

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÊNFASE EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE

HELENA FRANCELIN

**EFEITO DO AMBLYOMIN-X NO PROCESSO DE ATIVAÇÃO E DIFERENCIAMENTO
DA LINHAGEM CELULAR THP-1**

RIBEIRÃO PRETO
2018

HELENA FRANCELIN

EFEITO DO AMBLYOMIN-X NO PROCESSO DE ATIVAÇÃO E DIFERENCIADA LINHAGEM CELULAR THP-1

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas, com Ênfase em Biotecnologia em Saúde.

Orientador(a): Dra. Ana Marisa Chuszinski-Tavassi

RIBEIRÃO PRETO
2018

Àquela que viveu comigo todas as conquistas e frustrações da graduação, como se fossem suas. Àquela que nunca deixou de me ouvir. À quem me inspira todos os dias. À minha irmã.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ana Marisa Chudzinski-Tavassi, pela oportunidade de estudar sob sua orientação e por ser um exemplo e incentivadora da inovação na pesquisa brasileira.

Aos coordenadores e professores do Curso de Ciências Biomédicas por seu empenho e dedicação fundamentais para a construção do curso.

À todos os mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos membros do CENTD por compartilharem seus conhecimentos e experiências, que sem dúvidas foram muito importantes para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Dr. Jean Gabriel de Souza por me mostrar as belezas da Imunologia, e principalmente, pela paciência de me ensinar e acompanhar em cada etapa do meu trabalho e sempre me salvar nos momentos de desespero.

Ao Dr. Carlos De Ocesano Pereira pelos ensinamentos em Biologia Molecular e os conselhos sobre a vida, e por se tornar uma inspiração para mim.

Ao Dr. Giuliano Bonfá por compartilhar comigo todas as adversidades ao longo da padronização da THP-1 e pelas importantes discussões sobre a diferenciação celular, sem as quais não seria possível consolidar o modelo celular.

À minha família, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões e nunca me deixaram desistir; em especial à minha irmã, que viveu comigo todas as aventuras ao longo da minha graduação.

“Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como você o encara é que faz a diferença.”

(Benjamin Franklin)

RESUMO

O tumor é uma massa heterogênea composta por diversos tipos celulares, como células imunológicas, endoteliais, estromais e tumorais. A interação entre estas células ocorre por contato direto, via ativação e/ou inibição de receptores ou via mediadores solúveis, tais como citocinas e quimiocinas. O conjunto de eventos que ocorre na massa tumoral, também chamado de microambiente tumoral é um sistema complexo capaz de modular a função de células do sistema imunológico o qual pode favorer ou inibir a progressão do tumor. Diversos mecanismos como nutrição, sobrevivência, crescimento e dispersão de metástases são orquestrados por este microambiente. Os macrófagos associados ao tumor (TAM) são as principais células imunológicas que atuam no microambiente tumoral, e podem exercer diversas funções que contribuem para a progressão do tumor, como angiogênese, crescimento celular e metástase. Como exemplo, em pacientes oncológicos, o recrutamento de macrófagos em determinados tumores, induzem maior formação de coágulos, bem como, angiogênese, o que está relacionado com o maior desenvolvimento do tumor e maior ocorrência de metástase.. O Amblyomin-X é uma proteína recombinante expressa em sistema *E.col*, sem cauda de histidina, que foi identificada a partir da biblioteca de cDNA das glândulas salivares do carapato *Amblyomma sculptum*. Estudos *in vitro* e *in vivo* com Amblyomin-X demonstram que esta proteína é capaz de inibir o Fator Xa da cascata de coagulação, e possui efeito antitumoral via inibição do proteassoma, estresse do retículo endoplasmático e parada do ciclo celular, de forma seletiva ao tumor. Os efeitos do tratamento com Amblyomin-X reforçam o potencial desenvolvimento da molécula como um futuro fármaco. No entanto, a estreita relação entre os sistemas de coagulação sanguínea e imunológico frente a modulação do microambiente tumoral carece de maiores estudos, para o melhor entendimento da ação desta proteína em células presentes no microambiente tumoral, especialmente células imunológicas.

Palavras-chave: THP-1; Diferenciação celular; Macrófagos tipo 1; Amblyomin-X; ativação celular.

ABSTRACT

The tumor is a heterogeneous mass composed of several cell types, such as immunological, endothelial, stromal and tumor cells. The interaction between these cells occurs by direct contact, via activation and / or inhibition of receptors or via soluble mediators, such as cytokines and chemokines. The set of events that occurs in the tumor mass, also called tumor microenvironment is a complex system capable of modulating the function of cells of the immune system which may favor or inhibit tumor progression. Several mechanisms such as nutrition, survival, growth and dispersal of metastases are orchestrated by this microenvironment. Tumor-associated macrophages (TAM) are the major immunological cells that act in the tumor microenvironment, and can exert various functions that contribute to tumor progression, such as angiogenesis, cell growth and metastasis. As an example, in cancer patients, recruitment of macrophages into certain tumors induces increased clot formation, as well as angiogenesis, which is related to increased tumor development and increased occurrence of metastasis. Amblyomin-X is a protein recombinant strain expressed in E.coli system, without histidine tail, which was identified from the cDNA library of *Amblyomma sculptum* tick salivary glands. In vitro and in vivo studies with Amblyomin-X demonstrate that this protein is capable of inhibiting Factor Xa of the coagulation cascade, and has an antitumor effect via proteasome inhibition, endoplasmic reticulum stress and cell cycle arrest, selectively to the tumor . The effects of Amblyomin-X treatment reinforce the potential development of the molecule as a future drug. However, the close relationship between blood clotting and immunological systems against the modulation of the tumor microenvironment needs further studies to better understand the action of this protein in cells present in the tumor microenvironment, especially immunological cells.

Key words: THP-1; Cell differentiation; Macrophage Type 1; Amblyomin-X; cell activation

LISTA DE IMAGENS

Figura 1: representação dos mecanismos de imunoedição em tumores.....	15
Figura 2: Representação da diferenciação celular de THP-1 em macrófagos pelos protocolos 1 e 2	33
Figura 3: Representação da diferenciação celular de THP-1 em macrófagos pelos protocolos 3 e 4	34
Figura 4: Modulação da expressão de marcadores celulares após o processo de diferenciação celular.....	35
Figura 5: imagens representativas da expressão dos marcadores celulares CD11b e CD14 frente aos diferentes protocolos de diferenciação celular	36
Figura 6: Representação da estratégia de <i>gate</i> utilizada para análise dos dados da citometria de fluxo por imagem.....	38
Figura 7: Ativação de STAT3 após o tratamento de macrófagos e células THP-1 com Amblyomin-X por 24h.....	39
Figura 8: Imagens representativas da translocação nuclear de STAT3 em células controle e tratadas com Amblyomin-X	39
Figura 9: Ativação de p38 após o tratamento de macrófagos e células THP-1 com Amblyomin-X por 24h.....	40
Figura 10: Imagens representativas da translocação nuclear de p38 em células controle e tratadas com Amblyomin-X	41
Figura 11: Representação da integridade das amostras utilizadas no experimento de qRT-PCR.....	42
Figura 12: Modulação da expressão gênica após o tratamento de macrófagos e células THP-1 com Amblyomin-X por 12h.....	44
Figura 13: Modulação da expressão gênica após o tratamento de macrófagos e células THP-1 com Amblyomin-X por 24h	45
Figura 14: Modulação do perfil de liberação de citocinas após o tratamento de macrófagos e células THP-1 com Amblyomin-X por 12 e 24h	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: lista das citocinas analisadas por Multiplex	27
Tabela 2: lista dos genes avaliados por qRT-PCR e representação das respectivas sequências dos primers <i>forward</i> e <i>reverse</i> utilizados para realização do experimento	31
Tabela 3: Índice de pureza das amostras utilizadas no experimento qRT-PCR.....	42
Tabela 4: Quantificação das amostras utilizadas no experimento qRT-PCR.....	43
Tabela 5: lista das citocinas moduladas pelo tratamento com Amblyomin-X.....	46

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cDNA	DNA complementar
HCS	<i>High Content Screening</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
IRF3	<i>Interferon Regulatory Factor 3</i>
IRF9	<i>Interferon Regulatory Factor 9</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
MIP-1	<i>Macrophage Inflammatory Protein 1</i>
Myd88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
mRNA	RNA mensageiro
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PHEM	<i>Pipes – HEPES- EGTA – MgCl₂</i>
p38	Mitogen activated <i>protein kinase p38</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
qRT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time
SFB	Soro Fetal Bovino
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
TAM	<i>Tumor Associate Macrophage</i>
TFPI	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>
TRIM	<i>T Cell interaction molecule</i>
SOCS3	<i>Supressor of cytokine signaling 3</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

mL	mililitros
μ L	microlitros
μ M	micromolar
nM	nanomolar
nm	nanometro

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE IMAGENS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	9
LISTA DE SÍMBOLOS	10
1) Introdução.....	12
1.1) Inflamação e câncer.....	12
1.2) Macrófagos associados ao tumor (TAM).....	16
1.3) Amblyomin-X	17
1.4) Linhagem celular de monócito humano - THP-1.....	19
2) Objetivo	20
3) Materiais e Métodos	20
3.1) Cultura de células.....	20
3.2) Diferenciação da linhagem THP-1 em macrófagos utilizando PMA.....	20
3.3) Tratamento e coleta das células.....	21
3.4) Avaliação da taxa de diferenciação celular por HCS (High Content Screening).....	23
3.5) Avaliação do estado de ativação celular após o tratamento com Amblyomin-X por Citometria de Fluxo por Imagem	25
3.6) Análise da modulação de citocinas induzida pelo tratamento com Amblyomin-X através da técnica de Multiplex	26
3.7) Avaliação da expressão gênica induzida pela diferenciação celular e pelo tratamento com Amblyomin-X pela técnica de qRT-PCR	28
3.8) Análise estatística	31
3) Resultados e discussão	32
3.1) Padronização da diferenciação celular a partir da linhagem THP-1	32
3.2) Expressão de receptores envolvidos no processo de diferenciação em macrófagos....	34
3.3) Translocação nuclear de STAT3 e P38 em THP-1 e Macrófagos após tratamento com Amblyomin-X.....	37
5) Conclusão.....	49
6) Referências Bibliográficas	50

1) Introdução

1.1) Inflamação e câncer

O câncer é uma doença que está relacionada à desregulação da proliferação celular; ao desenvolvimento de mecanismos de evasão do sistema imune e da morte celular; alterações metabólicas; angiogênese; instabilidade genômica e mutações, o que permite que células normais se tornem células neoplásicas (Hanahan and Weinberg, 2011). Algumas células tumorais têm a capacidade de se desprender da massa tumoral e migrar para outros órgãos através da corrente sanguínea ou linfática, sendo este fenômeno caracterizado como metástase (Kitamura et al., 2015). A divisão celular acelerada leva ao crescimento de uma massa de tecido sólido e desorganizado, denominado tumor, o qual é caracterizado por ser bastante heterogêneo, sendo composto por células tumorais; estromais, como por exemplo fibroblastos e células endoteliais; e células do sistema imune, como macrófagos, linfócitos e células dendríticas; além de matriz extracelular, a qual pode apresentar quantidades variáveis dependendo do tamanho tumor (de Visser et al, 2006).

O desenvolvimento do câncer está associado a diversos fatores ambientais e genéticos. O estilo de vida do paciente, como tabagismo, obesidade, presença de infecções crônicas e exposições a substâncias cancerígenas são as principais causas de câncer relacionadas a fatores ambientais. Já o histórico familiar de desenvolvimento de tipos específicos de câncer indicam uma predisposição ligada a hereditariedade genética. Tais fatores, quando combinados, resultam em uma série de mutações no material genético, fazendo com que a célula não passe pelo processo de senescência, se multiplicando indeterminadamente. Além disso, o microambiente composto por citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento liberados por diversos tipos celulares induz a formação de novos vasos sanguíneos, o que proporciona as condições adequadas para o crescimento do tumor e invasão de tecidos distantes, através da chegada de nutrientes pelo suprimento sanguíneo (Grivennikov et al., 2010) .

Sabe-se que a maioria dos tumores recrutam células imunológicas, o que contribui para o desenvolvimento de um quadro inflamatório, principalmente devido a ação de células do sistema imune inato, como macrófagos associados ao tumor (na sigla em inglês TAM, *Tumor-Associated Macrophage*) (Shiao et al., 2011). A inflamação proporciona a liberação de citocinas e quimiocinas, que juntamente com

demais fatores liberados por outras células presentes na massa tumoral, como células estromais, endoteliais e tumorais, desenvolvem um microambiente que é capaz de modular a ação das células inflamatórias, resultando no desenvolvimento de um perfil imunossupressor e desenvolvimento de respostas inflamatórias pró-tumorais que favorecem o crescimento do tumor (Gajewski et al., 2013). Dessa forma, as células inflamatórias presentes no tumor liberam citocinas que auxiliam na progressão dos mecanismos necessários para o desenvolvimento tumoral, como angiogênese, replicação celular ilimitada, invasão e metástase. Este fenômeno é denominado imunoedição, em que a medida que o tumor cresce, há o desenvolvimento de um microambiente tumoral imunossupressor, que estimula o desenvolvimento de mecanismos de evasão da resposta imune protetora (Smyth et al., 2006).

Vesely e colaboradores descrevem em seu trabalho as várias interações entre a imunidade inata e adaptativa no câncer sugerindo um modelo dinâmico de imunoedição, onde células como macrófagos M2, MDSC, TH17, Treg e TCD8⁺ expressando o receptor CTLA-4 estão presentes na inflamação crônica e favorecem os processos relacionados à progressão tumoral. Em contra partida, os autores ainda apontam a importância das células NK, NKT, TCD8⁺, TCD4⁺, Macrófagos M1, DCs, célula T $\gamma\delta$ e as citocinas IL12 e IFN-gama no equilíbrio e eliminação de células tumorais, conforme ilustrado na figura 1.

