

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM  
LEUCÓCITOS DE EQUINOS: ANÁLISE PELA TÉCNICA  
DO MICROARRAY EM UM MODELO *EX VIVO* DE  
ENDOTOXEMIA**

**Priscila Dalmagro**

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM  
LEUCÓCITOS DE EQUINOS: ANÁLISE PELA TÉCNICA  
DO MICROARRAY EM UM MODELO *EX VIVO* DE  
ENDOTOXEMIA**

**Priscila Dalmagro**

**Orientadora: Prof. Adj. Juliana R. Peiró**

**Co-orientador: Dr. Sergio Moraes Aoki**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP

2012

Catálogo na Publicação (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

	Dalmagro, Priscila
D148a	<p>Avaliação da expressão gênica em leucócitos de equinos: análise pela técnica do microarray em um modelo <i>ex vivo</i> de endotoxemia./.. Priscila Dalmagro.</p> <p>Araçatuba: [s.n], 2012</p> <p>40f. il.; CD-ROM</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2012</p> <p>Orientador: Prof Adj. Juliana Regina Peiró</p> <p>Co-orientador: Sergio Moraes Aoki</p> <p>1. Biologia molecular 2.Reação de fase aguda 3. Fatores de crescimento transformadores 4. Fator de necrose tumoral alfa 5. Bacteria Gram-negativa</p> <p>CDD 572.808</p>

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** Avaliação da expressão gênica em leucócitos de equinos: Análise pela técnica do  
microarray em um modelo de ex vivo de endotoxemia.

**AUTORA:** PRISICLA DALMAGRO

**ORIENTADORA:** Dr.ª JULIANA REGINA PEIRÓ


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL  
(Fisiopatologia Médica e Cirúrgica) pela Comissão Examinadora.

  
Dr. JOSÉ PAES DE OLIVEIRA FILHO

  
Dr.ª FLÁVIA DE ALMEIDA LUCAS

  
Dr.ª JULIANA REGINA PEIRÓ

**DATA DA REALIZAÇÃO:** 17 de julho de 2012.

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dr.ª JULIANA REGINA PEIRÓ  
- Orientadora -

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**PRISCILA DALMAGRO** – Dourados – MS, 02 de Junho de 1985. Graduada em Medicina Veterinária, 2008, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul. Atua na área da Biologia Molecular na empresa DNApta Inovação Biotecnológica, 2009, São José do Rio Preto, São Paulo. Aluna do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal – UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba, São Paulo.

*“O que fazemos para nós, morre conosco. O que fazemos pelos outros  
e pelo mundo, continua e é imortal.”*

*(Albert Pine)*

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por sempre estar ao meu lado e por ter me ajudado a cumprir mais esta etapa.

Agradeço aos meus pais e meus irmãos que me apoiaram ao longo desses anos, sem eles não seria possível e sempre pensei neles em todos os momentos, sempre querendo que eles se orgulhassem do meu caminho.

Agradeço à Professora Adjunto Juliana R. Peiró pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela confiança em mim depositada, orientação, paciência e conhecimentos compartilhados. E por muitas vezes segurar a barra e me acolher como uma filha. Muito Obrigada.

Agradeço ao Dr. Sergio Moraes Aoki e ao Dr. Paulo Peitl Júnior pelos ensinamentos e por todo apoio ao longo do projeto. Pela paciência e por me liberarem para que eu pudesse cumprir com minhas obrigações com o programa.

Agradeço à Dra. Daisy Maria Favero Salvadori, responsável pelo laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica da Faculdade de Medicina da UNESP/Botucatu, e sua equipe por permitirem que eu realizasse parte do projeto e por ajudarem com a técnica do microarray. Em especial à Dra. Glenda Nicioli da Silva, pela ajuda, pelo apoio, pelas discussões sobre o projeto e pela descontração e hospedagem.

Agradeço ao Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci, e sua equipe, responsável pelo laboratório de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP por cederem seus laboratórios para a realização de parte deste estudo.

Agradeço meus colegas de trabalho: Valéria C. Miura, Elisandra Baroni, Lilian Pires e Carolina C. Azevedo pela ajuda em todos os momentos, pelas conversas, pelo apoio incondicional e pelas risadas que fizeram com que essa jornada fosse mais fácil.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba pela estrutura física concedida assim como apoio da Coordenação e equipe do Curso de Pós-graduação pela solicitude.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto, fundamental para realização do projeto de pesquisa.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma cooperaram para o desenvolvimento desse trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
I. Lista de figuras .....	vii
I. Lista de tabelas .....	ix
I. RESUMO .....	x
I. SUMMARY .....	xi
I. INTRODUÇÃO .....	12
II. MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
2.1 Caracterização dos animais .....	18
2.2 Delineamento Experimental .....	19
2.3 Extração de RNA .....	20
2.4 Separação e tratamento dos <i>pools</i> .....	21
2.5 Síntese, Transcrição Reversa e marcação do cDNA .....	22
2.6 Purificação e determinação do rendimento e especificidade ....	23
2.7 Hibridização, lavagem e leitura das lâminas .....	23
III. RESULTADOS .....	26
IV. DISCUSSÃO .....	29
4.1 TGF-B .....	30
4.2 AQP4 .....	31
4.3 PI3K .....	32
4.4 IL-8 .....	33
V. CONCLUSÃO .....	34
VI. REFERÊNCIAS .....	35

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática da composição da membrana celular de uma bactéria Gram-negativa (*E. coli*) e localização do lipopolissacarídeo (LPS). Adaptado de Textbook of Bacteriology..... 12
- Figura 2** - Representação esquemática da estrutura do lipopolissacarídeo (LPS), um componente estrutural da membrana de bactérias Gram-negativas. O LPS possui 3 regiões: Antígeno O, Core e Lipídio A. Adaptado de Textbook of Bacteriology 13
- Figura 3** - Representação das moléculas envolvidas na cascata de sinalização dos receptores Toll-like 2 – 4. Fonte: [http://limi-lip.blogspot.com.br/2011\\_08\\_01\\_archive.html](http://limi-lip.blogspot.com.br/2011_08_01_archive.html) 18
- Figura 4** - Delineamento experimental. LPS indica o estímulo com lipopolissacarídeo nas diferentes concentrações (1 ou 10 ng/mL) ou tampão PBS (0 ng/mL); Os momentos da colheita (0, 2 e 4 horas) de 500 µL das amostras de sangue para a avaliação da expressão gênica 20
- Figura 5** - Géis de agarose 1,2% feitos para checar a integridade do RNA após a limpeza dos *pools*. A foto indica uma boa integridade das amostras pois há uma boa separação das bandas 28s e 18s dos RNAs 21
- Figura 6** - Representação da filtragem realiza na ferramenta de análise IPA<sup>®</sup> em busca dos receptores Toll-like 4 e Toll-like 2, assim como das citocinas IL-1; TNF- $\alpha$  que são as principais encontradas nas resposta aguda desencadeada pelo LPS 25
- Figura 7** - Via de sinalização gerada pela ferramenta de análise IPA<sup>®</sup>. Representação da relação D10 ng LPS/mL e D0 ng LPS/mL entre os momentos 4 e 2. As moléculas verdes representam as 30x menos expressas enquanto as vermelhas 30x mais expressas 26

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Relação dos genes encontrados na ferramenta de busca IPA<sup>®</sup> e suas principais funções biológicas 27
- Tabela 2** - Genes e valores exponenciais de alguns dos genes representados nas vias assim como suas funções. As setas vermelhas indicam os genes 30x mais expressos e as verdes os 30x menos expressos 28

## **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM LEUCÓCITOS DE EQUINOS: ANÁLISE PELA TÉCNICA DO MICROARRAY EM UM MODELO *EX VIVO* DE ENDOTOXEMIA**

**RESUMO** – Endotoxemia é distúrbio sistêmico que se origina da resposta do hospedeiro a um componente da membrana celular das bactérias Gram-negativas. Esta resposta se dá através da exposição dos receptores celulares TLR-4 e TLR-2 ao LPS. Os objetivos deste estudo foram investigar as alterações na expressão gênica da exposição ao LPS em leucócitos de equinos utilizando a técnica de microarray, avaliar a eficiência do modelo *ex vivo* para os estudos envolvendo a endotoxemia pela mesma técnica, avaliar a expressão global de genes em vias envolvidas, identificar componentes da cascata metabólica com potenciais para novas terapias, e fornecer subsídio para futuros estudos. Amostras de sangue total (15mL) de cavalos saudáveis (n=6) foram incubadas durante 4 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> na presença (1 ou 10 ng/mL) ou ausência de LPS (0 ng/mL). Alíquotas de 500µL de sangue foram coletadas nos momentos 0, 2 e 4 horas após o estímulo do LPS. O RNA, extraído das mostras, foi utilizado para a transcrição do cDNA. A hibridização do cDNA marcado com Cy-3 foi realizada em lâminas 4x44K v2 de humanos contendo sequências homólogas com a espécie equina para os genes de interesse. Após a leitura das lâminas, com filtro para genes 30x mais ou menos expressos, verificou-se um aumento da expressão do TLR-2 na concentração de 10 ng LPS/mL no momento 4 em relação ao momento 2. Este resultado sugere que, embora o receptor TLR-4 seja o principal receptor no reconhecimento do LPS, o receptor TLR-2 também tem um papel no reconhecimento destas moléculas.

**Palavras-chave:** Biologia Molecular, Reação de fase aguda, fatores de crescimento transformador, fator de necrose tumoral alfa, bactérias Gram-negativas.

