

2.02.02 - Genética / Genética Molecular e de Microorganismos

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PENTRAXINA 3 E DOS MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS *IL1B* E *TNFA* EM RESPOSTA A LPS E TOXINA A DE *Clostridium difficile*

Flávia I. S. Oliveira^{1*}, Priscila F. Rodrigues², João Paulo S. Nunes², Adriana A. M. Dias³

1. Estudante de IC do Departamento de Biologia Geral – ICB, UFMG

2. Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral – ICB, UFMG / Doutorandos

3. ICB-UFMG - Laboratório de Genética Experimental, Departamento de Biologia Geral – ICB, UFMG / Orientadora

Resumo:

Entender os mecanismos fisiopatológicos da resposta imunológica na mucosa intestinal é crucial no desenvolvimento de terapias que minimizem as lesões intestinais decorrentes da inflamação neste tecido. A Pentraxina 3 (PTX3) é uma molécula com funções imunoreguladoras e inflamatórias cuja síntese aumentada foi detectada na ileíte causada pela Toxina A (TxA) da bactéria *Clostridium difficile*. Este trabalho visou caracterizar a expressão de *PTX3* e das citocinas *IL1B* e *TNFA* nas células epiteliais intestinais humanas DLD-1 em resposta ao LPS (agonista do TLR4) e à TxA. LPS (100ng/ml) leva ao aumento dos níveis de expressão de *IL1B* e *TNFA* (pico de expressão em 3h) e regula negativamente *PTX3*. Em resposta à TxA, há uma modulação positiva de *IL1B* (pico 1,5h após o tratamento), de *TNFA* (pico em 3h) e de *PTX3* que apresenta dois picos de expressão: 1,5h e 3h após o tratamento. Os nossos dados indicam que células epiteliais intestinais sintetizam *PTX3* em resposta a estímulos pro-inflamatórios.

Palavras-chave:

Pentraxina 3; Inflamação; Mucosa Intestinal.

Apoio financeiro: FAPEMIG, CAPES, PRPq/UFMG, CNPq.

Introdução:

As pentraxinas são uma família de proteínas evolutivamente conservadas com funções imunoreguladoras e inflamatórias importantes. Os membros da família compartilham uma porção C-terminal de aproximadamente 200 aminoácidos, dentro da qual encontra-se uma sequência amplamente conservada de 8 aminoácidos que é chamada de assinatura das pentraxinas¹.

De acordo com o tamanho da sequência de aminoácidos na porção N-terminal, essa superfamília de proteínas foi subdividida em dois grupos: pentraxinas longas e pentraxinas curtas. A pentraxina 3 (PTX3) é o protótipo das pentraxinas longas², com um domínio N-terminal único³, enquanto, as pentraxinas

curtas melhor caracterizadas são a proteína C-reativa (CRP) e a Soro-amilóide P (SAP), as principais proteínas de fase aguda em humanos e camundongos, respectivamente^{4,5}.

PTX3 foi identificada no início da década de 1990^{6,2} como uma molécula cuja produção é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNFA) e pela interleucina 1-beta (IL1B)⁶, além disso, sua produção também pode ser estimulada por agonistas dos receptores do tipo Toll (TLR) e várias moléculas microbianas, tais como lipopolissacarídeo (LPS) e componentes da parede celular de bactérias e fungos⁴. Diferentemente das pentraxinas curtas CRP e SAP, que são sintetizadas no fígado, PTX3 pode ser produzida diretamente nos sítios de inflamação por uma variedade de tipos de celulares⁷.

PTX3 atua na regulação da inflamação, porém, seus efeitos dependem da amplitude e origem da injúria. Recentemente, utilizando um modelo de colite causado pela injeção da Toxina A (TxA) de *Clostridium difficile* na alça ileal de camundongos, nosso grupo descreveu pela primeira vez a presença de Ptx3 no tecido intestinal⁸. *C. difficile* é uma bactéria Gram-positiva comensal do trato gastrointestinal responsável por afecções que vão desde diarreias, a colites pseudomembranosas. Entretanto, embora PTX3 tenha sido identificada no íleo, o tipo celular responsável por sua síntese, bem como seu papel tanto fisiológico quanto patológico neste tecido, ainda precisa ser estudado. O objetivo desse trabalho foi caracterizar a expressão de *PTX3* e dos mediadores pró-inflamatórios que induzem sua produção, *IL1B* e *TNFA*, em células epiteliais intestinais humanas em resposta a TxA de *C. difficile* e ao LPS, principal agonista de receptor do tipo Toll 4 (TLR4).