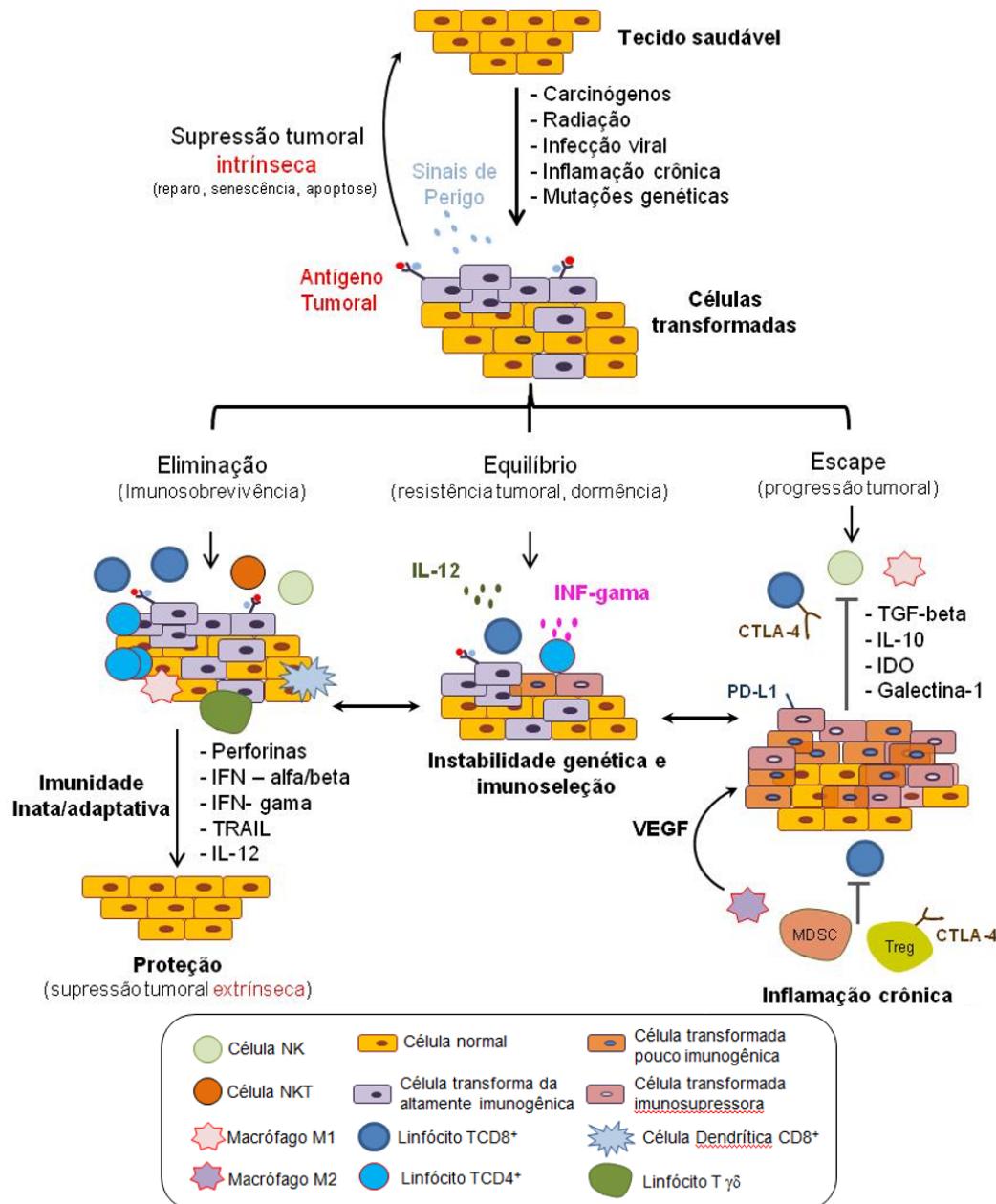


Figura 1: Imunoedição do processo tumoral: envolvimento da Imunidade Inata e adaptativa na erradicação, equilíbrio e promoção tumoral, adaptada de Vesely, 2011

As principais células imunológicas encontradas no tumor e que contribuem para o desenvolvimento do microambiente tumoral são os linfócitos (Gajewski et al., 2013), e macrófagos associados ao tumor (TAM), que possuem importante papel no desenvolvimento do quadro inflamatório (Grivennikov et al., 2010). TAMs participam de diversos processos envolvidos no desenvolvimento tumoral e metástase, desde a angiogênese, até a transição epitélio-mesenquimal, transporte de células tumorais na corrente sanguínea, intravasão e extravasão de células tumorais dos vasos

sanguíneos e preparação do nicho pré-metástatico. Além disso, também estão relacionados com a liberação de citocinas que contribuem para o desenvolvimento do microambiente tumoral e modulação de células do sistema imunológico (Kitamura et al., 2015; Noy and Pollard, 2014).

Diversos tipos de tumores apresentam infiltrados linfocitários, apresentando linfócitos T CD4+, os quais podem liberar citocinas que contribuem ou inibem o crescimento do tumor dependendo do microambiente tumoral desenvolvido; e linfócitos TCD8+, os quais estão relacionados com o melhor prognóstico do câncer e desenvolvimento de respostas antitumorais, apesar de também serem modulados pela ação de outras células inflamatórias presentes no tumor (Grivennikov et al., 2010; Gajewski et al., 2013).

Outro tipo celular que também está presente no tumor e possui sua função alterada devido a ação do microambiente tumoral são as células dendríticas, as quais podem exercer um papel pró-tumoral através da maior expressão de moléculas regulatórias da resposta imunológica antitumoral, como PD-1; e da redução da ativação do sistema imunológico adaptativo de combate ao tumor, devido ao fato de que o microambiente tumoral é capaz de reduzir o potencial de apresentação de抗ígenos destas células (Tran Janco et al., 2015).

É importante notar também que os tipos de células imunológicas presentes em cada tumor varia de acordo com o tipo de câncer que o paciente apresenta, bem como a função de tais células pode variar segundo o microambiente tumoral desenvolvido, o que faz com que diferentes tipos de tumor apresentem mecanismos diferentes de desenvolvimento (Grivennikov et al., 2010).

Tais células inflamatórias liberam diversas citocinas, como IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-22, TNF-alfa e TGF- β que são capazes de se ligarem a receptores presentes na membrana plasmática de células tumorais e desencadear diversas vias de sinalização intracelulares, provocando a ativação de alguns fatores de transcrição como STAT3, NF-kB e AP-1, os quais ativam genes relacionados com a sobrevivência, proliferação e crescimento celular; produção e liberação de citocinas; angiogênese e motilidade, o que contribui para o crescimento da massa tumoral (Grivennikov et al., 2010). Tais citocinas também participam do processo de metástase, exercendo diferente funções, como preparação do nicho pré-metastático, síntese de metaloproteínas de matriz, transição epitelio-mesenquimal de células

tumorais, bem como intravasão e extravasão de tais células nos vasos sanguíneos (Kitamura et al., 2015; Noy and Pollard, 2014).

Além disso, diversos estudos já comprovaram que além da ação do sistema imunológico no microambiente tumoral, o sistema hemostático também exerce importante função no mesmo, contribuindo para o desenvolvimento tumoral. Alguns estudos demonstram que o tumor induz o estado de hipercoagulabilidade, e predispõe a formação de coágulos e trombose; ao passo que a fibrinólise afeta a biologia do tumor, reduzindo o crescimento do mesmo, a angiogênese e a taxa de metástase (Wang et al., 2012). Dessa forma, a indução ao estado de hipocoagulação em casos de desenvolvimento tumoral pode reduzir o crescimento do mesmo.

1.2) Macrófagos associados ao tumor (TAM)

Os macrófagos associados ao tumor são considerados as células mais importantes no desenvolvimento da inflamação e do microambiente tumoral, liberando grandes quantidades de citocinas que promovem o crescimento tumoral, como IL-6, TNF- alfa e IFN-gama (Grivennikov et al., 2010; Noy and Pollard, 2014) . Assim como demais células do sistema imunológico, os macrófagos recrutados para o ambiente tumoral apresentam inicialmente respostas antitumorais. No entanto, ao passo que o microambiente tumoral se desenvolve, a resposta imunológica destas células é modulada, sendo caracterizada pelo seu papel imunossupressor e pró-tumoral (Qian and Pollard, 2010).

TAMs participam de diferentes processos necessários para a progressão do tumor, como angiogênese, invasão, motilidade, intravasão, extravasão, crescimento celular e até mesmo preparação do nicho pré-metastático (Kitamura et al., 2015; Noy and Pollard, 2014). Estes mecanismos pró-tumorais ocorrem devido a liberação de diferentes citocinas, como CSF-1, EGF e TGF-beta; quimiocinas, como CCL22, CCL5 e CCL20; algumas enzimas, como Arginase-I; bem como a expressão de algumas moléculas em sua membrana plasmática, como PD-L1 e B7, que são capazes de se ligarem a receptores PD-1 e CTLA-4, respectivamente, que quando ativados levam a imunossupressão de diversas células efetoras do sistema imune, como linfócitos T CD4+ e T CD8+ (Noy and Pollard, 2014) .

As citocinas liberadas pelos macrófagos associados ao tumor (TAM) também são responsáveis pela modulação do perfil imunossupressor do microambiente

tumoral, juntamente com demais citocinas liberadas pelas diferentes células presentes no tumor, o que acarreta no desenvolvimento, recrutamento e sobrevivência de linfócitos T reguladores; inativação de linfócitos T citotóxicos; e inativação e diminuição da maturação de linfócitos T CD4+, fazendo com que estas células apresentem perfil imunossupressor, o que contribui para o crescimento tumoral (Grivennikov et al., 2010; Noy and Pollard, 2014; Qian and Pollard, 2010).

Além disso, sabe-se também que há uma significante relação entre a formação de coágulos e o recrutamento de macrófagos, o que contribui com o desenvolvimento tumoral e o maior índice de metástases (Gil-Bernabe et al., 2012). Devido ao fato de que as células tumorais apresentam maior expressão do Fator Tecidual, também conhecido como Fator III, o qual é responsável por iniciar a via extrínseca da cascata de coagulação (Lima and Monteiro, 2013), há a maior formação de coágulos em regiões próximas ao tumor. Alguns macrófagos, em especial aquelas células que expressam CD11b, são capazes de se interagir com alguns componentes do coágulo, como fibronectina, e desencadear uma série de ações sobre o tumor relacionados a sobrevivência das células tumorais e o processo de metástase, através da liberação de citocinas (Gil-Bernabe et al., 2012).

Outro fator que contribui para o maior índice de formação de coágulos em pacientes oncológicos, é a maior expressão dos fatores de ativação da cascata de coagulação, os quais juntamente com o Fator Tecidual, expresso nas células tumorais, desencadeiam uma série de sinalizações intracelulares que culminam na angiogênese tumoral e crescimento do mesmo (Lima and Monteiro, 2013). Ademais, tais proteínas também podem agir como mediadores capazes de modular o perfil de ativação dos macrófagos recrutados devido à formação do coágulo, o que resulta no perfil imunossupressor e pró tumoral (Ma et al., 2011). Sendo assim, inibidores dos fatores de ativação da cascata de coagulação são alternativas para o tratamento do câncer e redução de metástases (Lima and Monteiro, 2013).

1.3) Amblyomin-X

O Amblyomin-X, é uma proteína recombinante, com massa molecular de cerca de 13 KDa, capaz de inibir o fator X ativado da cascata de coagulação, com Ki na faixa de 4 uM, de forma não competitiva. Esta molécula foi encontrada a partir de estudos de uma biblioteca de cDNA das glândulas salivares do carrapato *Amblyomma sculptum*, popularmente conhecido como Carapato Estrela (Branco et

al., 2016). Esta proteína apresenta o domínio do tipo Kunitz, o qual também está presente em alguns inibidores da cascata de coagulação, como TFPI ou inibidores TFPI-like (Batista et al., 2010).

Alguns inibidores da cascata de coagulação, como heparina, TFPI e outros inibidores do fator X ativado, possuem efeitos anti-angiogênicos, antitumorais e antimetastáticos (Wang et al., 2012; Zalpour et al., 2011). O Amblyomin-X também é capaz de reduzir a massa tumoral e metástase em tumores sólidos (Ventura et al., 2013), através da indução à apoptose devido a inibição do proteassoma e parada do ciclo celular (Chudzinski-Tavassi et al., 2010; Maria et al., 2013). Além disso, o tratamento de animais saudáveis com a proteína recombinante não apresentou toxicidade para células em estado fisiológico e demais órgãos saudáveis, indicando um mecanismo de seletividade para células tumorais (Chudzinski-Tavassi et al., 2010).

Como já descrito anteriormente, o sistema imunológico exerce papel importante no microambiente tumoral, principalmente devido a imunoedição realizada pelas microambientes tumorais (Gajewski et al., 2013). Dessa forma, a modulação da função das células imunológicas no ambiente tumoral pode favorecer a redução do tumor, bem como a diminuição das taxas de metástase. Dados recentes do grupo demonstraram, em modelo translacional de tumor renal, que o tratamento com Amblyomin-X demonstrou o maior recrutamento e ativação de linfócitos T CD4+, T CD8+ e células NK, além de alterar o perfil de citocinas e induzir a modulação do tipo de resposta pró-inflamatória no microambiente tumoral favorecendo o efeito antitumoral da molécula.

Dessa forma, o Amblyomin-X é uma molécula capaz de induzir a apoptose seletiva de células tumorais, bem como a redução de metástases, através da inibição do proteassoma, sendo que seu efeito antitumoral é intensificado pela ação de células imunológicas, devido a sua potencial atividade imunomoduladora. Além disso, o Amblyomin-X também é capaz de inibir a cascata de coagulação, a qual desempenha importante função quanto a sobrevivência e dispersão de células tumorais através de mecanismos relacionados ao recrutamento, ativação e modulação de macrófagos. Assim sendo, é de grande relevância compreender melhor o efeito do Amblyomin-X no processo de ativação dos macrófagos.

1.4) Linhagem celular de monócito humano - THP-1

Diversos estudos têm como objetivo compreender melhor o papel de monócitos e macrófagos no contexto de diversas doenças, uma vez que o sistema imunológico exerce importante papel no desenvolvimento de algumas doenças crônicas, como câncer, diabetes e osteoartrite. O uso de linhagens celulares é bastante difundido na área da pesquisa visando o melhor controle de variáveis afim de elucidar o entendimento acerca do objeto de estudo. A THP-1 é uma linhagem de monócito cultivada em suspensão e que responde a diferenciação para células de origem mieloide dependendo do tipo de estímulo. Classicamente, a THP-1 pode ser induzida a diferenciação celular para macrófagos quando tratada com ésteres de forbol, como o PMA (*forbol-12-miristato-13-acetato*); ou demais moléculas, como 1,25 – dihidroxivitamina D₃ (Daigneault et al., 2010).

A THP-1 (ATCC® TIB 202) foi estabelecida em 1980, e obtida a partir do sangue periférico de uma criança portadora de uma doença denominada leucemia monocítica aguda (Tsuchiya et al., 1980). É caracterizada por ser cultivada em suspensão e apresentar morfologia arredondada, alta refringência, e compartilhar algumas características específicas de monócitos humanos, como expressão de alguns marcadores (Qin, 2012).

A THP-1 é uma das linhagens celulares mais utilizadas em pesquisas, devido ao fato de apresentar algumas vantagens em relação ao uso de monócitos humanos primários, como acessibilidade fácil e rápida, pelo fato de poderem ser congeladas por muito tempo sem que a viabilidade ou capacidade de diferenciação seja alterada; alto índice de proliferação; baixo risco de contaminação com demais tipos celulares; e background genético homogêneo, o que reduz o grau de variabilidade de fenótipo celular . Além disso, alguns estudos já demonstraram que a THP-1 apresenta um fenótipo mais semelhante a de monócitos humanos em relação a outras linhagens monocíticas, como por exemplo a U937 (Qin, 2012; Forrester et al., 2018).

Na literatura, o agente indutor da diferenciação celular mais utilizado é o PMA, o qual é capaz de ativar a enzima PKC (Protein Kinase C), proteína presente em vias de sinalização intracelulares relacionadas à diferenciação e proliferação celular (Daigneault et al., 2010). Sabe-se que o tratamento de células THP-1 com PMA ativa majoritariamente a isoforma PKC δ (Schwende et al., 1996), através da

ligação do agente indutor no domínio N-terminal da proteína PKC, o que induz a translocação da mesma para o seu sítio de ação, que resultará na ativação de fatores de transcrição como NF- κ B e AP1 (Park et al., 2007). Além disso, anteriormente ao início do processo de diferenciação celular, o PMA inibe a progressão do ciclo celular na fase G1/S, através da ativação da via de sinalização MAPK de maneira dependente da produção de ROS (Reactive Oxygen Species). Sendo assim, estudos sugerem que a ativação da via de sinalização Raf/MEK/ERK pode interferir de maneira direta ou indireta na regulação da expressão gênica que ocorre no processo de diferenciação celular (Traore et al., 2005).

2) Objetivo

Avaliar o efeito do Amblyomin-X na ativação e modulação de macrófagos derivados da linhagem celular THP-1.