**EVALUATION OF GENE EXPRESSION IN LEUKOCYTES OF HORSES:  
ANALYSIS OF THE MICROARRAY TECHNIQUE IN AN *EX VIVO* MODEL OF  
ENDOTOXIN**

**SUMMARY** – Endotoxemia is systemic disturbance that originates from the host response to a component of the cellular membrane of Gram-negative bacteria. This response occurs through exposure of cellular receptors TLR-4 and TLR-2 to LPS. The objectives of this study were to investigate changes in gene expression of exposure to LPS in horse leukocytes using the microarray technique, to evaluate the efficiency of the *ex vivo* model for studies of endotoxemia by the same technique, to evaluate the global expression of genes in the metabolic pathways involved, identify components of the metabolic cascade with potential for new therapies, and provide allowance for future studies. Whole blood samples (15mL) of healthy horses (n=6) were incubated for 4 hours at 37°C with 5% of CO<sub>2</sub> in the presence (1 or 10 ng/ml) or absence of LPS (0 ng/ml). Aliquots of 500µL of blood were collected at 0,2 and 4 hours after LPS stimulation. The RNAs, extracted from the samples, were used for the transcription of the cDNAs. Hybridization of labeled cDNAs with Cy-3 were performed in 4x44K v2 slides containing human sequences homologous to the equine species for the genes of interest. After the reading of the slides with filter for genes 30x up regulation or down regulation expression, it was observed an increased expression of the TLR-2 concentration of 10 ng LPS/mL at time 4 compared to time 2. This result suggests that, although the TLR-4 receptor is the main LPS recognition receptor, the receptor TLR-2 also plays a role in recognition of these molecules.

**Keywords:** Molecular biology, Acute phase reaction, transforming growth factor, Tumor necrosis factor alpha, Gram-negative bacteria.

## I. INTRODUÇÃO

A endotoxemia é uma síndrome clínica que se origina da resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Salmonella* (Figura 1). O LPS é liberado após lise bacteriana na forma insolúvel, resultado de autólise, lise externa mediada por complemento e lisozima, e digestão fagocítica celular (MOORE, 2001). O lipídio-A é a porção do LPS associada com a toxicidade, sendo responsável pela maioria dos efeitos deletérios da endotoxina (MOORE, 2001). *In vivo*, pequenas quantidades de endotoxinas são liberadas enquanto ocorre o crescimento bacteriano, o que pode ser importante na estimulação da imunidade natural. O LPS é uma molécula de aproximadamente 10 KDa, que quando comparada às exotoxinas (50-1000 KDa) são menores, com menor toxicidade, menor grau de especificidade e sem função enzimática. Além disso, as endotoxinas são pirogênicas e resistentes à desnaturação por calor. Na grande maioria dos mamíferos, a presença do LPS na corrente sanguínea leva a uma rápida resposta, desencadeia uma cascata inflamatória e por isso é uma das ameaças mais comumente encontrada em equinos com distúrbios gastrointestinais (MOORE, 2001). Animais com dor abdominal (cólica) geralmente apresentam na circulação endotoxinas de bactérias Gram-negativas (MOORE, 2001).

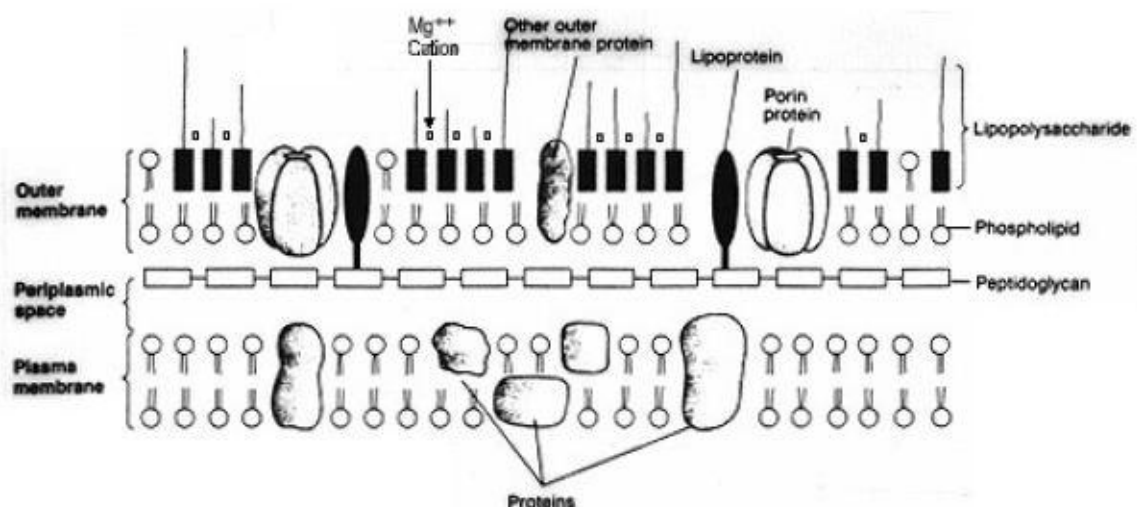


FIGURA 1 - Representação esquemática da composição da membrana celular de uma bactéria Gram-negativa (*E. coli*) e localização do lipopolissacarídeo (LPS). Adaptado de *Textbook Bacteriology* 2009.

Os achados clínicos mais comuns em equinos com quadro de endotoxemia incluem anormalidade da coloração de membranas mucosas, que se inicia com uma “linha tóxica” ao redor dos dentes, prolongamento do tempo de preenchimento capilar, aumento das frequências respiratórias e cardíacas, febre e hemoconcentração (CAMPEBELL et al., 2007).

O termo endotoxemia, concedido Pfeiffer há muitos anos, criado para nomear as toxinas que ele não conseguia identificar no organismo vivo (MOORE, 2001) e, descrever biologicamente a atividade do material presente em culturas filtradas de bactérias Gram-negativas (MORRISON, 1994). Entretanto estudos subseqüentes mostraram que estas toxinas não eram oriundas do interior da bactéria e sim de sua membrana externa e que consistiam de lipopolissacarídeos (MOORE, 2001).

O LPS é o principal componente da membrana externa das bactérias Gram-negativas (CAMPO, 2008; PALSSON-MCDERMOTT et al., 2004; SEYDEL et al., 2002) e é composto por três porções: uma região polissacarídica externa (O-antigênica), uma região central (monossacarídica) e uma interna rica em ácidos graxos denominado lipídio A, que é a porção tóxica desta molécula e a mais importante na fisiopatogenia da endotoxemia (CROSS, 2002; MOORE, 2001; MORRISON, 1978) (Figura 2).

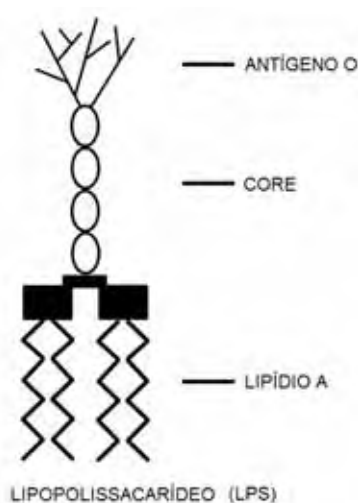


FIGURA 2 - Representação esquemática da estrutura do lipopolissacarídeo (LPS), um componente estrutural da membrana de bactérias Gram-negativas. O LPS possui 3 regiões: Antígeno O, Core e Lipídio A. Adaptado de Textbook of Bacteriology 2009.

Sua ação endotóxica pode ser compreendida em termos de sua habilidade em gerar estresse no alvo de membranas celulares, seja atuando no sítio de sinalização de proteínas (agonistas) ou inibindo a vinculação de moléculas agonistas a estes alvos (antagonistas) (SEYDEL et al., 2002). Logo, o LPS se torna o alvo principal para o reconhecimento do sistema imunológico e tem a capacidade de desencadear a expressão de uma variedade de citocinas pro-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), citocinas antiinflamatórias como a IL-10, histamina (FOSTER; MEDZHITOV, 2009) e também espécies reativas ao oxigênio (ROS) (CAMPO, 2008).

Em toda a extensão do trato intestinal dos mamíferos os microorganismos Gram-negativos são normalmente o maior constituinte da variedade de bactérias encontradas nele (MACKAY, 1992; MORISSON, 1978). Neste ambiente as bactérias Gram-negativas podem se multiplicar rapidamente, sofrer lise ou então morrer e, nestas situações, há uma liberação constante de endotoxinas no lúmen intestinal (MOORE, 2001). Mesmo assim, manter esta relação simbiótica é possível, mas parece essencial que o hospedeiro mantenha ativo muitos mecanismos de defesa contra uma potencial invasão bacteriana, que poderia levar a um quadro de sepse Gram-negativa e até mesmo à morte do hospedeiro (MORISSON, 1978). Distúrbios gastrointestinais (como a cólica) podem alterar esta relação simbiótica e danificar a barreira da mucosa intestinal permitindo a passagem das toxinas, que podem alcançar a circulação (MOORE, 2001).

