

XXIII SEMANA DO VPT**XXIII SEMANA CIENTIFICA PROF. DR. BENJAMIN EURICO MALUCELLI**

(Continuação dos resumos apresentados na edição anterior)

8 a 10 de outubro de 2014

Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP)

São Paulo (SP) – Brasil

APRESENTAÇÃO ORAL – INICIAÇÃO CIENTÍFICA – MEDICINA VETERINÁRIA**AÇÃO DA CROTOXINA SOBRE A FUNÇÃO ANGIOGÊNICA DE MACRÓFAGOS AVALIADA EM MODELO DE CO-CULTURA**

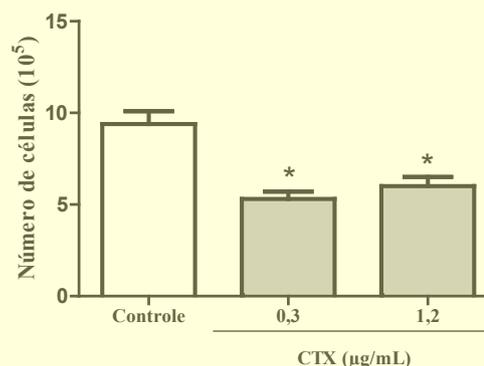
PIMENTA, L.A.; PEREIRA, J.F.; KATO, E.E.; CIRILLO, M.C.; SAMPAIO, S.C.

Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo – SP, Brasil

Introdução: A Crototoxina (CTX), toxina majoritária do veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* apresenta ação supressora sobre a resposta imune e sobre o crescimento tumoral, além de acarretar inibição dos eventos da resposta inflamatória, modulando, em particular a funcionalidade de macrófagos, células fundamentais para os mecanismos da defesa inata [10, 3, 4]. Brigatte et. al. 2007² constataram que a CTX estimula a capacidade secretória de macrófagos peritoneais de ratos obtidos de animais portadores de tumor de Walker 256 no flanco superior. Esse aumento é acompanhado por significativa diminuição da massa tumoral. Adicionalmente, ensaios *in vitro*, demonstraram que macrófagos previamente tratados com CTX inibem a proliferação de células tumorais, em modelo de co-cultura, mediada, em parte, pelo aumento da produção de reativos do oxigênio e nitrogênio, secreção de IL-1 β e a geração da LXA₄ e 15-epi-LXA₄ [5], mediadores lipídicos com potente ação antitumoral. De fato, a literatura demonstra a importância dos macrófagos, tanto na gênese tumoral, como no seu desenvolvimento, apresentando ação dual, uma vez que desempenham atividades que podem prevenir ou favorecer a progressão do tumor [1, 6, 8, 11]. Além da ação sobre a proliferação de células tumorais, os macrófagos também influenciam outros eventos do processo tumoral, tais como a neovascularização [12]. Baseados nestes fatos, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade moduladora de macrófagos tratados com CTX sobre a migração e proliferação de células endoteliais.

Materiais e Métodos: *Ensaio de Proliferação:* Macrófagos residentes (1x10⁶) foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos Wistar machos (CEUAIB nº 1052/13), aderidos e incubados com CTX (0,3 ou 1,2 μ g/mL), por um período de 2 h. Após esta incubação, os macrófagos foram lavados e incubados em meio RPMI fresco contendo as células endoteliais t.End.1 (5x10⁵) e após 24 horas, as células foram tripsinizadas e o número de células determinado em câmara de Neubauer. Em outro ensaio, as t.End.1 foram incubadas na presença de macrófagos ou de sobrenadantes obtidos destes macrófagos, previamente tratados com CTX (0,3 μ g/ml) e após 24 horas, o número de células foi determinado. *Ensaio de Wound Healing:* Após a confluência da monocamada de t.End.1 (1x10⁶), foi realizada a ferida com uma ponteira estéril, as células foram lavadas e incubadas na presença de macrófagos (1x10⁶) ou apenas dos sobrenadantes destes macrófagos, previamente tratados com CTX (0,3 μ g/ml) ou apenas meio e incubadas por 24 horas. A migração foi determinada