3) Materiais e Métodos

3.1) Cultura de células

As células foram cultivadas em suspensão em meio RPMI 1640 como recomendado pela ATCC®, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de L-glutamina em garrafas de 125 cm³, com volume total de 30ml, à 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. A troca de meio foi realizada a cada três dias, com densidade inicial de 200.000 células/ml, seguindo as recomendações descritas pela ATCC®.

3.2) Diferenciação da linhagem THP-1 em macrófagos utilizando PMA

Alguns protocolos de diferenciação celular da linhagem THP-1 em macrófagos induzida por PMA foram testados, a fim de padronizar a melhor condição para o presente estudo. Há diversos estudos com protocolos divergentes quanto a concentração de PMA, o período de tratamento e o tempo de descanso. Após uma breve análise da literatura, notou-se que a concentração de PMA variava entre 5nM e 200nM entre os diferentes protocolos. Além disso, os períodos de tratamento eram inversamente proporcionais às concentrações de PMA, ou seja, quanto maior concentração de PMA, menor o período de tratamento. Sendo assim, foram encontrados protocolos que apresentavam tempo de tratamento de 24horas a 4

dias. Por fim, também observou-se que o tempo de descanso variava de modo proporcional à concentração de PMA utilizada, apresentando uma variação de 24 horas a 5 dias dentre os diferentes protocolos estudados.

A fim de selecionar o protocolo mais adequado para a realização dos experimentos, testou-se 4 protocolos distintos, sendo eles:

1. 100nM de PMA durante 3 dias + 5 dias de descanso
2. 100nM de PMA durante 3 dias + 3 dias de descanso
3. 100nM de PMA durante 2 dias + 24 horas de descanso
4. 25nM de PMA durante 2 dias + 24 horas de descanso

Todos os protocolos foram realizados utilizando 2×10^6 células em garrafas de 25 cm³, com volume total de 5 ml.

Preparação do meio para diferenciação

O PMA (Sigma) utilizado para realização de todos os experimentos foi diluído conforme instruções fornecidas pelo próprio fabricante, e aliquotado em eppendorf âmbar, com volume de 15µl cada na concentração de 1mg/mL, e armazenado a -20°C.

Cada alíquota de PMA foi utilizado uma única vez, sendo a fração não utilizada descartada. Preparava-se o volume necessário de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB, em tubos Falcon, e em seguida, acrescentava-se o PMA conforme a molaridade de cada condição. Por fim, colocava-se 5 ml deste meio, juntamente com as células, em cada garrafa, e incubava-se por 48 horas em estufas à 37°C e 5% de CO₂.

Preparação do meio para o período de descanso

Após o período de tratamento com PMA, o meio foi aspirado e adicionado 5 ml de meio RPMI 1640 fresco, suplementado com 10% de SFB e 1% de L-glutamina, durante os períodos estabelecidos, em estufas à 37°C e 5% de CO₂.

3.3) Tratamento e coleta das células

Após a diferenciação em macrófagos, as células foram tratadas com 50µM de Amblyomin-X com volume final de 2,5ml de meio, em privação de soro fetal bovino,

em garrafas de 25 cm³. Os tratamentos foram realizados durante 12 e 24 horas, em quatro condições distintas, sendo elas:

- THP-1 sem tratamento;
- THP-1 tratada com 50µM de Amblyomin-X;
- macrófago sem tratamento;
- macrófago tratado com 50µM de Amblyomin-X.

Ao término de cada uma das condições de tratamento acima citadas, as células eram coletadas e ressuspensas em PBS 1X. Previamente ao início dos protocolos dos diferentes experimentos subsequentes, avaliava-se o número de células recuperadas e a viabilidade celular através do método de exclusão pelo corante Azul de Tripans.

Processo de coleta de células THP-1 após o tratamento

Para obtenção das células THP-1, coletava-se todo o meio em tubos Falcon, centrifugava-se por 5 minutos a 1100 rpm, descartava-se o sobrenadante, e então, o pellet de células era ressuspensido em 1ml PBS 1X.

Processo de coleta de macrófagos derivados de THP-1 após o tratamento

Como os macrófagos derivados de THP-1 são células aderentes, é necessário utilizar alguma reação enzimática para soltá-los da garrafa. Para tanto, foi utilizado o reagente TripLE Express, o qual é um substituinte direto da Tripsina, e que através da reação de protease recombinante cliva a porção C-terminal das proteínas de adesão celulares. O mesmo foi escolhido devido ao fato de apresentar maior eficiência, menor degradação de proteínas celulares e maior rapidez em relação a Tripsina.

Sendo assim, para execução do protocolo de obtenção dos macrófagos, o meio foi aspirado, e a garrafa lavada somente uma vez com 5ml de PBS 1X. Em seguida, 2ml de TripLE Express foi adicionado por 20 minutos em estufa à 37°C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, acrescentou-se 2ml de PBS 1X, uma vez que o TripLE Express não necessita de nenhum inibidor para ser inativado, bastando apenas a diluição do mesmo. Por fim, coletava-se todo o volume em tubos Falcon, centrifugava-se por 5 minutos a 1100 rpm, descartava-se o sobrenadante e o pellet de células era ressuspensido em 1ml de PBS 1X.

3.4) Avaliação da taxa de diferenciação celular por HCS (High Content Screening)

High Content Screening (HCS) é uma tecnologia avançada que permite a aquisição de forma automatizada de imagens de microscopia de fluorescência em alta resolução, as quais estão acopladas a um sistema de análise quantitativa. Neste processo analítico, além de obter dados quantitativos em larga escala relacionados a morfologia celular (morfometria), também podemos extrair dados quantitativos baseados na intensidade de fluorescência de marcadores específicos. Devido aos diversos avanços tecnológicos na ciência, como microscópios automatizados, melhoramento de softwares de análise de imagens, plataformas de softwares integrados e acesso a banco de dados, o HCS é capaz de avaliar uma grande quantidade de amostras de maneira rápida e eficaz, o que contribui para que esta seja uma das metodologias mais utilizadas recentemente na busca de novas drogas, além de estudos de larga escala para compreensão de sistemas biológicos e efeitos de pequenas moléculas na biologia celular (Zanella et al, 2018).

Esta ferramenta foi utilizada com o objetivo de avaliar a taxa de diferenciação celular a partir da análise da variação do nível de expressão de receptores de membrana característicos de células THP-1 e macrófagos, após o protocolo de diferenciação celular com PMA.

Escolha dos protocolos de diferenciação celular e obtenção das amostras

Visando a padronização da diferenciação celular de THP-1 em macrófagos, foram testados vários protocolos de diferenciação celular conforme descritos anteriormente. Durante este processo, as células foram observadas por microscópio óptico de luz, a fim de avaliar quais procedimentos testados resultariam em alterações morfológicas. Dos quatro protocolos testados, apenas dois indicaram adequada mudança morfológica característica de macrófagos, os quais foram escolhidos para análise dos receptores por HCS, sendo eles:

- 1) Tratamento com 25nM PMA por 48 horas + 24 horas de descanso
- 2) Tratamento com 100nM PMA por 48 horas + 24 horas de descanso

Para realização do experimento, foram plaqueadas 4×10^6 células em 2 garrafas de 25 cm^3 , para cada um dos protocolos listados acima, e as células foram

tratadas por 48 horas com as diferentes concentrações de PMA. Após o período de tratamento, as células foram coletadas segundo o protocolo descrito anteriormente. Em seguida, plaqueou-se 4×10^4 células por poço em uma placa de 96 wells, estéril, preta, μClear e específica para HCS (Greiner, No.: 675986). Após o plaqueamento, as células descansaram durante 24 horas em meio fresco, na estufa à 37°C e 5% de CO₂.

Seleção dos marcadores de diferenciação celular

Para avaliação da taxa de diferenciação celular, escolheu-se os receptores de membrana CD11b, como marcador para macrófago; e CD14, como principal indicador de células THP-1, conforme descrito na literatura (Forrester et al., 2018; Qin, 2012).

Protocolo de marcação para imunofluorescência

Após a realização da diferenciação celular, iniciou-se o protocolo de marcação para imunofluorescência, o qual é composto por quatro etapas principais. A primeira delas é a etapa de fixação celular, em que se utiliza uma solução de PHEM (2 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 60 mM PIPES – pH 6.9) contendo PFA 4% durante 30min a temperatura ambiente, seguido por 3 lavagens com PHEM-Glicina, com um intervalo de 5min entre elas. O próximo passo consistiu na etapa de bloqueio por 30min, em solução BSA 1%, a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos primários, *overnight*, a 4°C. No dia seguinte, elas foram lavadas 3 vezes com PHEM; finalmente, as células foram incubadas com os anticorpos secundários, durante 1h à temperatura ambiente. Apesar esta etapa, as celulas foram lavadas 3 vezes com PHEM e mantidas com 200μL de PBS. É importante ressaltar que a escolha dos fluoróforos foi estratégica e determinada pela configuração do equipamento de aquisição das imagens. Simultaneamente a marcação com os anticorpos secundários, o DNA nuclear foi corado com Hoechst 33342 (5μM – Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) por 1h a temperatura ambiente.

Aquisição e análise dos dados

As imagens foram adquiridas no equipamento ImageXpress Micro Confocal High-Content Imaging System (Molecular Devices, USA) de acordo com a

recomendações do fabricante. Os dados foram adquiridos e analisados pelo software MetaXpress 6 High Content Image Acquisition and Analysis Software (Molecular Devices, USA). A aquisição das imagens e quantificação da intensidade de fluorescência foram conduzidas automaticamente através do software MetaXpress, usando a objetiva de 20X. Para cada condição de tratamento e filtro do equipamento, foram adquiridas 9 imagens por poço em triplicata. Em todos os casos, também foi realizada a contagem do número de células por poço. A expressão dos marcadores foram determinadas e quantificadas através de mudanças da intensidade do sinal de fluorescência (MFI – Median Fluorescent Intensity) usando o módulo “Multi Wavelenght Cell Scoring”. Os valores plotados nos gráficos correspondem a média da intensidade de fluorescência obtida a partir da média dos 9 sítios analisados por poço, cuja mediana foi normalizada pelo número de células adquiridas.

3.5) Avaliação do estado de ativação celular após o tratamento com Amblyomin-X por Citometria de Fluxo por Imagem

A citometria de fluxo por imagem é uma técnica que integra a citometria de fluxo convencional e a microscopia de fluorescência, o que permite a obtenção de uma imagem em alta resolução de cada célula que passa ao longo do sensor de fluxo, sendo possível identificar cada evento obtido a partir da citometria de fluxo através das imagens adquiridas em tempo real (Han et al., 2016). Assim, esta técnica possibilita análises morfológicas e fenotípicas, como tamanho celular e expressão proteica, de cada célula, bem como a região da célula em que é expressa, possibilitando a distinção de populações heterogêneas, de forma rápida e eficiente (Barteneva et al., 2012).

Esta técnica foi utilizada com o objetivo de avaliar o estado de ativação celular, a partir da análise e quantificação do nível de translocação nuclear do fator de transcrição STAT3 e da proteína p38.

Processo de obtenção das amostras

Para coleta das amostras foram diferenciadas 4×10^6 células em 2 garrafas de 25 cm³, para cada condição de tratamento. A diferenciação celular foi realizada de acordo com protocolo padronizado anteriormente, em que utiliza-se 25nM de PMA durante 48 horas, seguido de 24 horas de descanso em meio fresco. Após a

diferenciação, as células foram tratadas com Amblyomin-X (50µM) durante 24 horas. Ao final do tratamento, o pellet de células foi coletado e iniciou-se o protocolo de marcação para imunofluorescência, semelhante àquele descrito para HCS. O experimento foi realizado em triplicata biológica.

Aquisição e análise dos dados

O equipamento utilizado para realização do experimento foi o ImageStream®^X Mark II (Millipore). Para aquisição e análise dos dados utilizou-se os softwares INSPIRE® e IDEAS®, respectivamente, ambos fornecidos pelo próprio fabricante.

3.6) Análise da modulação de citocinas induzida pelo tratamento com Amblyomin-X através da técnica de Multiplex

A metodologia multiplex consiste em um ensaio imunológico multiparamétrico, que permite a quantificação de diversos mediadores liberados para o sobrenadante de cultura de forma simultânea, com alta sensibilidade de detecção e rápida. A tecnologia Luminex xMAP®, é baseada na detecção de esferas magnéticas recobertas por anticorpos contra cada analito que pretende-se detectar em um meio solúvel, seja plasma, soro, lisado celular ou sobrenadantes. Cada esfera magnética recorbeta pelos anticorpos a serem analisados, possui uma característica de cor e tamanho. Após a reação de ligação entre as diferentes esferas e seus respectivos analitos um anticorpo de revelação acoplado ao fluorocromo Ficoeritrina é adicionado, o qual irá se ligar apenas nos sítios que houveram ligação com os mediadores investigados. Enquanto a intensidade de fluorescência identifica os níveis em pictogramas/mL, as características de cada esfera magnética possibilita a distinção entre cada um dos analitos. Sendo assim, a identificação de cada citocina é baseada nas características das esferas magnéticas, ao passo que a quantificação das mesmas ocorre pela intensidade de fluorescência do anticorpo secundário (Chowdhury et al., 2009)

Esta técnica foi utilizada com o objetivo de analisar a modulação da liberação de citocinas induzida pelo tratamento com Amblyomin-X, a partir da quantificação do nível de expressão de um conjunto de citocinas pré-determinados.

Processo de obtenção das amostras

Para coleta das amostras, foram diferenciadas 4×10^6 células em 2 garrafas de 25 cm³, para cada condição de tratamento. A diferenciação celular foi realizada de acordo com protocolo padronizado previamente, em que utiliza-se 25nM de PMA durante 48 horas, seguido de 24 horas de descanso em meio fresco. Após a diferenciação, as células foram tratadas com Amblyomin-X (50µM) durante 12 e 24 horas, como descrito anteriormente. Após os períodos de tratamento, coletou-se separadamente o sobrenadante de cada garrafa em tubos Falcon e centrifugou-se. Em seguida, foram colhidas três alíquotas de 100µl de cada uma das condições de tratamento e congelou-se em freezer -20°C. O experimento foi realizado em triplicata biológica.

Seleção dos analitos

Neste experimento, foram analisados 24 analitos, conforme disposto no kit para multiplex HMCYTOMAG – 60K - 24 (Millipore) listados na Tabela 1.

Lista de analitos kit HMCYTOMAG-60K-24		
FGF-2	MCP-3	IL-6
EGF	IL-12P70	IL-8
TGF-alfa	CD40L	IP-10
G-CSF	IL-17A	MCP-1
GM-CSF	IL-1alfa	MIP-1alfa
IFN-Alfa2	IL-1beta	MIP-1beta
IFN-Gama	IL-2	TNF-alfa
IL-10	IL-4	TNF-beta

Tabela 1: analitos avaliados no kit HMCYTOMAG – 60K – 24 utilizado para realização do experimento

Aquisição e análise dos dados

Para execução do experimento, seguiu-se todas as instruções contidas no protocolo fornecido pelo fabricante do kit. O equipamento utilizado para realização do experimento foi o Luminex 200 (Merck). Os dados foram adquiridos utilizando o software Xponent, e a análise dos mesmos foi realizada pelo software Milliplex Analysis, ambos fornecidos pelo próprio fabricante.