Metodologia:

Neste trabalho, foi utilizada a linhagem de

epitélio intestinal humano DLD-1 proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC) e estocada no Banco de Células do Laboratório de Genética Experimental (LGEX) do ICB/UFMG. A cultura celular foi subcultivada e criopreservada conforme recomendado pela ATCC.

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços em meio McCoy's 5A acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Penicilina/Estreptomicina e incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ até adesão completa (6 horas). Em seguida, o meio foi trocado por outro contendo apenas 0,5% SFB e as células foram privadas de SFB por 18 horas para sincronização do ciclo celular. O meio foi, então, substituído por um novo contendo 10% de SFB e LPS (100 ng/ml), TxA (10 ng/ml) ou somente meio (controle) e as células foram incubadas por 1h 30min, 3h, 6h, 12h ou 24h.

Em cada tempo de tratamento, a morfologia celular foi avaliada por microscopia óptica de contraste de fase (Quimis – Motic AE310, com câmera acoplada), e, em seguida, foi realizada a extração do RNA total das culturas, utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante.

A quantificação do RNA extraído foi feita por espectrofotometria no equipamento NanoDrop® (Thermo scientific) e a integridade avaliada por fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% e Brometo de Etídio 0,5µg/ml. Uma alíquota de 2 µg do RNA total foi reversamente transcrita utilizando o kit ImProm-II™ (Promega) e iniciadores oligo(dT)₂₀ (IDT).

O cDNA sintetizado foi usado como molde em reações de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) para avaliar a expressão dos genes *PTX3*, *IL1B* e *TNFA* utilizando iniciadores específicos. Como sistema de detecção, foi utilizado o fluoróforo SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e a plataforma ABI 7900HT Real Time PCR (Applied Biosystems). O cálculo da expressão gênica diferencial foi realizado segundo a fórmula de Pfaffl⁹ e utilizando o gene constitutivo *HPRT1* como normalizador.

As análises estatísticas foram realizadas usando o pacote estatístico Prism 6 (GraphPad). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos. O ensaio foi feito em triplicata técnica.

Resultados e Discussão:

O tratamento com TxA ou LPS não promoveu alterações morfológicas em DLD-1. O tratamento com LPS por 3 h aumentou de forma significativa a expressão de *TNFA* e *IL1B* ($p < 0,0001$), mas modulou negativamente a expressão de *PTX3* ($p < 0,01$). Os níveis de transcritos para *TNFA* permaneceram aumentados até 6h após o tratamento ($p < 0,01$) e os níveis basais foram restabelecidos 12 horas após o estímulo (figura 1).

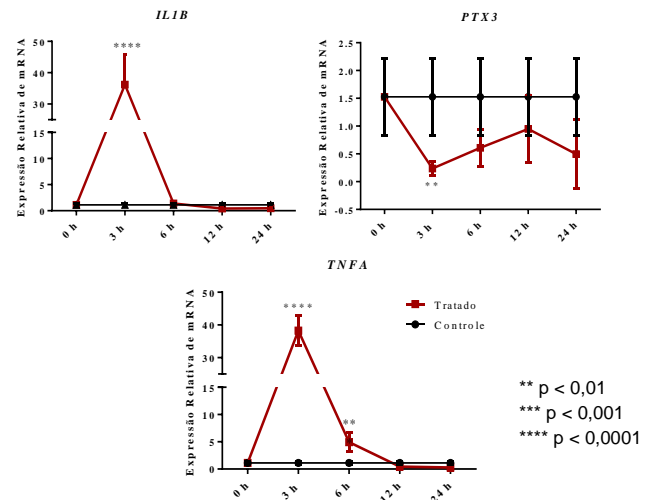


Figura 1: Perfil de expressão gênica de *IL1B*, *TNFA* e *PTX3* em resposta ao tratamento com LPS. Células da linhagem epitelial intestinal humana DLD-1 foram tratadas com LPS (100 ng/ml) por 1h30min, 3h, 6h, 12h e 24h. Em cada um dos tempos o RNA total foi extraído, reversamente transcrito e o cDNA usado como molde para análise da expressão dos genes *IL1B*, *TNFA* e *PTX3* por RT-qPCR.

