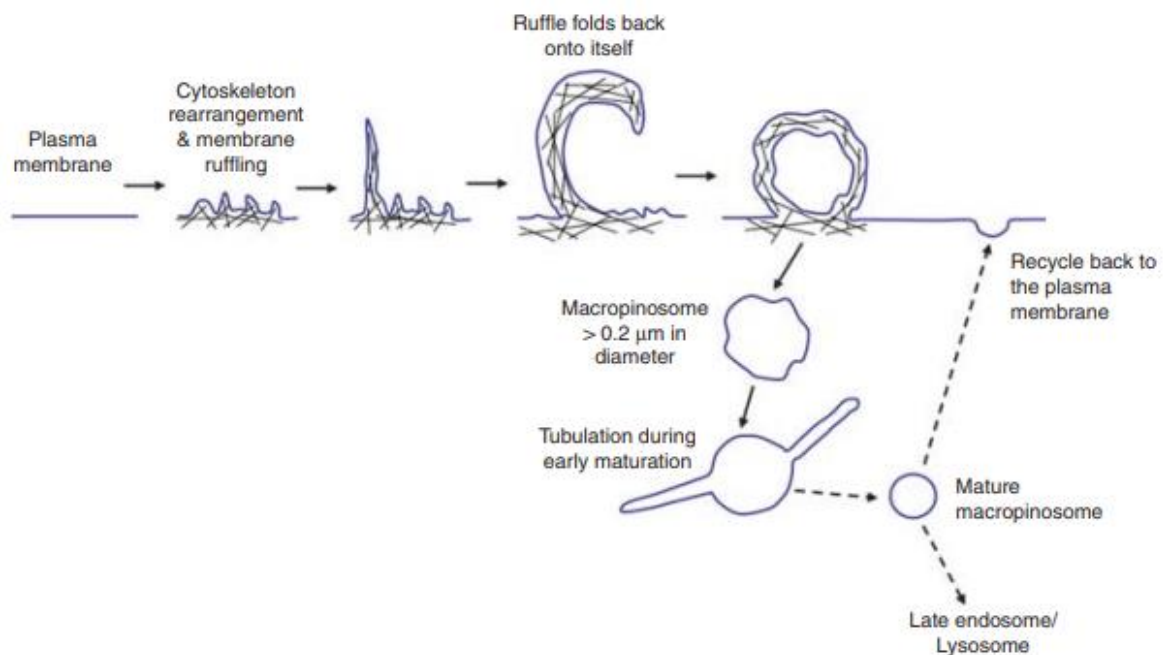


Figura 3 - Mecanismo da macropinocitose. A macropinocitose envolve polimerização e rearranjo dos filamentos de actina do córtex celular formando projeções da membrana plasmática. As projeções se embrulham e fusionam puxando solvente e soluto e formando o macropinosomo. A maturação do macropinosomo termina com a fusão com lisossomo e reciclagem dos vacúolos. Traduzido de Lim & Gleeson (2011).

2.2. Trombócitos

Trombócitos são células nucleadas do sistema circulatório de vertebrados não mamíferos que possuem papel semelhante às plaquetas nos mamíferos (Edmonds, 1968), atuando principalmente na coagulação sanguínea (Stalsberg & Prydz, 1963). Os leucócitos mais abundantes no sangue de galinhas são os trombócitos, (Chang & Hamilton, 1979) e utilizando Percoll para separar as células sanguíneas (Perloft *et al.*, 1978), pode-se obter mais de 80% de pureza dessas células na cultura (DaMatta

et al., 1998a, b). A linhagem de progenitores trombocítica/eritrocítica de vertebrados não mamíferos é funcionalmente equivalente à linhagem de progenitores megacariocítica/eritrocítica de mamíferos; os progenitores celulares dessas células possuem características fenotípicas e mecanismos de sinalização similares (Svoboda *et al.*, 2014). Vertebrados não mamíferos possuem trombócitos e eritrócitos fenotipicamente semelhantes contendo núcleo e com o formato oval (Ratnoff, 1987). A semelhança morfológica entre essas células pode ser explicada, pois são formadas pela mesma célula progenitora, os “progenitores trombócitos-eritrócitos” em vertebrados não mamíferos (Bartunek *et al.*, 2008).

A função de hemostasia realizada por trombócitos ocorre em casos de rompimento vascular. Nesse caso essas células são ativadas pelo contato com componentes da matriz extracelular, induzindo aglomeração umas às outras e ativação da protrombina, resultando em fibrinogênio clivado, formação de fibrina e o coágulo sanguíneo propriamente dito, que impede o extravasamento do sangue (George, 2000). Apesar de plaquetas e trombócitos serem diferentes morfológicamente, desempenham essa função hemostática de forma similar (Stalsberg & Prydz, 1963).

Os trombócitos (5-8 μm de diâmetro) são células maiores que plaquetas humanas (1-2 μm de diâmetro), com formato semelhante a leucócitos, possuindo núcleo (Lucas & Jamroz, 1961). Essas células têm um sistema de membrana plasmática invaginada, conhecido como sistema canalicular que permite maior eficiência na comunicação com o meio externo (Khanderkar *et al.*, 2012). Esse mesmo sistema também pode ser encontrado em menor proporção nas plaquetas (Daimon *et al.*, 1977). Além disso, trombócitos possuem grânulos positivos para a enzima fosfatase ácida, semelhante aos grânulos lisossomais das plaquetas (Carlson *et al.*, 1968).

Além da participação nos processos de homeostase e coagulação sanguínea, outras funções dos trombócitos estão relacionadas a processos imunes e suas ações na defesa do organismo. Trombócitos de galinha participam em processos inflamatórios (Grecchi *et al.*, 1980) e foram descritas como tendo alta atividade fagocítica em galinhas (Glick *et al.*, 1964) e alguma atividade em peixes (Nagasawa *et al.*, 2012). No entanto, nosso grupo mostrou que essa capacidade fagocítica é consideravelmente menor que os monócitos de galinha (DaMatta *et al.*, 1998a). Durante a infecção de galinhas por malária aviária foi descrito o aparecimento de

trombócitos atípicos (com núcleo alongado ou dois núcleos), trombocitopenia e foram encontrados merozoítos de *Plasmodium gallinaceum* dentro desses trombócitos. Esses resultados sugerem consumo excessivo dessas células durante a infecção explicando a trombocitopenia (Macchi *et al.*, 2013). Essas células ativadas com LPS expressam genes de interleucinas pró-inflamatórias, como IL-1Beta, IL-6 e IL-12 (Ferdous *et al.*, 2008), expressam genes para diversos TLRs, e apresentam atividade inflamatória e ação contra vírus (St. Paul *et al.*, 2012).

Na década de 60 estudos mostraram que trombócitos podem exercer essa função de aderir e englobar partículas por fagocitose, sendo descritas como as células sanguíneas mais fagocíticas em galinhas (Glick *et al.*, 1964). Trombócitos de anfíbios e répteis são descritos como capazes de internalizar partículas de carbono (Dawson, 1933). Trombócitos de galinhas fagocitam bactérias que são degradadas em seus vacúolos (Carlson *et al.*, 1968). Ademais, foi demonstrado por microscopia de fluorescência e eletrônica de transmissão a fagocitose de microesferas fluorescentes e bactérias em trombócitos de peixes e anfíbios, além da formação do fagolisossomo mostrando que as partículas estavam internalizadas (Nagasawa, *et al.*, 2014). Contudo, os trombócitos não podem ser considerados fagócitos profissionais, pois mostram uma capacidade limitada de fagocitar bactérias e protozoários, como *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*, sendo que esse último penetra ativamente nos trombócitos (DaMatta *et al.*, 1998a).

Trombócitos também possuem capacidade macropinocítica mostrada em estudo utilizando VN. Essas células aumentaram sua captação de partículas conforme a temperatura foi sendo elevada. Foram comparadas as temperaturas de 41°C em relação a 37°C em ensaio *in vitro* (Roland & Birrenkott, 1998). O corante VN é uma partícula com cor facilmente internalizada por diversos tipos celulares sendo considerado um ótimo indicador para ensaio de pinocitose e viabilidade celular (Weeks *et al.*, 1987).

A utilização da técnica de sequenciamento de RNA na última década possibilitou a descoberta de vários genes relacionados ao sistema imunológico nos trombócitos além de comprovar que essas células possuem um papel mais ativo durante a infecção por patógenos. Esses artigos utilizaram trombócitos ativados por antígenos de bactéria (LPS e LTD - ácido lipoteicóico) e de vírus (Poly dt e Poly A:C) e, através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), obtiveram resultados conclusivos da presença de genes imunológicos nessas células (Ferdous *et al.*,

2017). Trombócitos apresentam transcritos para citocinas inflamatórias, IL-1-Beta, IL-6, IL-8, IL-12 e IFN-alfa (Nagasawa, *et al.*, 2014, St. Paul *et al.*, 2012, Ferdous *et al.*, 2008); receptores tipo Toll, TLR 2, TLR 3, TLR 4, TLR 5, TLR 7 e TLR 21 (St. Paul *et al.*, 2012); e iNOS (do inglês *inducible nitric-oxide synthases*) (St. Paul *et al.*, 2012, Nagasawa, *et al.*, 2014). Os TLRs são complexos proteicos transmembranais que podem reconhecer antígenos, denominados como PAMPs (Akira, 2001). Após a ativação de trombócitos com antígeno de vírus foram detectados transcritos de iNOS enzima que induz a produção de óxido nítrico (NO), participante do processo antimicrobiano nos fagócitos profissionais, assim como descreveram rápida formação de NO, detectado pelo reagente de Griess (Ferdous & Scott, 2014). Trombócitos de peixes expressam genes de TLR e MHC classe II, indicativos de células que processam e apresentam antígenos (Fink *et al.*, 2015). Esses transcritos que codificam proteínas importantes para a atividade imunológica encontrados em trombócitos ativados podem classificar esse tipo celular como um agente efetor da atividade imune e na inflamação causada por patógenos em galinhas.

Foi o que concluiu o grupo liderado por Ferdous e colaboradores em 2016 que sequenciou o transcriptoma total de trombócitos de galinha ativados por LPS expandido ainda mais os genes relacionados à atividade imunológica que eram conhecidos anteriormente. Foi descrito que as interleucinas mais expressas foram IL-6, IL-8 e IL-1Beta, todas relacionadas a resposta inflamatória. Outros transcritos também foram bastante expressos, como G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor), unidade B do receptor de TNF (*Tumor Necrosis Factor*), membro da ARSI (*Arylsulfatase*), F3 (*Coagulation Factor 3*) e IRG1 (*Immunoresponsive 1 Homolog*) (Ferdous *et al.*, 2016).

Outro método para ativação de trombócitos pode ser a utilização de meio condicionado de linfócitos de baço com Concanavalina A, uma vez que esse meio condicionado é fonte de citocinas pró-inflamatórias em mamíferos como IL-6, IFN- γ e GM-CSF (Abe *et al.*, 1991), além da sua combinação com LPS, visto que a ativação de macrófagos por LPS aumenta sua capacidade fagocítica (Islam *et al.*, 2013; Guimarães *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2009) e macropinocítica (Condon *et al.*, 2018). Macrófagos peritoneais inativados de galinha não tem a capacidade de destruir células tumorais *in vitro*, porém depois de ativados com LPS e com MC adquirem a capacidade de destruir células tumorais (Qureshi & Miller, 1991) e células dendríticas se tornam microbicidas ao serem ativadas com IFN- γ (Pan *et al.*,

2004). A capacidade de trombócitos de exercer atividade imunológica (como por exemplo, atividade endocítica) pode ser testada com alguns ensaios clássicos realizados por células da defesa imunológica.

