

## Otimização de metodologia para isolamento de leucócitos a partir de sangue total periférico de bovinos<sup>1</sup>

Isabela Karoline de Aguiar Soares<sup>2,3</sup>, Jair Alves da Cunha Filho<sup>2,3</sup>, Gabrielle Oliveira Soares<sup>2,3</sup>, Tamires Rodrigues de Lima<sup>2,4</sup>, Victor Hugo Halfeld Kelmer Maluf<sup>2,5</sup>, Rosiana Angélica Campos<sup>2,6</sup>, Carla de Oliveira Loures<sup>2,7</sup>, Robert Domingues<sup>8</sup>, Emanuelle Baldo Gaspar<sup>9</sup>, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza<sup>10</sup>, Mariana Magalhães Campos<sup>11</sup>, Hyago Passe Pereira<sup>12</sup>, Marco Antonio Machado<sup>11,13</sup>, Marta Fonseca Martins<sup>11,13,14</sup>, Wanessa Araújo Carvalho<sup>11</sup>

<sup>1</sup>O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto SEG 10.19.03.054.00.00, liderado por Wanessa A. Carvalho.

<sup>2</sup>Bolsista do Programa de Bolsa de Iniciação Científica do CNPq/ Embrapa

<sup>3</sup>Graduando(a) em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Juiz de Fora. E-mail: [isabelakas1@gmail.com](mailto:isabelakas1@gmail.com), [jaircunhafilho@hotmail.com](mailto:jaircunhafilho@hotmail.com), [gosoares96@gmail.com](mailto:gosoares96@gmail.com)

<sup>4</sup>Graduanda em Farmácia - Universidade Federal de Juiz de Fora. E-mail: [thalima18@hotmail.com](mailto:thalima18@hotmail.com)

<sup>5</sup>Graduando em Ciências Biológicas - Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora. E-mail: [victorhmaluf@hotmail.com](mailto:victorhmaluf@hotmail.com)

<sup>6</sup>Graduanda em Farmácia - Suprema. E-mail: [rosianacampos@hotmail.com](mailto:rosianacampos@hotmail.com)

<sup>7</sup>Graduanda Medicina Veterinária- Universidade Federal de Viçosa. E-mail: [carla.loures@ufv.br](mailto:carla.loures@ufv.br)

<sup>8</sup>Analista, Embrapa Pecuária Sul. E-mail: [robert.domingues@embrapa.br](mailto:robert.domingues@embrapa.br)

<sup>9</sup>Pesquisadora, Embrapa Pecuária Sul. E-mail: [emanuelle.gaspar@embrapa.br](mailto:emanuelle.gaspar@embrapa.br)

<sup>10</sup>Analista, Embrapa Gado de Leite. E-mail: [daniele.reis@embrapa.br](mailto:daniele.reis@embrapa.br)

<sup>11</sup>Pesquisador(a), Embrapa Gado de Leite. E-mail: [mariana.campos@embrapa.br](mailto:mariana.campos@embrapa.br), [marco.machado@embrapa.br](mailto:marco.machado@embrapa.br), [marta.martins@embrapa.br](mailto:marta.martins@embrapa.br), [wanessa.carvalho@embrapa.br](mailto:wanessa.carvalho@embrapa.br)

<sup>12</sup>Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora, Bolsista Capes. E-mail: [hyago9295@gmail.com](mailto:hyago9295@gmail.com)

<sup>13</sup>Bolsista de Produtividade CNPq.