3.7) Avaliação da expressão gênica induzida pela diferenciação celular e pelo tratamento com Amblyomin-X pela técnica de qRT-PCR

O PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) é um método que permite quantificar a expressão de mRNA de maneira altamente sensível, sendo derivada da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional. O processo de amplificação das amostras no qRT-PCR ocorre de maneira similar ao PCR, apresentando uma fase de desnaturação dos ácidos nucleicos, seguida pelo anelamento dos primers e a ação polimerásica da DNA Polimerase. No entanto, na reação do qRT-PCR são adicionados corantes fluorescentes que são capazes de se ligar às fitas de DNA durante a sua síntese, permitindo a quantificação das amostras em tempo real, a qual pode ser realizada de duas maneiras. A primeira delas é a quantificação relativa que baseia-se na análise comparativa da expressão gênica de uma molécula alvo em diferentes condições em relação a um controle interno de referência, também conhecido como gene normalizador, o qual deve ser um gene de expressão constitutiva. Já a quantificação absoluta visa calcular o número exato de moléculas de um determinado transcrito alvo em qualquer situação, inclusive na ausência de um gene normalizador, utilizando como referência uma curva de calibração gerada a partir de diluições seriadas de uma quantidade inicial conhecida da molécula alvo. Neste caso, será utilizado o método de quantificação relativa.

Este método foi utilizado a fim de avaliar a expressão gênica induzida durante a diferenciação de células THP-1 em macrófagos, bem como pelo tratamento com Amblyomin-X.

Processo de obtenção das amostras

Para obtenção das amostras, foram diferenciadas 4×10^6 células em 2 garrafas de 25 cm³, com um volume final de 5ml de meio, para cada condição de tratamento. A diferenciação celular foi realizada de acordo com protocolo descrito anteriormente, em que foi utilizado 25nM de PMA durante 48h, seguido de 24h de descanso em meio fresco. Após a diferenciação, as células foram tratadas com Amblyomin-X (50µM) durante 12 e 24h, como descrito anteriormente. No final do tratamento, o pellet de células foi coletado e congelado em freezer -150°C até que todas as amostras fossem obtidas. Foi realizada triplicata biológica para cada condição experimental.

Extração do RNA total, purificação e tratamento com DNase

O isolamento do RNA foi purificado e tratado com DNasel utilizando o kit RNAspin (GE Healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante, alterando-se apenas o tempo de incubação com a DNasel de 15 min para 1h. O RNA purificado foi armazenado a -80°C.

Avaliação da integridade do RNA

As amostras de RNA foram quantificadas por sua densidade óptica a 260nm, e sua pureza atestada pelas razões 260/280nm e 260/230nm. As medidas foram realizadas no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific). Também realizou-se a quantificação de mRNA pelo ensaio de fluorescência por Ribogreen, o qual consiste em um método de alta sensibilidade para quantificação de ácidos nucleicos. O RNA foi analisado quanto à sua integridade utilizando-se o equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), que realiza uma eletroforese capilar de alta resolução. A integridade das amostras foi avaliada com o programa 2100 Expert (Agilent Technologies). Este programa atribui um valor de integridade de RNA (RNA Integrity Number, RIN), que permite uma estimativa da integridade das amostras de RNA por meio da análise das intensidades das bandas de todo o traçado eletroforético da amostra, e não apenas da razão entre as bandas dos RNAs ribossomais. Apenas amostras que tinham uma boa integridade ($RIN > 7$) foram utilizadas em todos os experimentos.

Transcrição reversa e síntese do cDNA

Para a transcrição reversa e síntese de cDNA fita simples foram utilizados 325 ng de RNA total de cada condição experimental. Cada amostra foi transcrita com o kit SuperScript III First Strand Synthesis Mix (Invitrogen), utilizando oligonucleotídeos iniciadores oligo-dT(20), segundo as recomendações do fabricante, com incubação à 50°C. É importante mencionar que uma pré-incubação de 3 min a 85°C foi introduzida no protocolo, antes da fase de anelamento, para desnaturar completamente o RNA. Após o término da fase de anelamento, a reação foi mantida a 50°C por 2h, para a adição da enzima em tampão pré-aquecido à 50°C, eliminando-se a etapa de resfriamento no gelo descrita no protocolo do fabricante. O cDNA obtido foi diluído 10X antes da utilização nas reações subsequentes das PCRs.

PCR em tempo real – quantificação relativa

As reações das PCRs em tempo real (qPCR) para a quantificação relativa foram feitas em duplicita em um volume de 8 μ L contendo 4 μ L de SYBER Green Fast Master Mix (Applied Biosystems), 2 μ L de cDNA da transcrição reversa (RT) (diluído 1:10) e 400nM de cada par de oligonucleotídeos iniciadores (Forward e Reverse) específicos para cada gene. A concentração dos oligos utilizados nas reações foi calculada previamente através da construção de curva de otimização da concentração de cada par de primer (dados não mostrados). A reação foi realizada no equipamento QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems) utilizando os parâmetros padrão do equipamento.

O ciclo da PCR no qual a intensidade de fluorescência do SYBER Green Fast, ligado à dupla fita de DNA amplificado, é detectada determina o Ct do gene (Cycle threshold – ciclo referência). Este Ct é uma medida relativa da quantidade inicial de moléculas do transcrito alvo presente no cDNA ou DNA genômico analisado. Quanto menor o Ct, mais abundante é o transcrito. Para tornar as medidas de expressão comparáveis entre as amostras usa-se como referência o Ct de um gene constitutivo ou que não tenha sua expressão alterada nas diferentes condições de estudo. Neste caso, utilizamos como genes de referência *ACTB* e *RPL37A* (Maess et al., 2010), através do fator de normalização calculado entre ambos.

O delta-Ct (Δ Ct) foi obtido pela diferença entre a média das triplicatas (réplicas técnicas) do Ct do gene em análise e o Ct médio do gene normalizador. A partir dos valores de Δ Ct obtidos, foi calculado o valor de delta-delta-Ct ($\Delta\Delta$ Ct) que consistiu na subtração do Δ Ct obtido nas diferentes condições testadas (tratamento e controle). A diferença de expressão relativa do gene em estudo, fold change, foi calculada como $2^{-\Delta\Delta}$ Ct (considerando-se que os iniciadores possuem uma eficiência similar e alta, como previamente testada – dados não mostrados) de acordo com as recomendações de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Seleção dos genes avaliados e desenho dos oligonucleotideos iniciadores

Os genes selecionados para avaliação da expressão foram escolhidos segundo resultados obtidos em estudos prévios realizados no laboratório que também buscaram avaliar a diferença de expressão gênica de diversos genes após o tratamento das células com Amblyomin-X em um modelo de melanoma *in vivo*. Foram selecionados 20 genes, os quais estão relacionados com processos de

modulação e ativação do sistema imunológico. Os primers foram desenhados seguindo alguns parâmetros específicos para as reações de qRT-PCR, entre eles: a temperatura de *melting*, porcentagem de C-G e o tamanho do amplicon gerado. Além disso, também levou-se em consideração a baixa probabilidade de formação de self e hetero-dimer entre os oligos. Foi utilizado o programa Primer3 para desenho dos oligos, o qual é um software de domínio aberto (Rozen and Skaletsky 2000) e o OligoAnalyzer, para análise dos parâmetros moleculares citados acima. Todos os primers utilizados no presente trabalho estão apresentados na Tabela 2.

<i>Gene</i>	<i>Primer forward</i>	<i>Primer reverse</i>
<i>OSM</i>	CCAGCTCCAGAACGACAGACAG	CCCTGCAGTGCTCTCTCAGT
<i>SELP</i>	ACGAGGACTGCGTGGAGATA	GGCACTCTCCTGTTGCTG
<i>STAT3</i>	GTGACAGCTTCCCAATGGAG	TGGCATGTGATTCTTGCTG
<i>PI3KR6</i>	AAGAAGGTCGAGCG	GCAAGGGAATGATGACATGC
<i>VEGFA</i>	CTTCAAGCCATCCTGTGTGC	CCGCATAATCTGCATGGTG
<i>IFN-gama</i>	TGTGGAGACCATCAAGGAAGA	CATGTATTGCTTGCCTGG
<i>CD36</i>	GCCAGTTGGAGACCTGCTTA	CCTGTGGATTTGCACATCA
<i>IL1B</i>	CCATGGACAAGCTGAGGAAG	ATCGTGCACATAAGCCTCGT
<i>IL8</i>	CAAACCTTCCACCCCCAAAT	CAGTTTCCTGGGTCCAG
<i>TNF-alfa</i>	GTGCTGACCGACAAAGAAGG	AGGGTGATGGTGTACATCTG
<i>IL6</i>	TGGCTGAAAAAGATGGATGC	CACAGCTCTGGCTTGTTCCT
<i>IRF9</i>	CCATGCAGAACTGCACACTC	GCTCCAATGTCTGAATGGA
<i>IRF3</i>	TGGGGCCCTTCATTGTAGAT	CTTGACCATCACGAGCCTCT
<i>STAT1</i>	TCGGGAAATATTAGACGAC	CCAGGCTCTGATTTCATGC
<i>CD86</i>	CGACGTTCCATCAGCTTG	GCTGAGGGCCTCAAGCTCT
<i>SOCS3</i>	AGGAGAGCGGCTTACTGG	GACTGGTCTTGACGCTGAG
<i>TREM1</i>	AGCCTCACATGCTTTCGAT	CAAGGCCTTAGTGGTGGTAGG
<i>MYD88</i>	AGCAGGAGGAGGCTGAGAAG	TGGGGCAATAGCAGATGAAG
<i>CD40</i>	AAATACTGCGACCCCCAACCT	TCGTACAGTGCCAGCCTCT
<i>CD80</i>	TGCTGGCTGGCTTTCTCAC	CGAGTTGTGCCAGCTCTTC
* <i>ACTB</i>	ATTGCCGACAGG	GCTGATCCACAT
* <i>RPL37A</i>	ATTGAAATCAGCCAGCACGC	AGGAACCACAGTGCCAGATCC

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as qRT-PCR.*Refere-se aos genes que foram utilizados como referências nas reações de qRT-PCR.

3.8) Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados por no mínimo três ensaios independentes em triplicata. Os valores foram expressos como média \pm SD (desvio padrão) e analisados estatisticamente por ANOVA de duas vias seguido pelo pós teste de múltipla comparação de Tukey-Kramer ou Teste t student paramétrico uni-

caudal (INSTAT- GraphPad Software 7.0), comparando-se os valores do grupo controle com os valores experimentais. As diferenças foram consideradas significativas para o nível de * $p<0,05$ (5%), ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

3) Resultados e discussão

3.1) Padronização da diferenciação celular a partir da linhagem THP-1

A linhagem celular THP-1 sofre alterações morfológicas durante o processo de diferenciação, o qual resulta em um fenótipo semelhante a macrófago. Após a diferenciação, os macrófagos derivados de THP-1 aderem na superfície de cultivo e apresentam menor taxa de proliferação. A morfologia ameboide, característica de macrófagos, ocorre devido ao aumento do citoplasma e do número de organelas, como complexo de golgi e retículo endoplasmático, maior número de ribossomos e tornam-se abeis ao processo de fagocitose (Qin, 2012). Inicialmente, avaliou-se as melhores condições para a diferenciação celular, levando em conta a capacidade de aderência das células, bem como as alterações morfológicas, por microscopia óptica de campo claro.

Para o primeiro protocolo de diferenciação celular testado, foi utilizado 100nM de PMA por 3 dias, seguido de 5 dias de descanso em meio fresco. Após o tratamento com PMA foi possível observar alteração da morfologia celular (Figura 2a). No entanto, após o terceiro dia de descanso notou-se que as células iniciaram um processo de dediferenciação, apresentando formato mais arredondado e menor aderência, o que resultou poucas células aderidas ao final do período de descanso (Figura 2b). Dessa forma, o protocolo foi refutado para a continuidade dos demais experimentos. O segundo protocolo de diferenciação celular, foi realizado mantendo a mesma concentração de PMA e o mesmo tempo de incubação, no entanto o período de descanso, ou seja, sem PMA, foi de três dias. O resultado observado no segundo protocolo foi similar ao primeiro . Ao final do período de descanso, as células também estavam arredondadas e desprendendo da superfície de cultivo (Fig. 2c).

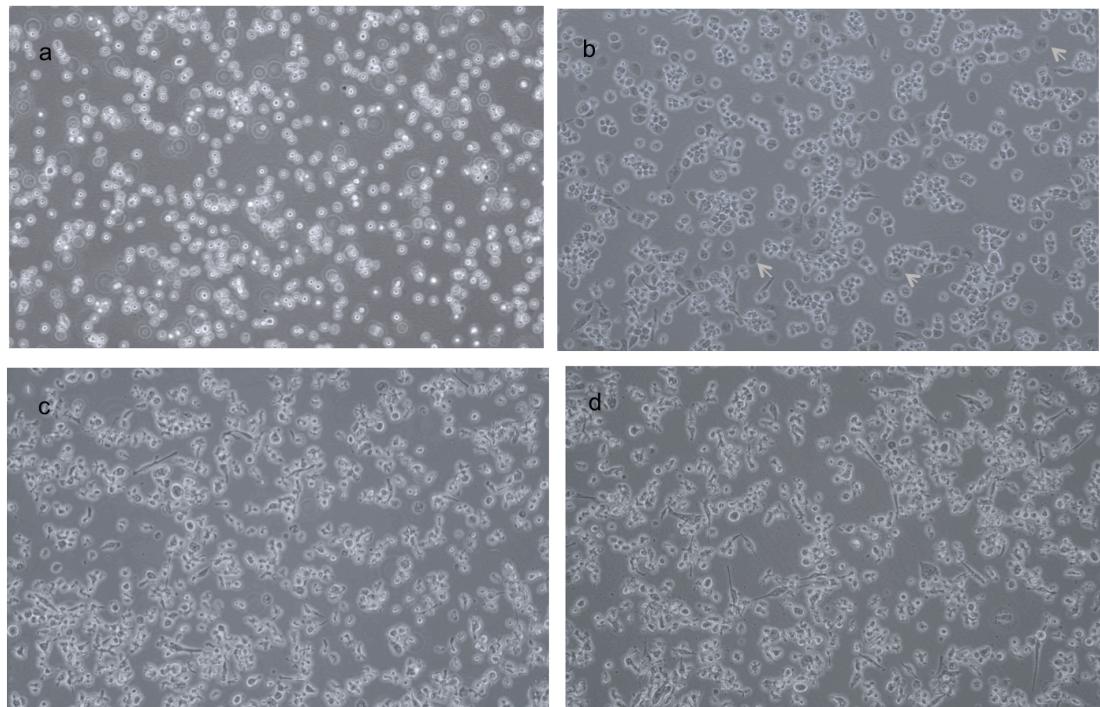


Figura 2: Imagens representativas do processo de diferenciação de células THP-1 em macrófagos. a) células THP-1. b) Após 3 dias de incubação com 100nM de PMA. Comum aos protocolos 1 e 2. c) Descanso de 3 dias, após 3 dias de estimulação com 100nM de PMA. D) Descanso de 5 dias, após 3 dias de estimulação com 100nM de PMA. As setas indicam alguns macrófagos .

Um terceiro foi testado utilizando 100nM de PMA por 48 horas, seguido do período de descanso por apenas 24 horas, em meio fresco. Após o tratamento com PMA, observou-se alteração da morfologia celular (Fig. 3a). Ao término do período de descanso, as células continuavam aderidas, inclusive notou-se que houve aumento no número de células diferenciadas (Fig. 3b).

Como o principal objetivo foi analisar a ativação dos macrófagos frente ao tratamento com Amblyomin-X, o protocolo mais adequado de diferenciação celular seria aquele que, ao término do procedimento, as células estivesse com maior numero de diferenciação e menor estado de ativação. Desta forma, testou-se o protocolo descrito por Lund et al.(2016), onde foi realizado o estímulo de 25nM de PMA durante 48 horas, seguido do período de descanso por 24 horas, em meio fresco. Ao final do tratamento, houve diferenciação celular semelhante ao protocolo anterior (Fig. 3c). Após o período de descanso de 24 horas, as células permaneceram aderidas, e com maior quantidade de células diferenciadas (Fig. 3d).