2.3. Avaliação do metabolismo energético por FLIM

FLIM (Microscopia de imagem de tempo de vida de fluorescência) é uma técnica de microscopia que explora as propriedades fluorescentes de moléculas presentes em células vivas, ganhou popularidade devido à sua alta capacidade de detectar o ambiente molecular e possíveis mudanças na conformação molecular. A técnica de FLIM tem sido amplamente usada em imagens moleculares autofluorescentes para estudar o metabolismo celular. A técnica fornece parâmetros únicos sobre a saúde celular de uma maneira não destrutiva e é frequentemente usado para estudar organismos vivos (Stringari *et al.*, 2015). Quando uma molécula no estado fundamental absorve luz de energia igual ou maior que os níveis de energia mais altos, um elétron é excitado para um nível de energia mais alto por um curto período. O elétron sofrerá relaxamento vibracional até o nível vibracional mais baixo do estado excitado por um processo não radiativo chamado conversão interna. A partir do estado eletrônico excitado, as moléculas retornam ao estado fundamental por um processo radioativo ou não radioativo (Datta *et al.*, 2020). A fluorescência é um processo no qual as moléculas (fluoróforos) decaem para o estado inicial emitindo fótons detectáveis (na escala de tempo de 10^{-10} s). Esta emissão obrigatória do mais baixo nível eletrônico excitado garante que o espectro de emissão permaneça o mesmo e seja independente do comprimento de onda de excitação. A energia do fóton de fluorescência emitido é menor devido à perda de energia no relaxamento vibracional e conversões internas. Essa mudança no comprimento de onda de emissão é chamada de Stokes (Datta *et al.*, 2020).

Os sistemas biológicos são ricos em fluoróforos endógenos que são usados para imagens moleculares de autofluorescência. Os fluoróforos endógenos são poderosos biomarcadores porque suas propriedades de emissão são frequentemente influenciadas por seu microambiente, bem como a morfologia, estado metabólico e condições patológicas da amostra. A imagem de fluoróforos endógenos é vantajosa porque evita a administração de corantes fluorescentes externos, contornando assim as complicações introduzidas por esses agentes de contraste, incluindo ligação inespecífica, toxicidade e interferência com o funções

bioquímicas e fisiológicas da amostra. Além disso, a imagem de autofluorescência pode ser facilmente traduzido para monitoramento in vivo em modelos animais para medidas clínicas (Datta *et al.*, 2020).

A glicólise e a fosforilação oxidativa são vias metabólicas celulares que podem ser aferidas por FLIM (Datta *et al.*, 2020). Ambas as vias envolvem dinucleotídeos de NADH. No entanto, NADH presente na glicólise é livre e o presente na fosforilação oxidativa é ligado. O estado de ligação de NADH pode ser mensurado avaliando os distintos tempos de vida de fluorescência emitida pela molécula. Quer dizer, NADH excitado por onda eletromagnética, se livre ou ligado, emite fluorescência em tempos distintos, independente da presença de marcadores exógenos. NADH livre emite por aproximadamente 0,4 ns; NADH ligado emite por 2 a 4 ns. Essa diferença nos tempos de vida da fluorescência emitida é capaz de ser detectada por FLIM permitindo avaliar se a célula viva tem mais NADH livre ou ligado. Portanto, o estado metabólico da célula, se mais glicólise, fosforilação oxidativa ou ambas, pode ser inferido pelo tempo de vida da fluorescência do NADH. Logo, FLIM é capaz de avaliar alteração metabólica de células e tecidos vivos (Datta *et al.*, 2020). A medição do tempo de fluorescência de NADH pela técnica FLIM pode indicar o metabolismo glicolítico de macrófagos após serem ativados (Alfonso-Garcia *et al.*, 2016), o que pode ser similar ao processo de ativação de trombócitos, fazendo com que essas células possam ser analisadas pela técnica FLIM.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Compreender a funcionalidade de trombócitos de galinha após ativação com citocinas e LPS analisando a resposta endocítica e metabolismo celular.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1- Verificar a capacidade fagocítica e atividade macropinocítica de trombócitos de galinhas ativadas ou não com LPS e MC.

3.2.2- Avaliar o metabolismo energético pelo tempo de emissão da fluorescência do NADH de trombócitos de galinhas ativadas ou não com LPS e MC.

4. Materiais e Métodos

4.1. Galinhas

Esse estudo foi realizado com galinhas da linhagem Cobb adultas obtidas em estabelecimento comercial em Campos dos Goytacazes, RJ. Os animais foram mantidos em gaiolas com acesso a água e alimentação balanceada no aviário do CBB. Esse projeto é parte do projeto guarda-chuva “Macrófagos, heterófilos e trombócitos na inflamação da malária aviária: efeito da aminoguanidina” que está certificado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UENF (protocolo 386, até 07/2022).

4.2. Obtenção dos trombócitos

Seringa contendo 50 µl de heparina foi usada para coletar 3 mL de sangue da veia da asa das galinhas mantidas com água *ad libitum* e 100 g de ração 1 vez por dia. O sangue coletado foi levado para o laboratório e imediatamente diluído na proporção 1:1 em *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM). Essa mistura foi adicionada sobre Percoll (55%, 60% e 65%) e centrifugada, sem freio, a 600 x g, 20°C por 20 min. O plasma diluído foi descartado e as células (leucócitos mononucleares e trombócitos) coletadas, lavadas duas vezes com 500 µl de solução de Hank por poço e ressuspendidas em 5 mL de solução de Hank para centrifugação a 500 x g, 4°C por 10 min. As células foram coletadas e lavadas, ressuspendidas em DMEM, contadas e plaqueadas (150 µL de 1×10^7 células/mL) em lamínulas ou não (500 µL de 1×10^7 células/mL) em placas de 24 poços por 1 h a 37°C em 5% CO₂. Após o tempo de aderência os trombócitos foram ativados ou não com 2 µg/mL de LPS puro ou com 20 % de MC por meia e 1 h. As células foram lavadas com solução de Hank, fixadas, coradas com Giemsa para determinar a porcentagem de trombócitos, monócitos e outras células; ou mantidas em DMEM para experimento de caracterização funcional dos trombócitos.

4.3. Produção do meio condicionado de baço de galinha (MC)

Conforme descrito por Guimarães *et al.* (2010), o baço de galinha foi coletado e rompido com 5 mL de PBS para liberação dos leucócitos. O tecido rompido foi centrifugado (500 g, 10 min, 20° C) e o sedimento ressuspenso em 1 mL de PBS. Foi utilizado 5 mL de tampão ACK (*ammonium-chloride-potassium*) para lisar as hemácias por 5 minutos. Os leucócitos foram centrifugados (500 g, 10 min, 20° C),

contados (1×10^6 células por mL) e plaqueados com 5 mL de meio suplementado (DMEM, SFB e antibióticos) em garrafas de cultura. Foi utilizado 15 µg/ml da lectina ConA por 48 h para ativar os linfócitos T, que produz citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e GM-CSF (Abe *et al.*, 1991). O sobrenadante foi centrifugado para remoção das células, coletado e armazenado à -20°C.

4.4. Ativação das células

Após o cultivo por 1 h as células aderidas sobre lamínulas nos poços da placa foram ativadas com 1 µg/mL e 2 µg/mL de LPS ou com a combinação de 2 µg/mL de LPS e 20 % de MC por 30 min e 1 h.

4.5. Coloração com Giemsa e contagem diferencial de células

As células aderidas sobre lamínulas nos poços da placa foram fixadas com solução de formaldeído 4%, lavadas com phosphate-buffered saline (PBS) e água destilada. Solução de Giemsa na proporção 1:9 com água destilada foi colocada nos poços cobrindo as lamínulas por 10 min. O corante foi retirado e as lamínulas lavadas com água, desidratadas em diferentes soluções de acetona e xilol. As lamínulas foram montadas em lâminas com Entellan.

4.6. Atividade macropinocítica por espectrofotômetro

Os trombócitos de galinhas foram aderidos nos poços sem lamínulas da placa de 24 poços, sem lamínula, e incubados com 500 µl de DMEM contendo VN. A incubação das células com solução de VN foi realizada inicialmente com diferentes concentrações (0, 10, 20, 40, 80, 160 µg/ml) no intervalo de 1 h. Após a incubação, as células foram lavadas com solução de Hanks e 500 µl de álcool ácido (3% HCl em etanol 100%) foi adicionado por poço para lisar as células liberando o VN. O lisado foi coletado e a absorbância avaliada no leitor de placas à 533 nm. Uma amostra contendo apenas álcool ácido foi usada como branco. Uma curva padrão da solução de VN em álcool ácido contendo 2,5; 1,25; 0,625 e 0,313 µg/ml de VN foi montado, lido no leitor de placas e uma reta de regressão usada para determinar a concentração macropinocitada pelos trombócitos.

4.7. Atividade macropinocítica por Microscopia óptica

Após a separação, cocultivo em lamínulas e ativação, os trombócitos e monócitos de galinhas foram incubadas por 1 h a 37 °C com 500 µl de DMEM

contendo 160 µg/ml VN. Após a incubação as células foram lavadas e as lamínulas montadas com 5 µL de DMEM. As células foram observadas usando microscópio óptica Zeiss Axioplan para avaliar a presença de vacúolos contendo VN nas células. 100 células foram contadas por lamínula.

4.8. Bactérias

Bactérias (*Escherichia coli*) foram cultivadas à 37 °C em caldo de peptona para obter as colônias. As culturas foram lavas com 5 mL de PBS e fluoresceinadas utilizando FITC (Isotiocianato de fluoresceína) conforme DaMatta *et al.* (1989b). As bactérias foram autoclavadas por 15 min e incubadas com 0,1 mg/mL de FITC em 0.1 M bicarbonato de sódio, pH 9, à 25 °C. Depois de 1 h, as bactérias foram lavas 5 vezes com 5 mL de PBS, aliquotadas e armazenadas à -20 °C.

4.9. Atividade fagocítica

Após a separação, cultivo em lamínulas e ativação por 1h, os trombócitos foram incubados por 1 h à 37 °C com bactérias fluoresceinadas por FITC na razão de 10:1. Após a interação as células foram lavadas e as lamínulas montadas com 5 µL de brometo de etídio (25 ug/mL). As células foram observadas usando microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan para avaliar sua atividade fagocítica, distinguindo trombócitos com bactéria internalizada (verde), aderida (vermelha) ou não presente (DaMatta *et al.*, 1998b). 100 células foram contadas por lamínula.

4.10. Avaliação do metabolismo energético por FLIM

Após a separação, cultivo em lamínulas e ativação ou não, de 1 e 2 µg/mL de LPS (lipopolissacarídeos) e MC ativados por ConA para ativação das células por diferentes intervalos de tempo (30 min e 1 h). As lamínulas contendo os trombócitos aderidos foram seladas em lâminas com parafina e levadas para uma incubadora de células à 37°C em 5% CO₂ e analisadas no microscópio confocal Zeiss LSM 710, afim de analisar as diferenças metabólicas dessas células pelo decaimento da fluorescência de NADH. A fluorescência de NADH foi analisada utilizando laser na frequência de 305 nm e o WGA da membrana dos trombócitos foi analisada utilizando laser na frequência de 488 nm.

4.11. Análise dos resultados

Foram calculadas médias e erro padrão das contagens de células e leitura de VN de no mínimo três experimentos em triplicatas. A análise estatística destes

dados foi realizada através dos testes One-Way, Two-Way ANOVA, pós-teste de Turkey e teste de múltiplas comparações de Dunnett. Ambas análises foram feitas pelo programa GraphPad Prism 5.0.

