

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TOXINA DO BACILLUS ANTHRACIS REENGENHEIRADA, ATIVADA PELA UROQUINASE (UPA) E METALOPROTEINASES (MMPS) EM HEMANGIOSSARCOMA CANINO E CÉLULAS ENDOTELIAIS NORMAIS CANINAS IMPLANTADOS EM CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES

Leticia Huggler Ribeiro

Maria Lucia Zaidan Dagli

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade de São Paulo

leticiahuggler@usp.br

Objetivos

Avaliar os efeitos do tratamento com as toxinas reengenheiradas do *Bacillus anthracis* ativada pela uroquinase (uPA) e metaloproteinase (MMP) sobre células de hemangiossarcomas caninos implantados por meio da técnica do Hollow Fiber em camundongos atímicos BALB/c nu/nu.

Métodos e Procedimentos

Toxina reengenheirada do *Bacillus anthracis*; cultivo celular: utilizamos linhagens celulares de hemangiossarcoma canino: EMMA, FROG e SPAR e as células de melanoma canino CMGD2. Foi realizada uma padronização de imunocitoquímica nas linhagens de células EMMA e SPAR, onde foram testados diversos anticorpos. Foi realizado dois testes *in vitro* da toxina, o primeiro foi um Ensaio MTT, e o segundo um Ensaio Cristal Violeta. Posteriormente ao tratamento das células com as diferentes concentrações da toxina modificada, foi feita uma análise em relação ao controle com o teste estatístico ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Dunnett.

Resultados

Padronização da imunocitoquímica: foram testados marcadores para células endoteliais e outros marcadores relevantes.

Na imunocitoquímica, houveram algumas diferenças de reações positivas e negativas conforme o tipo de fixador utilizado nas células (álcool 70% e paraformaldeído 2%) e também entre as linhagens de células (EMMA e SPAR). No primeiro teste *in vitro* da toxina notamos que as células de hemangiossarcoma canino EMMA tiveram uma redução de crescimento em todas as doses da toxina. Na linhagem de melanoma canino CMGD2, que foi usada como um parâmetro pois se apresentou sensível em testes anteriores, somente a combinação de LF e PAL1/PAU2 foi capaz de reduzir o crescimento das células, de maneira dose-dependente. No segundo teste *in vitro* da toxina observamos que quando foi colocado somente o LF e também a associação de LF com PAL1/PAU2, em algumas concentrações houve diminuição do crescimento celular, porém em determinadas concentrações houve um aumento da viabilidade celular, o que não é desejado, pois espera-se que a associação cause a morte das células.

Conclusões

Na imunocitoquímica, as linhagens de células EMMA e SPAR tiveram reações positivas para anticorpos que são marcadores para células endoteliais, o que corrobora com o fato de que ambas as linhagens são de células endoteliais. A partir do primeiro teste *in vitro* da toxina, concluímos que a linhagem de hemangiossarcoma canino EMMA Brain possui

sensibilidade à toxina antraz e a partir do segundo teste in vitro da toxina, concluímos que a linhagem de hemangiossarcoma canino SPAR apresentou ação inibitória estatisticamente diferente em relação ao controle em determinadas concentrações da toxina antraz e em outras concentrações obtivemos um resultado não esperado de aumento da viabilidade celular.

Referências Bibliográficas

Cell Culture Basics Handbook. Invitrogen; GIBCO. p. 26 - 40. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-culture/cell-culture-learning-center/gibco-education.html?CID=flgibcoeducation>>. Acesso em 04, fev de 2020.

Laboratory of Jaime F. Modiano, VMD, PhD, University Minnesota, Twin Cities.

Kerafast. Canine Hemangiosarcoma Cell Line (DD-1). Disponível em: <<https://www.kerafast.com/item/1080/canine-hemangiosarcoma-cell-line-dd-1>>. Acesso em: 04, fev de 2020.

Evaluation of the effects of urokinase-activated (UPA) and metalloproteinases (MMPs) on canine hemangiosarcoma and normal canine endothelial cells implanted in immunodeficient mice

Leticia Huggler Ribeiro

Maria Lucia Zaidan Dagli

School of Veterinary Medicine and Animal Science/University of São Paulo

leticiahuggler@usp.br

Objectives

To evaluate the effects of treatment with urankinase (uPA) and metalloproteinase (MMP) activated Bacillus anthracis toxins on canine hemangiosarcoma cells implanted using the Hollow Fiber technique in athymic mice BALB/c nu/nu.

Materials and Methods

Bacillus anthracis reengineered toxin; Cell culture: we used canine HSA cell lines: EMMA, FROG and SPAR and the canine melanoma cells CMGD2. An immunocytochemistry standardization was performed in the EMMA and SPAR cell lines where several antibodies were tested; two in vitro tests of the toxin were performed, the first was an MTT Assay, and the second was a Violet Crystal Assay. Subsequent to the treatment of the cells with the various concentrations of the modified toxin, an analysis was made in relation to the control with the one-way ANOVA statistical test followed by the Dunnett post-test.

Results

Standardization of immunocytochemistry: Markers for endothelial cells and other relevant markers were tested. In immunocytochemistry, there were some differences in positive and negative reaction depending on the type of fixative used in the cells (alcohol 70% and paraformoldehyde 2%) and also between cell lines (EMMA and SPAR). In the first in vitro test of the toxin we noticed that the EMMA canine hemangiosarcoma cells had a growth reduction in all doses of the toxin. In the CMGD2 canine melanoma strain, which was used as a parameter because it was sensitive in previous tests, only the combination of LF and PAL1 / PAU2 was able to reduce cell growth in a dose-dependent

manner. In the second in vitro toxin test we saw that when only LF was placed and also in the association of LF with PAL1 / PAU2 in some concentrations there was a decrease in cell growth, but in certain concentrations there was an increase in cell viability, which is not desired, as it is expected that the association causes cell death.

Conclusions

In immunocytochemistry, EMMA and SPAR cell lines had positive reactions to antibodies that are markers for endothelial cells, which corroborates the fact that both strains are endothelial cells. From the first in vitro toxin test, we conclude that the canine hemangiosarcoma strain EMMA Brain has sensitivity to anthrax toxin and from the second in vitro toxin test, we conclude that the canine hemangiosarcoma strain SPAR showed a statistically different inhibitory action in relation to the control in certain concentrations of the anthrax toxin and in other concentrations we obtained an unexpected result of increased cell viability.

References

- Cell Culture Basics Handbook. Invitrogen; GIBCO. p. 26 - 40. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-culture/cell-culture-learning-center/gibco-education.html?CID=fl-gibcoeducation>>. Acesso em 04, fev de 2020.
- Laboratory of Jaime F. Modiano, VMD, PhD, University Minnesota, Twin Cities. Kerafast. Canine Hemangiosarcoma Cell Line (DD-1). Disponível em: <<https://www.kerafast.com/item/1080/canine-hemangiosarcoma-cell-line-dd-1>>. Acesso em: 04, fev de 2020.