Quando ganham a corrente circulatória as endotoxinas podem interagir com proteínas circulantes e células sanguíneas ou podem ser removidas por macrófagos fixados nos tecidos do fígado, baço e pulmão (MOORE, 2001). As células mononucleares, por exemplo, os monócitos do sangue ou macrófagos dos tecidos, são cruciais no “policiamento” do ambiente interno (MORRISON, 1978) e o LPS tem capacidade de induzi-las (PAIK et al., 2003). Uma vez ativadas pelo LPS, estas células produzem uma gama de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 (CROSS, 2002; NOMURA et al., 2000), interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), citocinas da classe das quimiocinas, responsáveis pelo controle da migração de células imunes para locais com reações inflamatórias ou infecções, (ZIDEK et al., 2009) e até mesmo síntese de NOS induzida (iNOS) (PALSSON-MCDERMOTT et al., 2004).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), por sua vez, estimula a síntese de outros mediadores inflamatórios (interleucinas, eicosanóides) da fase da resposta aguda e da febre. Ele também parece ser responsável pela síntese e liberação de mediadores anti-inflamatórios como IL-10 (MOORE, 2001), que parece operar como desativador dos fagócitos mononucleares e também como inibidor a síntese de citocinas pró-inflamatórias (CAVAILLON, 2003; MOORE, 2001). O interferon- $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) induz a transcrição de componentes da fase aguda da resposta inflamatória como a ceruloplasmina (ANDERSON, 2010).

Em 1990 descobriu-se que o receptor de superfície celular CD14, denominado antígeno de diferenciação de agrupamento CD14, presente em células mononucleares, atua como um dos principais receptores de LPS (BLEUTER et al., 2002). Porém para que o LPS se ligue de forma eficiente ao CD14 ele deve estar acoplado a uma proteína ligante do LPS (LBP) e só assim formar o complexo LPS-LBP-CD14 (MORRISON et al., 1994; THOMAS et al., 2006). Aparentemente a ligação deste complexo (LPS-LBP-CD14) na superfície celular por si só não é suficiente para induzir o sinal de transdução e conseqüentemente levar à ativação celular e produção de TNF- $\alpha$  e outras citocinas (CAVAILLON et al., 1996). Esta ineficiência na ativação celular pode ser explicada pelo fato do receptor CD14 não possuir um domínio trans membrana e, por conseguinte, não conseguir ativar de forma direta o sistema mensageiro secundário ou caminho para transdução de sinais responsável pela síntese e liberação dos mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. (MOORE, 2001).

Recentemente, foi identificada a presença de outros receptores na superfície celular, denominados Toll-like (TLRs), que são responsáveis por discriminar moléculas patogênicas das moléculas corpóreas (AKIRA et al., 2003). Estes receptores também são responsáveis por induzirem a expressão dos genes envolvidos na resposta inflamatória, ou seja, iniciarem a via de transdução de sinais. (DOBROVOLSKAIA et al., 2003; TAKEDA et al., 2005; TAKEDA, 2005). Isto é possível, uma vez que os TLRs, ao contrário do CD-14, são dotados de componentes intracelulares e trans membrana que permitem a comunicação entres os aspectos exteriores e interiores das células (MOORE, 2001; KAWAI; AKIRA, 2009), levando à produção de citocinas (IL-1, IL-6, IL12, IL-10) e TNF- $\alpha$  (LI et al., 2005; LI et al., 2009).

Atualmente foram identificados treze membros da família de receptores Toll-likes em mamíferos, dos quais onze são expressos em humanos, (TSAN; GAO, 2007), sendo estes receptores distribuídos diferentemente pela célula. Os receptores Toll-like 1 (TLR-1), Toll-like-2 (TLR-2) e Toll-like-4 (TLR-4) são expressos na superfície celular, enquanto que, os Toll-like-3 (TLR-3), Toll-like-7 (TLR-7), Toll-like-8 (TLR-8) e Toll-like-9 (TLR-9) foram demonstrados em compartimentos intracelulares (TAKEDA et al., 2005).

Funcionalmente, cada receptor possui papel diferenciado. O Toll-like-2 está envolvido na resposta a uma variedade de componentes bacterianos, incluindo o LPS (AKIRA et al., 2003; TAKEDA et al., 2005). Estudos recentes indicaram que o receptor Toll-like-2 é o primeiro a traduzir o sinal molecular de LPS de certas bactérias Gram-negativas (não enterobactérias), embora o principal receptor Toll-like envolvido na sinalização de LPS seja o Toll-like-4 (TLR-4) (DOBROVOLSKAIA et al., 2003). É possível que o receptor Toll-like-2 interaja com outros TLRs para explicar a sinalização em certas bactérias Gram-negativas não enterobactérias (HIRSCHFELD et al., 2001), pois alguns autores (OZINSKY et al., 2000) acreditam que o domínio TIR do TLR-2 é ativado não por uma interação homotípica e sim por uma interação heterotípica como o domínio TIR do TLR-1 ou TLR-6 (MIYAKE, 2006).

O Toll-like-4 é o principal reconhecedor dos componentes microbianos, o LPS (AKIRA et al., 2003; DOBROVOLSKAIA et al., 2003; TAKEDA et al., 2005; TAKEUCHI et al., 2001; YANG et al., 2011) e para alguns ele também está envolvido na quimiotaxia de macrófagos (WU et al., 2009).

Contudo, para que o TLR-4 se torne responsivo ao LPS e exerça sua função é necessária sua associação com a proteína acessória de diferenciação mielóide-2 (MD-2) (PAIK et al., 2003), da qual ele é estritamente dependente (BRANDL et al., 2005).

Quanto à via de sinalização intracelular esta é elucidada pelo domínio TIR que é conservado entre as regiões citoplasmáticas de todos os receptores da família Toll-like (YAMAMOTO et al., 2003; TSAN; GAO, 2007) e, assim como os receptores IL-1 e IL-18, eles demonstram capacidade em se ligar com adaptadores moleculares intracelulares favorecendo a cascata de sinalização (DOBROVOLSKAIA et al., 2003).

A evolução desta cascata só é viável devido à interação dos domínios TIRs dos TLRs com domínios TIRs específicos que contêm proteínas adaptadoras, tais como: Fator de Diferenciação Mielóide 88 (MyD88), Adaptador-like MyD88 (MAL ou TIRAP), adaptador contendo domínio TIR induzindo Interferon- $\beta$  (TRIF) e molécula adaptadora relacionado ao TRIF (TRAM) (DOBROVOLSKAIA et al., 2003; KENNY et al., 2009; LI et al., 2005). As proteínas quinases associadas ao IL-1RI (IRAKs) têm um importante papel nas vias de sinalização e por isso alguns as consideram como mediadores centrais da sinalização dos Toll-Like pela ativação da IRAK-1. (TAKEDA et al., 2005). Acredita-se que a IRAK-1 seja um componente integral e essencial das vias de sinalização do LPS, TNF- $\alpha$  e da IL-1 que regulam o fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (LOCKETT et al., 2008).

O resultado final da cascata é a ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e o IRF-3 e os produtos finais são as citocinas, quimiocinas assim como algumas moléculas anti-inflamatórias (KENNY et al., 2009). A maioria dos sinais de acionamento da cascata de ativação do NF- $\kappa$ B tem início na membrana plasmática e convergem a nível do complexo IKK, o qual contém quinase- $\alpha$  I $\kappa$ B $\alpha$  (IKK $\alpha$ ), IKK $\beta$  e IKK $\gamma$  (LOCKETT et al., 2008), levando à fosforilação destas proteínas inibidoras e conseqüentemente à translocação nuclear do NF- $\kappa$ B (; LI et al., 2009; SILVERMAN; MANIATS, 2001) que, por conseguinte, gera a ativação de mais de 200 genes. Contudo, o mecanismo sinal dependente do complexo IKK ainda não está bem esclarecido (LOCKETT et al., 2008).

Devido aos muitos fatores e ao grande número de moléculas (citocinas, knases, proteínas, receptores) que podem estar envolvidos e levar ao quadro de endotoxemia na espécie equina e em outras, é de suma importância a realização de estudos a fim de se melhor compreender a fisiopatogenia da endotoxemia. O que também pode contribuir para o desenvolvimento e direcionamento de novos medicamentos e de novas estratégias de tratamento de pacientes com quadros de endotoxemia, sepse ou choque séptico. Com o presente estudo pretende-se investigar as alterações na expressão gênica da exposição dos leucócitos de equinos ao LPS utilizando a técnica de microarray, avaliar a expressão global de genes nas vias metabólicas envolvidas, identificar



cirurgia abdominal. Os animais incluídos neste estudo foram avaliados clinicamente, sendo que, somente eqüinos com valores normais de hemograma foram utilizados.

## 2.2 Delineamento Experimental

Sangue (15 mL) total dos 6 cavalos foi coletado por venopunção jugular em tubos contendo EDTA potássico (Vacutainer 15 mL, BD, USA). Os tubos foram identificados conforme o tratamento. Após a identificação foi retirado 500 µL de sangue total de cada tubo e acrescidos 500 µL de solução de tampão fosfato salino-PBS (0,01 M e pH 7,2) no grupo controle (D0 = 0 ng de LPS/mL), enquanto os falcons dos grupos experimentais foram tratados com 500 µL de uma solução contendo 1 ou 10 ng de LPS/mL derivado de *E. coli* (O55:B5, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) respectivamente. As amostras controle foram identificadas como D0 e as controles como D1 ou D10 conforme a dose de LPS. No momento seguinte, amostras de 500 µL de sangue de cada grupo foram colhidas e transferidas para tubos de polipropileno (1,5 mL) para a extração do RNA, representando o momento de tempo 0 conforme esquematizado na figura 4. Os tubos falcons, que passaram a ter o volume de 14,5 mL, foram incubados em uma rotisserie orbital (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e o procedimento de coleta dos 500 µL de sangue foi repetido nos momentos 2 e 4 horas (Figura 4).