5. Resultados

5.1. Purificação de cultura de trombócitos *in vitro*

Para a obtenção de trombócitos do sangue de galinha variou-se as concentrações de Percoll (55%, 60% e 65%) objetivando uma cultura mais pura dessas células. Mesmo variando a concentração de Percoll existe uma contaminação de aproximadamente 20% de outras células (principalmente de monócitos), resultando em um cocultivo com 80% de trombócitos (figura 4). As concentrações de Percoll de 60% e 65% renderam maior número de células ($6 \times 10^7/\text{mL}$) do que 55% ($1 \times 10^7/\text{mL}$).

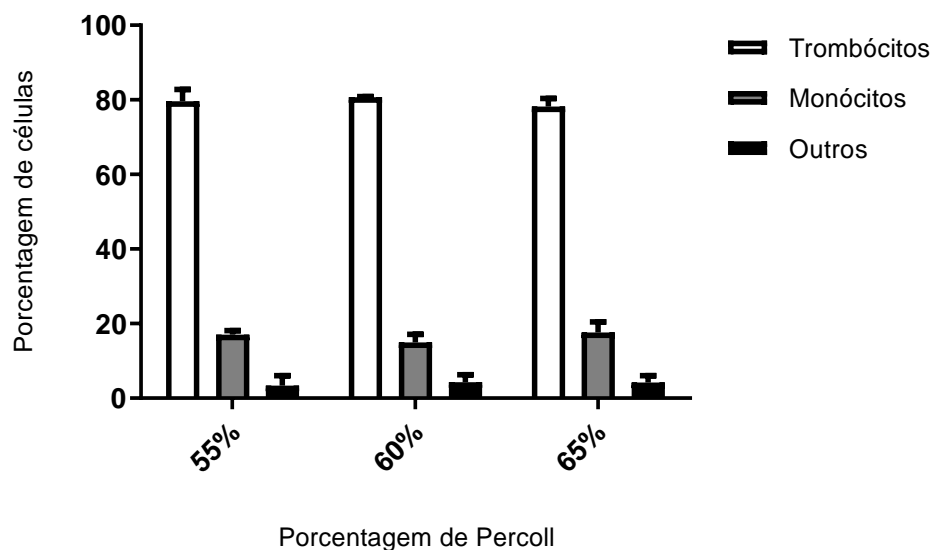


Figura 4 - Porcentagem de trombócitos, monócitos e outros tipos celulares após centrifugação em diferentes porcentagens de Percoll e adesão em lamínulas por 1 h. Ensaio realizado por microscopia de campo claro, 100 células foram contadas por lamínula. Dados em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Não houve diferença entre as barras da mesma categoria celular pelo teste Two-Way ANOVA.

5.2. Ensaio de macropinocitose de trombócitos e monócitos

As células do cocultivo apresentaram uma capacidade significativa de atividade macropinocítica. A macropinocitose dessas células variou com a concentração de VN no meio de cultivo. Percebeu-se crescente absorção de VN,

pelo aumento da absorbância, pelas células conforme o aumento da concentração do soluto (Figura 5). Visto a quantidade de monócitos presentes na cultura *in vitro* e a alta capacidade macropinocítica dessas células (Norbury, 2006), foi realizado uma análise por microscopia óptica da cultura a fim de observar o VN dentro das células. A porcentagem de trombócitos com vacúolos contendo VN positivo das diferentes concentrações foi avaliada por microscopia de campo claro, mostrando que cerca de 30-40% dessas células apresentaram pelo menos um vacúolo com VN e não houve diferença significativa na taxa de macropinocitose com o uso das diferentes concentrações de VN (Figura 6). Esse dado indicou que a quantificação da macropinocitose tinha que ser realizada por microscopia óptica, separando o resultado de trombócitos de monócitos.

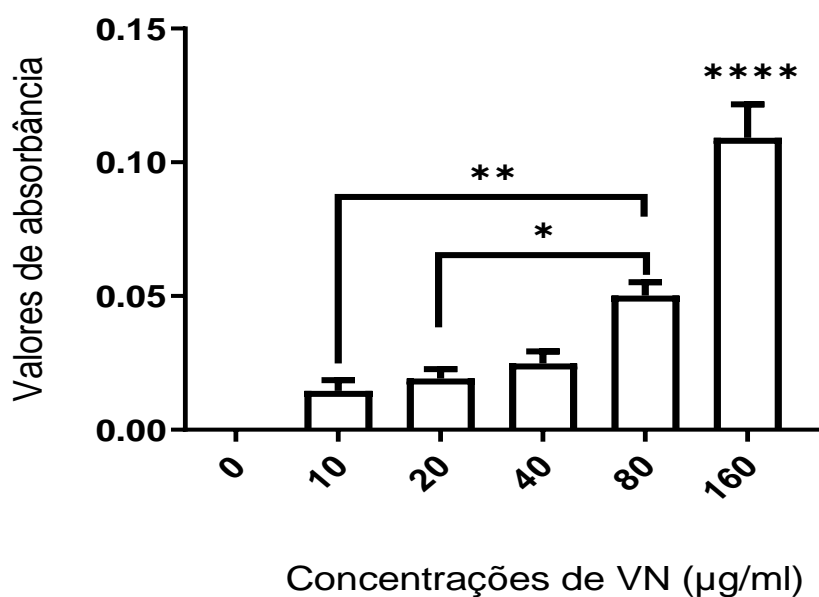


Figura 5 – Absorbância (433 nm) de lisado de cocultivo de trombócitos e monócitos após incubação por 1 h com diferentes concentrações de vermelho de neutro (VN). Dados em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$ pelo teste One-Way ANOVA e pós-teste de Turkey.

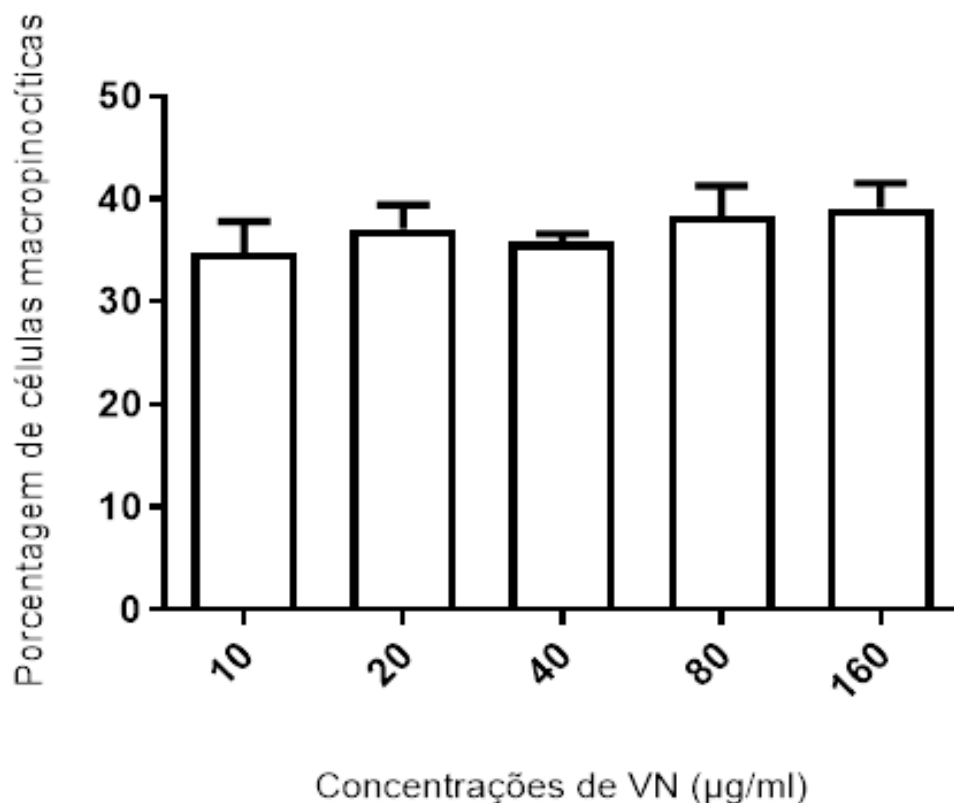


Figura 6 – Porcentagem de trombócitos que apresentaram macropinosomo(s) contendo vermelho neutro (VN) após incubação por 1 h com diferentes concentrações de VN. Ensaio realizado por microscopia de campo claro, 100 células foram contadas por lamínula. Dados em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Não houve diferença entre as barras pelo teste One-Way ANOVA.

Foram encontrados trombócitos com variadas capacidades de captação de VN. Na figura 7 A pode-se observar trombócitos VN negativo. Em 7 B, C e D, trombócitos apresentaram um ou mais vacúolos contendo VN. Os vacúolos maiores dos trombócitos apresentaram em média 1,5 µm de diâmetro. Também foi observado que os monócitos apresentaram grande quantidade de vacúolos contendo VN (Figura 8), confirmando a necessidade de realizar a análise por microscopia óptica permitindo diferenciar os tipos celulares garantindo uma análise somente dos trombócitos. Como a macropinocitose de VN pelas células da cultura apresentaram diferentes capacidades de captação (trombócitos apresentam diferenças no número de vacúolos), foi feita uma análise percentual da quantidade de vacúolos com VN positivo, mostrando que nas diferentes concentrações houve

uma prevalência de trombócitos com apenas um vacúolo contendo VN, cerca de 55% das células macropinocíticas (Figura 9).

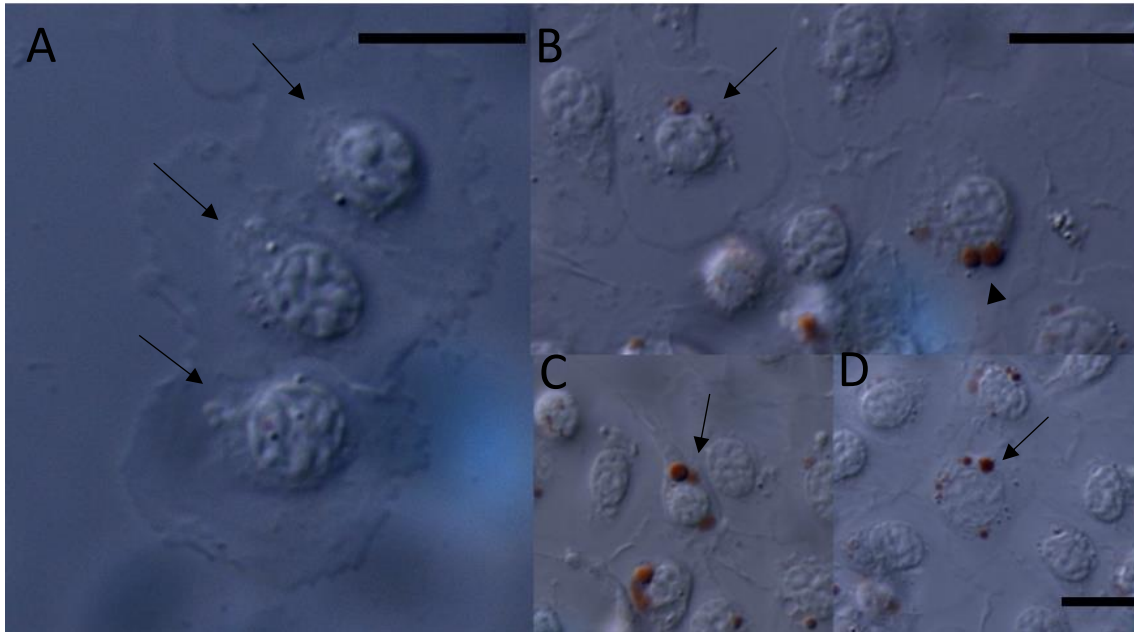


Figura 7 – Trombócitos com e sem a presença de macropinosomos contendo vermelho neutro (VN) visualizados por contraste interferencial de Nomarski. A- Trombócitos com vacúolos negativos para VN (setas). B- Trombócitos com um vacúolo contendo VN (seta) e outro com dois vacúolos contendo VN (cabeça de seta). C- Trombócito com três vacúolos contendo VN (seta). D- Trombócito com quatro ou mais vacúolos contendo VN (seta). Barra = 10 μ m.

