



# Mecanismos envolvidos no processo de ativação das células dendríticas e monócitos na anemia falciforme: Atividade da indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO)

**Palavras-Chave:** Anemia falciforme, Células dendríticas, Ativação imunológica

**Autores/as:**

**Pedro Henrique Cardoso Almeida – IB, Unicamp**

**Dra. Renata Sesti Costa (orientadora) – Hemocentro, Unicamp**

## INTRODUÇÃO:

A anemia falciforme (AF) é uma das hemoglobinopatias mais comum do mundo, as hemácias dos indivíduos afetados por ela mudam de conformação em condições de baixa oxigenação, adquirindo uma forma de foice. Essa alteração leva a liberação de DAMPs (damage-associated molecular patterns) na circulação, como o heme livre, devido a alta taxa de lise das hemácias afetadas. A presença dessas moléculas acarreta uma ativação constante dos receptores, como o Toll-like receptor 4 (TLR4) das células imunes desses indivíduos. Em resposta a ativação dos TLR4, as células imunes dos pacientes com AF produzem altas quantidades de citocinas pró-inflamatórias (BELCHER et al., 2014; KATO et al., 2018; Lanaro, C et al., 2009) e, de forma compensatória, elevados níveis de citocinas anti-inflamatórias (Alagbe et al., 2022). Mesmo com essa sinalização tolerogênica nos pacientes com AF, a presença de inflamação crônica neles indica uma incapacidade dos mecanismos de inibição da resposta imune de se adequar com a constante sinalização de dano associado à doença. Esse desbalanço imunológico é um dos fatores responsáveis pela resposta mal-adaptada a infecções encontradas nesses pacientes (Booth, C et al., 2010).

A célula dendrítica (DC) é um dos tipos celulares mais importantes na atuação e organização do sistema imune, um ponto de destaque dessas células é a formação de uma ponte entre a imunidade inata e a adaptativa, sendo capaz de polarizar essa resposta de forma dependente do estímulo encontrado. Foi demonstrado que a distribuição das subpopulações desta célula é afetada pela AF (Sesti-Costa et al., 2021), porém pouco é conhecido sobre como esse efeito afeta seu comportamento no corpo, e se existem outras mudanças na sua fisiologia celular em resposta à doença.

Um importante mediador do comportamento dessas células é a enzima IDO, responsável por iniciar a cadeia de degradação do aminoácido triptofano. Um dos metabólitos gerados nessa reação é a quinurenina (Kyn), que é secretada pelas DCs, em forma de ácido quinurênico. Esse metabólito ativa o receptor de hidrocarboneto arílico (AhR) em várias células-alvo, um fator de transcrição que ativa a expressão de genes associados à tolerância, como o próprio gene da IDO, e genes associados a metabolismo xenobiótico, como o citocromo P450 (CYP)1A1 e CYP1B1 (Denison MS, Nagy SR., 2003). Nas DCs, a IDO tem outro papel importante estimulando a expressão de citocinas anti-inflamatórias e de PD-L1, uma proteína que se liga a células-T, inibindo as efetoras e diferenciando as imaturas em células-T reguladoras, Treg (Salazar, F et al., 2017). Sua expressão é estimulada pela sinalização dos receptores TLR4, de citocinas inflamatórias, como a IFN- $\gamma$ , e de citocinas anti-inflamatórias, condições encontradas na AF.

Mesmo com a ativação de vários mecanismos tolerogênicos, a AF ainda é associada com uma inflamação crônica e sistêmica, evidenciando um desbalanço na atividade pró e anti-inflamatória nessa

doença. Dessa forma, neste projeto será investigada a expressão da IDO por células dendríticas e seus possíveis efeitos na AF.