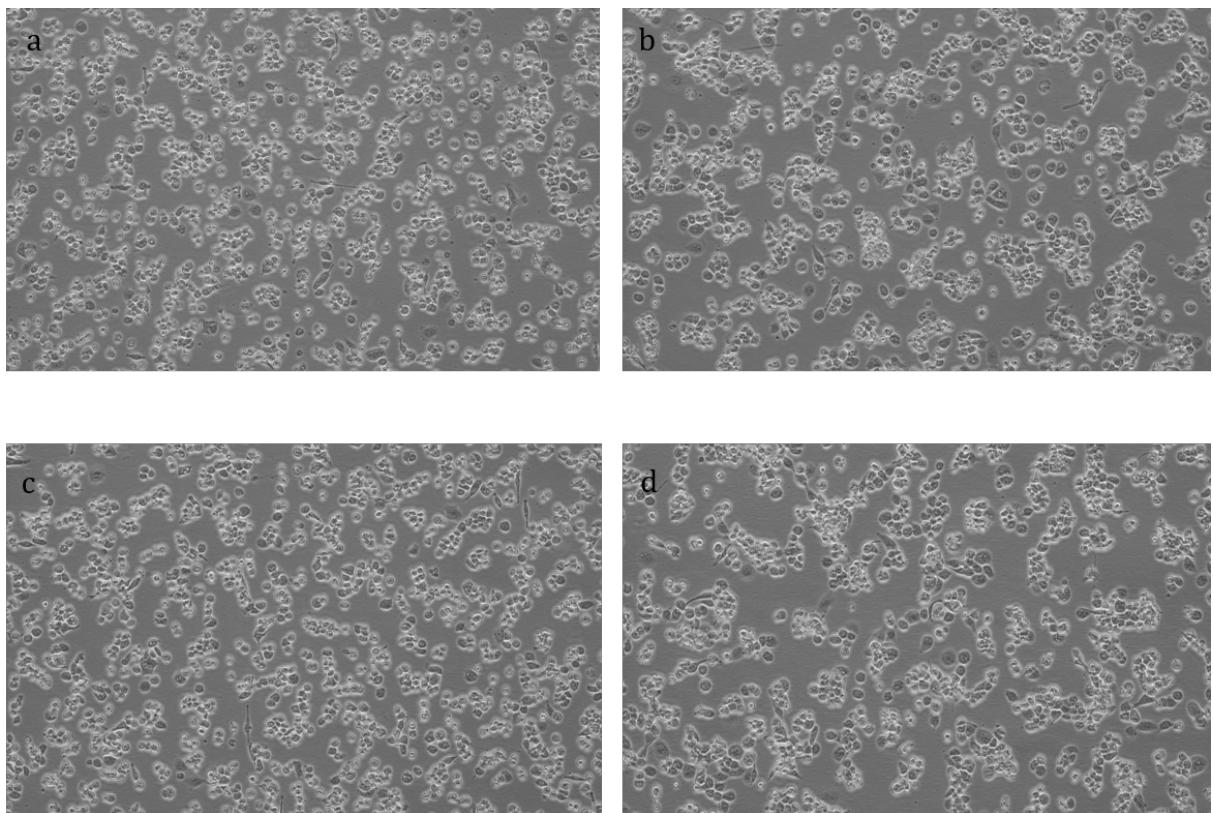


Figura 3: Representação da diferenciação de células THP-1 em macrófagos segundo descrito no protocolo 3, após realização do tratamento com 100nM PMA durante 48 horas (a); seguido do período de descanso de 24 horas em meio fresco (b). Representação da diferenciação de células THP-1 em macrófagos segundo descrito no protocolo 4, após realização do tratamento com 25nM PMA durante 48 horas (c); seguido do período de descanso de 24 horas em meio fresco (d).

Tendo em vista que ao final do terceiro e quarto protocolos, as células apresentaram as alterações morfológicas características de macrófagos, a diferenciação celular dos dois últimos protocolos foram avaliadas em HCS (*High Content Screening* – Molecular Devices) quanto a expressão de receptores, característicos para macrófagos.

3.2) Expressão de receptores envolvidos no processo de diferenciação em macrófagos.

Nesta etapa, foram avaliadas a expressão dos receptores CD11b e CD14 nas células diferenciadas a partir dos protocolos 3 e 4.

Os resultados obtidos utilizando a tecnologia HCS demonstraram aumento na expressão de CD11b em macrófagos em relação às células THP-1. Além disso, notou-se uma diferença significativa no nível de expressão de CD11b entre os diferentes protocolos realizados, sendo que o tratamento com 25nM de PMA induziu

maior expressão deste marcador celular em relação ao tratamento com 100nM de PMA (Figura 4a). O mesmo padrão de variação de expressão proteica também pode ser observado em relação ao marcador CD14, ou seja, nota-se que macrófagos apresentam maior expressão de tal receptor em relação às células THP-1, bem como o tratamento com 25nM de PMA induziu maior expressão de CD14 quando comparado com o tratamento de 100nM de PMA (Figura 4b).

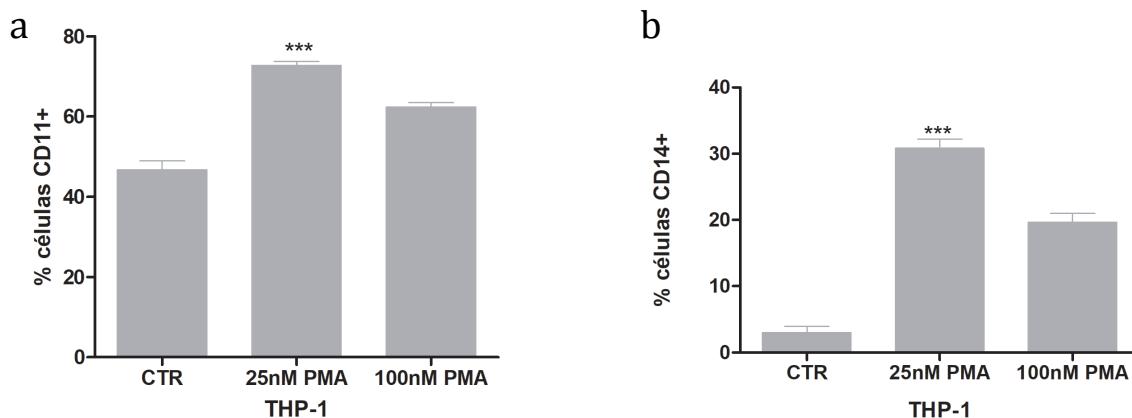


Figura 4: representação gráfica da modulação da expressão dos marcadores celulares (a)CD11b e (b)CD14 após o tratamento com diferentes concentrações de PMA a fim de padronizar o protocolo de diferenciação celular. Significância por ANOVA de duas vias, seguido pelo pós teste de múltipla comparação de Tukey-Kramer. ***P<0,001.

A variação da expressão dos receptores na membrana plasmática também pode ser observado através das imagens obtidas através da tecnologia HCS (Figura 5)

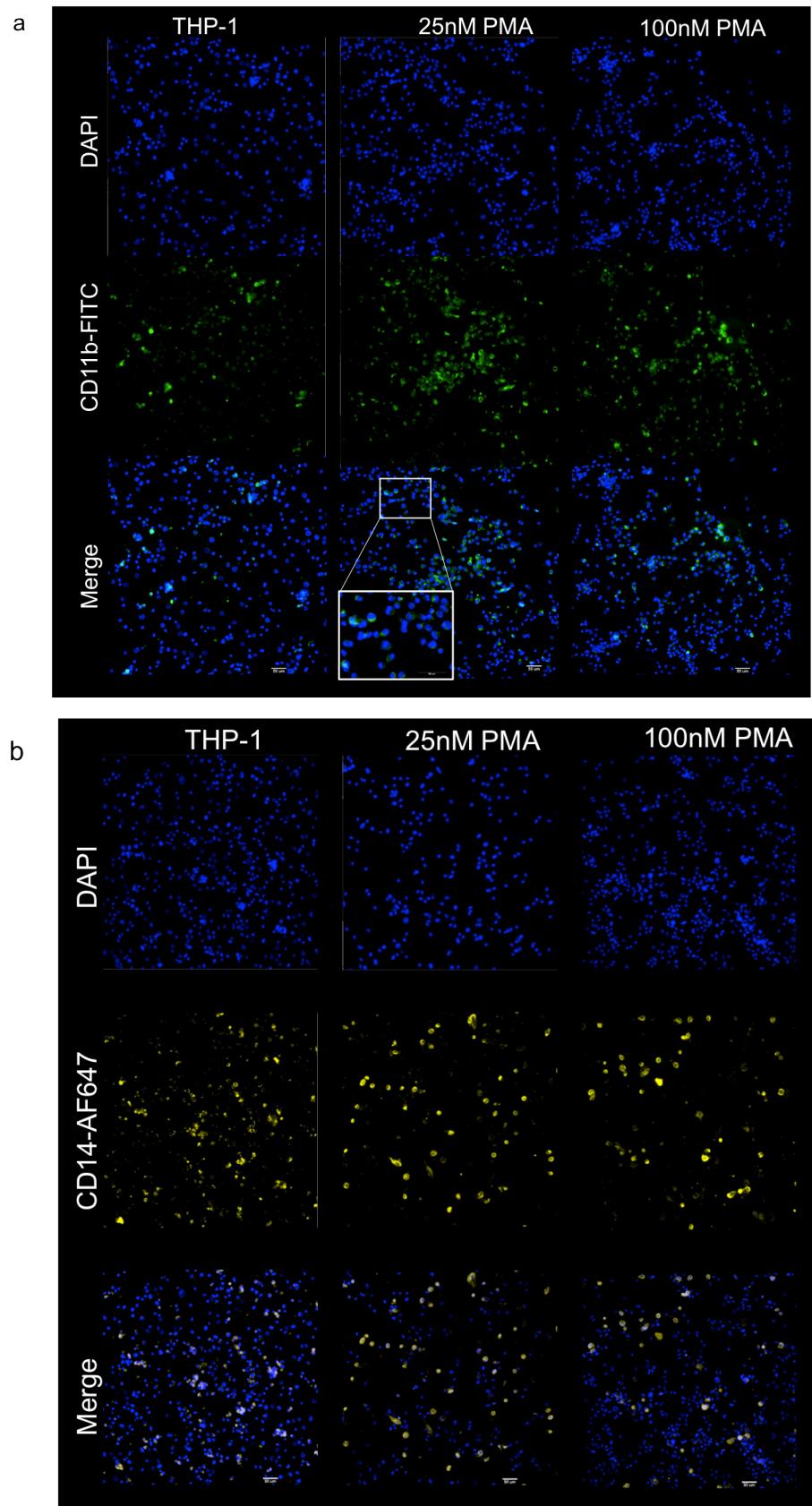


Figura 5: imagens representativas da expressão dos marcadores celulares CD11b(a) e CD14(b) nos diferentes protocolos testados.

Embora culturas primárias de monócitos isolados a partir do sangue, apresente aumento da expressão de CD11b e redução de CD14 no processo de diferenciação em macrófagos, está bem documentado na literatura que no processo de diferenciação de THP-1 em macrófagos, o aumento na expressão de CD11b e CD14 é o esperado (Forrester et al., 2018; Starr et al., 2018; Qin, 2012; Yu et al., 2016; Schwende et al., 1996). Porém, alguns artigos defendem que a diferenciação celular de THP-1 em macrófagos induz o aumento de CD11b e a redução de CD14 (Daigneault et al., 2010). Sendo assim, o uso do receptor de membrana CD14 como marcador da diferenciação celular para macrófagos é contraditório na literatura.

No entanto, alguns estudos demonstram que a modulação do nível de expressão de CD14 antes e após a diferenciação celular de THP-1 em macrófagos induzida por PMA é dependente da forma como as células são cultivadas anteriormente ao processo de diferenciação. Aldo et al (2013). apresentou que a cultura de células THP-1 em alta densidade estimula a expressão de CD14 ainda em fase monocítica, e potencializa a expressão de tal receptor após o tratamento com PMA; enquanto que o fenômeno reverso pode ser observado quando células THP-1 são cultivadas em baixa densidade (Aldo et al., 2013).

As células THP-1 utilizadas para realização do presente estudo foram inicialmente cultivadas em densidade maior que a recomendada pela ATCC, porém mais baixa que a densidade celular apresentada pelo artigo de Aldo et al.(2013). Dessa forma, este fator pode ter influenciado uma possível alteração no fenótipo das células THP-1, o que resultou no aumento da expressão do receptor CD14 após o processo de diferenciação celular.

Assim, com base nos resultados obtidos nos experimentos anteriores, o estímulo de 25nM de PMA durante 48 horas, seguido pelo descanso de 24 horas, foi o protocolo adotado para os tratamentos com Amblyomin-X (50uM).

3.3) Translocação nuclear de STAT3 e P38 em THP-1 e Macrófagos após tratamento com Amblyomin-X

Avaliou-se a ativação de células THP-1 e macrófagos após o tratamento com Amblyomin-X (50 μ M), a partir da análise do nível de translocação nuclear do fator de transcrição STAT3 e da proteína p38.

Na citometria de fluxo por imagem, os dados são adquiridos com base na imagem. Por isso, é necessário utilizar uma estratégia de *gate* em que

primeiramente deve-se determinar o foco de aquisição das imagens, e em seguida especificar o *gates* nos quais as células de interesse estão localizadas, para posteriormente analisar os dados com base na pergunta a ser respondida. Neste caso, a estratégia de *gate* foi elaborada com o objetivo de selecionar as células que apresentavam translocação nuclear de alguma das proteínas estudadas (Figura 6).

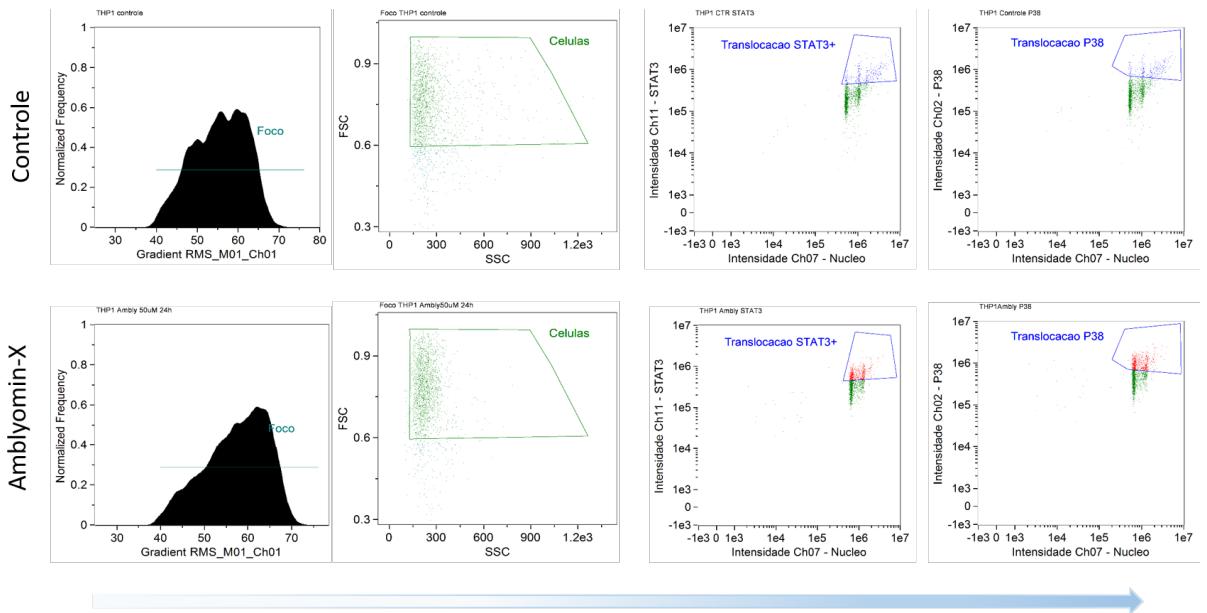


Figura 6: estratégia de *gate* utilizada para análise dos dados

As células THP-1 quando tratadas com Amblyomin-X (50 μ M) apresentam maior nível de translocação nuclear do fator de transcrição STAT3 comparado às células sem tratamento. Por outro lado, não houve diferença estatística quando o mesmo tratamento foi realizado em macrófagos (Figura 7). Além disso, pode-se observar também que as células THP-1 tratadas com Amblyomin-X (50 μ M) apresentaram maior translocação nuclear de STAT3 em relação aos macrófagos que receberam o tratamento nas mesmas condições.