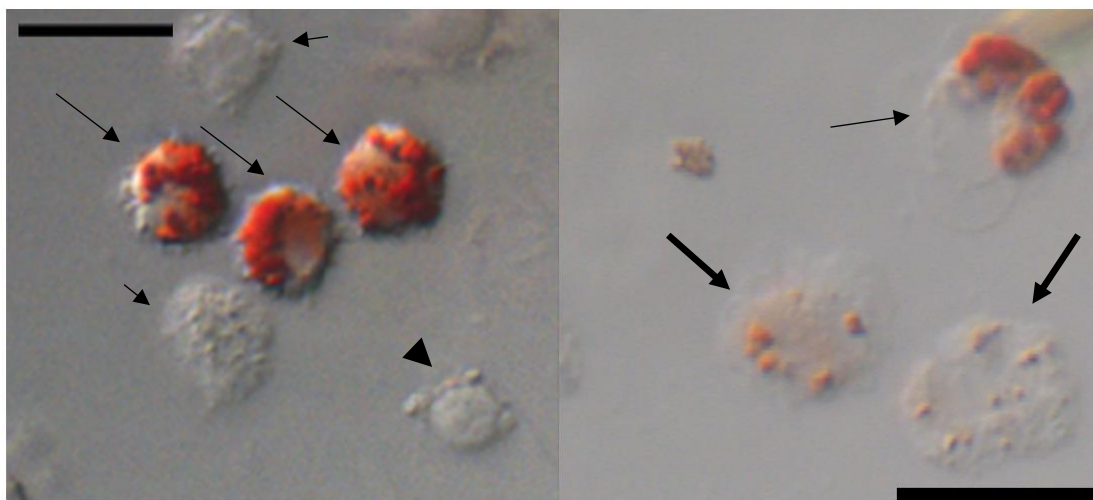


Figura 8 – Monócitos e trombócitos com e sem a presença de macropinossomos contendo vermelho neutro (VN) visualizados por contraste interferencial de Nomarski. Quatro monócitos com grande quantidade de vacúolos contendo VN (setas finas), dois monócitos com pequena quantidade de vacúolos contendo VN (setas grossas), dois monócitos negativos (seta curta), e trombócito com vacúolos negativos para VN (cabeça de seta) podem ser visualizados. Barra = 10 μ m.

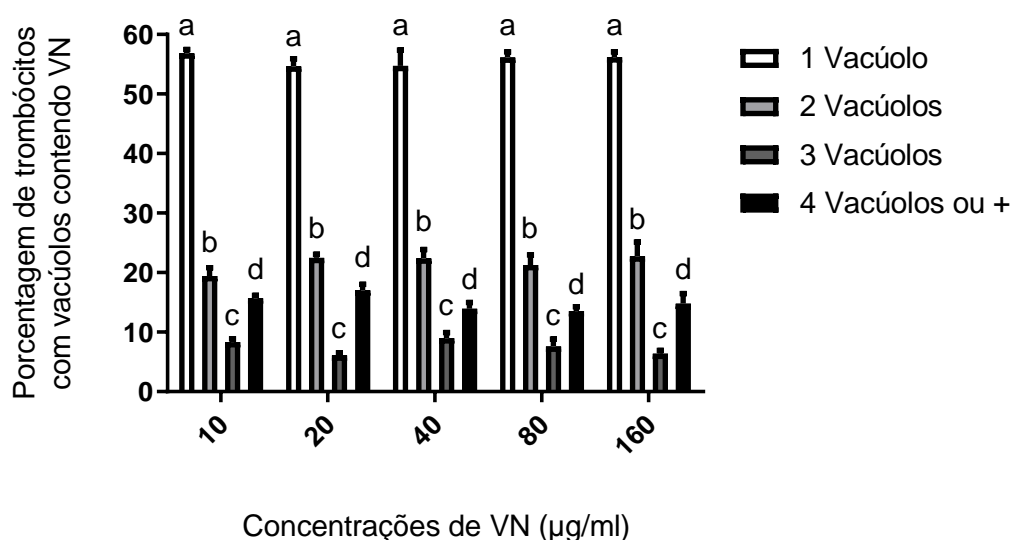


Figura 9 – Porcentagem de trombócitos com macropinossomos contendo vermelho neutro (VN) categorizados por número de vacúolos positivos após incubação por 1 h com diferentes concentrações. Ensaio realizado por microscopia de campo claro, 100 células foram contadas por lamínula. Dados em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Não houve diferença das mesmas categorias de barras entre as diferentes concentrações de VN pelo teste Two-Way ANOVA, mas as letras (a, b, c, d) indicam que as categorias de barras são diferentes entre si pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett.

5.3. Ativação de trombócitos aumenta atividade macropinocítica

Na figura 10 foi testado a se a ativação de trombócitos aumentaria a porcentagem de células com vacúolos contendo VN positivo. Foi utilizado a concentração de 160 µg/ml de VN. Cerca de 55-60% das células ativadas por LPS e 75% das células ativadas por LPS e MC, apresentaram pelo menos um vacúolo contendo VN (figura 10). Também foi contabilizado se a ativação dos monócitos aumentaria a atividade macropinocítica dessas células. Verificou-se aumento de 7% na quantidade células que macropinocitaram VN (Figura 11).

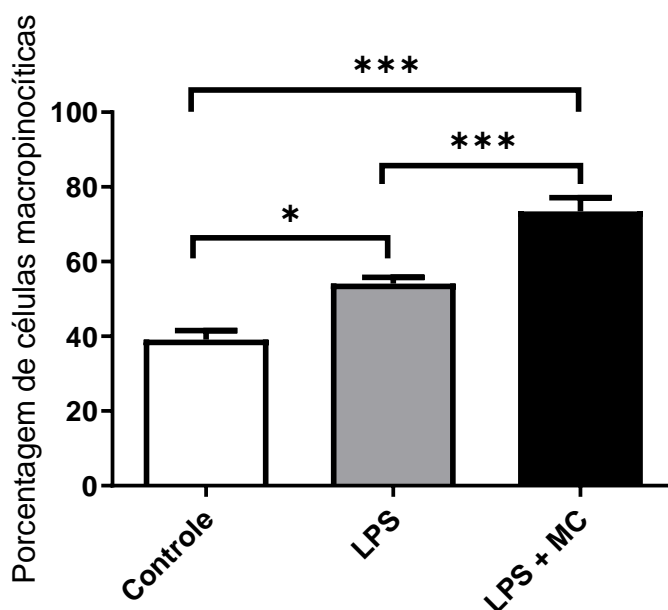


Figura 10 - Porcentagem de trombócitos ativados ou não com macropinosomos contendo vermelho neutro (VN). Células não ativada (controle) interagiram apenas com o VN (barra branca); trombócitos foram ativados com 2 µg/ml de lipopolissacarídeos (LPS) (barra cinza), e ativados com 2 µg/ml de lipopolissacarídeos (LPS) e 20% de meio condicionado de células do baço ativadas com ConA (LPS+MC) (barra preta). Ensaio realizado por microscopia de campo claro, 100 células foram contadas por lamínula. Dados em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,0001$ pelo teste One-Way ANOVA e pós-teste de Turkey.

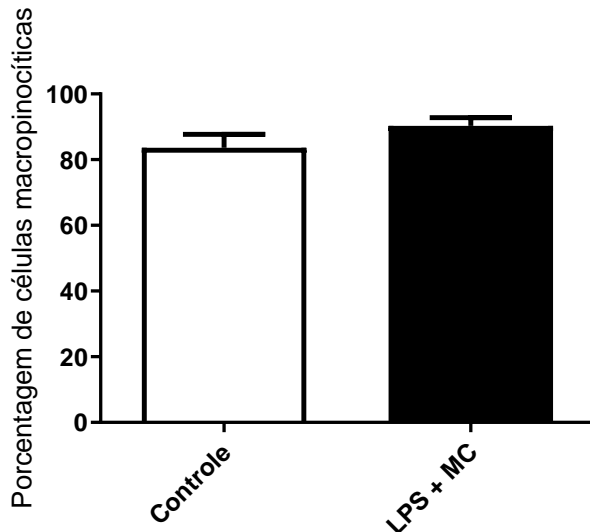


Figura 11 - Porcentagem de monócitos ativados ou não com macropinosomos contendo vermelho neutro (VN). Células não ativada (controle) interagiram apenas com o VN (barra branca) e ativados com 2 µg/ml de lipopolissacarídeos (LPS) e 20% de meio condicionado de células do baço ativadas com ConA (LPS+MC) (barra preta). Ensaio realizado por microscopia de campo claro, 100 células foram contadas por lamínula. Dados em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. Não houve diferença entre as barras pelo teste Turkey.

5.4. Ativação de trombócitos aumenta atividade fagocítica

A atividade fagocítica de trombócitos foi analisada utilizando bactérias fluoresceinadas. Os trombócitos foram ativados com LPS e MC ou não ativados. Após a posterior ativação e interação com as bactérias, as células foram incubadas com solução contendo brometo de etídio que marcam as células e deixam as bactérias não internalizadas vermelhas (DaMatta *et al.*, 1998a). Trombócitos apresentaram bactéria internalizada (Figura 12). Trombócitos ativados com LPS e MC, aumentaram sua atividade fagocítica, quando comparado com o controle e trombócitos ativados apenas com LPS (Figura 13).