Dados na literatura mostram que LPS é capaz de modular positivamente expressão de *PTX3* em fagócitos mononucleares humanos¹⁰ e em neutrófilos e monócitos derivados de macrófagos¹¹. Nas células de epitélio intestinal DLD-1, entretanto, observamos uma redução da expressão de *PTX3* em resposta a este estímulo. Ao contrário do que se observa nos locais estéreis do corpo, onde o reconhecimento de microrganismos inicia cascatas altamente inflamatórias, a abundância de microrganismos comensais simbióticos no intestino necessita que as células epiteliais intestinais mantenham uma resposta alterada¹². A proximidade desses sinais microbianos faz com que sejam necessários mecanismos especializados para manter a sinalização via Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR) alterada ou pouco responsiva a estímulos comensais^{13; 14}, tais como a presença de TLRs^{15; 16} e a expressão de reguladores negativos de sinalização pró-inflamatórios PRR dependentes^{13; 17; 18}. Devido a esses diferenciais das células epiteliais intestinais, é possível observar que elas são células menos sensíveis aos estímulos inflamatórios, o que poderia explicar o fato da expressão de *PTX3* apresentar-se diminuída significativamente no

tempo 3 h em nosso estudo, tendo em vista que PTX3 é uma importante proteína inflamatória. O tratamento com TxA de *C. difficile* aumenta significativamente a expressão de *IL1B* ($p < 0,01$), cujos transcritos apresentam um pico de expressão no tempo de 1h 30min ($p < 0,0001$), se mantêm elevados até o tempo de 3h, quando, então, começam a cair e em 6h retornam aos níveis basais. *TNFA* também é modulado positivamente pela TxA depois de 1h 30min de tratamento, mostrando um pico de expressão no tempo de 3 h ($p < 0,05$) e retornando, depois de 6h, aos níveis basais (Figura 2). A TxA regula positivamente a

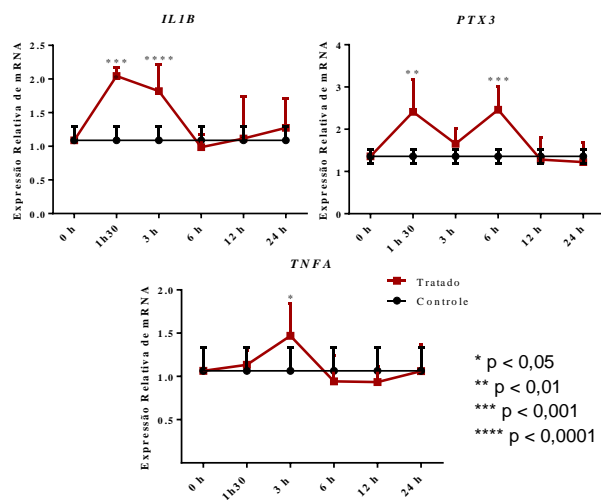


Figura 2: Expressão gênica de *IL1B*, *TNFA* e *PTX3* após o tratamento com TxA de *C. difficile* na linhagem epitelial intestinal humana DLD-1. Células da linhagem epitelial intestinal humana DLD-1 foram tratadas com TxA (10 ng/ml) por 1h30min, 3h, 6h, 12h e 24h, seguido pela extração do RNA total, e análise da expressão dos genes *IL1B*, *TNFA* e *PTX3* por RT-qPCR.

expressão de *PTX3* que apresenta dois picos de expressão: 1h 30min e 6h após o tratamento ($p < 0,001$). Já o segundo aumento de *PTX3* ocorre após a expressão de *TNFA*, o que pode indicar que *TNFA* está estimulando a produção de *PTX3*.

O mecanismo de ação da toxina A de *C. difficile* envolve a sua ligação a receptores de carboidratos na superfície celular¹⁹, diferentemente do mecanismo de ação de LPS, no qual ele é entregue por uma proteína especial de transferência de lípidos (proteína de ligação de LPS), a CD14 (*Cluster* de diferenciação 14), nas superfícies de células de mamíferos²⁰. Os diferentes mecanismos de ação celular dos estímulos utilizados podem explicar a diferente resposta na expressão de *PTX3*.