<sup>14</sup>Orientadora

**Resumo:** O desenvolvimento de uma resposta imune efetiva depende da ação orquestrada de diversos subtipos celulares que atuam tanto na resposta imune inata quanto adaptativa. Desse modo, é de grande importância a realização de estudos sobre o comportamento dessas células em diferentes raças de bovinos com propósito de desenvolver soluções para animais menos resistentes a agentes infecciosos. Para o isolamento destas células, é preciso estabelecer protocolos padronizados de coleta de *buffy coat* e células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), os quais possam ser utilizados para diferentes raças de bovinos buscando reduzir possíveis interferentes. Durante a condução dos experimentos, foram feitas otimizações de protocolo como a substituição de reagentes e adição de etapas para que os mesmos fossem padronizados. Por fim, obteve-se dois protocolos que possibilitaram o isolamento tanto de *buffy coat* quanto de PBMCs, as quais serão utilizadas em análises genômicas e imunológicas.

**Palavras-chave:** bovinos, *buffy coat*, protocolos, PBMCs, sequenciamento de RNA

### Optimization of methodology for isolation of leukocytes from bovine peripheral whole blood

**Abstract:** The development of an effective immune response depends on several cell subtypes that act on both the innate and adaptive immune responses. It is of great importance to carry out studies on the behavior of these cells in different breeds of cattle with the aim of developing solutions for animals that are less resistant to infectious agents. For the isolation of these cells, it is necessary to establish standardized protocols for collecting buffy coat and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which could be useful for different breeds of cattle. While conducting the

experiments, protocol optimizations were made, such as replacing reagents and adding steps to standardize them. Finally, two protocols were obtained that allowed the isolation of both white cells and PBMCs, which can be used in genomic and immunological analysis.

**Keywords:** cattle, buffy coat, tick, protocols, PBMCs, RNA sequencing

## Introdução

O sangue é composto por soro, hemácias, plaquetas e leucócitos. Este último grupo é composto por dois grandes grupos, os polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) e os mononucleares (linfócitos e monócitos), os quais têm diferentes funções relacionadas à proteção do organismo frente a patógenos ou mesmo à remoção de células inviáveis (Tizard, 2014). Os monócitos são fagócitos mononucleares que participam de processos como resistência microbiana, apoptose, vigilância tumoral e manutenção de tecidos, mas a sua principal função é se diferenciar em macrófagos teciduais, os quais junto com os monócitos são capazes de interligar a resposta imune inata e a adaptativa pela apresentação de antígenos (Sampath et al., 2018).

Visto as funções dos monócitos no combate aos patógenos, são necessários estudos que avaliem o comportamento dessas células em bovinos de raças zebuínas e europeias infestados por ecto e endoparasitas. Dessa forma, será possível obter uma solução biomolecular para os animais que têm respostas menos efetivas frente a esses agentes, como é o caso das raças europeias. Além disso, por meio do isolamento de macrófagos, estudos sobre padrões de resposta imunológica de bovinos de uma forma geral poderão ser compreendidos mais profundamente.

Sendo assim é de suma importância estabelecer e otimizar protocolos para isolamentos dos grupos celulares envolvidos nos processos de defesa. Segundo Turner et al. (2020), a qualidade das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) é influenciada por vários fatores e devido a isso, antes de as utilizar é preciso validar os métodos de processamento das amostras. Dessa forma, para que as PBMCs sejam utilizadas em ensaios comparando diferentes grupos genéticos, é preciso evitar possíveis interferentes que prejudiquem a acurácia das análises. Assim, o objetivo desse estudo foi a otimização e padronização de protocolos de isolamento celular por meio de técnicas de coleta de *buffy coat* (células brancas) e de PBMCs de duas raças de bovinos distintas, as quais serão utilizadas para análises genômicas e imunológicas.

## Material e Métodos

Como protocolo inicial foi utilizado o método empregado por Daibert et al. (2020), entretanto algumas etapas precisaram ser otimizadas ao longo do desenvolvimento do projeto. Amostras de sangue periférico foram coletadas por punção de veia jugular utilizando tubos a vácuo com EDTA de vacas e bezerros das raças Gir e Holandesa criados no Campo Experimental José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite (CEUA 8798030820). Para as análises laboratoriais dessas amostras os procedimentos otimizados foram: a coleta de *buffy coat* e a coleta de PBMCs para extração de RNA e congelamento de células para futuras análises.