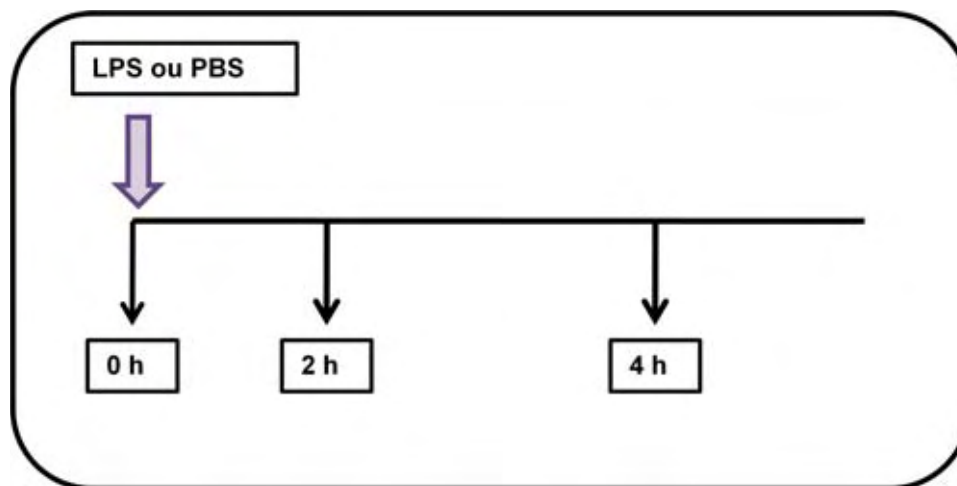


FIGURA 4 - Delineamento experimental. LPS indica o estímulo com lipopolissacarídeo nas diferentes concentrações (1 ou 10 ng/mL) ou tampão PBS (0 ng/mL); Os momentos da colheita (0, 2 e 4 horas) de 500  $\mu$ L das amostras de sangue para a avaliação da expressão gênica

### 2.3 Extração de RNA

Cada alíquota de 500  $\mu$ L de sangue total, das diferentes concentrações e dos diferentes momentos, foi lisada e teve o isolamento total do RNA com a adição de 500  $\mu$ L do TRIzol® Reagents (Invitrogen) e 200  $\mu$ L do clorofórmio 100% de acordo com as instruções do fabricante. Após a lise as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C e ocorreu a formação de três fases: aquosa, branca e vermelha. A fase aquosa, que contém o RNA, foi transferida para um novo tubo de polipropileno ao qual foi adicionado 500  $\mu$ L de álcool isopropílico (Sigma, EUA) e 200  $\mu$ L de glicogênio. Em seguida as amostras foram incubadas por 10 minutos a uma temperatura de -80°C para a precipitação do RNA. Terminado o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi lavado com 1000  $\mu$ L de etanol 70% (Sigma, EUA) gelado. Em seguida os tubos foram centrifugados a 7.500 g por 8 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado. O pellet, quando seco, foi eluído em 20  $\mu$ L de água RNase-free e as amostras foram armazenadas a -80°C.

## 2.4 Separação e tratamento dos *pools* com DNase I

Os *pools* de amostras foram feitos a partir do RNA total dos animais, conforme o tempo de incubação, (T0, T2, T4h), e as concentrações de LPS (0; 1 ou 10 ng/mL), padronizado-se um total de 1.000 ng/ $\mu$ L de RNA de cada animal/*pool*. Os *pools* foram tratados com DNase I (Qiagen): 2,5 $\mu$ L de solução estoque DNase I, 10 $\mu$ L de tampão RDD e o volume foi completado para 100 $\mu$ L com água livre de RNase, seguido de incubação por 10 minutos a 20-25°C, conforme o protocolo do fabricante. Em seguida, realizou-se a “limpeza” destes *pools* conforme o protocolo do RNeasy® Mini Kit (Qiagen). Após esta etapa, a quantidade total de RNA dos *pools* foi quantificada por espectrofotometria (NanoVue Spectrophotometer, GE Healthcare, EUA) e a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1,2% (Sigma, EUA) (Figura 5).

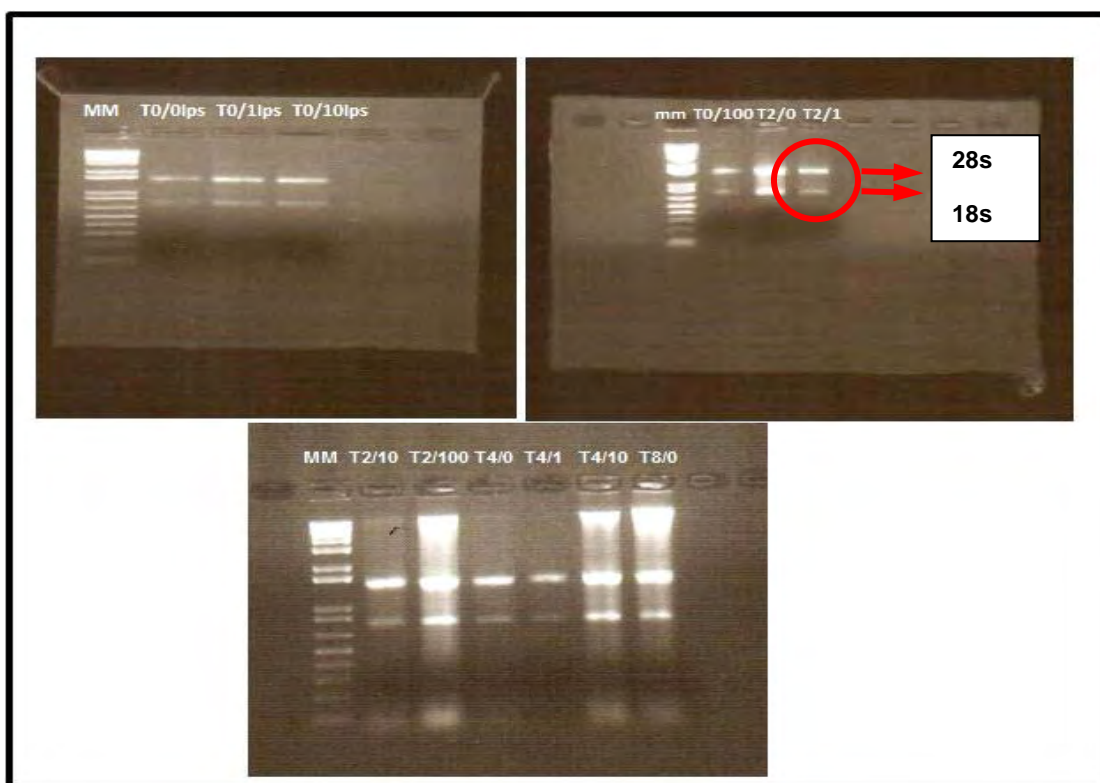


FIGURA 5 - Géis de agarose 1,2% feitos para checar a integridade do RNA após a limpeza dos *pools*. Na foto os T representam os momentos 0, 2 ou 4h enquanto o valor 0, 1 ou 10 representa o tratamento. A foto indica uma boa integridade das amostras, pois há uma boa visualização e separação das bandas 28s e 18s dos RNAs

## 2.5 Síntese, Transcrição e Marcação de cDNA

Antes da síntese foi feita a diluição das sequências de RNAs controles da reação, o One-Color RNA Spike In (Agilent, EUA), para amostras com 25ng de RNA. Com base nesta concentração inicial teve-se quatro diluições seriadas sendo que a ultima, que foi utilizada para o experimento, seguiu a proporção 1:4. Desta diluição foi adicionado 2  $\mu\text{L}$  às duplicatas das amostras previamente padronizadas para uma concentração de 34,5ng de RNA em um volume final de no máximo 1,5  $\mu\text{L}$  conforme recomendado pelo protocolo (Low Input Quick Amp Labeling, Agilent, EUA).

Em seguida, 1,8  $\mu\text{L}$  do T7 Promoter Primer mix foram adicionados à cada amostra (volume total de 5,3  $\mu\text{L}$ ), seguido de incubação a 65°C/10 minutos para incorporação do primer.

Ao termino da incubação foram adicionados 4,7 $\mu\text{L}$  do cDNA Master Mix (2  $\mu\text{L}$  de 5X First Strand Buffer; 1  $\mu\text{L}$  de DTT a 0,1M; 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP a 10 mM e 1,2  $\mu\text{L}$  AffinityScript RNase Block Mix) às duplicatas dos *pools*. As amostras (volume total de 10  $\mu\text{L}$ ) foram incubadas inicialmente a 40°C/2 horas e depois a 70°C/15 minutos para inativação da enzima AffinityScript RNase e então as amostras foram armazenadas a -8°C.

No dia seguinte, o processo de transcrição se seguiu e após o período de incubação, 6  $\mu\text{L}$  do Transcription Master Mix (0,75  $\mu\text{L}$  água livre de nuclease; 3,2  $\mu\text{L}$  do 5X tampão de transcrição; 0,6  $\mu\text{L}$  DTT a 0,1 M; 1  $\mu\text{L}$  de NTP; 0,21  $\mu\text{L}$  da T7 RNA Polymerase Blend e 0,24  $\mu\text{L}$  de cianina 3-CTP conforme o protocolo do fabricante (Low Input Quick Amp Labeling, Agilent, EUA), atingindo um volume final de 16  $\mu\text{L}$ /amostra, em duplicata. As amostras foram novamente incubadas a 40°C/2 horas.