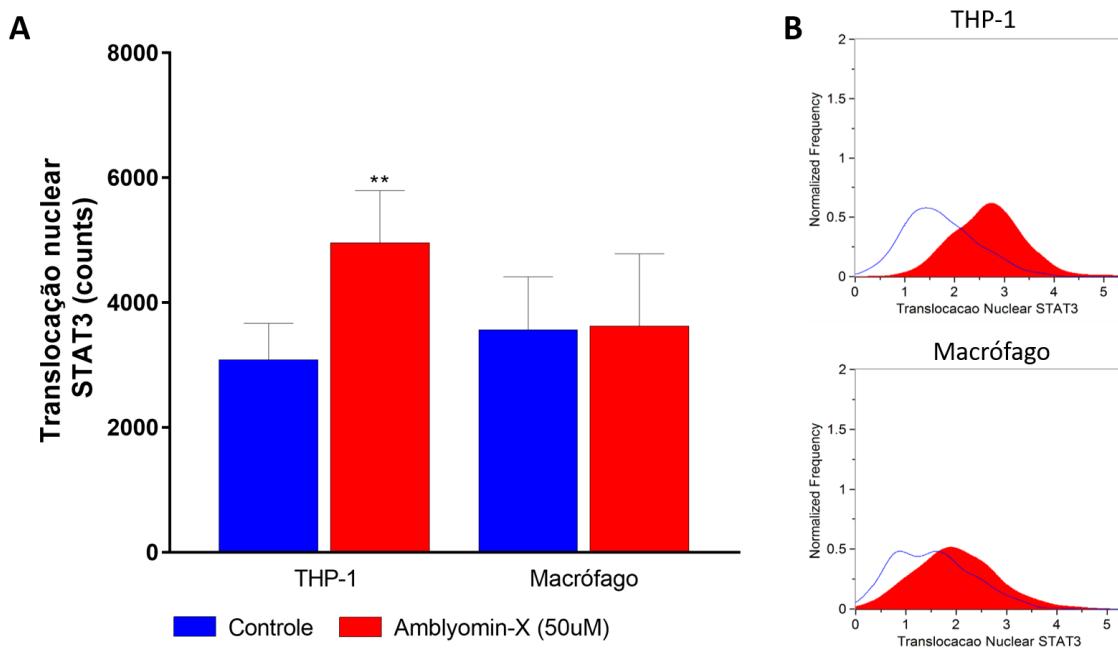


Figura 7: Translocação nuclear de STAT3 em THP-1 e Macrófagos, tratado com Amblyomin-X (50 μ M). A) Gráfico de barras: número de células positivas para translocação nuclear para STAT3. B) Histograma representativo: o deslocamento para a direita indica maior número de células translocadas .Experimentos realizados por citometria de Imagem. O gráfico representa a média \pm SD de três experimentos independentes. Significância por ANOVA de duas vias, seguido pelo pós teste de múltipla comparação de Tukey-Kramer. **P<0,01.

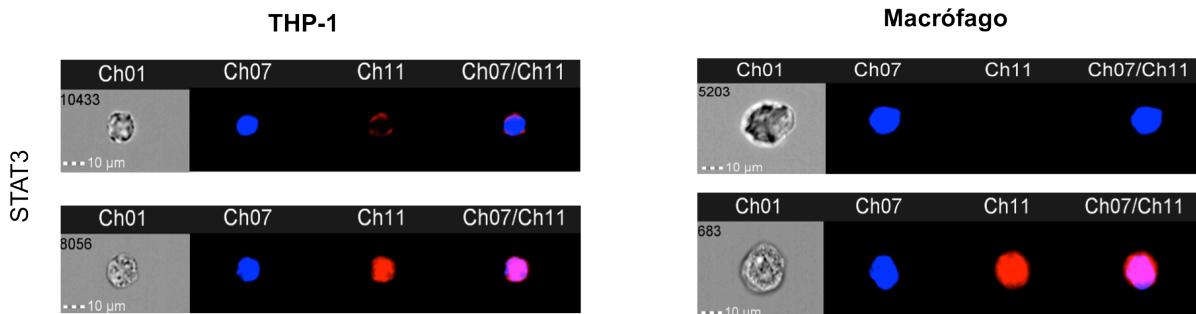


Figura 8: imagens representativas da translocação nuclear de STAT3 em células THP-1 e macrófagos obtidas a partir da citometria de fluxo por imagem. Ch01 – campo claro; Ch07 – Núcleo; Ch11 – Stat3-AF647

O mesmo efeito do tratamento com Amblyomin-X pode ser observado em relação a translocação nuclear da proteína p38, em que células THP-1 tratadas com Amblyomin-X (50 μ M) são mais responsivas quando comparadas ao seu respectivo controle, representado pelo deslocamento para direita da curva correspondente às células THP-1 tratadas, em relação ao respectivo controle (Figura 9). Além disso, também nota-se que não há diferença na translocação nuclear da proteína p38 entre

macrófagos tratados e controle, indicado pela sobreposição parcial dos histogramas correspondentes a cada condição de tratamento (Figura 9b). É possível observar também que as células THP-1 tratadas com Amblyomin-X apresentaram maior translocação nuclear quando comparado com macrófagos tratados com Amblyomin-X (50 μ M) (Figura 9a).

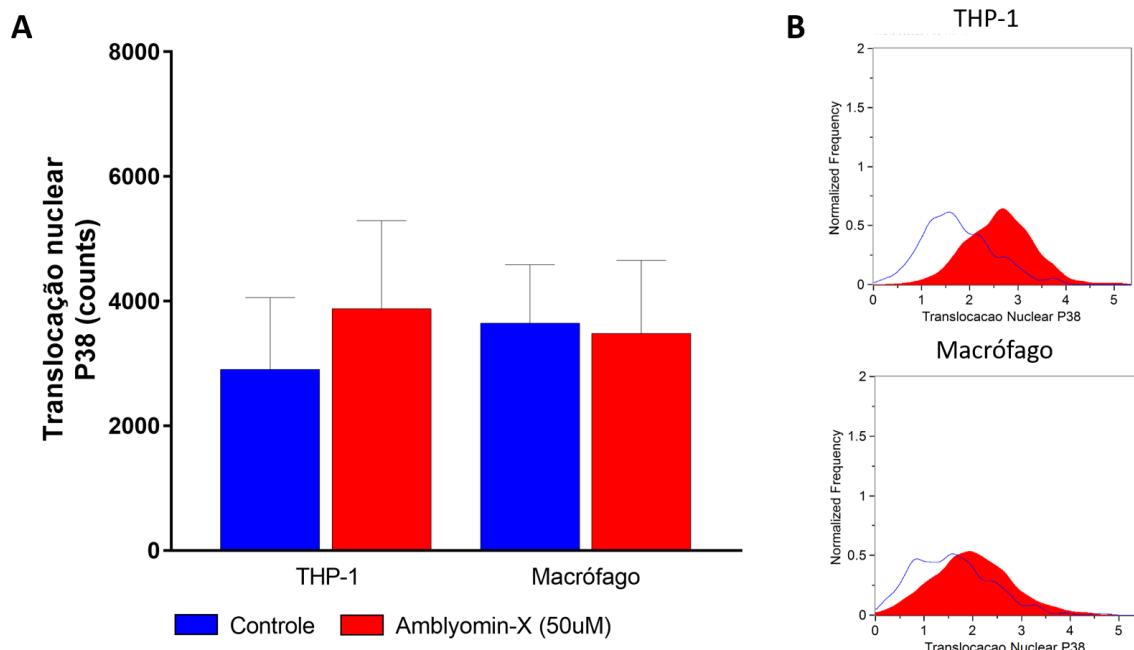


Figura 9: Translocação nuclear da proteína p38 em THP-1 e Macrófagos, tratado com Amblyomin-X (50uM). A) Gráfico de barras: número de células positivas para translocação p38. B) Histograma representativo: o deslocamento para a direita indica maior número de células translocadas. Experimentos realizados por citometria de Imagem. O gráfico representa a média \pm SD de três experimentos independentes. Significância por ANOVA de duas vias, seguido pelo pós teste de múltipla comparação de Tukey-Kramer. **P<0,01.

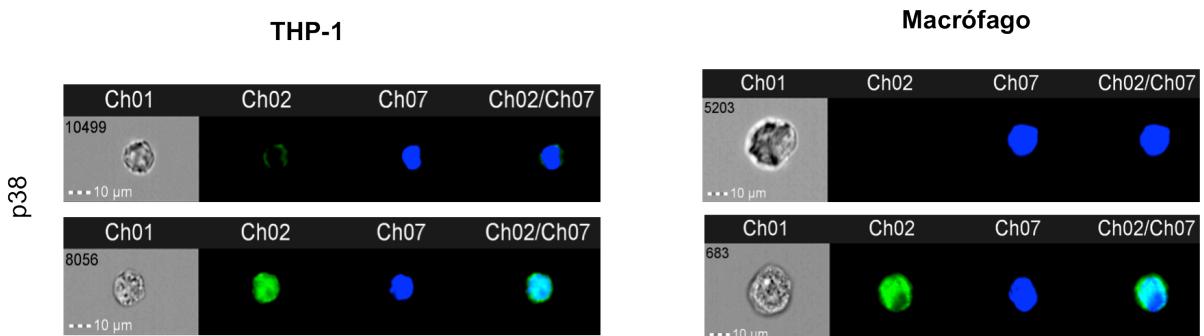


Figura 10: imagens representativas da translocação nuclear de p38 em células THP-1 e macrófagos obtidas a partir da citometria de fluxo por imagem. Ch01 – campo claro; Ch02 – p38-AF488; Ch07 – Núcleo.

Sabe-se que tanto STAT3, quanto P38 estão intimamente relacionados à regulação da transcrição de diversas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IL6, IL-1 β e TNF-alfa. Sendo assim, avaliou-se a modulação da expressão gênica de alguns genes relacionados à ativação da imunidade inata em células THP-1 e macrófagos frente ao tratamento com Amblyomin-X através da qRT-PCR.

Foi realizada como controle de qualidade, uma breve análise de integridade e pureza dos mRNAs extraídos, a fim de garantir que os resultados de amplificação obtidos seriam correspondentes unicamente aos genes de interesse.

A análise da integridade do mRNA foi realizada utilizando a tecnologia Bioanalyzer. Os resultados demonstraram que nenhuma das amostras degradaram ao longo do processo de extração do mRNA, como pode ser observado pelas bandas bem definidas correspondentes às amostras (Figura 11).

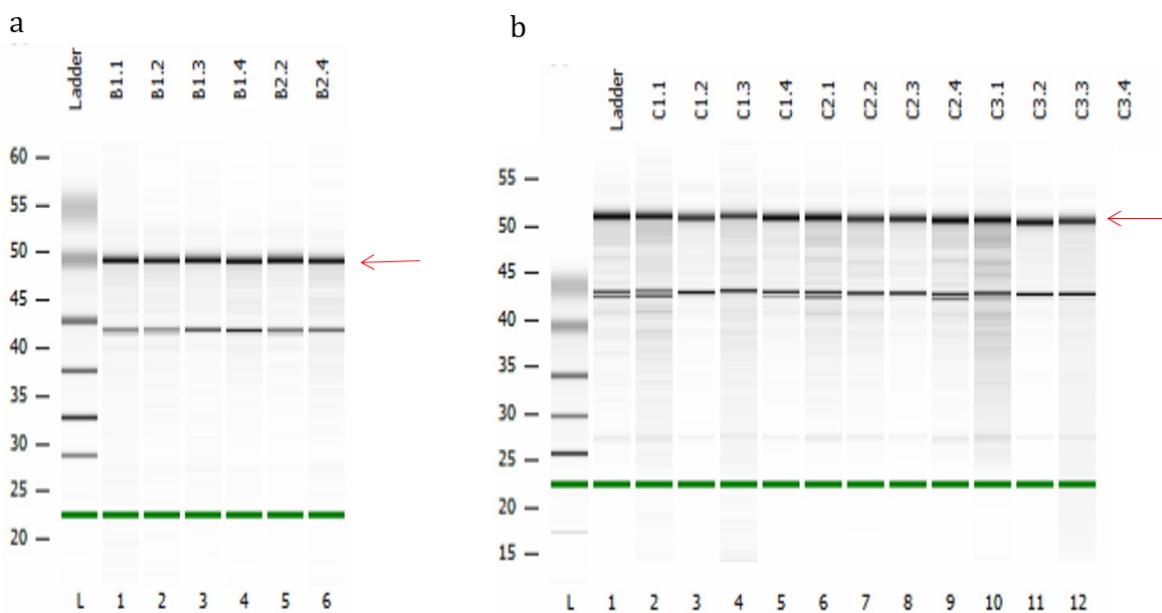


Figura 11: representação dos resultados obtidos utilizando a técnica Bioanalyzer, demonstrando a integridade do mRNA extraído do pellet de células. As setas em vermelho indicam as bandas correspondentes às amostras (a) tratadas com Amblyomin-X 50 μ M durante 12 horas e (b) durante 24 horas.

A pureza das amostras também foi avaliada a partir das razões 260/280nm e 260/230nm obtidas através do espectrofotômetro NanoDrop, como descrito na seção Materiais e Métodos. O fabricante indica que amostras com alto índice de pureza devem apresentar valores entre 1,8 e 2,0. Sendo assim, o mRNA extraído das amostras não apresentaram contaminantes proteicos ou compostos fenólicos

derivados do processo de extração do mRNA, uma vez que os valores estão próximos daqueles indicados como adequados (Tabela 3).

Sample ID	A260	A280	260/280	260/230
A1.1	11.644	5.545	2.10	2.06
A1.2	11.118	5.315	2.09	2.12
A1.3	22.290	10.712	2.08	2.10
A1.4	23.688	11.216	2.11	2.18
A2.1	17.521	8.364	2.09	2.10
A2.2	26.221	12.299	2.13	2.21
A2.3	23.967	11.427	2.10	2.14
A2.4	21.185	9.996	2.12	2.19
A3.1	23.367	11.058	2.11	2.03
A3.2	25.358	11.995	2.11	2.15
A3.3	28.529	13.541	2.11	1.96
A3.4	22.638	10.790	2.10	2.21
B1.1	3.246	1.524	2.13	1.88
B1.2	2.252	1.061	2.12	1.84
B1.3	2.360	1.101	2.14	1.57
B1.4	4.780	2.258	2.12	1.55
B2.2	2.985	1.408	2.12	1.67
B2.4	2.128	0.988	2.15	0.48
C1.1	8.433	3.970	2.12	1.92
C1.2	2.891	1.361	2.12	1.89
C1.3	15.116	7.066	2.14	1.90
C1.4	1.561	0.740	2.11	1.73
C2.1	8.551	4.049	2.11	2.07
C2.2	11.311	5.410	2.09	1.85
C2.3	10.925	5.222	2.09	1.98
C2.4	12.250	5.872	2.09	2.10
C3.1	19.006	8.994	2.11	2.05
C3.2	5.724	2.682	2.13	1.53
C3.3	13.273	6.284	2.11	2.12
C3.4	13.174	6.265	2.10	2.14

Tabela 3: representação dos valores de absorbância obtidos através do espectrofotômetro NanoDrop, indicando o alto nível de pureza das amostras uma vez que os resultados estão próximos ou iguais aos valores considerados ideais. Segundo recomendação do fabricante os valores das razões 260/280nm e 260/230nm devem estar entre 1,8 e 2,0.