por contagem das células em cinco campos diferentes. *Ensaio de Formação de Tubos:* Um total de 60 μ L de Matrigel foi revestido sobre uma placa de 96 poços, durante 1 hora a 37°C e 50 μ L de t.End.1 (2,5x10⁴) foram adicionados a 50 μ L de sobrenadantes de culturas de macrófagos tratados ou não com CTX (0,3 μ g/ml) e incubadas durante 2 horas a 37°C em uma atmosfera umidificada de CO₂ a 5%. Foram avaliados como a formação de estruturas tubulares em matriz 3D. **Resultados:** Inicialmente, foi avaliada a concentração que seria capaz de alterar a atividade secretória de macrófagos. Assim, baseados em estudos anteriores, os macrófagos foram incubados com CTX nas concentrações de 0,3 μ g/mL [5, 9] e 1,2 μ g/mL [7]. Conforme demonstrado na **Figura 1**, os macrófagos tratados com ambas as concentrações de CTX foram capazes de modular de forma similar a função das células endoteliais inibindo de mesma magnitude (44 e 36%, respectivamente), quando comparadas ao controle.

Determinação da Concentração de CTX

Macrófagos residentes foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos, aderidos (1x10⁶/poço), em placas de seis poços e incubados com CTX (0,3 e 1,2 μ g/mL), por um período de 2 h. Após esta incubação, os macrófagos foram lavados e incubados em meio fresco contendo as células endoteliais derivadas de endotelioma de timo de camundongo (5x10⁷ células/poço) e incubadas na presença apenas de meio RPMI 1640, por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, as células foram tripsinizadas, ressuspensas com PBS com adição de corante azul de Tripán e o número de células foi determinado em câmara de Neubauer. *P<0,05 por comparação ao o grupo incubado com macrófagos pré-tratados apenas com meio de cultura (controle).

Figura 1 – Efeito do co-cultivo de macrófagos pré-incubados com diferentes concentrações de CTX sobre a proliferação de células endoteliais.

Dados obtidos demonstraram que a capacidade proliferativa das células endoteliais foi significativamente diminuída (34%), quando comparada ao grupo controle, **Figura 2**. Simultaneamente co-cultura (Macrófago/t.End.1), foram mantidas para avaliar a magnitude da resposta e, acarretaram ação anti-proliferativa das células de magnitude similar (32%), ao observado na co-cultura (sobrenadante/t.End.1).

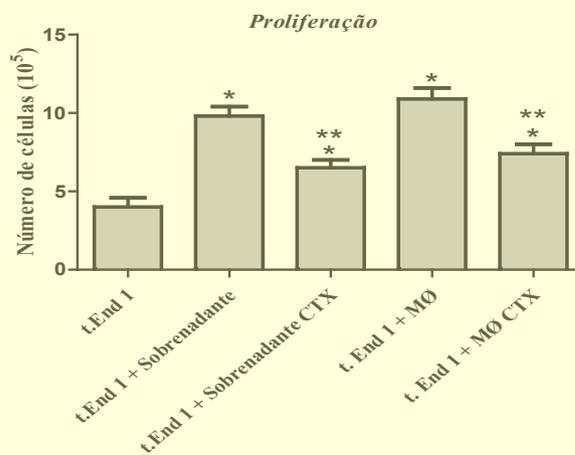
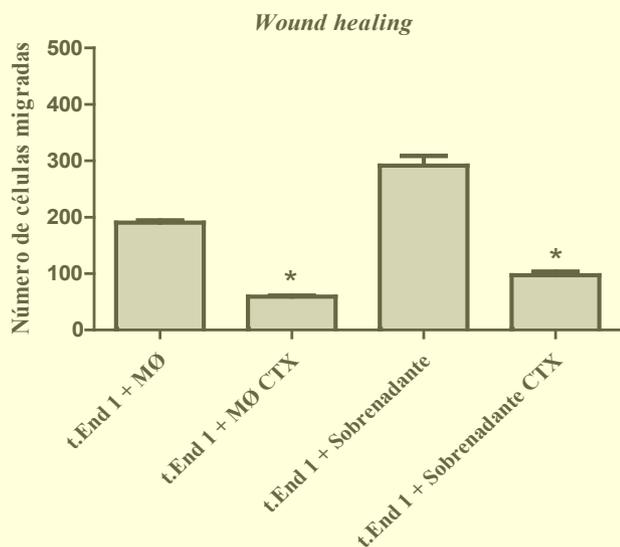


