

PARTICIPAÇÃO DA MORTE CELULAR INDUZIDA POR ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA NA RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO.

Breno Pazinato Antonio^{1*}, Érica Sernaglia², Aline Vieira², Marco Aurélio Ramirez Vinolo³

1. Estudante de IC do Laboratório de Imunoinflamação, Dept. Genética, UNICAMP.

2. Mestranda do Laboratório de Imunoinflamação, Dept. Genética, UNICAMP.

3. Orientador responsável pelo Laboratório de Imunoinflamação, Dept. Genética, UNICAMP.

Resumo:

Os neutrófilos são células essenciais na resposta imune a microrganismos. Bactérias podem modificar, direta ou indiretamente, o processo de morte de neutrófilos, podendo ser relevante para a resposta imune. Ao entrar em apoptose essas células são reconhecidas e fagocitadas por macrófagos (eferocitose), os quais por sua vez modificam o seu perfil de pró-inflamatório para anti-inflamatório. No presente projeto analisamos a relevância da indução de morte de neutrófilos por produtos do metabolismo bacteriano (os ácidos graxos de cadeia curta, AGCCs) no que diz respeito a capacidade de macrófagos fagocitarem neutrófilos (eferocitose) e sua resposta efetora incluindo produção de citocinas e killing de bactérias. Nossa hipótese é que a produção de AGCCs por bactérias patogênicas tem um papel relevante tanto no que diz respeito a ação do sistema imune quanto aos danos teciduais decorrentes da ativação desse sistema.

Autorização legal: Todos os procedimentos descritos neste projeto foram previamente submetidos ao Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia da Unicamp. Protocolo 3739-1

Palavras-chave: Neutrófilos; macrófagos; resposta imune.

Apoio financeiro: PIBIC / CNPq

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UNICAMP

Introdução:

Durante o início do processo inflamatório, os neutrófilos são recrutados para o tecido, o que envolve sua interação com moléculas de adesão presentes no endotélio e quimiocinas “apresentadas” pelas células endoteliais e dispersas na matriz extracelular (Kolaczowska and Kubes 2013). Uma vez no local da infecção, os neutrófilos exercem suas funções efetoras incluindo a fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, liberação do conteúdo de seus grânulos, liberação de armadilhas

extracelulares (NETs) e mediadores inflamatórios (derivados do ácido araquidônico e citocinas, principalmente), que atuam em conjunto tanto na destruição dos microrganismos como na amplificação da resposta imune (Mantovani, Cassatella et al. 2011).

O processo de morte de neutrófilos também pode ser induzido ou inibido por microrganismos incluindo bactérias, direta ou indiretamente, o que pode ser relevante para a resposta imune. Nesse sentido, já foi demonstrado que bactérias incluindo *Salmonella* spp e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* podem induzir a apoptose de neutrófilos e com isso evadir seus mecanismos efetores (Permpnich et al. 2006; Chiu et al. 1999).

A morte de neutrófilos por apoptose e sua remoção de modo íntegra, processo esse feito pelos fagócitos e denominado eferocitose, ajuda a limitar o dano tecidual (Vinolo, Rodrigues et al. 2011). Esse processo constitui importante mecanismo de promoção da resolução da inflamação por prevenir a exposição de componentes intracelulares visando manter a homeostase, além de constituir importante mecanismo de reparo e terminação da resposta inflamatória nos tecidos.

Ao fagocitar células apoptóticas, os macrófagos evitam extravasamento do conteúdo celular e conseqüentemente a produção e liberação de componentes pró-inflamatórios como TNF- α , IL-12 e IL-1 β . A produção de componentes anti-inflamatórios como IL-10, TGF- β e prostaglandina E2, também pode ser estimulada.

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), são gerados durante o processo de fermentação bacteriana.

Bactérias anaeróbias, dentre as quais *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Fusobacterium nucleatum*, as quais têm papel relevante no desenvolvimento de doenças periodontais e outros tipos de infecções, produzem grandes quantidades de AGCCs (Kurita-Ochiai, Fukushima et al. 1995; Hendrickson, Xia et al. 2009).

Os AGCCs atuam sobre diferentes tipos celulares envolvidos na resposta imune como neutrófilos (Vinolo, Hatanaka et al. 2009; Vinolo, Rodrigues et al. 2009; Vinolo, Ferguson et al. 2011; Vinolo, Rodrigues et al. 2011), linfócitos (Cavaglieri, Nishiyama et al. 2003) e macrófagos (Park, Woo et al. 2005; Park, Lee et al. 2007). As principais ações desses ácidos graxos na resposta imune/inflamatória incluem modulação negativa, em geral, da produção de mediadores inflamatórios. (Vinolo, Rodrigues et al. 2011). Além dessas ações dos AGCCs, sabe-se que eles também modulam a sobrevivência de determinados tipos celulares incluindo neutrófilos (Aoyama, Kotani et al. 2010; Vinolo, Rodrigues et al. 2011).