## **2.6 Purificação e determinação do rendimento e especificidade das reações**

A purificação foi feita com a utilização das colunas do kit RNeasy mini spin (Qiagen, EUA). Brevemente, foram adicionados 84  $\mu\text{L}$  de água livre de nuclease, 350  $\mu\text{L}$  do tampão RLT e 250  $\mu\text{L}$  de etanol (96% a 100%) aos 16  $\mu\text{L}$  de cada amostra para atingir o volume final de 700  $\mu\text{L}$ . Cada amostra foi transferida para as colunas do RNeasy mini spin (Quiagen, EUA) e centrifugada a 13.000rpm durante 30 segundos a 4°C. Os filtrados foram descartados e 500  $\mu\text{L}$  do tampão RPE foram adicionados a cada filtro, repetindo-se o processo de centrifugação. As colunas foram transferidas para novos tubos para nova lavagem através da centrifugação a 13.000rpm por 60 segundos a 4°C. As colunas foram novamente transferidas para novos tubos de polipropileno (1,5mL), adicionando-se 30  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase à cada coluna, seguido de incubação por 60 segundos em temperatura ambiente e posterior centrifugação a 13.000rpm por 30 segundos a 4°C.

O cálculo para determinar se o rendimento e a especificidade da reação foi feito com os valores obtidos por espectrofotometria (NanoVue Spectrophotometer, GE Healthcare, EUA), conforme o protocolo do fabricante (Low Input Quick Amp Labeling, Agilent, EUA). Para que a hibridização das lâminas de vidro (espécie humana 4x44K v2, G2519F-266521 Agilent Technologies, EUA) fosse possível, esses valores deveriam ser de no mínimo 1,65  $\mu\text{g}$  de cRNA e 6 pmol Cy-3 por  $\mu\text{g}$  de cRNA, respectivamente.

## **2.7 Hibridização, lavagem e leitura das lâminas**

A etapa de hibridização foi realizada utilizando-se o volume máximo de 28  $\mu\text{L}$  de cada amostra purificada, segundo o protocolo do kit de hibridização (Agilent Hybridization Kit). Este volume foi estipulado, pois a maioria das amostras apresentou os valores mínimos para o rendimento e especificidade. A hibridização se deu com a adição de 11  $\mu\text{L}$  (10x) do agente bloqueador e 2,2  $\mu\text{L}$  do 25x do tampão de fragmentação às amostras, seguido de incubação a

65°C/30 minutos, após a qual foram adicionados 55 µL do 2x tampão de hibridização HI-RPM, atingindo-se o volume final de 110 µL para cada amostra, em duplicata.

Do volume final das amostras apenas 100 µL foi aplicado no acessório de vedação. Em seguida as lâminas foram sobrepostas a estes, como um sanduíche, e acopladas aos “arrays-gaskets”. Após a verificação do acoplamento e da formação da bolha na lâminas estas foram incubadas no forno de hibridização (Agilent Technologies, EUA) por 17 horas a 65°C a 10rpm.

Findado o período de incubação, as lâminas foram lavadas nos tampões de lavagem 1 e 2, sendo que este último estava a 37°C, e em seguida passaram pelas soluções de acetonitrila e de estabilização e secagem com o objetivo de acelerar o processo de secagem destas e evitar a formação de bolhas.

Até o momento da leitura, as lâminas permaneceram no escuro e na presença de sílica para evitar sua oxidação. A leitura delas foi realizada em scanner (G2565CA Microarray Scanner, Agilent Technologies, EUA) e as imagens foram analisadas com o uso do programa Scan Control Software versão 8,5. Os dados gerados pelo scanner foram tabulados e normalizados usando-se o valor do percentil 75 para cada gene conforme o protocolo do fabricante (Low Input Quick Amp Labeling).

A análise das vias metabólicas foi feita após a normalização dos dados e subsequente exportação destes para o programa Ingenuity® Pathways Software (IPA® Ingenuity Systems, [http://www.ingenuity.com/products/pathways\\_analysis – html](http://www.ingenuity.com/products/pathways_analysis.html)). Desta forma foi possível a análise e a comparação das principais vias metabólicas, nos diferentes momentos e concentrações de LPS, bem como realizar a busca pelos principais genes envolvidos no processo de indução à endotoxemia.

Com os dados gerados foi calculada a média das duplicatas hibridizadas nas lâminas. A partir destas foi possível anular o valor do tempo de incubação sobre a resposta normal na expressão gênica através da equação:  $D1/D0/T2/T0 = (Y2/Y0) / (X2/X0)$ , sendo que os valores Y2, Y0, X2 e X0 representam as médias já normalizadas e as doses são representadas pelo D0 (0 ng

LPS/mL) e D1 (1 ng LPS/mL) e os tempos por T0 (momento 0 hora) e T2 (momento 2 horas).

Os valores oriundos destas equações foram exportados para o programa Ingenuity Pathways Analysis (IPA<sup>®</sup>, Ingenuity Systems Inc., CA, USA) utilizando-se como ID o nome de cada gene e a análise foi filtrada com genes 30 vezes mais ou menos expressos, assim como genes relacionados às vias de sinalização como: TLR-4 e TLR-2 e às citocinas produzidas nestas cascatas tais como: IL-1, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (Figura 6).

The screenshot shows the IPA software interface with the following details:

- Filter:** TLR-2, TLR-4, IL1, IL10
- Navigation:** Summary, Functions, Canonical Pathways, Transcription Factors, Networks, Network Explorer, Overlapping Networks, Molecules, Lists, My Pathways
- Buttons:** VIEW NETWORKS, ADD TO MY PATHWAYS, ADD TO REFERENCE, MERGE NETWORKS, FUNCTIONS
- Message:** The filtering found 2 networks. To view a network, select the appropriate network(s) and click View Networks. To merge selected networks, click Merge Networks.

ID	Molecules in Network	Score	Focus Molecule	Top Functions
13	acetylcholine, $\uparrow$ ARHGDI1A, $\uparrow$ ARHGDI1B, $\uparrow$ BMP8A, $\uparrow$ CAMP (includes EG:12736), $\uparrow$ CD69*, $\downarrow$ CD86, $\uparrow$ CD80 (includes EG:12519), $\uparrow$ CKM, $\downarrow$ COP55, $\downarrow$ CTLA4*, $\downarrow$ CUL4B*, $\downarrow$ ELF2, $\uparrow$ FANCD2*, GUCY, $\uparrow$ IL5, $\downarrow$ IL1RAPL2, $\uparrow$ KLHL12*, $\downarrow$ KRT34*, $\uparrow$ LAMC2*, $\downarrow$ MAPK13*, $\uparrow$ MAPKAP1*, miR-146a-5p (and other miRNAs w/seed GAGAACU), $\uparrow$ MYOG, $\uparrow$ NUP50*, $\downarrow$ RAD50*, $\uparrow$ RNF114, $\downarrow$ RNF149*, $\downarrow$ RNF166, $\downarrow$ SLC16A3, $\downarrow$ TNF, $\uparrow$ TRIM36*, $\downarrow$ UBC*, $\downarrow$ UBE2H*, $\uparrow$ VMP1	14	10	Lymphoid Tissue Structure and Development, Cellular Function and Maintenance, Hematological System Development and Function
14	$\downarrow$ AQP4*, BCR (complex), $\uparrow$ BTLA, $\uparrow$ CHRNA1*, Gm-csf, Ifn, IFN Beta, Ifn gamma, Iga, IgG1, Igg3, IgG, IgG2a, Igm, IL1, $\uparrow$ IL8*, IL23, IL12 (complex), IL12 (family), Bbr, Immunoglobulin, Interferon alpha, $\uparrow$ LCK*, LDL, MHC Class II (complex), $\uparrow$ PCDH7, PI3K (complex), $\downarrow$ POLR3A, $\uparrow$ PPDP*, $\downarrow$ SLA2*, STAT5a/b, Tgf beta, $\uparrow$ TLR2*, Tlr, VAV	14	10	Cellular Function and Maintenance, Hematological System Development and Function, Inflammatory Response

FIGURA 6 - Representação da filtragem realizada na ferramenta de análise IPA<sup>®</sup> em busca dos receptores Toll-like 4 e Toll-like 2, assim como das citocinas IL-1; TNF- $\alpha$  que são as principais encontradas nas resposta aguda desencadeada pelo LPS

### III. RESULTADOS

Após a análise dos genes no IPA®, destacou-se a via de sinalização relacionada ao TLR-2 ao se comparar as concentrações de 10ng LPS/mL e 0ng LPS/mL entre os momentos 4 e 2 horas (Figura 7). As amostras tratadas com 1 ng LPS/mL (D1) não apresentou diferenças significativas quando comparadas ao controle (D0). Os principais genes desta via e suas respectivas funções estão descritos a seguir na Tabela 1.

Os genes e valores exponenciais de alguns dos genes representados nas vias, assim como suas funções, encontram-se descritos na Tabela 2.