Por último, obteve-se a quantificação do mRNA extraído de cada uma das amostras através do ensaio de fluorescência por Ribogreen, o qual é um método quantitativo de ácidos nucleicos de maior sensibilidade em relação ao espectrofotômetro NanoDrop. A partir dos resultados obtidos (Tabela 4), determinou-se a quantidade de mRNA necessária para síntese do cDNA de cada uma das amostras (cálculos não apresentados).

Amostras	Nanodrop ng/uL	Correção Fd (*100) e para ng/uL (1/1000)
A1.1	465,7	571,5
A1.2	444,7	413,4
A1.3	891,6	820,6
A1.4	947,5	1009,8
A2.1	700,8	649,1
A2.2	1048,8	1037,4
A2.3	958,7	1375,3
A2.4	847,4	906,2
A3.1	934,7	836,1
A3.2	1014,3	907,4
A3.3	1141,2	1115,1
A3.4	905,5	874,6
B1.1	129,8	105,6
B1.2	90,1	72,6
B1.3	94,4	73,0
B1.4	191,2	161,1
B2.2	119,4	111,4
B2.4	85,1	74,9
C1.1	337,3	226,8
C1.2	115,7	83,1
C1.3	604,6	694,5
C1.4	62,5	53,5
C2.1	342	337,7
C2.2	452,4	350,7
C2.3	437	379,5
C2.4	490	434,9
C3.1	760	626,6
C3.2	228,9	188,2
C3.3	530,9	512,7
C3.4	527	531,1

Tabela 4: representação dos valores de quantificação do mRNA de cada uma das amostras obtidos por NanoDrop, bem como os valores quantitativos obtidos pelo ensaio de fluorescência por Ribogreen. Os valores da concentração final de mRNA de cada amostra e que foram utilizados para realização dos cálculos da síntese de cDNA estão indicados em verde.

Tendo em vista que as amostras apresentavam alta qualidade e obteve-se quantidade suficiente para a síntese de cDNA para todas as amostras, realizou-se o experimento para avaliar a expressão dos genes selecionados em dois tempos distintos de tratamento, sendo 12 e 24h.

Os resultados demonstraram que o tratamento de macrófagos com Amblyomin-X induziu maior modulação da expressão de maior número de genes em relação às células THP-1 tratadas nas mesmas condições, o que indica que macrófagos são mais responsivos ao tratamento quando comparados a monócitos (Figura 12). Além disso, também é possível observar que a expressão de alguns genes é alterada quando se compara os dois tempos de tratamento, sendo que o

tratamento com Amblyomin-X por 24h induziu maior modulação da expressão gênica em ambos os tipos celulares, quando comparados com o tratamento de 12h (Figura 13).

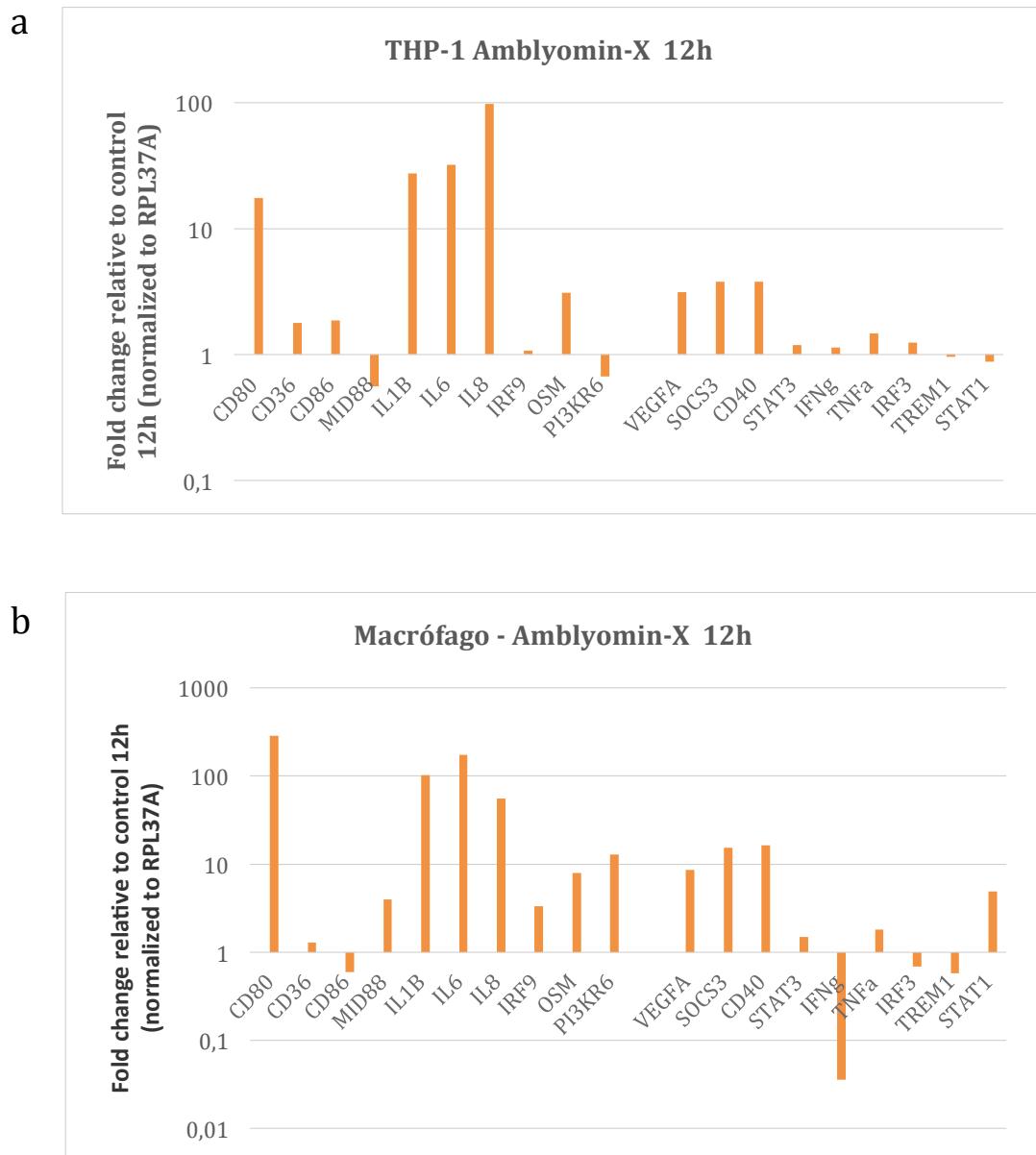


Figura 12: Representação gráfica da modulação da expressão gênica pelo tratamento com Amblyomin-X por 12h. As barras correspondem à variação da expressão gênica em comparação com o controle (não apresentado), em logaritmo.

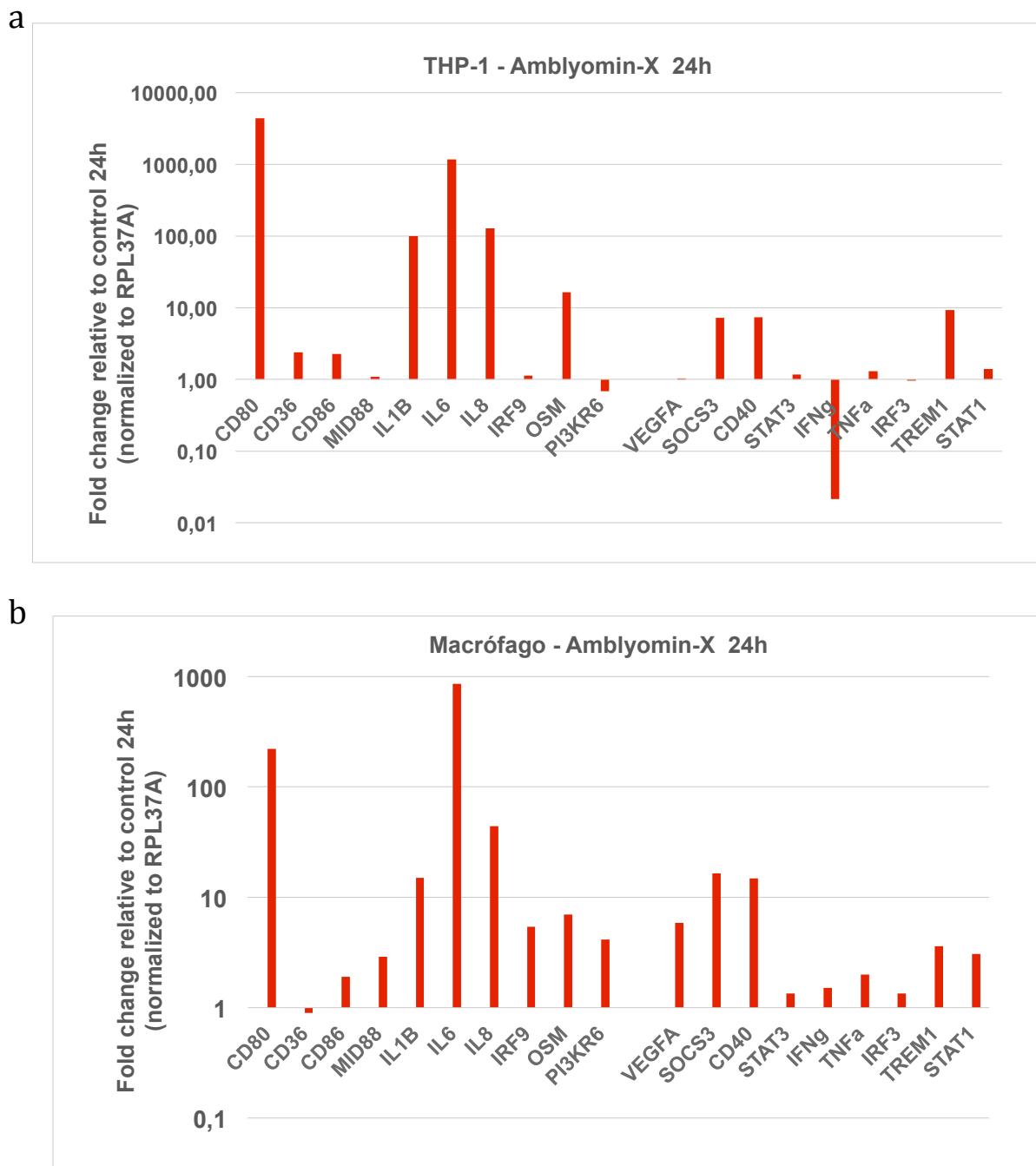


Figura 13: Representação gráfica da modulação da expressão gênica pelo tratamento com Amblyomin-X por 24h. As barras correspondem à variação da expressão gênica em comparação com o controle (não apresentado), em logaritmo.

A fim de dar continuidade na avaliação da modulação da ativação celular induzida pelo Amblyomin-X, analisou-se a liberação de citocinas após o tratamento, presentes nos sobrenadantes coletados das amostras utilizadas para realização da qRT-PCR. Os resultados demonstraram que dos 24 analitos avaliados durante o experimento, somente 15 destas citocinas foram moduladas. As demais citocinas

não apresentaram nenhuma modulação da liberação induzida pelo tratamento, as quais estão listadas na tabela abaixo (Tabela 5).

Citocinas não moduladas por Amblyomin-X (50µM)	
IL17	EGF
CD40L	MCP-3
TGF-alfa	IL4
IFN-gama	TNF-β

Citocinas moduladas por Amblyomin-X (50µM)		
TNF-alfa	GM-CSF	IL-1alfa
IL-1B	FGF-2	IP-10
IL-8	IFN-alfa2	MCP-1
IL-6	IL-10	MIP-1alfa
G-CSF	IL-12p70	MIP-1β

Tabela 5: lista das citocinas moduladas ou não pelo tratamento com Amblyomin-X (50µM)

Ao analisar os resultados obtidos somente das citocinas que apresentaram alguma modulação no perfil de liberação induzida por uma das condições de tratamento, notou-se que tanto as células THP-1, quanto os macrófagos aumentaram a liberação de algumas quimiocinas, como MCP-1, IP-10 e MIP-1β, independentemente do período de tratamento. Também observa-se aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa e IL-8, em ambos os tipos celulares estimuladas pelos tratamentos de 12 e 24h. No entanto, nota-se que macrófagos aumentam a liberação de maior número de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β e IL6; além de alguma citocinas estimuladoras da diferenciação celular, como G-CSF e GM-CSF, quando comparado com células THP-1, o que indica que macrófagos podem ser mais responsivos ao tratamento com Amblyomin-X, independentemente do tempo de tratamento (Figura 14).

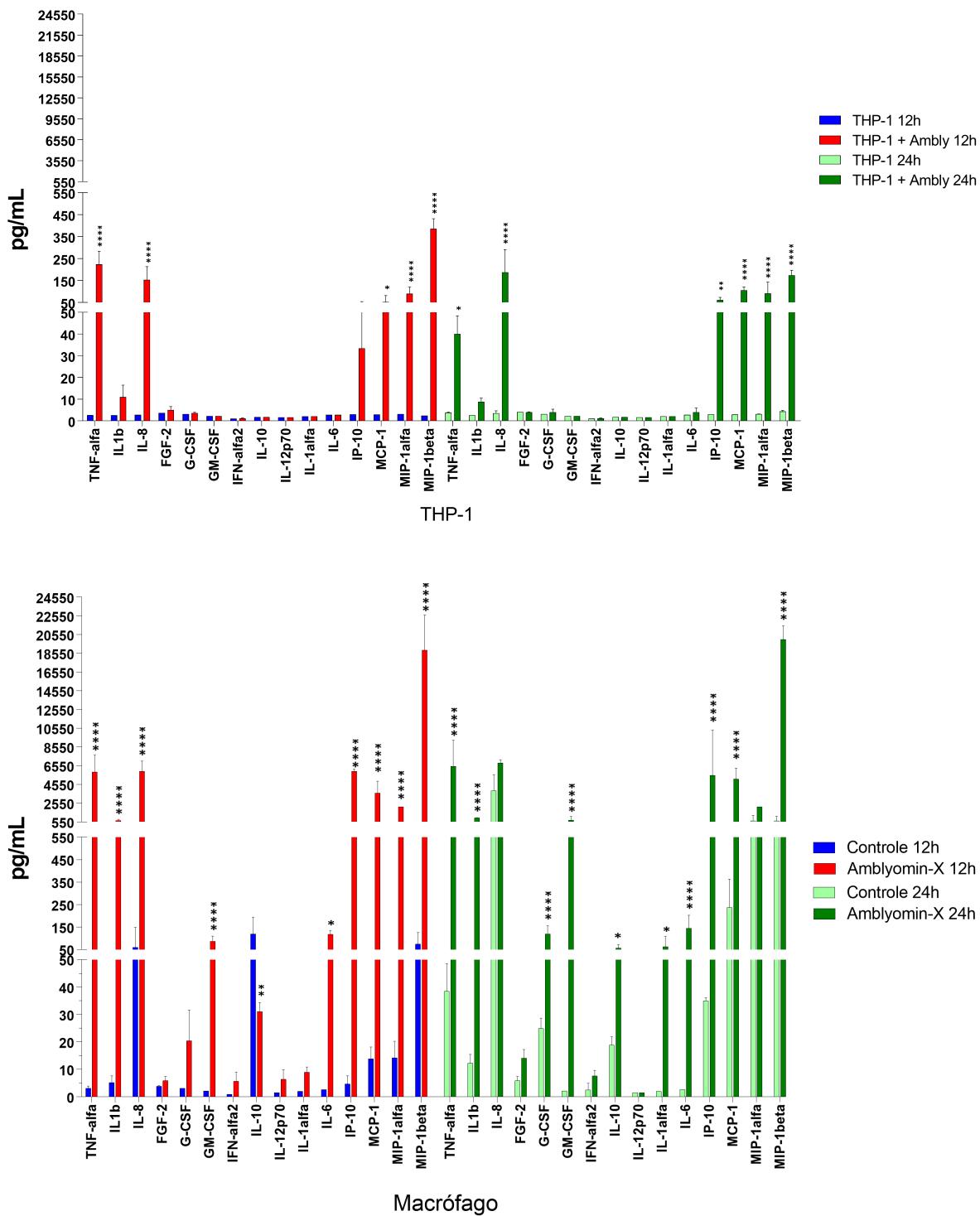


Figura 14: representação gráfica da modulação do perfil de liberação de citocinas frente ao tratamento com Amblyomin-X (50 μ M) durante 12 e 24h em células THP-1 e macrófagos. O gráfico representa a média \pm SD de três experimentos independentes. Significância por ANOVA de duas vias, seguido pelo pós teste de múltipla comparação de Tukey-Kramer. * p<0,05 (5%), **p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001.