## **METODOLOGIA:**

**Diferenciação de células dendríticas in vitro:** Para o isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), 20ml de sangue foi coletado de um doador saudável, o material coletado foi diluído em PBS e essa mistura foi então colocada sobre metade do volume de Ficoll. A mistura foi centrifugada a 1500 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente sem aceleração e sem desaceleração. As PBMCs separadas no buffy coat foram coletadas e lavadas duas vezes em PBS. Após as lavagens, as células foram contadas, usando azul de tripan e o contador automático LUNA II. Os monócitos foram separados das PBMCs usando anticorpos anti-CD14 conjugados a beads magnéticas (Myltenyi). Aproximadamente  $5 \cdot 10^5$  monócitos foram plaqueados em placas de 24 poços com 1 ml de meio RPMI completo, contendo 5% SFB, 1% de penicilina, estreptomina e L-Glutamina, e suplementado com 20ng/ml de GM-CSF e de IL-4, fatores necessários para a diferenciação das células dendríticas. As células foram então incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, após 3 dias de incubação, metade do meio foi substituído por meio novo contendo os fatores de diferenciação. Após 6 dias de cultura, momento em que as DCs já estavam completamente diferenciadas, as células foram estimuladas.

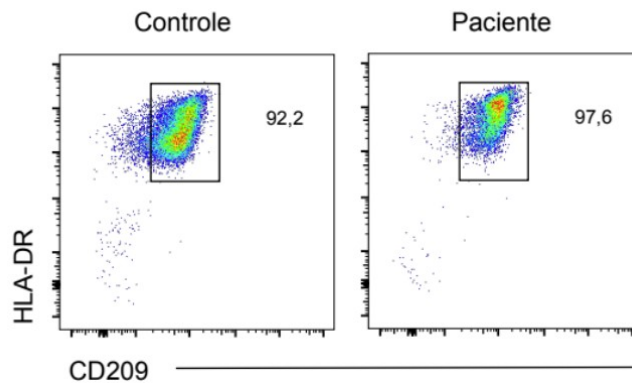
**Estimulação das DC com soro sanguíneo:** Em cada poço contendo células dendríticas, foi adicionado 500 µl de meio novo contendo 10% de um pool de soro sanguíneo obtidos de doadores saudáveis ou de indivíduos com AF, e as células foram incubadas por 12 e 24 horas, para avaliação da expressão gênica e da produção de proteínas, respectivamente. Após 12 horas de estímulo, as células foram ressuspensas em 350 µl de RLT com 1% de βME, congeladas a -80°C e posteriormente usadas para extração de RNA. Já as células estimuladas por 24 horas tiveram o sobrenadante coletado e congelado a -80°C para análise da produção de kynurenina, e as células foram ressuspensas em 1 ml PBS gelado, centrifugadas por 2 min a 7.000 RPM, em 15°C e o pellet foi ressuspensado em 50µl de PBS\BSA\ACD para fenotipagem das células por citometria de fluxo.

**Citometria de fluxo:** As células dendríticas foram incubadas no escuro a 4°C por 30 minutos com um mix contendo anticorpos anti-CD86, CD209, HLA-DR e PD-L1, conjugados com os fluoróforos BB515, Percp-Cy5, APC-Cy7 e PE-CF594, respectivamente, nas concentrações obtidas pela prévia titulação. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 2% formaldeído em PBS e mantidas no escuro a 4°C até a aquisição no citômetro de fluxo Cytotflex (Beckman Coulter). A estratégia de gates foi definida considerando inicialmente apenas células únicas com características morfológicas das células dendríticas, dentro dessas células foram consideradas apenas aquelas que tinham marcação positiva para CD209 e HLA-DR, marcadores de células dendríticas. Para determinar a ativação e maturação das células foi utilizada a média de intensidade de fluorescência (MIF) de CD86 e HLA-DR, já a MIF de PD-L1 foi usada para medir o comportamento inibitório das células. Foram adquiridas 10.000 células por amostra no citômetro e a análise foi realizada usando o software FlowJo da BD Biosciences.