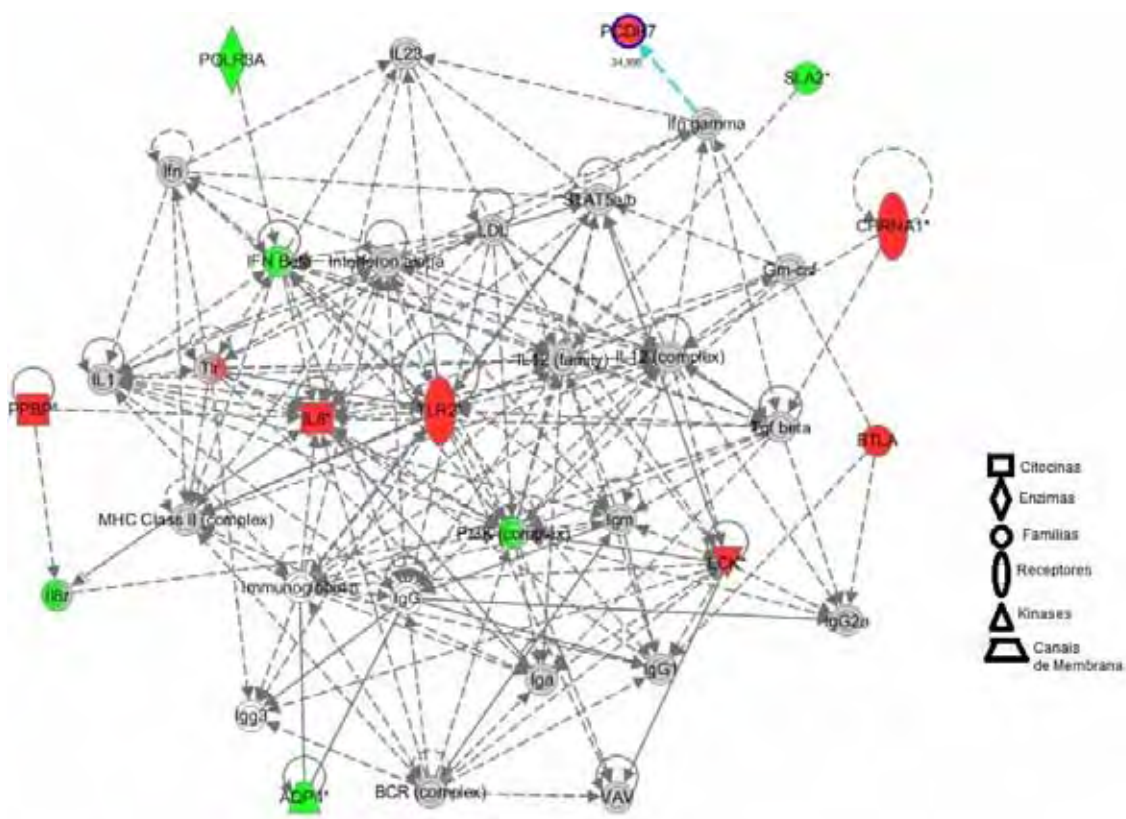


FIGURA 7 - Via de sinalização gerada pela ferramenta de análise IPA®. Representação da relação D10 ng LPS/mL e D0 ng LPS/mL entre os momentos 4 e 2. As moléculas verdes representam as 30x menos expressas enquanto as vermelhas 30x mais expressos

Tabela 1 - Principais genes encontrados na ferramenta de busca IPA<sup>®</sup> e suas principais funções biológicas

<b>Genes</b>	<b>Funções Biológicas</b>
<b>TLR-2</b>	Receptor de superfície celular; resposta celular ao lipopeptídeos bacteriano; resposta celular ao ácido lipoteicóico; resposta celular ao peptidoglicano; resposta celular ao triacyl lipopeptídeos bacteriano; transporte cloranfenicol; resposta de defesa a bactéria; reação de defesa contra bactéria Gram-positiva; detecção de lipopéptido triacil bacteriano; um dos responsáveis pela fosforilação da I-kappaB.
<b>IL-1</b>	Função semelhante à do TNF. Mediadora da resposta inflamatória do hospedeiro a infecções e outros estímulos. Age em conjunto com o TNF na imunidade natural e inflamação.
<b>IL-8</b>	Citocina pró-inflamatória. Apresenta resposta celular a estímulos de fator de crescimento de fibroblastos; resposta celular à interleucina-1; resposta celular ao lipopolisacarídeo; resposta celular ao fator de necrose tumoral e tem função quimiotática.
<b>IL-10</b>	Citocina anti-inflamatória sintetizada em grande quantidade em macrófagos. Pode estar relacionada com o estado de "tolerância à endotoxina". Inibe a produção de IL-12 e expressão de coestimuladores e moléculas MHC classe II.
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias gram-negativas e outros microrganismos infecciosos e é responsável por muitas das complicações sistêmicas de infecções graves.

Tabela 2 - Genes e valores exponenciais de alguns dos genes representados nas vias assim como suas funções. As setas vermelhas indicam os genes 30x mais expressos e as verdes os 30x menos expressos

<b>Genes das vias</b>	<b>Valores exponenciais (fold change)</b>	<b>Funções</b>
<b>SLA</b>	 2140,229	Desempenha papel de receptor proximal importante na regulação das respostas mediadas pelas células T e B e inibe a mobilização de cálcio do receptor induzido pelo antígeno
<b>PCDH7</b>	 34,895	Membro da família das caderinas. Associado á membrana glicoproteica que medeiam a adesão celule-celula cálcio dependente.
<b>CHRNA1</b>	 83197,837	Receptor de acetilcolina nos músculos.
<b>PI3K</b>	 997,918	Preoteína Kinase
<b>AQP4</b>	 142,400	Canais Seletivos de água presente nas membranas
<b>PPBP</b>	 56,44	Proteína básica das plaquetas . Precursor das proteínas granulares das plaquetas, da proteína basica das plaquetas(PBP) e ativador do tecido conjuntivo pepitidio III (CTAP3).
<b>BTLA</b>	 133,346	Atenuador da epressão dos linfócitos B e T.
<b>LCK</b>	 37,796	Envolvido na transdução do receptor de ativação mediada de células T.

#### IV. DISCUSSÃO

Com os dados gerados na leitura das lâminas e com as médias utilizadas nas análises detectou-se um aumento expressivo do TLR-2, assim como algumas citocinas e outras moléculas, na concentração de 10 ng LPS/mL do momento 4 em relação ao momento 2.

A endotoxemia associa-se a doenças com altas taxas de mortalidade em equinos (MORRIS; MOORE, 1989). Trata-se de um distúrbio sistêmico que se origina da resposta do hospedeiro a um componente da membrana celular das bactérias Gram-negativas (KUESIS; SPIER, 1998), sendo responsável por grandes perdas econômicas relacionadas aos custos com tratamento, possíveis complicações e morte (LOHMANN et al., 2003). Esse componente é o lipídio A, mais conhecido como lipopolissacarídeo sendo o componente bacteriano mais importante na fisiopatologia da endotoxemia (MOORE, 2001).

O LPS é reconhecido através dos receptores TLR-4 e TLR-2, uma vez que estes possuem estruturas responsáveis por mandar os sinais para a célula e desencadear a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (HAFENRICHTER, 1994).

Mesmo o TLR-2 não tendo a tamanha importância de reconhecimento ao LPS quanto o TLR-4, na pesquisa feita através da filtragem dos genes 30x mais ou menos expressos realizada no IPA<sup>®</sup> ele foi identificado como super-expresso em uma via. Isto pode ser justificado pela grande quantidade de outros componentes microbianos que ele é capaz de reconhecer, incluindo lipoproteínas, peptidoglicanos, ácido lipoteico e até mesmo uma porção diferente do LPS, uma vez que, o TLR-4 é o receptor responsável por reconhecer a principal porção do LPS, a porção A (KAWAI; AKIRA, 2009).

Nesta via encontrada também observou-se a expressão de outras moléculas, as quais estão relacionadas com processos inflamatórios. Destas, algumas chamam mais atenção seja por apresentarem uma expressão não esperada ou por serem pouco conhecidas.

## 4.1 TGF- $\beta$

O TGF- $\beta$  é um peptídeo multifuncional que controla a proliferação, diferenciação e outras funções em diferentes tipos celulares. A desregulação da sua ativação e da sinalização pode resultar em apoptose. Muitos tipos celulares sintetizam este peptídeo e quase todas possuem receptores específicos para ele (ZIDEK et al., 2009).

Alguns autores identificaram o TGF- $\beta$  como um fator que predispõe a uma produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias induzidas pelo LPS (CLARK; MOORE, 1989; TURNER et al., 1990), e ao choque endotoxêmico letal (MARIE et al., 1996) caracterizando um papel controverso dessa citocina.

Ele é sintetizado por diversos tipos celulares, incluindo células mononucleares, plaquetas e granulócitos, sendo comumente presente numa forma latente em amostras biológicas (TYLMAN et al., 2006). Como descrito anteriormente (CARRENHO, 2009), existem assim três hipóteses para não ter ocorrido a expressão do TGF- $\beta$  no presente modelo experimental: 1. a não ligação do TGF- $\beta$  aos receptores de membranas do tipo I e do tipo II, impedindo a sinalização intracelular mediada pelas proteínas SMADs e a transcrição de diferentes genes-alvos; ou 2. o estímulo de LPS em neutrófilos e monócitos resultaria em um aumento significativo da proteína TGF- $\beta$ , porém sem alterações na expressão do RNAm para TGF- $\beta$ , à semelhança da resposta em humanos (GROTENDORST et al., 1989), pois em muitos casos os níveis de mensagem do TGF- $\beta$  não correspondem à quantidade de proteína secretada, sugerindo uma regulação pós-transcricional e/ou pós-translacional da expressão do TGF- $\beta$  (KIM et al., 1992) ou ainda 3. o fato de ter sido utilizado um modelo *ex vivo* de sangue total, não houve influência do fígado na indução da expressão do TGF- $\beta$  durante a resposta de fase aguda, pois o fígado é a maior fonte de TGF- $\beta$  na endotoxemia (SHETH; BANKEY, 2001; SZABO et al., 2002). Porém tais estudos *in vitro* não consideraram a importância da origem hepática do TGF- $\beta$ , como demonstrado por Garcia-Lazaro (GARCIA-LAZARO et al., 2005) em camundongos transgênicos, cujos níveis hepáticos desta citocina apresentavam relevância após o estímulo de LPS.