Uma etapa inicial foi realizada em comum para os dois procedimentos, a qual promovia a lise de hemácias. Nesta etapa, as amostras foram centrifugadas a 2.1230 x g por 10 min para que ocorresse a separação das células. Dentro da capela de fluxo laminar, coletou-se a camada de *buffy coat* de todos os tubos e essas células foram transferidas para um tubo do tipo Falcon de 50 mL. Nas primeiras amostras acrescentou-se às células 15 mL de tampão de lise de hemácias (Cloreto de Amônio 0,144 M, Bicarbonato de Amônio 0,01 M), entretanto posteriormente esse reagente foi substituído pelo tampão de hemólise (bicarbonato de sódio 0,1 M, cloreto de amônio

0,15 M e EDTA 0,0001 M, pH 7,2) até completar 15 mL. Em seguida, o tubo foi agitado por inversão durante 30 seg, aguardou-se 3 min em repouso, depois o tubo foi agitado novamente por mais 30 seg e deixado em repouso por mais 1 min. Posteriormente completou-se o volume para 50 mL com PBS 1X (Cloreto de Sódio 0,137 M, Cloreto de Potássio 0,0027, Fosfato de Sódio 0,01 M e Fosfato de Potássio 0,0018 M, pH 7,4) e as amostras foram novamente centrifugadas a 2.440 rpm por 10 min. Inicialmente o PBS utilizado era suplementado com 1% de SFB (soro fetal bovino).

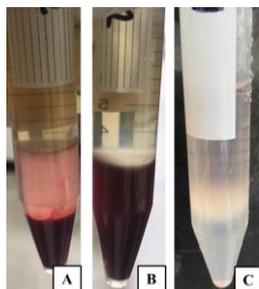
Em relação à coleta de *buffy coat*, o pelete obtido foi ressuscitado em 1 mL de PBS. Logo após, 10 µL dessa solução foi homogeneizada com 490 µL de solução de Azul de Tripán. Para a contagem do título celular, aplicou-se 10 µL desta diluição em uma câmara de Neubauer, onde a contagem foi realizada nos dois quadrantes das extremidades para que a média do número de células fosse obtida. Após a contagem, foi realizado o cálculo com o objetivo de obter alíquotas com concentrações de células de  $5 \times 10^6$ /mL. As amostras foram então centrifugadas a 400 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pelete foi ressuscitado em 300 µL de RNAlater (Ambion, Carlsbad, EUA). As amostras foram mantidas a 4°C por 24 h e, posteriormente, armazenadas à -20°C até o uso.

Por outro lado, para a coleta de PBMCs, o pelete obtido a partir da etapa inicial foi ressuscitado em 3 mL de PBS. Em um tubo de 15 mL, primeiramente foram adicionados 4 mL de Ficoll® Paque Plus (Merck, Darmstadt, Alemanha) e, em seguida, 3 mL das células preparadas foram adicionadas lentamente para evitar a mistura das soluções. As amostras foram então centrifugadas a 400xg por 40 min com ajuste de aceleração e desaceleração lentas. Um anel intermediário contendo os PBMCs foi observado e transferido para outro tubo já com 7 mL de PBS. Completou-se o volume com PBS até 15 mL. As amostras foram centrifugadas a 440 x g por 10 min. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o pelete foi ressuscitado em 1 mL de PBS. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer seguindo a mesma metodologia adotada para a contagem e armazenamento do *buffy coat*. A avaliação da qualidade das amostras será realizada em etapas posteriores ao presente trabalho e será baseada no rendimento de células bem como na viabilidade destas sob microscopia óptica.