**Extração de RNA e RT-qPCR:** A extração de RNA foi realizada com o kit RNeasy (50) mini kit, da empresa QIAGEN, conforme as instruções do fabricante. O RNA eluído foi quantificado usando o nanodrop e a síntese de cDNA foi feita utilizando-se o kit da Fermentas, também seguindo as instruções recomendadas, com incubação por 60 minutos a 42°C, seguido por 5 minutos a 70°C. Posteriormente, foram realizadas reações de RT-qPCR (*real time quantitative polymerase chain reaction*) para IDO, AhR e Cyp1a1, usando o master mix Sybr Green (Applied Biosystems) e o gene Gapdh como controle endógeno. A reação consistiu em uma etapa de desnaturação do DNA a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, adicionando-se uma curva de melting no final da reação. As análises foram feitas utilizando o cálculo do delta delta CT.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Após o isolamento e cultura dos monócitos na presença de GM-CSF e IL-4 por 7 dias, as células obtidas apresentaram a morfologia mais espalhada com a formação de dendritos quando visualizadas ao microscópio óptico (dados não mostrados) e se diferenciam em média 94,9% em células CD209 e HLA-DR positivas (Figura 1), que são características de DCs, demonstrando a eficiência da cultura. Para o restante das análises foi considerado apenas esse conjunto de células.

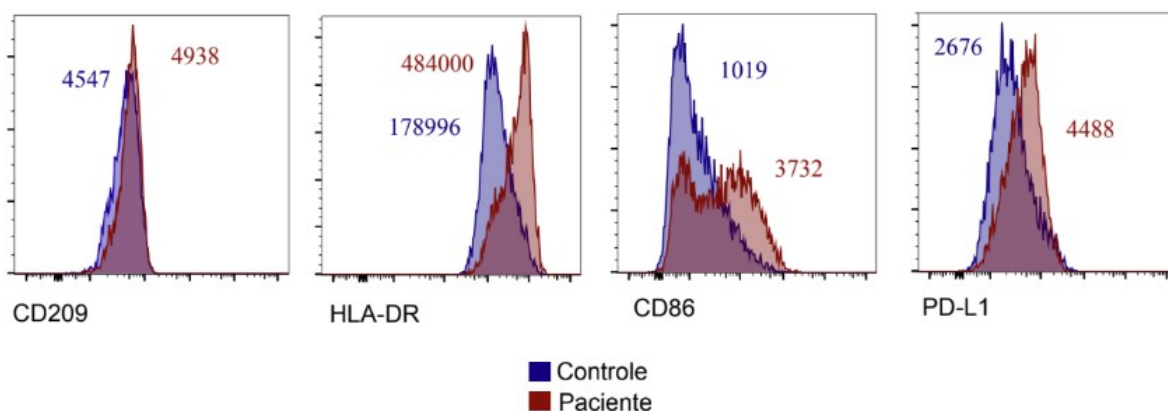


**Figura 1.** Dot plot representativo do conjunto de células HLA-DR e CD209 positivas incubadas com 10% de soro de pacientes com AF ou indivíduos controles.

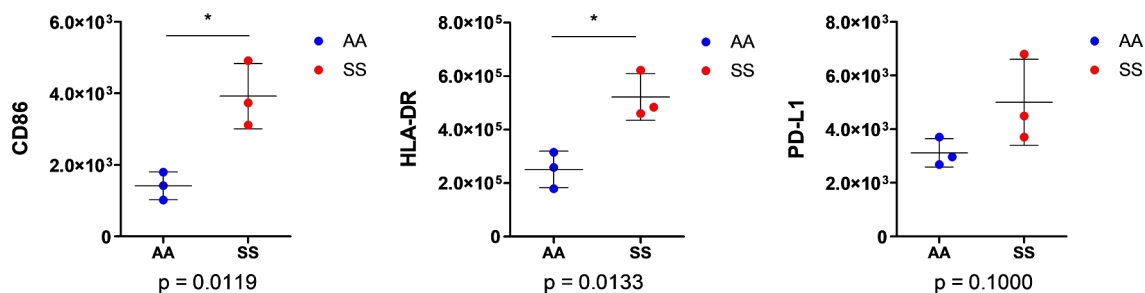
As DCs estimuladas com o soro de pacientes por 24 horas tiveram uma expressão significativamente maior de HLA-DR e de CD86 quando comparadas às células estimuladas com soro de doador saudável, indicando uma ativação maior dessas células em resposta aos DAMPs presentes nessas amostras. Além disso, pode-se também observar uma produção aumentada de PD-L1 nas DCs expostas ao soro de paciente, porém diferentemente da HLA-DR e CD86, a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 2). Embora não tenha tido poder estatístico, a tendência de aumento do PD-L1 sugere uma ativação de vias tolerogênicas das DCs em resposta ao soro de pacientes. Assim, investigamos a expressão deIDO e de genes downstream à sua ativação por RT-qPCR após 12h de incubação com o meio contendo o soro.