Sendo assim, a ausência da expressão da citocina TGF- $\beta$  no presente modelo *ex vivo* em equinos não teria sido possível de ser detectada por não acarretar a ativação hepática durante a fase aguda da inflamação.

## 4.2 AQP4

A aquaporina-4 (AQP4) faz parte de uma família de canais seletivos de água nas membranas e são encontradas em animais, plantas e microorganismos. Elas são encontradas em grande quantidade no cérebro onde tem um papel importante na homeostase da água (AMIRY-MOGHADDAM et al., 2003; LENNON et al., 2005).

Sabe-se que outros tipos de aquaporina, como a aquaporina-1 (AQP1), também conhecida como chip e a primeira a ser conhecida como um canal de água, é naturalmente expressa em células vermelhas de mamíferos, túbulos renais proximais e outros epitélios permeáveis à água. Aquaporina-2 (AQP2) é o canal de água vasopressina regulado dos dutos coletores renais. Aquaporina-3 (AQP3) é o canal de água nas membranas basolaterais dos dutos medulares coletores e a AQP4 nas membranas basolaterais do epitélio (VERKMAN, 1998).

Como mencionado anteriormente a AQP4 é um canal de água encontrado em altas concentrações ao redor de vasos venosos no cérebro e está organizada em módulos elaborados chamados matrizes quadradas. A função natural da AQP4 e da matriz permanecem desconhecidas, mas sob condições fisiopatológicas, a AQP4 tem uma influência em edemas cerebrais, funções sinápticas e migração celular (OLIVA et al., 2010; STRAND et al., 2009). Também foi demonstrada uma rápida concentração destes canais no músculo esquelético de ratos (BORGMA et al., 1999; LU et al., 1996). Outros autores afirmam que suas proteínas também estão expressas abundantemente no rim de mamíferos, onde tem demonstrado um papel essencial no equilíbrio de fluidos e concentração urinária (VERKMAN, 1998). Isto ocorre justamente pelas Aquaporinas terem um papel fundamental na troca de água e homeostase osmolar, pois facilitam a passagem da água e de pequenos solutos através das membranas plasmáticas de tecidos epiteliais, endoteliais e

outros. Estes também acreditam que as proteínas AQPs dos rins de equinos são susceptíveis de estarem envolvidas na regulação aguda e crônica da composição do fluido corporal e podem estar implicadas no equilíbrio dos distúrbios de água gerados pela cólica e endotoxemia (PROUDMAN et al., 2007).

Devido estas proteínas serem ainda pouco conhecidas, e a presença destas neste modelo experimental é muito interessante e indica a necessidade de mais estudos a seu respeito. Foi possível verificar que a AQP-4 está regulada negativamente. O que pode ser justificado, pois, é possível que um alto coeficiente de permeabilidade torne a célula frágil, e desafios mecânicos durante a passagem desta pelos tecidos podem ser deletérios. Assim, apenas uma célula com coeficiente de permeabilidade limitado sobreviveria (BROWN et al., 2004).

### **4.3 PI3K**

Fosfatidilinositol 3-Kinase é composta por duas subunidades, uma de 85 kD e outra de 110 kD. A primeira não possui atividade PI3-kinase e atua como adaptador, enquanto que a outra subunidade é ativada pela proteína kinase (HILES et al., 1992).

Neutrófilos são geralmente os primeiros leucócitos que chegam às áreas de inflamação e injúria, onde liberam uma variedade de mediadores inflamatórios, que contribuem para a definição da resposta que se seguirá.

Os neutrófilos humanos produzem IL-8 em resposta ao estímulo com agonistas de TLRs, tais como LPS. Essa resposta é dependente da ativação de: PI3K (FUKUSUNO et al., 2010). Contudo, de acordo com nossos resultados, a produção de IL-8 pela via TLR2 é independente de PI3K.

Demonstrou-se que em neutrófilos expostos a estímulos fisiológicos (como LPS e TNF- $\alpha$ ), a inibição da via de sinalização PI3K prejudica a síntese e secreção da IL-8, MIP-1 $\alpha$ , e MIP-1 $\beta$ . (FORTIN et al., 2011). Contudo, foi demonstrado em outros trabalhos que houve um aumento significativo de mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) quando os neutrófilos de humanos tiveram a PI3k inibida (GUHA; MACKMAN, 2002; HIRSCH et al.,

2000; WRANN C.D. et al., 2007). Porém, nenhuma destas alterações foram evidenciadas. Na via TLR-2 do presente estudo observou-se uma baixa expressão da PI3K e, em contrapartida, uma expressão acentuada da IL-8. Já a expressão de citocinas como a IL-1 também não se mostrou alta, mesmo a PI3K estando com uma baixa expressão. Com isso vimos que a influencia da PI3K na via dos receptores Toll-like e da produção e liberação de mediadores inflamatórios esta pouco elucidada, tornando-se necessários estudos mais profundos.

#### **4.4 IL-8**

Foi demonstrado que os receptores TLR2 de células B tiveram um aumento em pacientes com doenças inflamatórias crônicas e que o receptor TLR-2 sintético, Pam3CSK4, induz a mesma secreção abundante de IL-8 de células B dos pacientes. Além disso, o TLR-2 é um potente estimulador de IL-8 produzida por células B se comparado com outros receptores (MCDONNELL et al., 2011). No presente modelo experimental também houve um aumento na expressão do TLR-2 e da IL-8, sugerindo que esse fenômeno pode se repetir em um modelo experimental de doença inflamatória aguda.

Outra possibilidade para esse justificar este resultado é o conceito de que o “cross-talk” entre os membros da família TLR pode definir a resposta imune. Ele surgiu a partir de estudos sobre células do sistema imunológico sentinela, especialmente em células dentríticas e macrófagos. TLR-2 e TLR-4 ativam as células através de uma via comum MyD88-dependente. TLR-4 também ativa a TRIF/viaTRAM em resposta a ligantes selecionados. O conceito de “cross-talk” explica porque, pelo menos em alguns casos, o TLR4 tem o mesmo resultado biológico como co-união de TLR2 e TLR4 (BEKEREDJIAN-DING et al., 2006; JAGANNATHAN et al., 2009; TRINCHIERI et al., 2007).

## V. CONCLUSÃO

Com base nos resultados gerados, a técnica de microarray não só permitiu avaliarmos a expressão gênica gerada pela endotoxemia como também ressaltou a importância da participação da via TLR2 no desenvolvimento da resposta inflamatória desencadeada pelo LPS na espécie equina. Também foi possível evidenciar o envolvimento de diversos genes que codificam proteínas ou moléculas, cuja participação no desenvolvimento da endotoxemia em equinos ainda é pouco conhecida, como a AQP4. A técnica de microarray também se mostrou eficiente na avaliação do modelo *ex vivo*, uma vez que os resultados obtidos foram de acordo com outros achados que utilizaram diferentes técnicas, como a citometria de fluxo. Sendo assim estudos futuros ajudarão a esclarecer se estas moléculas, como a AQP4, poderão se tornar o alvo de novos tratamentos e terapias em animais com quadros clínicos de endotoxemia.

## VI. REFERÊNCIAS

AKIRA, S.; YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochemical Society Transactions*, v.31, n.3, p. 637-642, 2003.

AMIRY-MOGHADDAM, M. et al. An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, p. 2106-2111, 2003.

ANDERSON, P. Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v.10, p.24-35, 2010.

BEKEREDJIAN-DING, I. et al. T cell-independent, TLR-induced IL-12p70 production in primary human monocytes. *Journal Immunology*, v. 176, p. 7438–7446, 2006.

BLEUTER, B.; POLTORAK, A. Review: The search for LPS: 1993-1998. *Journal of Endotoxin Research*, v.8, n. 5, p. 329-335, 2002.

BORGNIA, M; et al. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *The Annual Review of Biochemistry*, v. 68, p. 425–458, 1999.

BRANDL, K. et al. A designed TLR4/MD-2 complex to capture LPS. *Journal of Endotoxin Research*, v.11, n.4, p. 197-206, 2005.

BROWN, P-SD. et al. Membrane organization and function of M1 and M23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells. *American Journal Physiology Renal Physiology*, v. 287, p. F501-F511, 2004.

CAMPEBELL, R. C. et al. Endotoxina por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, em equinos: efeitos de antiinflamatórios nas concentrações sérica e peritoneal do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 4, p. 837-843, 2007.

CAMPO, G. M. et al. Purified human plasma glycosaminoglycans reduced NF- $\kappa$ B activation, pro-inflammatory cytokine production and apoptosis in LPS – treated chondrocytes. *Innate Immunity Research*, v. 14, n. 4, p. 233-246, 2008.

CARRENHO, L. C. A. Avaliação *ex vivo* da expressão de TLR-2 e TLR-4 em leucócitos de equinos e sua relação com a tolerância a endotoxina. 72f. Dissertação (mestrado) UNESP Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2009.

CAVAILLON, J-M et al. CD14/LPS receptor exhibits lectin-like properties. *Journal of Endotoxin Research*, v. 3, n. 6, p. 471-480, 1996.

CAVAILLON, J-M et al. Endotoxin Tolerance: is there a clinical relevance? *Journal of Endotoxin Research*. v. 9, n. 2, p. 101-107, 2003.

CLARK, E.S; MOORE JN. The effects of slow infusion of a low dosage of endotoxin in healthy horses. *Equine Veterinary Journal. Supl*, v. 7, p. 33-37, 1989.

CROSS, A.S. Invited Review: Endotoxin Tolerance – current concepts in historical perspective. *Journal of Endotoxin Research*, v. 8, n. 2, p. 83-98, 2002.