Figura 2 – Efeito da atividade secretora de macrófagos pré-incubados com a CTX sobre a proliferação de células endoteliais.

Macrófagos residentes foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos, aderidos (1×10^6 /poço), em placas de seis poços e incubados com CTX (0,3 μ g/mL), por um período de 2 h. Após esta incubação, os macrófagos foram lavados e incubados em meio RPMI 1640 fresco, por 24 horas a 37° C e 5% de CO₂. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e adicionados às culturas de células endoteliais. Além disso, foram incubadas t.End.1 no contato cel:cel com macrófagos e células endoteliais na presença apenas de meio RPMI, a 10% de SFB, como controles. Após 24 horas, as células foram lavadas, tripsinizadas, ressuspensas com PBS com adição de corante azul de Tripán e o número de células foi determinado em câmara de Neubauer. Os resultados estão expressos como Número de Células e representam a média \pm e.p.m. para 6 amostras por grupo e representam três ensaios distintos. *P<0,05 por comparação ao o grupo incubado com t.End. 1 (controle); **P<0,05 por comparação dos grupos aos seus respectivos controles.

Os resultados apresentados na Figura 3 revelam que a migração das células endoteliais apresentou diminuição significativa quando incubadas na presença de macrófagos previamente tratados na concentração de 0,3 μ g/mL (49%), quando comparada à migração de células endoteliais cultivadas na presença de macrófagos tratados apenas com meio de cultura (controle). Além disso, houve diminuição significativa quando incubadas na presença de sobrenadantes de co-cultura de macrófagos tratados na concentração de 0,3 μ g/mL (48%), quando comparada à migração de células endoteliais cultivadas na presença de sobrenadantes de co-cultura de macrófagos tratados apenas com meio de cultura (controle).

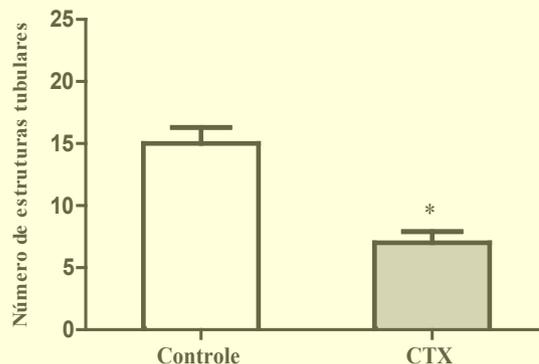


As células endoteliais da linhagem t.End.1 (1×10^6 células/poço) foram aderidas em placas de 24 poços, previamente revestidas com colágeno tipo I, por 1h, para a obtenção de uma monocamada confluyente de células. Após este período, foi realizada uma interrupção, com uma ponteira de 200 μ l, as placas foram lavadas com PBS e incubadas na presença dos sobrenadantes obtidos de cultura de macrófagos. O ensaio foi realizado em 24 horas. Inicialmente, a área livre de células foi medida com uma régua, que foi inserida por programa de computador sobre as imagens correspondentes ao tempo e ao tratamento. Os resultados estão expressos como Número de Células Migradas e representam a média \pm e.p.m. para seis amostras por grupo. *P<0,05 por comparação aos grupos incubados com macrófagos pré-tratados apenas com meio de cultura (respectivos controles).

Figura 3 – Efeito do co-cultivo de macrófagos pré-incubados com a CTX e do sobrenadante obtido de cultura de macrófagos pré-incubados com a CTX sobre a migração de células endoteliais.

