AVALIAÇÃO DA REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA DE NEUTRÓFILOS ATIVADOS PELA MOLÉCULA HEME

Palavras-Chave: NEUTRÓFILOS, REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA, IMUNOMETABOLISMO

Autores(as):

Priscila dos Santos Gomes, Universidade São Francisco – USF

Flávia Costa Leonardo – Hemocentro, UNICAMP

Érica Azevedo – Hemocentro, UNICAMP

Lucas Gushiken – Hemocentro, UNICAMP

Profª. Drª. Nicola Conran, Hemocentro – Hemocentro, UNICAMP

Prof. Dr. Fernando F. Costa – Hemocentro, UNICAMP

Drª Pamela Brito, Hemocentro – Hemocentro, UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A Anemia Falciforme (AF) é uma doença hereditária causada pela substituição de uma adenina por timina no códon 6 do gene da globina β, resultando na produção da hemoglobina anormal HbS. A polimerização da HbS em condições de hipóxia faz com que os eritrócitos assumam formato de foice. Devido à falcização recorrente, as hemácias tornam-se frágeis e sofrem danos na membrana, o que causa a sua remoção prematura da circulação (hemólise extravascular), ou ainda podendo romper-se no interior dos vasos (hemólise intravascular). Na hemólise intravascular, hemoglobina e heme livre causam a ativação de plaquetas e leucócitos, elevando a produção de citocinas inflamatórias como IL-1β, e a expressão de moléculas de adesão leucocitária MAC-1 e endotelial ICAM-1 e E-selectina, favorecendo o recrutamento de neutrófilos no vaso sanguíneo [1,2].

Os neutrófilos são os leucócitos que compõem a primeira linha de defesa do sistema imunológico na resposta inflamatória. Os PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos), como o lipopolissacarídeo (LPS), presentes em infecções, e as DAMPs (Padrões Moleculares Associados ao Dano), como ATP e heme, originados por lesões estéreis, participam na ativação destas células. Em doenças inflamatórias crônicas, como AF, aterosclerose e artrite reumatoide, os neutrófilos são continuamente recrutados ao local da inflamação, contribuindo para sua progressão por meio da geração rápida de espécies reativas de oxigênio (ROS), liberação de proteases e formação de armadilhas extracelulares (NETs) [3,4].

Na AF, os neutrófilos de pacientes apresentam um fenótipo ativado, liberando ROS e NETs que amplificam a ativação de leucócitos e células endoteliais, aumentando a produção de mediadores inflamatórios como TNF-α, proteína C reativa, M-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-8 e IL-6, que somado a baixa biodisponibilidade de óxido nítrico, resulta em disfunção endotelial. Na microvasculatura, esses eventos favorecem a agregação de hemácias falcizadas, e o recrutamento de plaquetas e leucócitos, que associada à vasoconstrição, resultam em vaso-oclusão, diminuição do fluxo sanguíneo, hipóxia, resposta inflamatória e lesão tecidual nesses pacientes [1,5,6,7].

Imunometabolismo refere-se ao conjunto de processos metabólicos das células do sistema imunológico, fundamentais para sua ativação, proliferação e eficiência na resposta imune. O

metabolismo dessas células é altamente especializado, adaptando-se às demandas do microambiente por meio da reprogramação metabólica [8]. Eventos como a hipóxia, característica na AF, causam nos neutrófilos a ativação do fator de transcrição HIF-1α, que promove a mudança do metabolismo da fosforilação oxidativa mitocondrial (oXPHOS) para a glicólise, garantindo a produção de energia. Esse efeito é semelhante ao observado em células cancerígenas e em doenças autoimunes como a artrite reumatoide [9,10]. Essa adaptação aumenta a produção de lactato e reduz a atividade do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e da oxidação de ácidos graxos (FAO), processos associados à mobilização de leucócitos e amplificação da inflamação [8]. Assim, a interação entre estímulos inflamatórios e metabolismo celular não apenas garante o funcionamento do sistema imune, mas também pode intensificar a resposta inflamatória [11,12,13].