Em conjunto, os resultados demonstram que tratamento com Amblyomin-X (50 μ M) por 24 horas induziu a ativação e translocação nuclear do fator de transcrição STAT3 e da proteína P38 em monócitos. Sabe-se que a P38 está

relacionadas com diversas funções celulares, dentre elas diferenciação celular, proliferação, angiogênese, migração e produção de citocinas pró-inflamatórias. Alguns estudos demonstram que a diferenciação de monócitos em macrófagos, bem como a migração e recrutamento de tais células é dependente da ativação de P38 (Ayala et al., 2000). Além disso, a P38 tem importante papel na regulação pós transcrecional de algumas citocinas, como TNF-alfa, IL8 e IL-6 (Cuenda and Rousseau, 2007), e está relacionada com a síntese de interferons através da ativação do fator de transcrição STAT1 (Goh et al., 1999). Sendo assim, a maior ativação da P38 frente ao tratamento com Amblyomin-X pode estar relacionado com a indução do perfil pró-inflamatório de monócitos, visto que houve aumento na expressão de STAT1 e das citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa, IL6 e IL8, o que também resultou na maior liberação de tais citocinas no sobrenadante, principalmente IL8 e TNFalfa.

Sabe-se também que o fator de transcrição STAT3 pode ser ativado por diversos fatores de crescimento e por citocinas pró-inflamatórias, como IL6, oncostatina-M e IL11(Hillmer et al., 2016). Alguns estudos comprovam que a migração e infiltração de monócitos e macrófagos está relacionada com a ativação de STAT3 induzida por IL-6, o que resulta na maior síntese de algumas quimioncinas, como MCP-1, MIP-1alpha e RANTES, que estão relacionadas no processo de recrutamento e quimioatração de células da imunidade inata (Zhang et al., 2013). O tratamento com Amblyomin-X induziu maior expressão de quimiocinas como MCP-1 e MIP-1alpha, em monócitos, o que pode estar relacionado com a ativação da via IL6/STAT3, uma vez que algumas citocinas que ativam a via do STAT3, como oncostatina e IL6 também estão mais expressas em monócitos tratados com Amblyomin-X .

Em contrapartida, o tratamento com Amblyomin-X(50 μ M) em macrófagos não levou a ativação da proteína P38, nem do fator de transcrição STAT3, apesar de apresentar elevada liberação de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, nota-se que houve aumento da expressão do fator de transcrição STAT1 e da proteína SOCS3. Alguns estudos demonstraram que SOCS3 é capaz de inibir a ativação de STAT3, e induzir a ativação de STAT1, o que leva a polarização do perfil M1 de macrófagos, o qual é caracterizado por desempenhar um papel pró-inflamatório e desempenhar efeito positivo de morte de células tumorais, através de diversos mecanismos, entre eles a liberação de diversas citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL6 e IL8 (Wilson, 2014).

Além disso, os macrófagos tratados com Amblyomin-X apresentaram aumento de expressão do receptor TREM1, o qual é expresso principalmente em monócitos e macrófagos CD14+, e que tem importante função na amplificação da resposta inflamatória e desenvolvimento do perfil pró-inflamatórios em macrófagos, induzindo a síntese e liberação de diversas citocinas inflamatórias, como TNF-alfa, IL6 e IL-1 β , bem como de quimiocinas como MIP-1alfa, MIP-2 e GM-CSF, através da via de sinalização PI3K/AKT (Dower et al., 2008).

O tratamento com Amblyomin-X também modulou a expressão de algumas proteínas, como aumento da expressão de IRF9 e redução de IRF3. Estudos demonstraram que IRF9 está relacionado com a ativação do fator de transcrição STAT1 e indução da liberação de algumas quimiocinas, como IP-10, a qual desempenha a função de quimioatração de células produtoras de interferon-gama, como Linfócitos T CD8 citotóxicos. Apesar de IRF3 estar relacionado com o desenvolvimento do perfil M2 de macrófagos, o estímulo de tais células com GM-CSF leva a redução da expressão de IRF3 e aumento de Myd88, o que colabora com a polarização do perfil M1 de macrófagos (Günthner and Anders, 2013).

Colaborando com a polarização para perfil M1 dos macrófagos, o tratamento com Amblyomin-X induziu o aumento da expressão de alguns receptores de membrana em macrófagos do tipo 1, como CD40 (Vogel et al., 2014), CD80 e CD86, sendo o último em menor amplitude. Tanto CD80, quanto CD86 são receptores co-estimulatórios no processo de sinapse imunológica, que leva a ativação de outras células do sistema imune inato e adquirido. Também são importantes no processo inflamatório, sendo o CD80 o que exerce papel mais relevante na regulação da inflamação em alguns casos específicos, como sepse. Dessa forma, CD80 é mais expresso em células inflamatórias ativadas do que CD86 (Nolan et al., 2009).

5) Conclusão

Pode-se concluir que o Amblyomin-X induz a polarização de macrófagos para o perfil M1, bem como ativa monócitos para expressão de moléculas pró-inflamatórias importantes para o processo de diferenciação, ativação e recrutamento de células para o ambiente da inflamação. Sabe-se que macrófagos com perfil M1 desempenha importante função no desenvolvimento de mecanismos anti-tumorais, como aumento do recrutamento de linfócitos e células NK para o tumor, que auxiliam

no processo de morte de células tumorais, bem como células do sistema imune para melhor apresentação de抗ígenos tumorais. O conjunto de dados apresentados nesse estudo abre a perspectiva para investigações com o objetivo de avaliar a capacidade de macrófagos tratados com Amblyomin-X ativar outras células do sistema imune e gerar respostas contra tumores susceptíveis a resposta imune.

6) Referências Bibliográficas

- 1) HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- 2) KITAMURA, Takanori; QIAN, Bin-Zhi; POLLARD, Jeffrey W. Immune cell promotion of metastasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 2, p. 73–86, 2015.
- 3) DE VISSER, Karin E.; EICHTEN, Alexandra; COUSSENS, Lisa M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 1, p. 24–37, 2006.
- 4) GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.
- 5) SHIAO, Stephen L. et al. Immune microenvironments in solid tumors: new targets for therapy. **Genes & Development**, v. 25, n. 24, p. 2559–2572, 2011.
- 6) GAJEWSKI, Thomas F; SCHREIBER, Hans; FU, Yang-Xin. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. **Nature Immunology**, v. 14, n. 10, p. 1014–1022, 2013.
- 7) SMYTH, Mark J.; DUNN, Gavin P.; SCHREIBER, Robert D. Cancer immuno-surveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. **Advances in Immunology**, v. 90, p. 1–50, 2006.
- 8) VESELY, Matthew D. et al. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 235–271, 2011.
- 9) NOY, Roy; POLLARD, Jeffrey W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 49–61, 2014.
- 10) TRAN JANCO, Jo Marie et al. Tumor-Infiltrating Dendritic Cells in Cancer Pathogenesis. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 7, p. 2985–2991, 2015.

- 11) QIAN, Bin-Zhi; POLLARD, Jeffrey W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39–51, 2010.
- 12) ADEEGBE, Dennis O.; NISHIKAWA, Hiroyoshi. Natural and Induced T Regulatory Cells in Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013.
- 13) GIL-BERNABE, A. M. et al. Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice. **Blood**, v. 119, n. 13, p. 3164–3175, 2012.
- 14) LIMA, Luize G.; MONTEIRO, Robson Q. Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression. **Bioscience Reports**, v. 33, n. 5, p. 701–710, 2013.
- 15) MA, Ying-Yu et al. Interaction of coagulation factors and tumor-associated macrophages mediates migration and invasion of gastric cancer. **Cancer Science**, v. 102, n. 2, p. 336–342, 2011.
- 16) WANG, J.G. et al. Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer. **Blood**, v. 119, n. 23, p. 5543–5552, 2012.
- 17) ZALPOUR, Ali et al. Role of Factor Xa Inhibitors in Cancer-Associated Thrombosis: Any New Data? **Advances in Hematology**, v. 2011, p. 1–12, 2011.
- 18) BATISTA, I.F.C. et al. A new Factor Xa inhibitor from Amblyomma cajennense with a unique domain composition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 493, n. 2, p. 151–156, 2010.
- 19) VENTURA, Janaína Souza et al. A Kunitz-type FXa inhibitor affects tumor progression, hypercoagulable state and triggers apoptosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 3, p. 192–196, 2013.
- 20) CHUDZINSKI-TAVASSI, Ana Marisa et al. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1145–1154, 2010.
- 21) MARIA, Durvanei Augusto et al. A novel proteasome inhibitor acting in mitochondrial dysfunction, ER stress and ROS production. **Investigational New Drugs**, v. 31, n. 3, p. 493–505, 2013.

- 22)BRANCO, Vania G. *et al.* Amblyomin-X having a Kunitz-type homologous domain, is a noncompetitive inhibitor of FXa and induces anticoagulation in vitro and in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 10, p. 1428–1435, 2016.
- 23)TSUCHIYA, Shigeru *et al.* Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **International Journal of Cancer**, v. 26, n. 2, p. 171–176, 1980.
- 24)QIN, Zhenyu. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. **Atherosclerosis**, v. 221, n. 1, p. 2–11, 2012.
- 25)FORRESTER, Megan A. *et al.* Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. **Cellular Immunology**, v. 332, p. 58–76, 2018.
- 26)DAIGNEAULT, Marc *et al.* The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8668, 2010.
- 27)PARK, K. A. *et al.* Sustained activation of protein kinase C downregulates nuclear factor- B signaling by dissociation of IKK- and Hsp90 complex in human colonic epithelial cells. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 1, p. 71–80, 2007.
- 28)SCHWENDE, Heike *et al.* Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 4, p. 555–561, 1996.
- 29)TRAORE, Kassim *et al.* Signal transduction of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced growth inhibition of human monocytic leukemia THP-1 cells is reactive oxygen dependent. **Leukemia Research**, v. 29, n. 8, p. 863–879, 2005.
- 30)ZANELLA, Fabian; LORENS, James B.; LINK, Wolfgang. High content screening: seeing is believing. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 237–245, 2010.
- 31)HAN, Yuanyuan *et al.* Review: imaging technologies for flow cytometry. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 24, p. 4639–4647, 2016.

- 32)BARTENEVA, Natasha S.; FASLER-KAN, Elizaveta; VOROBJEV, Ivan A. Imaging Flow Cytometry: Coping with Heterogeneity in Biological Systems. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 60, n. 10, p. 723–733, 2012.
- 33)CHOWDHURY, Ferdousi; WILLIAMS, Anthony; JOHNSON, Peter. Validation and comparison of two multiplex technologies, Luminex® and Mesoscale Discovery, for human cytokine profiling. **Journal of Immunological Methods**, v. 340, n. 1, p. 55–64, 2009.
- 34)JONES, Laurie J. *et al.* RNA Quantitation by Fluorescence-Based Solution Assay: RiboGreen Reagent Characterization. **Analytical Biochemistry**, v. 265, n. 2, p. 368–374, 1998.
- 35)Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115
Koressaar T, Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3 *Bioinformatics* 23(10):1289-91
- 36)PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.
- 37)MAESS, Marten B.; SENDELBACH, Stefanie; LORKOWSKI, Stefan. Selection of reliable reference genes during THP-1 monocyte differentiation into macrophages. **BMC molecular biology**, v. 11, p. 90, 2010.
- 38)LUND, Maria E. *et al.* The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. **Journal of Immunological Methods**, v. 430, p. 64–70, 2016.
- 39)STARR, Tregei *et al.* The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with *Salmonella Typhimurium*. **PloS One**, v. 13, n. 3, p. e0193601, 2018.
- 40)YU, Xiao *et al.* A novel miR-200b-3p/p38IP pair regulates monocyte/macrophage differentiation. **Cell Discovery**, v. 2, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/celldisc201543>>. Acesso em: 24 out. 2018.
- 41)ALDO, Paulomi B. *et al.* Effect of Culture Conditions on the Phenotype of THP-1 Monocyte Cell Line. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 70, n. 1, p. 80–86, 2013.

- 42) CUENDA, Ana; ROUSSEAU, Simon. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 8, p. 1358–1375, 2007.
- 43) AYALA, J. M. *et al.* Serum-induced monocyte differentiation and monocyte chemotaxis are regulated by the p38 MAP kinase signal transduction pathway. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, n. 6, p. 869–875, 2000.
- 44) GOH, K. C.; HAQUE, S. J.; WILLIAMS, B. R. p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons. **The EMBO journal**, v. 18, n. 20, p. 5601–5608, 1999.
- 45) HILLMER, Emily J. *et al.* STAT3 signaling in immunity. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 31, p. 1–15, 2016.
- 46) ZHANG, Congcong *et al.* Interleukin-6/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Pathway Is Essential for Macrophage Infiltration and Myoblast Proliferation during Muscle Regeneration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 3, p. 1489–1499, 2013.
- 47) WILSON, Heather M. SOCS Proteins in Macrophage Polarization and Function. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 357, 2014.
- 48) DOWER, K. *et al.* Innate Immune Responses to TREM-1 Activation: Overlap, Divergence, and Positive and Negative Cross-Talk with Bacterial Lipopolysaccharide. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 5, p. 3520–3534, 2008.
- 49) GÜNTHER, Roman; ANDERS, Hans-Joachim. Interferon-Regulatory Factors Determine Macrophage Phenotype Polarization. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1–8, 2013.
- 50) VOGEL, Daphne Y.S. *et al.* Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. **Immunobiology**, v. 219, n. 9, p. 695–703, 2014.
- 51) NOLAN, Anna *et al.* Differential Role for CD80 and CD86 in the Regulation of the Innate Immune Response in Murine Polymicrobial Sepsis. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6600, 2009.