Por último, foi avaliada a ação de macrófagos previamente tratados com a CTX sobre a capacidade das células endoteliais em formar estruturas tubulares do tipo capilares, na presença de sobrenadantes coletados de monoculturas de macrófagos. Na Figura 4, pode ser observado que após 2 horas de incubação, as células endoteliais apresentaram rápida formação das estruturas tipo capilares, com estruturas alongadas e finas propiciando o contato célula-célula. Células endoteliais incubadas na presença de sobrenadantes de monoculturas

de macrófagos tratados previamente com CTX (0,3 μ g/mL) apresentaram significativa diminuição da formação dessas estruturas do tipo capilar (53%), com poucas estruturas comunicantes, quando comparado ao grupo controle.



Foram plaqueados 50 μ L de Matrigel (9,3mg/mL) em cada poço da placa de 96 poços e polimerizados por 30 min a 37°C, 5% de CO₂. Após o período, células endoteliais t.End.1 ($1,5 \times 10^4$ células) foram ressuspensas em 50 μ L de sobrenadante de macrófagos pré-tratados na ausência (controle) ou presença de CTX (0,3 μ g/mL) e plaqueados sobre o Matrigel polimerizado, em seguida, incubados por 2 horas de incubação a 37°C, 5% de CO₂. Os resultados estão expressos em número de estruturas tubulares e representam a contagem de 5 campos de três amostras distintas de cada grupo. *P<0,0001, por comparação ao grupo controle incubado apenas com meio RPMI 1640.

Figura 4 – Efeito dos sobrenadantes de macrófagos pré-incubados com a CTX a formação de estruturas do tipo tubulares no matrigel 3D.

Conclusão: É bem conhecido que macrófagos induzem a proliferação de células endoteliais, contribuindo para a neovascularização durante o desenvolvimento tumoral. De fato, no presente trabalho foi constatado que os macrófagos induziram aumento na proliferação das células endoteliais. Por outro lado, foi observado que essa proliferação foi reduzida na presença de macrófagos pré-tratados com a CTX. Da mesma forma, o mesmo tratamento reduziu a capacidade migratória e, consequentemente, a formação de estruturas tubulares. Os resultados obtidos também sugerem que esta inibição pode estar associada à modulação induzida pela CTX sobre a secreção de substâncias por essas células, uma vez que tanto o contato Macrófago/t. End.1, como Sobrenadante/t.End.1 acarretam inibição das funções das células endoteliais de magnitude similar.

Foi confirmada a ação supressora dos macrófagos tratados com a CTX sobre os eventos fundamentais envolvidos com a angiogênese, necessários para a proliferação, sobrevivência e invasão de células malignas no desenvolvimento tumoral. Estas observações contribuem para a ampliação dos conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos na atividade antitumoral já descrita para esta toxina. Além disso, confirma o seu potencial como modelo para o desenho de novas drogas capazes de interferir com a progressão tumoral, além de sugerir uma nova perspectiva imunoterapêutica para esse produto integrante da biodiversidade brasileira. **Agradecimentos:** À FAPESP, Auxílios (2012/51241-5 e 2013/17190-7), Programa INCTTOX (2008/57898-0), CNPq e PIBIC-CNPq.

Referências Bibliográficas

- Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*.7(3):211-7, 2005.
- Brigatte P, Sampaio SC, Gutierrez VP, Guerra JL, Sinhorini IL, Curi R, Cury Y. Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. *J Pain*. 8(5):412-21, 2007.
- Cardoso, D.F. & Mota, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon*, 4: 607-612, 1997.
- Cardoso, D.F.; Lopes-Ferreira, M.; Faquim-Mauro, E.L.; Macedo, M.S.; Farsky, S.H.P. Role of crotoxin, a phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediators of inflammation*, 10: 125-33, 2001.
- Costa ES, Faiad OJ, Landgraf RG, Brigatte P, Curi R, Cury Y, Sampaio SC. Involvement Of Formyl Peptide receptors In The Stimulatory Effect Of Crotoxin On Macrophages Co-Cultivated With Tumour Cells. *Toxicon*, 74:167-78, 2013.

6. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 12: 953-64. 2005.
7. Kato EE, Pimenta LA, Pereira JF, Almeida MES, Santos MF, Sampaio SC. Crotoxin, a toxin from rattlesnake venom, inhibits endothelial cells function stimulated by tumor cell conditioned medium: in vitro assay. XII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular/VIII International Symposium on Extracellular Matrix. p.44, 2013.
8. Mantovani, A.; Sazzani, S.; Locati, M.; Allavena, P.; Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.*, 11: 549-55, 2002.
9. Oliveira RBB, Lima TS, Cirillo MC, Sampaio SC. Secretory activity of neutrophils is mediated by macrophages pretreated with crotoxin in co-culture model. *Memórias do Instituto Butantan*, Vol 69 December 2012. XIV Annual Scientific Meeting São Paulo, SP – Brazil. ISSN 1982-3045
- Sampaio, S.C.; Hyslop, S.; Fontes, M.R.; Prado-Franceschi, J.; Zambelli, V.O.; Magro, A.J.; Brigatte, P.; Gutierrez, V.P.; Cury, Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. *Toxicol.* 1: 55(6), 1045-60, 2010, Review.
10. Wang X, Deavers M, Patenia R, Bassett RL Jr, Mueller P, Ma Q, Wang E, Freedman RS. Monocyte/macrophage and T-cell infiltrates in peritoneum of patients with ovarian cancer or benign pelvic disease. *J Transl Med*. 6:430, 2006.
11. Wang X, Zhao X, Wang K, Wu L, Duan T. Interaction of monocytes/macrophages with ovarian cancer cells promotes angiogenesis in vitro. *Cancer Sci*. 104(4):516-23, 2013.

IDENTIFICAÇÃO DE VIAS MOLECULARES ASSOCIADAS À EFICIÊNCIA ALIMENTAR EM FÍGADO DE BOVINOS NELORE

ALEXANDRE, P.A.¹, KOGELMAN, L.J.A.², SANTANA, M.H.A.¹, ELER, J.P.¹, SILVA, S.L.³, LEME, P.R.³, COUTINHO, L.L.⁴, KADARMIDEEN, H.N.² e FUKUMASU, H.¹

¹Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Brasil. Email: pamela.alexandre@usp.br

²Department of Veterinary Clinical and Animal Sciences, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Denmark

³Departamento de Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Brasil.

⁴Departamento de Zootecnia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Brasil.

Introdução: A crescente demanda por energia e proteína para suprir a população humana em constante expansão traz para a pecuária preocupações com o aumento da produtividade e, ao mesmo tempo a diminuição do impacto ambiental que ela gera [1]. Uma forma de se lidar com essas questões é com a melhora na eficiência alimentar (EA) de bovinos de corte, característica diretamente relacionada à produtividade e lucratividade, pois um animal mais eficiente produz mais carne por quilograma de alimento ingerido [2]. Além disso, animais mais eficientes produzem menos poluentes como esterco e metano, o que diminui o impacto ambiental da sua exploração [3].

A seleção para EA é um grande desafio, pois envolve uma combinação de diferentes processos biológicos [4]. Abordagens de biologia de sistemas para análise de dados transcriptômicos podem propiciar a compreensão das complexas funções e interações de genes que trabalham coordenadamente para a expressão dessa característica, tornando possível, no futuro, a sua modulação pela dieta, meio ambiente ou mesmo pela identificação de marcadores moleculares responsáveis pela alteração fenotípica [5].