OBJETIVOS:

Este projeto propõe avaliar os efeitos de moléculas inflamatórias, que são elevadas nas doenças hemolíticas, como a AF, nas vias metabólicas de neutrófilos.

Objetivos específicos:

1) Avaliar os efeitos da molécula heme (molécula liberada pela hemólise intravascular) na modulação da via glicolítica e intermediados do ciclo do ácido tricarboxílico em neutrófilos;

2) Avaliar os efeitos da IL-1β (citocina pró-inflamatória) na modulação da via glicolítica e intermediados do ciclo do ácido tricarboxílico de neutrófilos;

3) Avaliar os efeitos da molécula LPS (controle positivo de processo inflamatório) na modulação da via glicolítica e intermediados do ciclo do ácido tricarboxílico de neutrófilos.

MÉTODOS:

Aspectos éticos da pesquisa e sujeitos: este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP, CAAE 84501924.2.0000.5404 e todos os participantes serão incluídos no estudo mediante termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) datado e assinado. Os indivíduos não devem ter sido diagnosticados com doenças inflamatórias aguda ou crônica, ou com hemoglobinopatias ou doenças hemolíticas (sadios), feminino e masculino, com idades entre 18-65 anos. Também não devem feito uso de antibióticos, antilipêmicos ou anti-inflamatórios nas últimas 3 semanas. Estes indivíduos serão recrutados do quadro de funcionários e alunos do Hemocentro, bem como indivíduos já doadores do Hemocentro da Unicamp, de forma voluntária.

Separação dos neutrófilos das amostras de sangue periférico e tratamentos: serão coletados 6-12 mL de sangue, em três tubos contendo citrato de sódio (3,2%), de indivíduos saudáveis (HbAA; n=30 total). Os granulócitos serão isolados por gradiente de densidade Ficoll (1.077 g/mL e 1.090 g/mL), seguido de centrifugação a 700 g por 30 minutos. A camada de granulócitos será coletada e ressuspendida em RPMI para contagem de células viáveis e ajuste da concentração. Para a estimulação inflamatória, as células concentração celular $2x10^6$ neutrófilos/mL, serão incubadas com: (i) RPMI (150 µl) como condição basal; (ii) Heme [50 µM]; (iii) IL-1β [10 ng/mL]; (iv) LPS [1 µg/mL] a 37°C por 1 hora.

Ensaio de captação de glicose: os neutrófilos serão incubados com a sonda 2-NBDG (2-(N(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl)amino)-2-deoxyglucose, que é um fluoróforo que mede a captação de glicose; Sigma) por 30 minutos a 37ºC. A análise de citometria de fluxo convencional será empregada para avaliar parâmetros de fluorescência.

Análise de oxidação de ácidos graxos: após incubação com anticorpo CD66b, as células serão incubadas com paraformaldeído 4% para fixação e em seguida permeabilizadas com 0,1% de triton x100. Em seguida, serão incubadas com solução de anticorpos primários anti-ACADM (Acyl-CoA dehidrogenase cadeia média), anti-ACADV (Acyl-CoA dehidrogenase cadeia longa) e anti-HADHA (Hydroxyacyl-CoA dehidrogenase). Após incubação com anticorpos secundários anti-mouse IgG1-FITC, as células serão novamente lavadas para aquisição em citômetro de fluxo.

Avaliação da geração de Espécies Reativas de Oxigênio mitocondrial: após estimulação, as células serão incubadas com a sonda MitoSox Red (50 nM; Invitrogen) e posteriormente processadas para aquisição em citômetro de fluxo.

