

## INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM MACRÓFAGOS MURINOS NA IMUNOSSENESCÊNCIA

Aldilane Lays Xavier Marques<sup>1\*</sup>, Karen Steponavicius Cruz Borbely<sup>2</sup>, Felipe Lima Porto<sup>3</sup>, Maria Clara Pitanga<sup>3</sup>, Salete Smaniotto<sup>2</sup>, Maria Danielma dos Santos Reis<sup>4</sup>.

1. Estudante de Ciências Biológicas - Bacharelado, do ICBS/UFAL

2. Pesquisadora do Laboratório de Biologia Celular – ICBS/UFAL

3. Estudante de Farmácia, da ESENFAR/UFAL

4. Pesquisadora do Laboratório de Biologia Celular – ICBS/UFAL (Orientadora)

### Resumo:

Muitas funções de macrófagos estão diminuídas durante o envelhecimento, tais como a fagocitose, migração mediada por quimiocinas e a produção de citocinas pró-inflamatórias. Além das alterações celulares, também já foi observado que os níveis plasmáticos de diversos hormônios estão reduzidos durante a senescência, dentre eles o hormônio do crescimento (GH), que além de suas funções clássicas no crescimento do organismo também é um potente imunomodulador. Diante desses argumentos, o presente trabalho teve como objetivo estudar *in vitro* os efeitos do hormônio do crescimento (GH) em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos velhos. Nossos resultados indicam que GH pode interferir na ativação de macrófagos idosos, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio, e na sua motilidade, agindo sobre a expressão de moléculas de matriz extracelular e na migração celular *in vitro*.

**Autorização legal:** Todos os procedimentos realizados durante o desenvolvimento deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFAL (Protocolos 67/2015; 47/2016).

**Palavras-chave:** Fagócitos; envelhecimento; neuroimunomodulação

**Apoio financeiro:** CNPq, FAPEAL

### Introdução:

O processo de imunossenescência inclui uma diminuição da resposta imune das células de defesa, dentre elas, os macrófagos (Agondi et al., 2012). Essa falha impede o organismo de responder de maneira eficiente à microrganismos patogênicos e às células malignas, podendo acarretar a morte do indivíduo. De fato, idosos apresentam uma alta incidência de infecções bacterianas nos pulmões, trato urinário, pele e mucosas, sendo estas infecções severas e propensas a causar óbitos (Plowden et al., 2004). Acredita-se que os sintomas das infecções sejam mais graves devido a uma falha na função das células do sistema imune inato, como macrófagos, que povoam os tecidos e são os primeiros a agir perante a um estímulo externo. Os macrófagos têm como principal função englobamento de partículas estranhas e microrganismos além da secreção de proteínas citotóxicas que auxiliam na erradicação de agentes patogênicos. Estudos anteriores demonstram que muitas funções dos macrófagos estão diminuídas durante o envelhecimento, dentre elas, a expressão de receptores do tipo Toll (TLR's), fagocitose, migração mediada por quimiocinas e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Plowden et al., 2004).

Também durante o envelhecimento ocorre uma diminuição nos níveis plasmáticos de diversos hormônios que são conhecidos por sua ação imunomoduladora, como por exemplo, o hormônio do crescimento (GH) (Lamberts et al., 1997). Assim, é possível acreditar que a redução dos níveis de GH durante o envelhecimento pode estar relacionada, direta ou indiretamente, com as alterações apresentadas por macrófagos durante a senescência. Sabe-se que o GH é importante para a atividade de macrófagos e monócitos e, recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que tanto o tratamento *in vitro* quanto o *in vivo* com GH podem modular a adesão e migração celular além da atividade fagocítica de macrófagos peritoneais residentes de camundongos jovens (Reis et al., 2018).

Com base nos argumentos acima expostos, o objetivo principal do projeto foi estudar a ação do GH em macrófagos durante o envelhecimento, analisando aspectos funcionais e moleculares que contribuam para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes na melhoria do sistema imunológico para o combate a infecções e malignidades que acometem a população em processo de envelhecimento.

### Metodologia:

Neste estudo, camundongos, machos e fêmeas, de 12 meses, da linhagem Swiss, provenientes do Biotério Central da UFAL foram utilizados para obtenção de macrófagos peritoneais a partir de lavagem da cavidade peritoneal. As células do lavado peritoneal foram cultivadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C para adesão dos macrófagos. Após adesão, as placas foram lavadas com PBS para retirada das células não aderentes e os macrófagos obtidos foram submetidos ao tratamento com 100 ng/mL de GH diluído em RPMI com 2% de soro fetal bovino (SBF). Células mantidas nas mesmas condições cultivadas na ausência de GH foram utilizadas como controles. Após tratamento, as células foram submetidas aos seguintes protocolos experimentais:

1. Avaliação da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) através do ensaio de redução do nitroazul de tetrazólio (em inglês Nitro-blue tetrazolium ou NBT).
2. Quantificação de citocinas utilizando método imuno enzimático empregando kits específicos para cada mediador seguindo instruções do protocolo do comerciante.
3. Avaliação da deposição de moléculas de matriz extracelular (MEC) por imunofluorescência em que as células foram incubadas com anticorpos primários específicos para fibronectina e para laminina, seguindo-se incubação com o anticorpo secundário adequado conjugado a fluorocromos. Análises quantitativas da deposição de fibronectina e laminina foram realizadas através do programa de computador Image J em que a marcação específica foi transformada em pixels e divididos pela área analisada para obtenção do número de pixels por  $\mu\text{m}^2$ .
4. Verificação da expressão de receptores integrina VLA-5 e VLA-6 por citometria de fluxo.
5. Ensaio de adesão celular em superfícies recobertas com moléculas da MEC.
6. Ensaio de migração celular in vitro utilizando o sistema transwell, com membranas de policarbonato com 10 mm de diâmetro, e poros de 8,0  $\mu\text{m}$ .
7. Ensaio de fagocitose com partículas de zimosan A (Sigma-Aldrich) após tratamento com GH.

Para as análises estatísticas dos dados obtidos e confecção dos gráficos foi utilizado o programa de computador GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Prism Software, Inc.). Os resultados foram representados como média e desvio padrão (DP), e avaliados estatisticamente através do teste não-paramétrico de Mann Whitney, para comparação de dois grupos, e o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de múltipla comparação de Dunn, ambos com um nível de significância selecionado para  $p < 0.05$ .

## Resultados e Discussão:

Foi observada uma redução significativa na produção de ERO nos macrófagos tratados com GH em comparação com os macrófagos não-tratados. Corroborando com esse dado, Keane e colaboradores (2015) demonstraram que o tratamento com o hormônio na concentração de 10  $\mu\text{g/L}$  reduziu a produção de ERO na matriz mitocondrial de células mononucleares do sangue periférico humano. Já na análise da produção de citocinas, foi verificado uma redução na produção da citocina IL-10 nos macrófagos tratados com GH em comparação com os macrófagos que não foram tratados, enquanto que a produção da citocina IL-6 manteve-se inalterada. No que se refere a atividade fagocítica, não foram encontradas diferenças significativas entre os macrófagos tratados com GH em comparação com as células sem tratamento. Dados anteriores do nosso grupo já haviam demonstrado que o tratamento in vitro com GH não altera a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de animais jovens (5-8 semanas) (Reis et al., 2018).

Também verificamos a deposição das moléculas da MEC, fibronectina e laminina, em que foi visto um aumento na deposição de fibronectina em células tratadas com GH, mas esse aumento não foi estatisticamente significativo. Interessantemente, macrófagos obtidos de animais de 12 meses não apresentaram marcação para a laminina, indicando assim que há um bloqueio na produção desta glicoproteína em macrófagos de camundongos idosos, e esse bloqueio não pode ser revertido pela ação do GH. Ao analisarmos os receptores integrina para essas moléculas de MEC não foi observada alteração na expressão de VLA-6, receptor para laminina, no entanto, observamos um aumento no percentual de macrófagos positivos para integrina VLA-5, receptor de fibronectina, no grupo tratado com GH em comparação com o grupo controle.

Diante das alterações observadas nas moléculas de MEC, buscamos avaliar a ação do GH na adesão e na migração in vitro dos macrófagos. Quando os macrófagos foram tratados com GH não foi observada alteração na adesão dessas à fibronectina e laminina quando comparamos com os respectivos controles sem tratamento. Quanto ao efeito do GH na migração de macrófagos dos animais de 12 meses, pode-se observar um aumento significativo no número de células migrantes nos grupos em que o GH na concentração de 100 ng/mL foi adicionado na porção inferior dos insertos transwell, sugerindo que o hormônio, nessas concentrações, pode agir como quimioatraente.

## Conclusões:

Neste estudo avaliamos a influência *in vitro* do GH em macrófagos peritoneais murinos durante o processo de imunosenescência. Com relação a ativação do macrófago, nossos resultados indicam que o GH pode interferir na produção de ERO e possui ação sobre a produção da citocina IL-10. Além disso, o hormônio mostrou influência sobre a produção de glicoproteínas da MEC, na expressão do receptor VLA-5 e pode ser quimioatraente de macrófagos velhos em ensaios de migração *in vitro*.

### Referências bibliográficas

Agondi RC, Rizzo LV, Kalil J, Barros MT. Imunosenescência. Rev. bras. alerg. Immunopatol 2012; 35(5):169-176.

dos Santos Reis MD, dos Santos YMO, de Menezes CA, Borbely KSC, Smaniotto S. Resident murine macrophage migration and phagocytosis are modulated by growth hormone. Cell Biol Int. 2018. doi: 10.1002/cbin.10939.

Keane J, Tajouri L, Gray B. The effect of recombinant human growth hormone and insulin-like growth factor-1 on the mitochondrial function and viability of peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. Appl Physiol Nutr Metab. 2015;40(2):105-15.

Lamberts SW, van den Beld AW, van der Lely AJ. The endocrinology of aging. Science. 1997;278(5337):419-24.

Plowden J1, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. Aging Cell. 2004;3(4):161-7.

Su HW, Lanning NJ, Morris DL, Argetsinger LS, Lumeng CN, Carter-Su C. Phosphorylation of the adaptor protein SH2B1 $\beta$  regulates its ability to enhance growth hormone-dependent macrophage motility. J Cell Sci. 2013;126(Pt 8):1733-43.