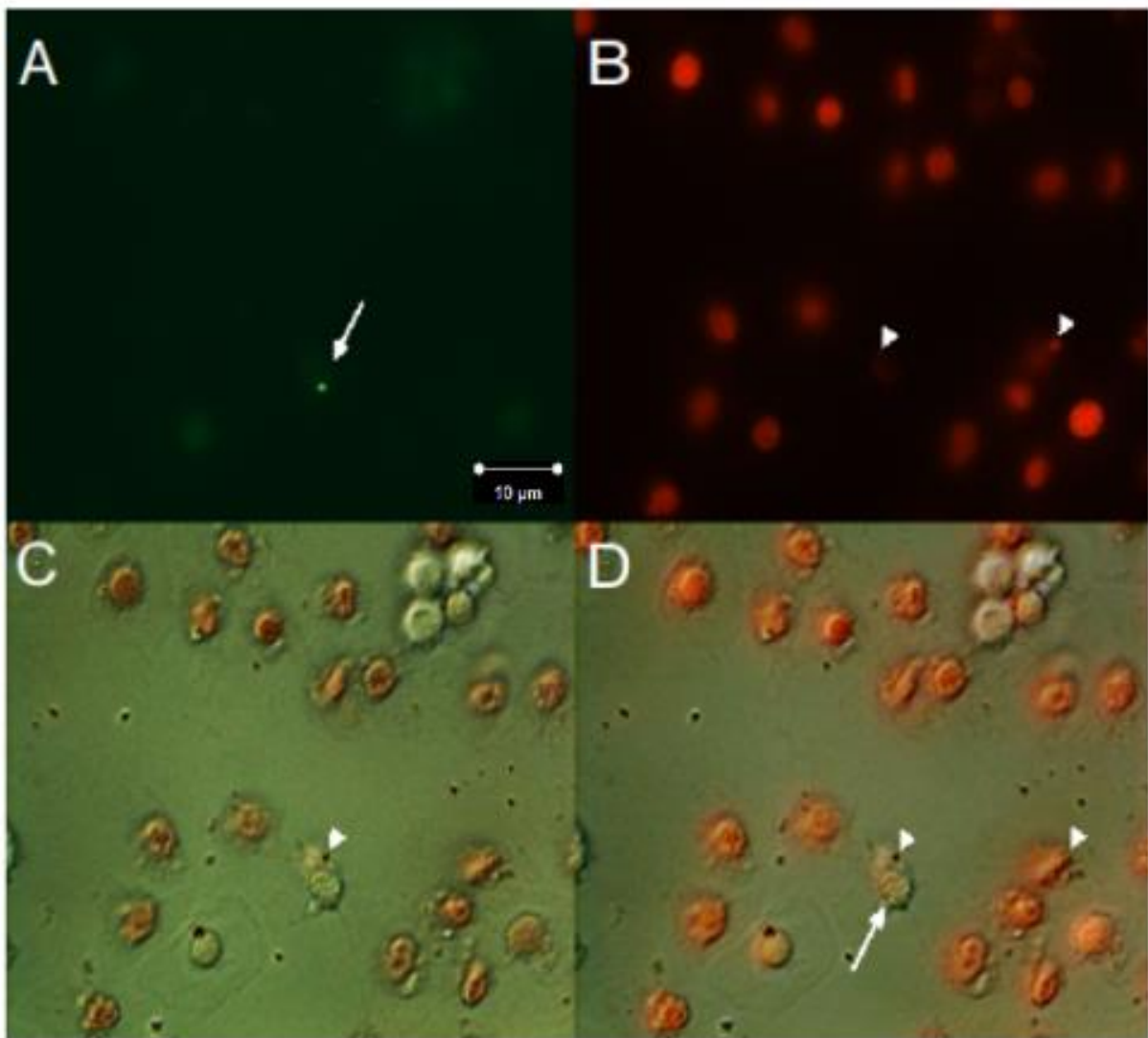


Figura 12 - Bactéria fagocitada por trombócito. Em A vemos uma bactéria fluoresceïnada em verde (seta) por microscopia de fluorescência. Em B vemos trombócitos e bactérias não internalizadas (cabeça de setas) em vermelho corados por solução de brometo de etídio. Em C temos trombócitos em DIC. Em D tem a sobreposição de A, B e C na qual se pode ver a bactéria dentro do trombócito.

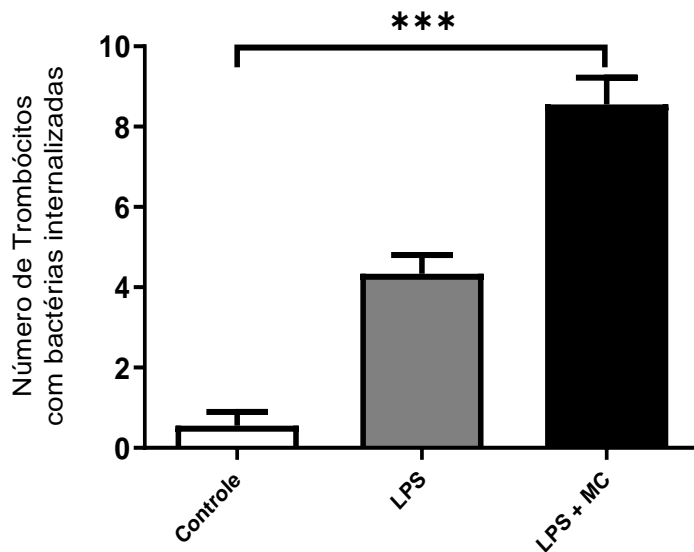


Figura 13 – Fagocitose de bactérias por trombócitos ativados ou não. Células não ativada (controle) interagiram apenas com as bactérias (barra branca); trombócitos foram ativados com 2 µg/ml de lipopolissacarídeos (LPS) (barra cinza), e ativados com 2 µg/ml de lipopolissacarídeos (LPS) e 20% de meio condicionado de células do baço ativadas com ConA (LPS+MC) (barra preta). Ensaio realizado por microscopia de campo claro e fluorescência, 100 células foram contadas por lamínula. Dados em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata. *** $P < 0,0001$ pelo teste One-Way ANOVA e pós-teste de Turkey.

5.5. Ativação torna os trombócitos glicolíticos

Foi utilizada a técnica de FLIM para analisar o tempo de fluorescência de NADH livre inferindo o metabolismo de trombócitos após ativação com LPS e MC ou não ativados. Na figura 14, no tempo de 30 minutos, em A o controle não apresentou resposta. Em C utilizando 1 µg/ml de LPS a resposta foi fraca, mas em E (2 µg/ml de LPS) e G (2 µg/ml de LPS + MC) foi observado sinal de NADH livre dos trombócitos. Em B, D, F e H foi utilizado o marcador WGA para a confirmação da presença de trombócitos. Na figura 15, no tempo de 60 minutos, em A o controle não apresentou resposta. Em C utilizando 1 µg/ml de LPS a resposta foi fraca, mas perceptível. Em E e G, contendo respectivamente 2 µg/ml de LPS e 2 µg/ml de LPS mais o MC, a resposta para a fluorescência de NADH livre nos trombócitos foi maior. Em B, D, F e H foi utilizado o marcador WGA para a confirmação da presença de trombócitos. Foi quantificada a intensidade luminosa da fluorescência dos trombócitos controle e

ativados, e a ativação de trombócitos com 2 $\mu\text{g/ml}$ de LPS mais o MC obteve maior valor (Figura 16).

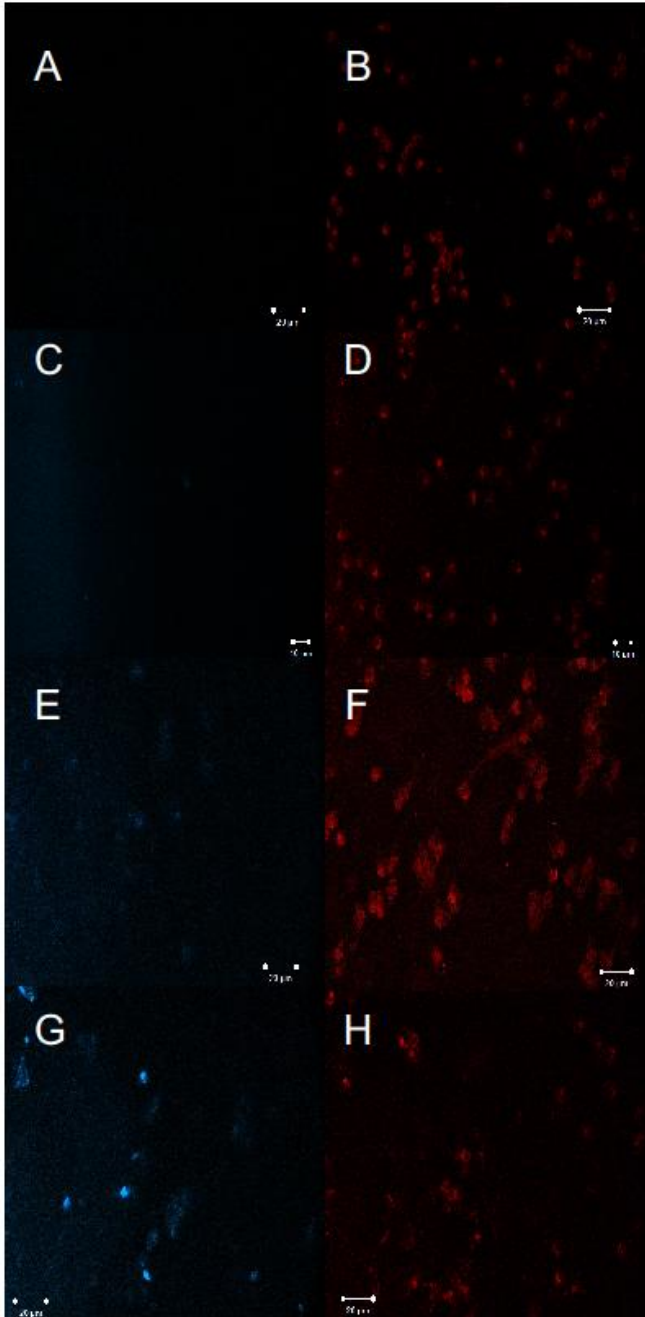


Figura 14 – Trombócitos ativados ou não por 30 min com lipopolissacarídeo (LPS) e meio condicionado de células do baço ativadas com ConA (MC). Imagens de trombócitos com FLIM (Flourescence Lifetime Imaging Microscopy) marcando NADH livre (A, C, E e G). Imagens de trombócitos com membrana plasmática marcada por WGA fluorescente (B, D, F e H). A, B - Controle. C, D - Trombócitos ativados com 1 $\mu\text{g/ml}$ de lipopolissacarídeos (LPS).

E, F - Trombócitos ativados com 2 $\mu\text{g/ml}$ de lipopolissacarídeos (LPS). G, H - Trombócitos ativados com 2 $\mu\text{g/ml}$ de lipopolissacarídeos (LPS) e 20% de meio condicionado de células do baço ativadas com ConA (LPS+MC).

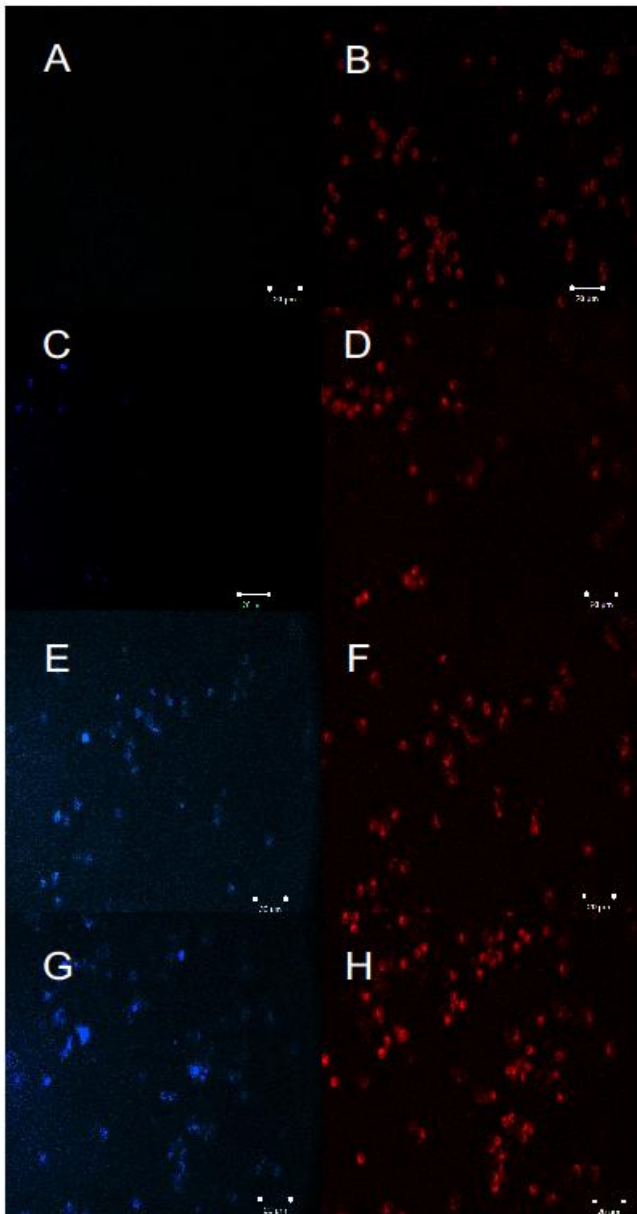


Figura 15 - Trombócitos ativados ou não por 1 h com lipopolissacarídeo (LPS) e meio condicionado de células do baço ativadas com ConA (MC). Imagens de trombócitos com FLIM (Flourescence Lifetime Imaging Microscopy) marcando NADH livre (A, C, E e G). Imagens de trombócitos com membrana plasmática marcada por WGA fluorescente (B, D, F e H). A, B - Controle. C, D - Trombócitos ativados com 1 $\mu\text{g/ml}$ de lipopolissacarídeos (LPS). E, F - Trombócitos ativados com 2 $\mu\text{g/ml}$ de lipopolissacarídeos (LPS). G, H - Trombócitos

ativados com 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lipopolissacarídeos (LPS) e 20% de meio condicionado de células do baço ativadas com ConA (LPS+MC).