Citometria de Fluxo: os granulócitos serão incubados com o anticorpo anti-CD66b para imunofenotipagem de neutrófilos. A população de neutrófilos viáveis será identificada pela expressão positiva para CD66b e negativas para 7AAD. Serão adquiridos no mínimo 10.000 eventos por amostra no citômetro de fluxo FACS-Calibur (BD). As análises serão realizadas no software *FlowJo* (BD).

Avaliação do metabolismo do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA): após estimulação, as células serão lisadas e o extrato celular será utilizado para a quantificação de α-cetoglutarato, um metabólito intermediário do TCA. Para isso será utilizado o kit colorimétrico (Cayman no. 701350). Brevemente, após a lise, o extrato celular será coletado e adicionado ácido perclórico a 4% do volume total obtido de sobrenadante. As amostras serão misturadas vigorosamente em vortex e em seguida será adicionado às amostras um volume correspondente a 34% do volume de sobrenadante de hidróxido de potássio. Após ajuste de pH 6,5 – 8,0, o sobrenadante será coletado para quantificação de α-cetoglurato.

Quantificação de L-lactato: o lisado dos neutrófilos será utilizado para a quantificação de L-lactato utilizando o kit comercial da Abcam (ab65331), seguindo as instruções do fabricante.

DESENHO EXPERIMENTAL:

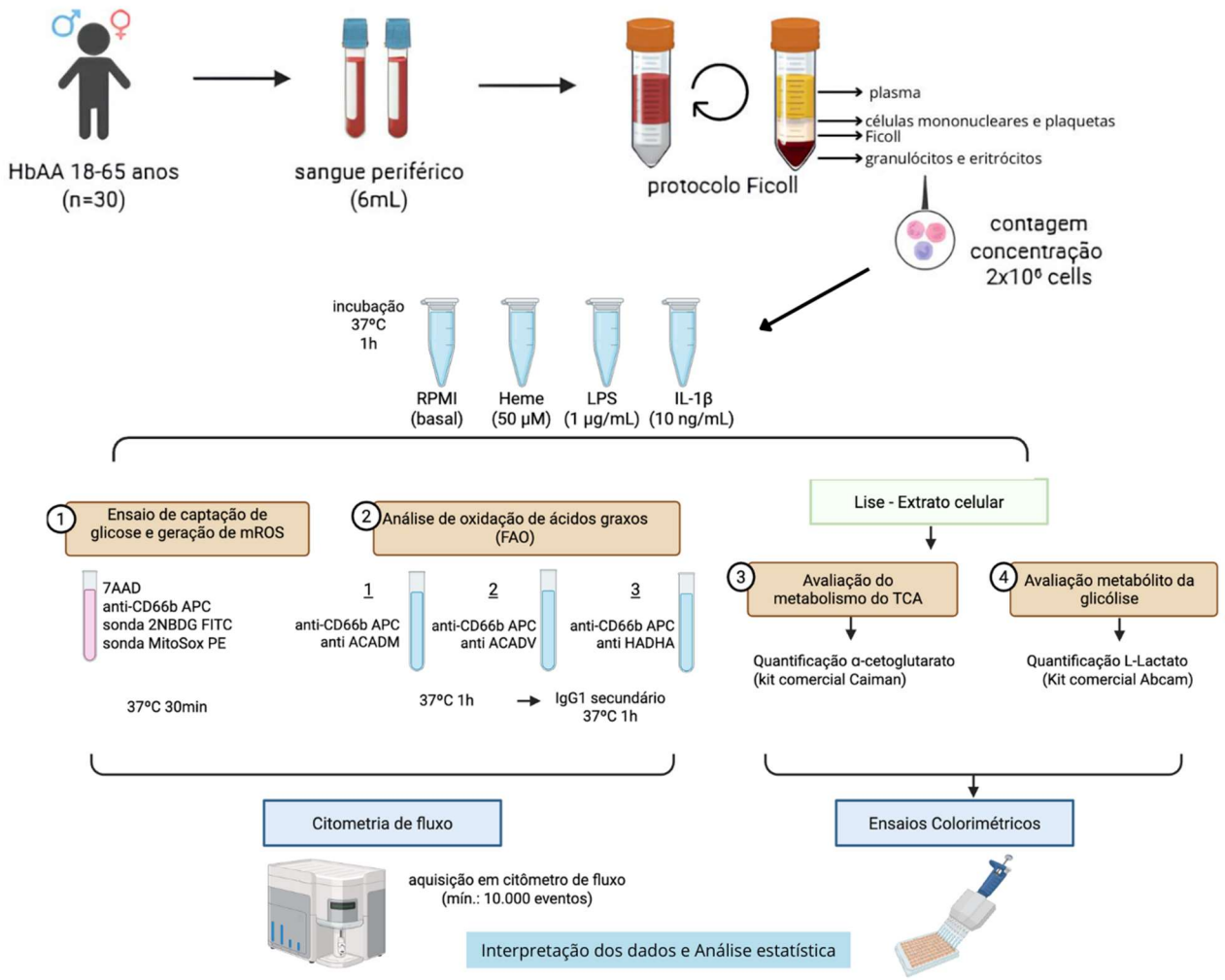

Figura 1. Neutrófilos isolados de indivíduos saudáveis serão estimulados in vitro com heme (DAMP), IL-1β (citocina inflamatória) ou LPS (PAMP), e comparados à condição basal (sem estímulo). Após 1 hora de incubação, os neutrófilos serão analisados por citometria de fluxo para avaliação da captação de glicose (via sonda fluorescente 2-NBDG), oxidação de ácidos graxos (via detecção de enzimas mitocondriais ACADM, ACADV e HADHA), e geração de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (via MitoSox Red). Além disso, os metabólitos α-cetoglutarato e L-lactato serão quantificados por ensaios colorimétricos. Este modelo visa caracterizar o perfil metabólico induzido por diferentes estímulos inflamatórios, com foco nas vias glicolítica, oxidação de ácidos graxos (FAO), e do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Imagem criada com Biorender.com.

ATIVIDADES REALIZADAS E RESULTADOS PRELIMINARES:

Nesta etapa inicial do projeto foi realizado o isolamento de granulócitos a partir de amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis. O número total de participantes foi de 6, dos sexos feminino (n=5) e masculino (n=1). Os granulócitos foram isolados por gradiente Ficoll e foram divididos em três grupos diferentes para incubação ($2x10^6$ células/mL) a 37ºC por 1 hora: (i) condição basal, com 150 µL de RPMI; (ii) heme [50 µM] e (iii) LPS [1 µg/mL]. Em seguida, as células foram processadas para os ensaios de captação de glicose e geração de ROS mitocondrial. Para a citometria foi utilizado o citômetro de fluxo FACS-Calibur (BD) e foram adquiridos 10.000 eventos por amostra. A análise foi feita no software *FlowJo* para separação de *gates*: Granulócitos → CD66b+ 7AAD- → 2NBDG+ e/ou MitoSox+, cálculos de porcentagem aparente (expressos em porcentagem %) e intensidade média de fluorescência (MFI). A separação dessas populações de células permitiu precisão para análise dos neutrófilos viáveis em atividade de captação de glicose e/ou geração de ROS mitocondrial.

Para a análise estatística dos valores de MFI e de porcentagem de neutrófilos positivos para 2NBDG e MitoSox, ou duplo positivo, foi utilizado o software *Prism*, aplicando-se o teste t pareado. Foi considerado significância estatística, um valor de p menor ou igual à 0,05. Os resultados são demonstrados como média ± desvio padrão.