Como observado na figura 3, as DCs estimuladas *overnight*, pelo soro sanguíneo de pacientes, tiveram sua expressão, da enzima IDO, significativamente aumentada ( $p = 0.0076$ ), em relação àquelas estimuladas pelo soro de indivíduos sanguíneo controles, comprovando a hipótese de que DCs tolerogênicas são geradas no ambiente produzido pela anemia falciforme. Por outro lado não foi observado diferenças estatisticamente relevantes na expressão do gene CYP1A2 quando comparadas as incubações com os diferentes soros.

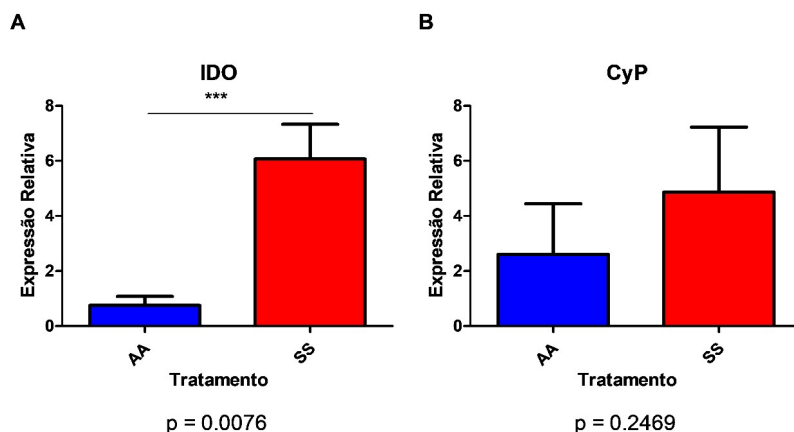
**A**



B



**Figura 2.** Média da intensidade de fluorescência (MIF) dos anticorpos anti-HLA-DR, CD86 e PD-L1, incubados com células dendríticas expostas a soro de pacientes com AF (SS) e doadores saudáveis (AA). (A) Histograma representativo e (B) média +SEM dos valores em triplicata.



**Figura 3:** Expressão relativa dos genes IDO (A) e CYP1A1 (B) nas células tratadas com soro de pacientes com AF (SS), e de soro controle (AA), após 12 horas de estímulo.

## CONCLUSÕES:

A partir dos resultados preliminares obtidos nesse estudo, é possível observar que fatores presentes no soro de pacientes falciformes são capazes de ativar as DCs e, ao mesmo tempo, de induzir uma resposta tolerogênica dessas células. A expressão de IDO está correlacionada com a expressão de PD-L1 pelas DCs estimuladas com o soro de pacientes, porém ainda é preciso mais estudos para se estabelecer uma relação de causalidade entre esses fatores.

## BIBLIOGRAFIA

Sesti-Costa, R., Borges, M. D., Lanaro, C., Albuquerque, D. M. de, Saad, S. T. O., & Costa, F. F. (2021). Inflammatory Dendritic Cells Contribute to Regulate the Immune Response in Sickle Cell Disease. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.617962>

Lanaro, C., Franco-Penteado, C. F., Albuquerque, D. M., Saad, S. T. O., Conran, N., & Costa, F. F. (2009). Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(2), 235–242. <https://doi.org/10.1189/jlb.0708445>

Alagbe, A. E., Domingos, I. F., Adekile, A. D., Blotta, M. H. S. L., & Santos, M. N. N. (2022). Anti-inflammatory cytokines in sickle cell disease. *Molecular Biology Reports*, 49(3), 2433–2442. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-07009-1>

Booth, C., Inusa, B., & Obaro, S. K. (2010). Infection in sickle cell disease: A review. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(1), e2–e12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.03.010>

Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:309-334. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828

Salazar, F., Awuah, D., Negm, O. et al. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase-aryl hydrocarbon receptor pathway in the TLR4-induced tolerogenic phenotype in human DCs. *Sci Rep* 7, 43337 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep43337>