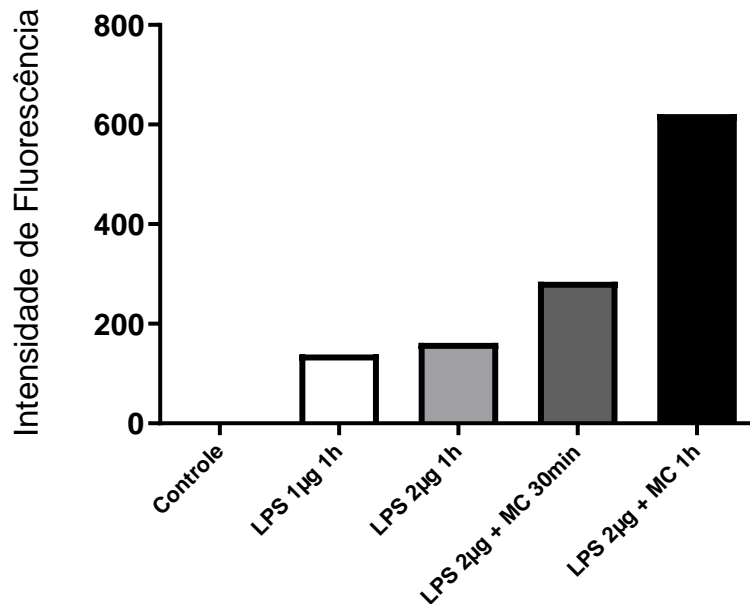


Figura 16 – Intensidade de sinal de NADH livre de trombócitos. Foi utilizado FLIM (*Flourescence Lifetime Imaging Microscopy*) no microscópio confocal para avaliar a presença de NADH livre de trombócitos. Células não ativada (controle); trombócitos foram ativados com: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lipopolissacarídeos (LPS) por 1 h (barra branca); 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS por 1 h (barra cinza clara); 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS e 20% v/v de meio condicionado de células do baço ativadas com ConA (MC) por 30 min (barra cinza escura), e 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS e 20% v/v de MC por 1 h (barra preta).

6. Discussão

Usando como base os recentes estudos que demonstram que trombócitos de diferentes espécies de vertebrados possuem variada gama de atividade no sistema imune (Nagasawa *et al.*, 2012; St. Paul *et al.*, 2012; Ferdous & Scott, 2014; Fink *et al.*, 2015), utilizamos trombócitos do sangue de galinha para experimento funcionais de endocitose e metabolismo. Independente da porcentagem de Percoll usada, uma contaminação de monócitos foi detectada na cultura das células. A análise de macropinocitose por espectrofotometria mostrou que as células captaram mais VN com o aumento da concentração de uso. Em contrapartida, a microscopia óptica revelou que a captação de VN por trombócitos foi estável independente da concentração de VN, indicando que os monócitos contribuíram com o aumento da

absorção de VN nos lisados celulares após o uso de concentração crescentes de VN analisado por espectrofotometria. A maioria dos trombócitos apresentou apenas 1 vacúolo positivo para VN, enquanto os monócitos em sua maioria apresentaram inúmeros vacúolos positivos. A ativação dos monócitos não alterou sua capacidade macropinocítica, entretanto a ativação dos trombócitos aumentou tanto a macropinocitose quanto a fagocitose de bactérias. Os trombócitos quando ativados mostraram metabolismo glicolítico, semelhante aos macrófagos ativados com LPS (Alfonso-Garcia *et al.*, 2016). Esses achados corroboram os resultados recentes (Ferdous *et al.*, 2008; St. Paul *et al.*, 2012; Nagasawa, *et al.*, 2014) indicando a maior participação dos trombócitos no sistema imunológico.

Para a purificação dos trombócitos do sangue de galinha foi utilizado o Percoll, que é um reagente utilizado para separação de células por densidade (Perloft *et al.*, 1978), variando sua porcentagem com base no valor utilizado no estudo com essas células (DaMatta *et al.*, 1998b). Mesmo com diferentes porcentagens de Percoll, utilizando a microscopia óptica para distinguir as células, não se teve alteração na purificação dos trombócitos, sendo 80% o valor médio dessas células na cocultura, como relatado por DaMatta e colaboradores em 1998. A maioria das células não trombócitos nas culturas foram os monócitos, que também são células aderentes, e possuem densidade muito semelhante aos trombócitos. Como a variação de Percoll não teve influência na purificação dos trombócitos e as concentrações de 60% e 65% resultaram em maior número de células, os experimentos foram realizados utilizando Percoll 60%. Dessa forma, se obteve a mesma purificação de trombócitos, maior quantidade de células e economia de Percoll, como descrito nas metodologias do grupo (DaMatta *et al.*, 1998a; DaMatta *et al.*, 1998b; Macchi *et al.*, 2013; Miranda *et al.*, 2016).

Após estabelecida a cocultura o corante VN foi usado para os ensaios de macropinocitose, pois marcadores de fase fluida são bons para revelar esse processo (Lim & Gleeson, 2011). Ademais, já foi demonstrada a capacidade de trombócitos de macropinocitar VN (Roland & Birrenkott, 1998). Foram utilizadas diferentes concentrações de VN para entender se o aumento da concentração aumentaria sua captação pelas células. Após a interação de trombócitos com VN, as células foram lavadas e lisadas para a análise da quantidade do corante por espectrofotômetro (Weeks *et al.*, 1987; Roland & Birrenkott, 1998). Conforme a concentração de VN aumentou, as células captaram mais o corante, porém as

concentrações de 10, 20 e 40 µg/ml de VN não resultaram em diferenças significativas entre elas, sendo as concentrações de 80 e 160 µg/ml as únicas com diferenças significativas. A microscopia óptica foi utilizada para analisar a porcentagem de células que macropinocitaram o VN. Mesmo utilizando diferentes concentrações de VN a porcentagem de trombócitos que macropinocitaram o corante foi semelhante, sendo entorno de 40% das células da cultura, não apresentando diferenças significativas entre as concentrações. Os trombócitos que realizaram a macropinocitose do VN apresentavam vacúolos com o corante VN, podendo apresentar mais de um, sendo fácil de diferenciar dos trombócitos sem corante. Mesmo com as concentrações de VN diferentes, o padrão de macropinocitose de trombócitos se manteve similar, com células em sua maioria apresentando apenas um vacúolo positivo para VN. Os maiores vacúolos contendo VN dessas células apresentaram diâmetro de macropinosomos (Racoosin & Swanson, 1993) indicando que trombócitos macropinocitaram VN, como observado por Roland & Birrenkott em 1998 utilizando esse mesmo marcador. Utilizando a microscopia óptica também se pode ver que os monócitos possuem uma capacidade macropinocítica muito maior que os trombócitos, apresentando grande número de vacúolos positivos para VN, apesar de ocorrer uma captação heterogênea, onde pode-se observar em menor frequência de células com poucos e sem apresentar vacúolos contendo VN. Esse resultado corrobora com os achados de que fagócitos profissionais possuem alta capacidade macropinocítica (Norbury, 2006) e fazem a absorção de forma interrupta de solutos (Norbury *et al.*, 1995). A quantidade de vacúolos contendo VN de trombócitos não variou independente da concentração utilizada para o ensaio. O resultado no qual o aumento da concentração de VN é proporcional à captação de VN pelas células, parece ser atribuído aos monócitos da cultura, pois na análise por microscopia óptica, a porcentagem de células positivas para VN se mantém constante nas diferentes concentrações, e os monócitos apresentam muito mais vacúolos que os trombócitos. Entretanto o aumento da captação de VN pelas células ao se aumentar a concentração do corante pode ser explicado apenas pelo aumento da concentração do VN, pois as células podem ter captado do mesmo modo só que com o corante mais concentrado no meio, por isso essa falsa alusão que ao se aumentar a concentração de VN ocorre aumento da captação pelas células. Por isso a macropinocitose foi analisada por microscopia óptica para confirmar se realmente os trombócitos também estavam macropinocitando o VN.

A ativação dos trombócitos utilizando LPS e MC aumentou a porcentagem de trombócitos com a presença de vacúolos contendo VN. O LPS já foi mostrado como um ativador clássico para células imunes, aumentando a atividade macropinocítica pelo aumento de projeções de membrana na membrana celular em macrófagos (Condon *et al.*, 2018) e células dendríticas (West *et al.*, 2004). Estudo recente mostrou que na verdade macrófagos anti-inflamatórios (ativados com IL-4) realizam macropinocitose de forma constitutiva (Redka *et al.*, 2018), indicando que ainda não foi bem esclarecida nos macrófagos a relação da capacidade de macropinocitose com característica microbicida ou reparadora. Os trombócitos de galinha também aumentam sua captação de VN ao serem ativados por LPS, mostrando que talvez compartilhem o mesmo mecanismo que macrófagos e células dendríticas. A adição do MC pode ter relação com o aumento na macropinocitose uma vez que é proveniente da ativação de linfócitos T, que quando ativados liberam várias citocinas pró-inflamatórias como, IFN- γ , IL-6 e GM-CSF, além da citocina anti-inflamatória IL-4 (Abe *et al.*, 1991). O IFN- γ ativa a capacidade microbicida de células dendríticas (Pan *et al.*, 2004), enquanto a IL-6 já foi confirmada como sendo responsável pela diferenciação de monócitos em macrófagos e outras atividades pró inflamatórias (Hirano, 1998). A GM-CSF é associada a diferenciação de macrófagos pró-inflamatórios junto a LPS e IFN- γ (Fleetwood *et al.*, 2009). A citocina IL-4, junto a M-CSF responsável pelo perfil anti-inflamatório em macrófagos, aumentou a capacidade macropinocítica em macrófagos (Redka *et al.*, 2018). Os monócitos contendo vacúolos com VN foram próximos de 85% e após a ativação não se obteve diferença significativa no aumento da macropinocitose, resultado esse que pode ter sido obtido pelo menor tempo de ativação, sendo 1h nesse estudo enquanto os monócitos são geralmente estimulados por 24h (Scheraga *et al.*, 2016), por outro lado a ativação pode não interferir na quantidade de monócitos que macropinocitam, mas pode aumentar a velocidade ou capacidade de ingestão de partículas. A rápida resposta dos trombócitos pode significar que essas células estão prontas para atuar caso encontrem um microambiente com citocinas e outras moléculas ativadoras.

A fagocitose é um processo relativamente comum em macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (Lancaster *et al.*, 2019), e os primeiros estudos da atividade fagocítica de trombócitos demonstram que essas células conseguem internalizar partículas de carbono (Dawson, 1933) e bactérias, por microscopia óptica (Glick *et al.*, 1964) e eletrônica (Carlson *et al.*, 1968), sendo considerada como a linha de

frente das células fagocíticas nos processos imunológicos (Chang & Hamilton, 1979). Entretanto, no final do último milênio com a melhora das análises de imagem pela microscopia tanto óptica e eletrônica a real capacidade fagocítica dos trombócitos foi desmentida, mostrando que essas células praticamente não realizam fagocitose (DaMatta *et al.*, 1998). Com a ferramenta da análise genética celular da última década, estudos mostram que os trombócitos possuem alguns genes que poderiam configurar essa célula como um potencial efetor do sistema imune (Ferdous *et al.*, 2016), além de ensaios de fagocitose melhor elaborado não deixando dúvidas dessa capacidade (Nagasawa *et al.*, 2012). Vimos o trombócito apresentando bactéria internalizada, mostrando que de fato essas células possuem tal capacidade. Assim como os macrófagos (Islam *et al.*, 2013), a ativação dos trombócitos por LPS e citocinas, provenientes do MC, aumentaram consideravelmente o número de bactérias internalizadas quando comparadas a cultura de trombócitos não ativados. A proporção da atividade fagocítica não é grande se comparada com macrófagos, mas pode se concluir que os trombócitos podem exercer tal função se forem requeridos e tal resultado deixa mais evidente que essas células fazem parte do sistema imunológico nos organismos.