## Resultados e Discussão

Durante a otimização/ padronização foi preciso realizar algumas alterações, as quais foram fundamentais para o isolamento de células viáveis e em estado ideal para serem utilizadas em análises futuras. Segundo Daibert et al. (2020), o SFB evita que componentes bioquímicos individuais do soro autólogo interfiram na diferenciação celular. Entretanto, no presente trabalho foi observado que algumas amostras apresentaram coagulação, o que provavelmente era resultado de reações com a albumina presente em altas concentrações no SFB. Portanto, o PBS passou a ser utilizado puro, o que não prejudicou a preservação das células.

Para a lise celular inicialmente foi utilizada a solução de ACK, entretanto foi preciso substituí-la pelo tampão de hemólise o qual continuou garantindo a lise das hemácias sem comprometer a integridade dos leucócitos. O primeiro protocolo de coleta de PBMCs era iniciado com o *buffy coat* diluído em PBS, o que funcionou muito bem para as vacas (Figura 2A). Contudo, observou-se que no caso dos bezerros o gradiente com o Ficoll Paque era prejudicado provavelmente devido a diferenças de volume celular (Figura 2B). Dessa forma, a solução encontrada foi a utilização da solução de hemólise, seguindo dessa forma a mesma etapa inicial de coleta de *buffy coat*, o que permitiu com que o gradiente adequado fosse formado (Figura 2C). Portanto o protocolo já anteriormente trabalhado foi sendo otimizado à medida que problemas foram surgindo, o que resultou em amostras íntegras e adequadas para a utilização em futuras análises.



**Figura 1.** Gradiente de Ficoll Paque: **1A** - vacas, **1B** (bezerros sem hemólise de hemácias) e **1C** (bezerros após hemólise de hemácias).

### Conclusões

Na literatura há diversos protocolos descritos, entretanto, cada estudo contém particularidades que precisam ser consideradas, as quais exigem aperfeiçoamentos constantes com o objetivo de se obter procedimentos bem estabelecidos para a população estudada. Portanto, foi possível destacar a importância do estabelecimento de protocolos universais para duas raças de bovinos e em diferentes idades. Dessa forma, o trabalho obteve protocolos com a uniformidade necessária ao reduzir o máximo de interferentes, o que possibilitará confiabilidade em futuras análises para o sequenciamento de RNA.

### Agradecimentos

À toda equipe envolvida no trabalho, em especial aos técnicos de campo Jonas Campos do Amaral, José Roberto Nogueira (Betinho), Glória Veronica e Luis Lopes pelos cuidados e dedicação com os animais experimentais, essenciais para os resultados obtidos.

### Referências

- DAIBERT, R. M. P.; JUNIOR, C. A. O. B.; VIEIRA, F. O.; DA SILVA, M. V. G. B; HOTTZ, E. D.; PINHEIRO, M. B. M.; FAZA, D. R. L. R.; PEREIRA, H. P.; MARTINS, M. F.; BRANDÃO, H. M.; MACHADO, M. A.; CARVALHO, W. A. Lipopolysaccharide triggers different transcriptional signatures in taurine and indicine cattle macrophages: Reactive oxygen species and potential outcomes to the development of immune response to infections. **PLoS ONE**. 2020. doi: [10.1371/journal.pone.0241861](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241861)
- SAMPATH, P.; MOIDEEN, K.; RANGANATHAN, U. D.; BETHUNAICKAN, R. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. **Frontiers in Immunology**. v.9, p. 1726, 2018. doi: [0.3389/fimmu.2018.01726](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01726)
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- TURNER, R.J.; GERAGHTY, N.J.; WILLIAMS, J.G.; LY, D.; BRUNGS, D; CAROLAN, M. G.; GUY, T. V.; WATSON, D.; LEON, J. F. de; SLUYTER, R. Comparison of

peripheral blood mononuclear cell isolation techniques and the impact of cryopreservation on human lymphocytes expressing CD39 and CD73. **Purinergic Signalling**. 16, p. 389–401, 2020. doi: [10.1007/s11302-020-09714-1](https://doi.org/10.1007/s11302-020-09714-1)