Conclusões:

Nossos dados indicam que as células epiteliais intestinais expressam a Pentraxina 3 e que esta expressão é modulada positivamente pela TxA

de *Clostridium difficile*. Entretanto, mais estudos são necessários para que se possa avaliar se a indução de *PTX3* por TxA ocorre de forma direta ou indiretamente, em resposta à citocinas pró-inflamatórias *IL1B* e *TNFA*.

Referências bibliográficas

- GARLANDA, C. et al. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 337-66, 2005. ISSN 0732-0582.
- BREVIARIO, F. et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. **J Biol Chem**, v. 267, n. 31, p. 22190-7, Nov 1992. ISSN 0021-9258.
- SEERY, L. T. et al. Identification of a novel member of the pentraxin family in *Xenopus laevis*. **Proc Biol Sci**, v. 253, n. 1338, p. 263-70, Sep 1993. ISSN 0962-8452.
- PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **J Clin Invest**, v. 111, n. 12, p. 1805-12, Jun 2003. ISSN 0021-9738.
- INFORZATO, A. et al. The angiogenic inhibitor long pentraxin *PTX3* forms an asymmetric octamer with two binding sites for *FGF2*. **J Biol Chem**, v. 285, n. 23, p. 17681-92, Jun 2010. ISSN 1083-351X.
- LEE, T. H. et al. Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts. **Mol Cell Biol**, v. 10, n. 5, p. 1982-8, May 1990. ISSN 0270-7306.
- VOURET-CRAVIARI, V. et al. Expression of a long pentraxin, *PTX3*, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan. **Infect Immun**, v. 65, n. 4, p. 1345-50, Apr 1997. ISSN 0019-9567.
- DE ARAÚJO JUNQUEIRA, A. F. et al. Adenosine deaminase inhibition prevents *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in mice. **Infect Immun**, v. 79, n. 2, p. 653-62, Feb 2011. ISSN 1098-5522.

- 9 PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol Lett**, v. 26, n. 6, p. 509-15, Mar 2004. ISSN 0141-5492.
- 10 ALLES, V. V. et al. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. **Blood**, v. 84, n. 10, p. 3483-93, Nov 1994. ISSN 0006-4971.
- 11 IMAMURA, M. et al. Lipopolysaccharide induced expression of pentraxin 3 in human neutrophils and monocyte-derived macrophages. **Cell Immunol**, v. 248, n. 2, p. 86-94, Aug 2007. ISSN 1090-2163.
- 12 PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 3, p. 141-53, Mar 2014. ISSN 1474-1741.
- 13 OTTE, J. M.; CARIO, E.; PODOLSKY, D. K. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 126, n. 4, p. 1054-70, Apr 2004. ISSN 0016-5085.
- 14 LOTZ, M. et al. Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. **J Exp Med**, v. 203, n. 4, p. 973-84, Apr 2006. ISSN 0022-1007.
- 15 BRANDL, K. et al. MyD88 signaling in nonhematopoietic cells protects mice against induced colitis by regulating specific EGF receptor ligands. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 46, p. 19967-72, Nov 2010. ISSN 1091-6490.
- 16 RAKOFF-NAHOUM, S. et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell**, v. 118, n. 2, p. 229-41, Jul 2004. ISSN 0092-8674.
- 17 CHASSIN, C. et al. miR-146a mediates protective innate immune tolerance in the neonate intestine. **Cell Host Microbe**, v. 8, n. 4, p. 358-68, Oct 2010. ISSN 1934-6069.
- 18 VEREECKE, L. et al. Enterocyte-specific A20 deficiency sensitizes to tumor necrosis factor-induced toxicity and experimental colitis. **J Exp Med**, v. 207, n. 7, p. 1513-23, Jul 2010. ISSN 1540-9538.
- 19 POTHOUKAKIS, C.; LAMONT, J. T. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 280, n. 2, p. G178-83, Feb 2001. ISSN 0193-1857.
- 20 ULEVITCH, R. J.; TOBIAS, P. S. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. **Curr Opin Immunol**, v. 11, n. 1, p. 19-22, Feb 1999. ISSN 0952-7915.