Os trombócitos ativados com LPS e MC como fonte de citocinas pró-inflamatórias mostraram aumento de NADH livre. O aumento de NADH livre é claro indicativo do metabolismo glicolítico das células (Datta *et al.*, 2020). Portanto, trombócitos ativados apresentaram um metabolismo glicolítico, possivelmente relacionado ao seu papel imunológico na resposta inflamatória (Nagasawa, *et al.*, 2014). Esse metabolismo nessas células é similar com os resultados da ativação por LPS e IFN- γ de macrófagos pró-inflamatórios (Alfonso-Garcia *et al.*, 2016). Esse resultado está relacionado com o aumento da macropinocitose de VN e da fagocitose de bactérias causado pela ativação dos trombócitos. Entretanto são necessários mais estudos para afirmar se trombócitos ativados se comportam metabolicamente como macrófagos pró-inflamatórios.

7. Conclusão

Trombócitos de galinha ativados com LPS e MC (como fonte de citocinas pró-inflamatórias) aumentaram suas capacidades macropinocíticas e fagocíticas quando comparados com trombócitos não ativados. Além do aumento da endocitose, esses ativadores resultaram em trombócitos com metabolismo mais glicolítico. Esses

achados sugerem que os trombócitos se comportam como macrófagos com perfil inflamatório ao serem ativados por citocinas pró inflamatórias possivelmente apresentando um caráter microbicida para auxiliar no sistema imunológico.

8. Perspectivas

É importante estabelecer uma cultura *in vitro* pura de trombócitos evitando a contaminação de monócitos, permitindo a análise dos lisados de trombócitos. Para tal, pretende-se utilizar anticorpos específicos para separar monócitos da cultura de trombócitos, podendo assim realizar análises moleculares em diferentes situações de cultivo.

Outros experimentos necessitam ser feitos para melhor entender o tipo de endocitose que trombócitos realizam. Uma forma é utilizar marcadores de actina para observar as projeções da membrana plasmática e bloqueadores da polimerização de actina, para observar a entrada do soluto nos trombócitos. Outros marcadores de fase fluida com dextran de diferentes tamanhos podem ser usados para melhor caracterizar o tipo de endocitose que trombócitos realizam.

Como existe controvérsia se a capacidade das células de macropinocitose e fagocitose *in vitro* é diferente quando *in vivo* (Griffiths *et al.*, 2022), seria interessante adaptar ensaios de endocitose *in vivo* para comparação como realizado por trabalhos clássicos (Dawson, 1933; Glick *et al.*, 1964; Carlson *et al.*, 1968; Chang & Hamilton, 1979).

Diversificar os ativadores clássicos usando citocinas recombinantes anti inflamatórias para comparação com as pró inflamatórias no processo endocítico de trombócitos também poderá desvendar as características da endocitose dessas células. Além da utilização da técnica de FLIM para analisar como o metabolismo energético dessas células altera com diferentes ativadores.

9. Referências bibliográficas

- Abe, E.; Ishimi, Y.; Jin, C.H.; Hong, M.H.; Sato, T.; Suda, T. (1991). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a major macrophage fusion factor present in conditioned medium of concanavalin A-stimulated spleen cell cultures. **Journal of Immunology**. 147: 1810–1815.
- Aderem, A.; Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**. 17: 593–623.

- Allen, L.A.; Aderem, A. (1996). Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**. 184: 627-637.
- Alfonso-García, A.; Smith, T.D.; Datta, R.; Luu, T.U.; Gratton, E.; Potma, E.O.; Liu, W.F. (2016). Label-free identification of macrophage phenotype by fluorescence lifetime imaging microscopy. **Journal of Biomedical Optics**, 21: 46005.
- Akira, S.; Takeda, K.; Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**. 2: 675–680.
- Araki, N. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. **Journal Cell Biology**. 135: 1249–1260.
- Babior, B.M. (2004). NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**. 16: 42–47.
- Bartunek, P.; Karafat, V.; Bartunkova, J.; Pajer, P.; Dvorakova, M.; Kralova J.; Zenke, M.; Dvorak, M. (2008) Impact of chicken thrombopoitin and its receptor c-Mpl on hematopoietic cell development. **Experimental Hematology**. 36: 495-505.
- Brunk, U.; Schellens, J.; Westermark, B. (1976). Influence of epidermal growth factor (EGF) on ruffling activity, pinocytosis and proliferation of cultivated human glia cells. **Experimental Cell Research**. 103: 295–302.
- Carlson, H.C.; Sweeny, P.R.; Tokaryk, J.M. (1968). Demonstration of phagocytic and trephocytic actives of chicken thrombocytes by microscopy and vital staining techniques. **Avian Diseases**. 12: 700-715.
- Canton, J. (2014). Phagosome maturation in polarized macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**. 96: 729–738.
- Canton, J.; Schlam, D.; Breuer, C.; Gütschow, M.; Glogauer, M.; Grinstein, S. (2016). Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in macrophages. **Nature Communications**. 7: 11284.
- Chang, C.F.; Hamilton, P.B. (1979). The thrombocyte as the primary circulating phagocyte in chickens. **Journal of the Reticuloendothelial Society**. 25: 585–590.
- Christoforidis, S.; McBride, H.M.; Burgoyne, R.D.; Zerial, M. (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. **Nature**. 397(6720): 621–625.

- Condon, N.D.; Heddleston, J.M.; Chew, T.L.; Luo, L.; McPherson, P.S.; Ioannou, M.S.; Hodgson, L.; Stow, J.L.; Wall, A.A. (2018). Macropinosome formation by tent pole ruffling in macrophages. **The Journal of Cell Biology**. 217(11): 3873–3885.
- Daimon, T.; Uchida, K.; Mizuhira, V. (1977) Ultrastructural localization of acid proteins, polysaccharides and calcium in the vacuoles of chicken thrombocytes. **Histochemistry**. 52: 25-32.
- DaMatta, R.A.; Manhães, L.; Seabra, S.H.; de Souza, W. (1998a). Coculture of chicken thrombocytes and monocytes: morphological changes and lectin binding. **Biocell**. 22: 45–52.
- DaMatta, R.A.; Seabra, S.H.; De Souza, W. (1998b). Further studies on the phagocytic capacity of chicken thrombocytes. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**. 30: 271-277.
- DaMatta, R.A.; Manhães, L.; Lassounskaia, E.; de Souza, W. (1999). Chicken thrombocytes in culture: lymphocyte-conditioned medium delays apoptosis. **Tissue Cell**. 31: 255-263.
- Dambuzza, I.M.; Brown, G.D. (2015). C-type lectins in immunity: recent developments. **Current Opinion in Immunology**. 32: 21–27.
- Dawson, A.G. (1993) The leucocyte reaction in *Necturus maculosus* to intravascular injections of colloidal carbon, with special reference to the behavior of the basophils and thrombocytes. **The Anatomical Record**. 57: 351-359.
- de Carvalho, T.M.; Barrias, E.S; de Souza, W. (2015). Macropinocytosis: a pathway to protozoan infection. **Frontiers in Physiology**. 6:106. Doherty, G.J., McMahon, H.T. (2009) Mechanisms of endocytosis. **Annual Review Biochemistry**. 78: 857-902.
- Dustin, M.L. (2016). Complement Receptors in Myeloid Cell Adhesion and Phagocytosis. **Microbiology spectrum**. 4.
- Edmonds, R.H. (1968) Electron microscope studies on the hemostatic process in bird embryos. I. The initial plug. **Journal of Ultrastructure Research**. 24: 295-310.
- Fawcett, D.W. (1965). Surface Specializations of Absorbing Cells. **The journal of Histochemistry and Cytochemistry**. 13: 75–91.
- Fares, H.; Greenwald, I. (2001). Genetic analysis of endocytosis in *Caenorhabditis elegans*: coelomocyte uptake defective mutants. **Genetics**. 159: 133–145.
- Ferdous, F.; Maurice, D.; Scott, T. (2008) Broiler chick thrombocyte response to lipopolysaccharide. **Poultry Science**. 87: 61-63.

- Ferdous, F.; Scott, T.R. (2015). Bacterial and viral induction of chicken thrombocyte inflammatory responses. **Developmental and Comparative Immunology**. 49: 225-230.
- Ferdous, F.; Sasaki, C.; Bridges, W.; Burns, M.; Dunn, H.; Elliott, K.; Scott, T.R. (2016). Transcriptome Profile of the Chicken Thrombocyte: New Implications as an Advanced Immune Effector Cell. **PloS One**. 11: e0163890.
- Ferdous, F.; Sasaki, C.; Bridges, W.; Burns, M.; Dunn, H.; Elliott, K.; Scott, T. R. (2017). Bacterial and Viral Products Affect Differential Pattern Recognition Receptor Activation of Chicken Thrombocytes Evidenced through RNA Sequencing. **Journal of Immunology**. 199: 774–781.
- Fink, I.R.; Ribeiro, C.M.S.; Forlenza, M.; Taverne-Thiele, A.; Rombout, J.H.W.M.; Savelkoul, H.F.J.; Wiegertjes, G.F. (2015). Immune-relevant thrombocytes of common carp undergo parasite-induced nitric oxide-mediated apoptosis. **Developmental and Comparative Immunology**. 50: 146-154.
- Flannagan, R.S.; Jaumouillé, V.; Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. **Annual Review of Pathology**. 7: 61–98.
- Fleetwood, A.J.; Dinh, H.; Cook, A.D.; Hertzog, P.J.; Hamilton, J.A. (2009). GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. **Journal of Leukocyte Biology**. 86: 411–421.
- Freeman, S.A.; Grinstein, S. (2014). Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. **Immunological Reviews**. 262: 193–215.
- Freeman, S.A.; Goyette, J.; Furuya, W.; Woods, E.C.; Bertozzi, C.R.; Bergmeier, W.; Hinz, B.; van der Merwe, P.A.; Das, R.; Grinstein, S. (2016). Integrins Form an Expanding Diffusional Barrier that Coordinates Phagocytosis. **Cell**. 164: 128–140.
- Garcia, B.A.; Smalley, D.M.; Cho, H.J.; Shabanowitz, J.; Ley, K.; Hunt, D.F. (2005) The platelet microparticle proteome. **Journal Proteome Research**. 4: 1516-1521.
- George, J.N. (2000) Platelets. **The Lancet**. 355: 1531-1539.
- Glick, B.; Sato, K.; Cohenour, F. (1964) Comparison of the phagocytic ability of normal and bursectomized birds. **Journal of the Reticuloendothelial Society**. 1: 442-449.
- Grecchi, R.; Saliba, A.M.; Mariano, M. (1980) Morphological changes, surface receptors and phagocytic potential of fowl mononuclear phagocytes and thrombocytes in vivo and in vitro. **The Journal of Pathology**. 130: 23-31.