Considerando que os AGCCs, principalmente, butirato, são capazes de induzir apoptose em neutrófilos, nos propomos no presente projeto a analisar a relevância desse processo no que diz respeito a capacidade de macrófagos de fagocitarem neutrófilos em vias de morte (eferocitose) e sua resposta efetora incluindo produção de citocinas e killing de bactérias. Nossa hipótese é que a produção de AGCCs por bactérias patogênicas tem um papel relevante tanto no que diz respeito a ação do sistema imune quanto aos danos teciduais decorrentes da ativação desse sistema.

Metodologia:

Foram utilizados camundongos machos C57/Bl6 adultos obtidos junto ao CEMIB.

3.1 Obtenção das células. Neutrófilos foram obtidos por lavagem da cavidade peritoneal, já os macrófagos foram obtidos a partir de células tronco da medula óssea de camundongos utilizando meio condicionado de células L929, conforme descrito na literatura (Weischenfeldt and Porse 2008).

3.2 Cultivo de neutrófilos e análise de apoptose em neutrófilos. Neutrófilos foram incubados, em estufa, a 37°C, por 4 horas, na presença acetato nas concentrações de 10 e 25 mM ou butirato 1 ou 5 mM. Após esse período, as amostras foram lavadas e marcadas com anexina-V FITC, 7-AAD e Ly-6G-PE para análise da viabilidade celular e apoptose, através de citometria de fluxo.

3.3. Co-cultivo de macrófagos e neutrófilos e estimulação com bactérias. Na co-cultura de neutrófilos e macrófagos, neutrófilos foram pré-incubados na presença de AGCCs e adicionadas aos macrófagos na proporção 1:5 (macrófago: neutrófilo). Os macrófagos então foram incubados com as bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e com *Escherichia coli* (E. coli).

3.4. Quantificação de mediadores inflamatórios. Para a análise de mediadores inflamatórios utilizamos o sobrenadante de 24

horas de incubação dos macrófagos (descritos no item anterior) estimulados com Aa. Quantificação de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-6) por ELISA.

3.5. Expressão gênica de genes inflamatórios. A extração do RNA foi realizada através de tubos coletores com coluna, utilizando o kit PureLink RNA (Ambion) de acordo com as orientações do fabricante e a análise da quantidade de RNA e do grau de pureza das extrações foi realizado utilizando o aparelho Nanodrop. Para síntese do cDNA foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) através do MIX (RT buffer, DNTP, Randon Primer, enzimas e H₂O) de acordo com os procedimentos do fabricante. Por fim foi realizado o PCR (real time) das amostras para os genes β 2M, TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-6 utilizando o marcador Sybr green de acordo com os procedimentos do fabricante do kit Power SYBR Green PCR Master MIX (Applied Bi systems).

3.6. Análise de crescimento bacteriano após incubação. Para a análise de killing extracelular, fizemos a coleta do meio de cultura após 2 horas de incubação dos macrófagos com Aa ou E.coli, já no caso do killing intracelular, adicionamos PBS com 5% de saponina nas amostras (sem o meio de cultura, pois foi removido anteriormente) com o propósito de liberar o conteúdo intracelular. O material foi processado, diluído e plaqueado, para posterior contagem de unidades formadoras de colônias (CFUs). A capacidade microbicida dos macrófagos foi calculada considerando a contagem de CFUs em amostras incubadas na ausência de macrófagos e plaqueadas nas mesmas condições das amostras.

3.7. Teste de eferocitose in vivo. Foram utilizados camundongos C57/Bl6 que expressam a proteína fluorescente GFP, Os neutrófilos desses animais foram coletados. Após a contagem, o número de células foi ajustado, resultando em 4 microtubos por condição (presença ou ausência de butirato 5 mM). Os microtubos foram incubados durante 4 horas. Após este período, as células foram inoculadas na cavidade peritoneal de animais que já haviam recebido tioglicolato a 4%. Após 2 horas, foi realizada a coleta das células dos animais injetados pelo mesmo protocolo de lavagem intraperitoneal. Em seguida todo o material coletado de cada animal foi ressuspensionado e foi adicionado 1 μ L de anticorpo de bloqueio de Fc (anti-CD16) e em seguida 2,5 μ L de anticorpo anti-F4/80 APC. As amostras obtidas dos animais foram passadas em um cell sorter (BDFACS Aria™),