DOBROVOLSKAIA, M. A. et al. Induction of *In Vitro* Reprogramming by Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR 4 Agonist in Murine Macrophages: Effects of TLR “Homotolerance” Versus “Heterotolerance” on NF- $\kappa$ B Signaling Pathway Componentes. *The Journal of Immunology*, v. 170, n.3, p. 508-519, 2003.

FORTIN, C.F et al. A class IA PI3K controls inflammatory cytokine production in human neutrophils. *European Journal of Immunology*, v. 41, p. 1709–1719, 2011.

FOSTER, S.; MEDZHITOV, R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clinical Immunology*, v. 130, n. 1, p. 7-15, 2009.

FUKUSUNO, S. et al. Granulocyte colony-stimulating factor negatively regulates Toll-like receptor agonist-induced cytokine production in human neutrophils. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 495, p. 144–151, 2010.

GARCIA-LAZARO, J.F. et al. Hepatic over-expression of TGF-  $\beta$ 1 promotes LPS-induced inflammatory cytokine secretion by liver cells and endotoxemic shock. *Immunology Letters*, v. 101, n. 2, p. 217-222, 2005.

GUHA, M; Mackman, N. The Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway Limits Lipopolysaccharide. Activation of Signaling Pathways and Expression of Inflammatory Mediators in Human Monocytic Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 35, p. 32124–32132, 2002.

GROTENDORST, G.R; SMALE, G; PENCEV D. Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *Journal of Cell Physiology*, v. 140, p. 396-402, 1989.

HAFENRICHTER, D.G. The Kupffer cell in endotoxin tolerance: mechanisms of protection against lethal endotoxemia. *Shock*, p. 251-6, 1994.

HILES, I.D. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell*, v. 70, p. 419-429, 1992.

HIRSCH E. et al. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase \_ in inflammation. *Science*, v. 287, p. 1049–1053, 2000.

HIRSCHFELD, M. et al. Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infection and Immunity*, v.69, n.3, p.1477-1482, 2001.

JAGANNATHAN, M. et al. TLR Cross-Talk specifically regulates cytokine production by B cells from chronic inflammatory disease patients. *Journal Immunology*, v. 183, n. 11, p. 7461-7, 2009.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The Roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology*, v.21, n.4, p.317-337, 2009.

KENNY, E. F., et al. MyD88 Adaptor-like is not Essential for TLR-2 signaling and inhibits signaling by TLR-3. *The Journal of Immunology*, v. 183, p. 3642-3651, 2009.

KIM, S. J et al. Post-transcriptional regulation of the human transforming growth factor- $\beta$ 1 gene. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 13702-13707, 1992.

KUESIS, B.; SPIER, S.J. Endotoxemia. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. *Medicina interna equina*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 550-561, 1998.

LENNON, V. A. et al. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *Journal Experimental Medicine*, v. 202, p. 473-477, 2005.

LI, X; QIN, J. Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *Journal of Molecular Medicine*, v.83, p. 258-266, 2005.

LI, X.; JIAN, S.; TAPPING, R. I. Toll-like receptor signaling cell proliferation and survival. *Cytokine*, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2009.

LOCKETT, A.; GOEBL, M. G.; HARRINGTON, M. A. Transient membrane recruitment of IRAK-1 in response to LPS and IL-1  $\beta$  requires TNF R1. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, v. 295, n. 2, p. c313-323, 2008.

LOHMANN, K.L.; VANDENPLAS, M.; BARTON, M. et al. Lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* is an agonist in equine cells. *Journal Endotoxin Research*, v. 9, n. 1, p. 33-37, 2003.

LU, M. et al. The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, n. 93, p. 10908-12, 1996.

MACKAY, R. Endotoxemia. In: ROBINSON N.E. *Current Therapy in Equine Medicine*, Philadelphia: Saunders, p.225-323, 1992.

MARIE, C.; CAVAILLON, J.M; LOSSER, M.R. Elevated levels of circulating transforming growth factor-beta 1 in patients with the sepsis syndrome. *Annals of Internal Medicine*, v. 125, p. 520-521, 1996.

MCDONNELL, M. et al. Systemic toll-Like receptor ligands modify b-cell responses in human inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease*, v. 17, n. 1, p. 298-307, 2011.

MIYAKE, K. Invited review: Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research*, v.12, n.4, p.195-204, 2006.

MOORE, J. N. II: A perspective on endotoxemia. *AAEP Proceedings*, v. 47, p. 61-74, 2001.

MORRIS, D.D.; MORRE, J.N. The effect of immunity to core lipopolysaccharides (LPS) on the production of thromboxane and prostacyclin by equine peritoneal macrophages. *Cornell Veterinary*, v. 79, n. 3, p. 231-247, 1989.

MORRISON D.C. The Effects of Bacterial Endotoxins on Host Mediation Systems. *American Journal of pathology*; p. 527-601, 1978.

MORRISON, D.C.; DINARELLO, C.A. ; MUNFORD, R.S. et al. Current status of bacterial endotoxins. *American Society for Microbiology News*, v. 60, p. 479-484, 1994.

NOMURA, F.; AKASHI S.; SAKAO, Y. et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *Journal of Immunology*, v. 164, n. 7, p. 3476-3479, 2000.

OLIVA, R. et al. Electrostatics of aquaporin and aquaglyceroporin channels correlate with their transport selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 9, p. 4135–4140, 2010.

OZINSKY, A.; UNDERHILL, D. M.; FONTENOT, J.D. et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.97, p.13766-13771, 2000.

PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; O'NEILL, L. A. J. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptors - 4. *Journal of Immunology*, v. 113, p. 153-162, 2004.

PAIK, Y-H. et al., Toll-like Receptor 4 Mediates Inflammatory Signaling by Bacterial Lipopolysaccharide in human hepatic Stellate Cells. *Journal of Hepatology*, v. 37, n. 5, p. 1043-1055, 2003.

PROUDMAN, SL et al. Expression and nephron segment-specific distribution of major renal aquaporins (AQP1–4) in *Equus caballus*, the domestic horse. *American Journal Physiology*, v. 293, p. R492–R503, 2007.

SEYDEL, V. et al. The Generalized Entotoxic Principle. *Journal of Endotoxin Research*, v. 8, n. 3, p. 168, 2002.

SHETH, K.; BANKEY P. The liver as an immune organ. *Current Opinion in Critical Care*, v. 7, p. 99-104, 2001.

SILVERMAN, N.; MANIATIS, T. NF- $\kappa$ B signaling pathways in mammalian and insect immunity. *Genes and Development*, v. 15, n. 18, p. 2321-2342, 2001.

STRAND, L. et al. Roles of aquaporin-4 isoforms and amino acids in square array assembly. *Biochemistry*, v. 48 n. 25, p. 5785-93, 2009.

SZABO, G; ROMICS, L; FRENDEL, G. Liver in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Clinics Liver Disease*, v.6, p. 1045-1066, 2002.

TAKDEA, K. Evolution and integration of innate immune recognition systems: The Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research*, v.11, n.1, p. 51-55, 2005.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2005.

TAKEUHI, O.; AKIRA, S. Toll-like Receptors; Their physiological role and signal transduction system. *International Immunopharmacology*, v. 1, p. 625-635, 2001.

THOMAS, P. et al. Identification of two novel LPS-binding proteins in Kupffer cells: implications in TNF- $\alpha$  production. *Journal of Endotoxin Research*, v. 2, n. 6, p. 352-357, 2006.

TRINCHIERI, G. et al. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, p. 179–190, 2007.

TSAM, M. F.; GAO, B. Pathogen-associated molecular pattern contamination as perturbative endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research*, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2007.

TURNER M.; CHANTRY D.; FELDMANN M. Transforming growth factor beta induces the production of interleukin 6 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*, v. 2:211-216, 1990.

TYLMAN, M. et al. Release of PMN elastase, TGF- $\beta$ 1 and neopterin during blood storage; unfiltered versus filtered blood. *Transfusion Apheresis Science*, v. 35, p. 97-102, 2006.

VENKATARAMAN, C. et al. Bacterial lipopolysaccharide induced B cell activation is mediated via a phosphatidylinositol 3-kinase dependent signaling pathway. *Immunology Letters*, v. 69, p. 233–238, 1999.

VERKMAN, A. S. Role of aquaporin water channels in kidney and lung. *American Journal Medicine Science*, v. 316, n. 5, p. 310-20, 1998.

ZÍDEK Z; ANZENBACHER P; KMONÍCKOVÁ E. Current status and challenges of cytokine pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, v. 157, n. 3, p. 342-61, 2009.

WRANN, C. D. et al. The Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway Exerts Protective Effects during Sepsis by Controlling C5a-Mediated Activation of Innate Immune Functions, *The Journal of Immunology*, v. 178, p. 5940–5948, 2007.

WU, T-T.; CHEN, T-L.; CHEN, R-M. Lipopolisaccharide triggers macrophage activation of inflammatory cytokine expression, chemotaxis, phagocytosis, and oxidative ability via a Toll-like receptor 4 dependent pathway: Validated by RNA interference. *Journal of Toxicology Letters*, v. 8, n. 25, p. 1-8, 2009.

YAMAMOTO, M. et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4 – mediated MyD88 – independent signaling pathway. *Nature Immunology*, v. 4, n. 11, p. 1144-1150, 2003.

YANG, Q. et al. A dual negative regulation model of Toll-like receptor 4 signaling for endotoxin preconditioning in human endotoxemia. *Mathematical Biosciences*, v. 232, p. 151–163, 2011.