O presente trabalho, identificou novos genes, funções biológicas e genes reguladores associados a expressão gênica global hepática de animais com alta e baixa eficiência alimentar. **Materiais e métodos:** Noventa e oito animais machos inteiros da raça Nelore foram avaliados quanto à sua EA pela medida de consumo e ganho residual (CGR) [3]. Baseado nos valores extremos

de CGR foram formados dois grupos, um com oito animais de alta eficiência alimentar e outro com oito animais de baixa eficiência alimentar. Amostras de fígado desses animais foram coletadas por biopsia, o seu mRNA foi extraído e posteriormente sequenciado no equipamento Illumina HiSeq 2500. As leituras resultantes do sequenciamento foram avaliadas pelo software FastQC e adaptadores, cauda poliA e bases com baixa qualidade foram removidas pelo software Seqclean. O alinhamento das sequências e a análise de expressão diferencial foram realizados utilizando-se TopHat2/Bowtie2 e Cufflinks2 [4]. A análise de co-expressão gênica foi executada com o pacote WGCNA do R para identificar módulos de genes altamente conectados, [8]. A correlação entre o perfil de expressão gênica desses módulos e o valor de CGR por animal foi calculado para identificar módulos associados à EA. Para a determinação dos genes reguladores dos módulos de interesse, foi utilizado o software Lemon-tree [9], [10]. Finalmente, a co-expressão diferencial entre os grupos de alta e baixa EA foi determinada pela diferença no valor de conectividade dos genes em cada grupo, [8]. Para os genes encontrados em cada abordagem, foi executada uma análise de enriquecimento funcional utilizando-se a ferramenta *on line* GeneCoDis. **Resultados:** Foram identificados 43 transcritos diferencialmente expressos entre os grupos de alta e baixa eficiência alimentar, 23 deles correspondem a genes conhecidos, quatro codificam proteínas não caracterizadas ou pseudogenes recentemente descobertos e 16 são novos transcritos, ou seja, não constam no genoma de referência utilizado (*Bos taurus* UMD 3.1 – ENSEMBL V67). Dentre os transcritos diferencialmente expressos, 17 deles correspondem a apenas uma das diferentes isoformas expressas pelo respectivo gene. Um exemplo é o gene *LDB3* que apresenta 6 isoformas diferentes, mas apenas a isoforma TCONS_00049442 é diferencialmente expressa (Figura 1). A análise modular de enriquecimento funcional mostrou que os genes diferencialmente expressos estão enriquecidos para ligação de grupo heme, região extracelular, citocromo P450, classe E, grupos I e IV, ligação de íons de metal e atividade de homodimerização de proteína (P-valor corrigido para taxa de falso positivo < 0,05).

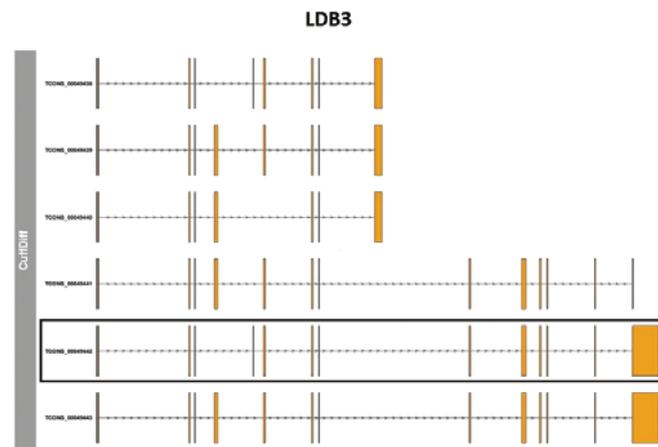


Figura 1 – Isoformas expressas do gene *LDB3*, em destaque a isoforma TCONS_00049442 expressa diferencialmente entre os grupos de alta e baixa EA.

As análises seguiram no sentido de identificar grupos de genes que apresentam perfil de expressão correlacionados e que, trabalham cooperativamente para uma dada função biológica ou estão sob o controle do mesmo conjunto de fatores de transcrição. A análise de co-expressão identificou 35 módulos de genes co-expressos e altamente conectados, mas apenas dois deles apresentaram correlação com eficiência alimentar e foram chamados de módulo Marrom e módulo Cinza (Figura 2). O módulo Marrom é composto por 155 genes e a análise modular de enriquecimento funcional mostrou que eles são, em sua maioria, constituintes estruturais de ribossomo e estão envolvidos na tradução de proteínas (P-valor corrigido para taxa de falso positivo < 0,05). Já o módulo