separando os macrófagos em quatro populações, macrófagos GFP positivos (eferocitose de neutrófilo GFP) ou macrófagos GFP negativos (ausência de eferocitose), na presença ou ausência de butirato. Após a separação, as quatro populações foram plaqueadas em duplicata, sendo uma estimulada com LPS e a outra não, gerando 8 diferentes condições. As células foram incubadas por 24 horas antes da retirada do sobrenadante, com o qual foi realizada a quantificação de mediadores inflamatórios por ELISA,

3.8 Análise estatística dos dados. Os resultados foram expressos como média + erro padrão da média. Comparações entre os diferentes grupos experimentais foram realizadas por análise de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de Dunnett e em alguns casos teste-t não pareado. Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças serão consideradas significativas para $p < 0,05$.

Resultados e Discussão:

Efeito dos AGCCs sobre a morte de neutrófilos. Foi adicionado ácidos graxos aos neutrófilos. Após análise por citometria de fluxo, verificamos que na presença do butirato (concentrações de 1 e 5 mM) a viabilidade das células foi significativamente reduzida. Esse tratamento desencadeou o processo apoptose em neutrófilos conforme evidenciado pelo aumento de células positivas para anexina, assim como de fragmentação de DNA.

Efeito da pré-incubação de neutrófilos com AGCCs sobre a eferocitose. Neutrófilos GFP+ foram incubados em placas de baixa adesão, tanto na presença quanto ausência de AGCCs, em seguida foram retirados da placa, e adicionados à placa contendo os macrófagos.

Esses macrófagos foram analisados por citometria de fluxo. Os neutrófilos pré-tratados com AGCCs por 4 horas não alteraram a eferocitose por macrófagos.

Efeito da pré-incubação de neutrófilos com AGCCs sobre a expressão de citocinas. A expressão do gene TNF- α por macrófagos incubados com neutrófilos é aumentada, porém, essa expressão diminui significativamente quando os neutrófilos são tratados previamente com butirato. Por outro lado, macrófagos incubados com neutrófilos mantiveram a expressão do gene IL-10, porém, ao tratar os neutrófilos com butirato 5 mM, houve um aumento significativo nessa expressão desse gene.

Efeito da pré-incubação de neutrófilos

com AGCCs sobre o killing de E.coli por macrófagos. Este experimento foi realizado com o intuito de analisar o efeito dos neutrófilos pré-incubados na presença ou ausência de AGCCs sobre a capacidade microbicida dos macrófagos. Não houve uma diferença significativa entre as 3 condições analisadas: macrófagos, macrófagos pré-incubados com neutrófilos e macrófagos pré-incubados com neutrófilos previamente tratados com butirato.

Sendo assim é possível afirmar que a presença de neutrófilos (tratados ou não com AGCCs), não interfere na capacidade microbicida dos macrófagos.

Conclusões:

De acordo com os resultados obtidos concluímos que a presença do butirato (concentrações de 1 e 5 mM) reduz significativamente a viabilidade de neutrófilos. Quando se trata da taxa de apoptose dos neutrófilos, nota-se um perfil dose dependente da concentração deste AGCC. Contudo, o pré-tratamento com butirato 5 mM não alterou a taxa de eferocitose in vitro ou in vivo nem a capacidade microbicida dos macrófagos. Com relação a expressão gênica, concluímos que o pré-tratamento com butirato 5 mM reduz a expressão de TNF- α e aumenta a de expressão de IL-10 nos macrófagos co-cultivados com os neutrófilos. Esse efeito também foi parcialmente observado nos experimentos realizados in vivo, nos quais os macrófagos que eferocitaram neutrófilos pré-tratados com butirato produziram maiores quantidades de IL-10 quando estimulados.

Considerando os achados até o momento temos que o butirato induz apoptose, mas apesar de não afetar a fagocitose de neutrófilos por macrófagos nem a capacidade microbicida dessas células, altera o seu padrão de produção de citocinas para um perfil mais anti-inflamatório. A relevância desse efeito será posteriormente investigada em modelos in vivo de infecção por bactérias.