- Greenbaum, J.; FitzGerald, G.A. (2009) Platelets, pyrexia and plasmodia. **The New England Journal of Medicine**. 361: 526-528.
- Griffiths, G.; Gruenberg, J.; Marsh, M.; Wohlmann, J.; Jones, A.T.; Parton, R.G. (2022). Nanoparticle entry into cells; the cell biology weak link. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 188: 114403.
- Guimarães, M.C.; Guillermo, L.V.; Matta, M.F.; Soares, S.G.; DaMatta, R.A. (2011). Macrophages from chickens selected for high antibody response produced more nitric oxide and have greater phagocytic capacity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 140: 317–322.
- Ha, K.D.; Bidlingmaier, S.M.; Liu, B. (2016). Macropinocytosis Exploitation by Cancers and Cancer Therapeutics. **Frontiers in Physiology**. 7: 381.
- Haigler, H.T.; McKanna, J.A.; Cohen, S. (1979). Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. **The Journal of Cell Biology**. 81: 382–395.
- Herre, J.; Marshall, A.S.; Caron, E.; Edwards, A.D.; Williams, D.L.; Schweighoffer, E.; Tybulewicz, V.; Reis e Sousa, C.; Gordon, S.; Brown, G.D. (2004). Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. **Blood**. 104: 4038–4045.
- Hirano, T. (1998). Interleukin 6 and its receptor: ten years later. **International Reviews of Immunology**. 16: 249–284.
- Hoeller, D.; Volarevic, S.; Dikic, I. (2005). Compartmentalization of growth factor receptor signaling. **Current Opinion in Cell Biology**. 17:107–111.
- Ishikawa, E.; Ishikawa, T.; Morita, Y.S.; Toyonaga, K.; Yamada, H.; Takeuchi, O.; Kinoshita, T.; Akira, S.; Yoshikai, Y.; Yamasaki, S. (2009). Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. **The Journal of Experimental Medicine**. 206: 2879–2888.
- Islam, M. A.; Pröll, M.; Hölker, M.; Tholen, E.; Tesfaye, D.; Looft, C.; Schellander, K.; Cinar, M.U. (2013). Alveolar macrophage phagocytic activity is enhanced with LPS priming, and combined stimulation of LPS and lipoteichoic acid synergistically induce pro-inflammatory cytokines in pigs. **Innate Immunity**. 19: 631–643.
- Kawai, T.; Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**. 34: 637–650.
- Khandekar, G.; Kim, S.; Jagadeeswaran, P. (2012) Zebrafish thrombocytes: functions and origins. **Advances in Hematology**. 2012: 1-9.

- Kinchen, J.M.; Ravichandran, K.S. (2008). Phagosome maturation: going through the acid test. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*. 9: 781–795.
- King, J.S.; Kay, R.R. (2019). The origins and evolution of macropinocytosis. **Series B, Biological Sciences**. 374: 20180158.
- Lancaster, C.E.; Ho, C.Y.; Hipolito, V., Botelho, R.J.; Terebiznik, M.R. (2019). Phagocytosis: what's on the menu?¹. **Biochemistry and Cell Biology**. 97: 21–29.
- Levin, R.; Grinstein, S.; Canton, J. (2016). The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. **Immunological Reviews**. 273: 156–179.
- Lewis, W.H. (1931) Pinocytosis. **Johns Hopkins Hospital bulletin**. 49:17-27.
- Li, L.; Wan, T.; Wan, M.; Liu, B.; Cheng, R.; Zhang, R. (2015). The effect of the size of fluorescent dextran on its endocytic pathway. **Cell Biology International**. 39: 531–539.
- Li, K.; Underhill, D.M. (2020). C-Type Lectin Receptors in Phagocytosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. 429: 1–18.
- Lim, J.P.; Gleeson, P.A. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalizing large gulps. **Immunology Cell Biology**. 89: 836–43.
- Lim, J.P.; Gosavi, P.; Mintern, J.D.; Ross, E.M.; Gleeson, P.A. (2015). Sorting nexin 5 selectively regulates dorsal-ruffle-mediated macropinocytosis in primary macrophages. **Journal of Cell Science**. 128: 4407–4419.
- Lin, X.P.; Mintern, J.D.; Gleeson, P.A. (2020). Macropinocytosis in Different Cell Types: Similarities and Differences. **Membranes**. 10: 177.
- Lucas, A.M.; Jamroz, C. (1961) Atlas of avian hematology. **Washington: United States Department of Agriculture**. 292p.
- Macchi, B.M.; Miranda F.J.B.; Souza F.S.; Carvalho E.C.Q.; Albernaz A.P.; Do Nascimento, J.L.M.; Damatta, R.A. (2013). Chickens treated with a nitric oxide inhibitor became more resistant to *Plasmodium gallinaceum* infection due to reduced anemia, thrombocytopenia and inflammation. **Veterinary Research**. 44: 1.
- Maréchal, V.; Prevost, M.C.; Petit, C.; Perret, E.; Heard, J.M.; Schwartz, O. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. **Journal of Virology**. 75: 11166–11177.
- Marsh, M.; Helenius, A. (2006). Virus entry: open sesame. **Cell**. 124:729–740.
- Marshansky, V.; Futai, M. (2008). The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. **Current Opinion in Cell Biology**. 20: 415–426.

- Mellström, K.; Heldin, C.H.; Westermark, B. (1988). Induction of circular membrane ruffling on human fibroblasts by platelet-derived growth factor. **Experimental Cell Research**. 177: 347–359.
- Miranda, F.J; Damasceno-Sá, J.C; DaMatta, R.A. (2016). Development of ostrich thrombocytes and monocyte-derived macrophages in culture and the control of *Toxoplasma gondii* reproduction after macrophage activation. **Poultry Science**. 95:12-18.
- Nagasawa, T.; Nakayasu, C.; Rieger, A.M.; Barreda, D.R.; Somamoto, T.; Nakao, M. (2014). Phagocytosis by thrombocytes is a conserved innate mechanism in lower vertebrates. **Frontiers in Immunology**. 5: 445.
- Nagasawa, T.; Somamoto, T.; Nakao, M. (2015). Carp thrombocyte phagocytosis requires activation factors secreted from other leukocytes. **Developmental and Comparative Immunology**. 52: 107-111.
- Naik, U.; Harrison, R.E. (2013). Phagocytosis. *In* Colloquium series on Building blocks of the cell. **Cell Structure and Function**. Vol. 1. No. 3. Morgan & Claypool Publishers, San Rafael, Calif.
- Norbury, C.C.; Hewlett, L.J.; Prescott, A.R.; Shastri, N.; Watts, C. (1995). Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. **Immunity**. 3: 783–791.
- Norbury C.C. (2006). Drinking a lot is good for dendritic cells. **Immunology**. 117: 443–451.
- Parton, R.G.; Richards, A.A. (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. **Traffic**. 4: 724-38.
- Pertoft, H.; Laurent, T.C.; Låås, T.; Kågedal, L. (1978). Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). **Analytical Biochemistry**. 88: 271–282.
- Qureshi, M.A.; Miller, L. (1991). Comparison of macrophage function in several commercial broiler genetic lines. **Poultry Science**. 70: 2094–2101.
- Pan, J.; Zhang, M.; Wang, J.; Wang, Q.; Xia, D.; Sun, W.; Zhang, L.; Yu, H.; Liu, Y.; Cao, X. (2004). Interferon-gamma is an autocrine mediator for dendritic cell maturation. **Immunology Letters**. 94: 141–151.
- Racoosin, E.L.; Swanson, J.A. (1993). Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. **The Journal of Cell Biology**. 121: 1011–1020.

- Ratnoff, O.D. (1987). The evolution of hemostatic mechanisms. **Perspectives in Biology and Medicine**. 31: 4-33.
- Redka, D.S.; Gütschow, M.; Grinstein, S.; Canton, J. (2018). Differential ability of proinflammatory and anti-inflammatory macrophages to perform macropinocytosis. **Molecular Biology of The Cell**. 29: 53–65.
- Rink, J.; Ghigo, E.; Kalaidzidis, Y.; Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. **Cell**. 122: 735–749.
- Roland, G.A.; Birrenkott, G.P. (1998) The effect of in vitro heat stress on the uptake of neutral red by chicken thrombocytes. **Poultry Science**. 77: 1661-1664.
- Rosales, C. (2007). Fc receptor and integrin signaling in phagocytes. **Signal Transduction**. 7: 386–401.
- Rosales, C.; Uribe-Querol, E. (2013). Antibody - Fc receptor interactions in antimicrobial functions. **Current Immunology Reviews**. 9: 44.
- Rosales, C.; Uribe-Querol, E. (2013). Fc receptors: Cell activators of antibody functions. **Advances in Bioscience and Biotechnology**. 4: 21-33.
- Sallusto, F.; Cella, M.; Danieli, C.; Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **The Journal of Experimental Medicine**. 182: 389–400.
- Scheraga, R.G.; Abraham, S.; Niese, K.A.; Southern, B.D.; Grove, L.M.; Hite, R.D.; McDonald, C.; Hamilton, T.A.; Olman, M.A. (2016). TRPV4 Mechanosensitive Ion Channel Regulates Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophage Phagocytosis. **Journal of immunology**. 196: 428–436.
- Schmid, E.M.; McMahon, H.T. (2007). Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. **Nature**. 448: 883–888.
- Slater, L.B. (2005) Malarial Birds: Modeling Infectious Human Disease in Animals. **Bulletin History Medicine**. 79: 261-94.
- Stalsberg, H.; Prydz, H. (1963) Studies on chick embryo thrombocytes. II. Function in primary hemostasis. **Thrombosis et Deathesis Haemorrhagica**. 9: 891-899.
- Stang, E.; Kartenbeck, J.; Parton, R.G. (1997). Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. **Molecular Biology of The Cell**. 8: 47–57.

- St. Paul, M.; Paolucci, S.; Barjesteh, N.; Wood, R.D.; Schat, K.A.; Sharif, S. (2012) Characterization of chicken thrombocytes responses to Toll-like receptor ligands. **Plos One**. 7: e43381.
- Stringari, C.; Wang, H.; Geyfman, M.; Crosignani, V.; Kumar, V.; Takahashi, J. S.; Andersen, B.; & Gratton, E. (2015). In vivo single-cell detection of metabolic oscillations in stem cells. **Cell Reports**. 10.
- Svoboda, O.; Stachura, D.L.; Machonova, O.; Pajer, P.; Brynda, J.; Zon, L.I.; Traver, D.; Bartunek, P. (2014) Dissection of vertebrate hematopoiesis using zebrafish thrombopoietin. **Blood**. 124: 220-228.
- Swanson, J.A. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**. 9: 639–649.
- Swanson, J.A.; King, J.S. (2019). The breadth of macropinocytosis research. **Philosophical Transactions of The Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**. 374: 20180146.
- Uribe-Querol, E.; Rosales, C. (2020). Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. **Frontiers in immunology**.11: 1066.
- Weeks, B.; Keisler, A.; Myrvik, Q.; Warinner, J. (1987) Differential uptake of neutral red by macrophages from three species of estuarine fish. **Developmental and Comparative Immunology**. 11: 117-124.
- West, M.A.; Bretscher, M.S.; Watts, C. (1989). Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. **The Journal of Cell Biology**. 109: 2731–2739.
- West, M.A.; Wallin, R.P.; Matthews, S.P.; Svensson, H.G.; Zaru, R.; Ljunggren, H.G.; Prescott, A.R.; Watts, C. (2004) Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. **Science**. 305: 1153-1157.
- Williams, T.D.; Kay, R.R. (2018). The physiological regulation of macropinocytosis during *Dictyostelium* growth and development. **Journal of cell Science**. 131: jcs213736.
- Winkler, C.; Ferdous, F.; Dimmick, M.; Scott, T. (2017). Lipopolysaccharide induced Interleukin-6 production is mediated through activation of ERK 1/2, p38 MAPK, MEK, and NFkappaB in chicken thrombocytes. **Development & Comparative Immunology**. 73: 124–30.
- Wu, T.T.; Chen, T.L.; Chen, R.M. (2009). Lipopolysaccharide triggers macrophage activation of inflammatory cytokine expression, chemotaxis, phagocytosis, and

oxidative ability via a toll-like receptor 4-dependent pathway: validated by RNA interference. **Toxicology Letters**. 191: 195–202.