Referências bibliográficas

- ABBAS, A. K. L., A.H.; PILLAI, S. (2012). IMUNOLOGIA CELULAR E MOLECULAR.
- Aoyama, M., J. Kotani, et al. (2010). "Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways." *Nutrition* 26(6): 653-661.
- Cavaglieri, C. R., A. Nishiyama, et al. (2003). "Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes." *Life Sci* 73(13): 1683-1690.
- Chiu, C. H., Ou, J. T. (1999). "Intracellular

- Salmonella typhimurium induce lysis of human polymorphonuclear leukocytes which is not associated with the Salmonella virulence plasmid. *Microbiol. Immunol.* 43, 9–14.
- Cook, S. I. and J. H. Sellin (1998). "Review article: short chain fatty acids in health and disease." *Aliment Pharmacol Ther* 12(6): 499-507.
- Fadok V. A., Voelker D. R., Campbell P. A., Cohen J. J., Bratton D. L., Henson P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148, 2207–2216.
- Genco, C. A., C. W. Cutler, et al. (1991). "A novel mouse model to study the virulence of and host response to Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis." *Infect Immun* 59(4): 1255-1263.
- Greenberg M. E., Sun M., Zhang R., Febbraio M., Silverstein R., Hazen S. L. (2006). Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 203, 2613–2625. 1084/jem.20060370.
- Hendrickson, E. L., Q. Xia, et al. (2009). "Pathway analysis for intracellular Porphyromonas gingivalis using a strain ATCC 33277 specific database." *BMC Microbiol* 9: 185.
- Kolaczowska, E. and P. Kubes (2013). "Neutrophil recruitment and function in health and inflammation." *Nature reviews. Immunology* 13(3): 159-175.
- Korns, D., S. C. Frasch, et al. (2011). "Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation." *Frontiers in immunology* 2: 57.
- Kurita-Ochiai, T., K. Fukushima, et al. (1995). "Volatile fatty acids, metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production." *J Dent Res* 74(7): 1367-1373.
- Mantovani, A., M. A. Cassatella, et al. (2011). "Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity." *Nature reviews. Immunology* 11(8): 519-531.
- Mydel, P., Y. Takahashi, et al. (2006). "Roles of the host oxidative immune response and bacterial antioxidant rubrerythrin during Porphyromonas gingivalis infection." *PLoS pathogens* 2(7): e76.
- Niederma, R., Y. Buyle-Bodin, et al. (1997). "Short-chain carboxylic acid concentration in human gingival crevicular fluid." *J Dent Res* 76(1): 575-579.
- Niederma, R., J. Zhang, et al. (1997). "Short-chain carboxylic-acid-stimulated, PMN-mediated gingival inflammation." *Crit Rev Oral Biol Med* 8(3): 269-290.
- Park, J. S., E. J. Lee, et al. (2007). "Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN-gamma-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NF-kappaB and ERK signaling pathways." *Int Immunopharmacol* 7(1): 70-77.
- Park, J. S., M. S. Woo, et al. (2005). "Repression of interferon-gamma-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression in microglia by sodium butyrate is mediated through specific inhibition of ERK signaling pathways." *J Neuroimmunol* 168(1-2): 56-64.
- Permpnich, P., Kowolik, M. J., Galli, D. M. (2006). "Resistance of fluorescent-labelled Actinobacillus actinomycetemcomitans strains to phagocytosis and killing by human neutrophils." *Cell. Microbiol.* 8, 72–84.
- Rotstein, O. D., T. L. Pruett, et al. (1985). "Lethal microbial synergism in intra-abdominal infections. Escherichia coli and Bacteroides fragilis." *Arch Surg* 120(2): 146-151.
- Topping, D. L. and P. M. Clifton (2001). "Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides." *Physiol Rev* 81(3): 1031-1064.
- Vinolo, M. A., G. J. Ferguson, et al. (2011). "SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor." *PloS one* 6(6): e21205.
- Vinolo, M. A., E. Hatanaka, et al. (2009). "Effects of short chain fatty acids on effector mechanisms of neutrophils." *Cell Biochem Funct* 27(1): 48-55.
- Vinolo, M. A., H. G. Rodrigues, et al. (2009). "Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites." *Clin Sci (Lond)* 117(9): 331-338.
- Vinolo, M. A., H. G. Rodrigues, et al. (2011). "Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils." *J Nutr Biochem* 22(9): 849-855.
- Vinolo, M. A., H. G. Rodrigues, et al. (2011). "Regulation of inflammation by short chain Fatty acids." *Nutrients* 3(10): 858-876.
- Weischenfeldt, J. and B. Porse (2008). "Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications." *CSH protocols* 2008: pdb prot5080.
- Zhang, J. (1996). *Gingival inflammation induced by food and short chain carboxylic acids (DMSc thesis)*. Harvard university.