Com os resultados, pode-se observar que, em relação às células não estimuladas (basal), o heme aumentou de maneira significativa a porcentagem de neutrófilos CD66b+7AAD- com a marcação da sonda 2NBDG (basal: 27,63 ± 12,8; heme: 48,53 ± 17,22; p=0,0305). O mesmo resultado foi observado quando analisado a MFI de 2NBDG, mostrando que em relação à condição basal, os neutrófilos incubados com heme tem um aumento de captação de glicose (basal: 15,68 ± 0,87; heme: 24,45 ± 5,81; p=0,0188). Tal resposta não foi observada em células incubadas com LPS, onde a captação de glicose não foi alterada quando comparada com a condição basal, tanto para a porcentagem (25,83 ± 6,34; p>0.05), quanto para a MFI (16,47 ± 2,73; p>0,05).

Ao analisarmos a geração de ROS mitocondrial através da sonda intracelular MitoSox, foi possível observar que o heme induziu, em relação ao basal, um aumento significativo de superóxido mitocondrial, como demonstrado pelo aumento de neutrófilos CD66b+7AAD-MitoSox+ (basal: 24,18 ± 17,11; heme: 45,44 ± 17,21; p=0,0044), assim como o aumento da MFI de MitoSox nessa população (basal: 9,89 ± 0,95; heme: 16,33 ± 3,73; p=0,0100). Já o estímulo com LPS não induziu superóxido mitocondrial, visto que não houve aumento significativo quando comparado à condição basal, tanto para a porcentagem (25,12 ± 14,62; p>0,05), quanto para a MFI (10,97 ± 2,54; p>0,05).

A análise cruzada entre as células que expressaram tanto positividade para 2NBDG quanto para o MitoSox (CD66b+7AAD-2NBDG+MitoSox+), população duplo-positivo, (basal: 20,85 ± 9,42; heme: 49,27 ± 18,5; p=0,0063) confirma que o heme induziu o estresse oxidativo mitocondrial e aumento da captação de glicose nos neutrófilos, sugerindo aumento na atividade metabólica dessas células. A mesma resposta não foi observada com a incubação com LPS, já que o grupo permaneceu parecido com a condição basal (23 ± 11,36; p>0,05).

Os resultados preliminares indicam que o heme, um DAMP importante liberado em doenças hemolíticas, como na AF, promove a ativação metabólica nos neutrófilos, evidenciada pelo aumento significativo na captação de glicose e na geração de ROS mitocondrial. Diferentemente do observado por Sadiku et al, que mostrou que o LPS aumenta a atividade glicolítica em neutrófilos humanos, em nossos experimentos o LPS na concentração e no tempo testados parece não alterar a atividade metabólica nos neutrófilos, mantendo-se semelhante à condição basal. Para confirmar esses dados, como próxima etapa iremos testar uma curva de dose-resposta utilizando diferentes concentrações de LPS em diferentes tempos de incubação.

Atividades em continuidade e a serem realizadas:

- Curva de concentração e tempo para uso de LPS;
- Estímulo com heme, IL-1β e LPS para obter n=30;
- Análise de ROS mitocondrial, oxidação de ácidos graxos e via glicolítica por citometria de fluxo;
- Quantificação de α-cetoglutarato e L-lactato.

BIBLIOGRAFIA

1. Costa, FF. Conran, N. Fertrin, KY. Anemia Falciforme. Zago, MA. Falcão, RP. Pasquini, R. TRATADO DE HEMATOLOGIA. Editora Atheneu, 2014.p. 205-224.

2. Sundd, P., Gladwin, M. T., & Novelli, E. M. (2019). Pathophysiology of Sickle Cell Disease. Annual review of pathology, 14, 263–292. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838>

3. Herrero-Cervera, A., Soehnlein, O. & Kenne, E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases. Cell Mol Immunol 19, 177–191 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00832-3>

4. Gong, T., Liu, L., Jiang, W., & Zhou, R. (2020). DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. Nature reviews. Immunology, 20(2), 95–112. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0215-7>

5. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease, Citation Information: J Clin Invest. 2017;127(3):750-760. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28248201/>

6. Conran N, Belcher JD. Inflammation in sickle cell disease. Clin Hemorheol Microcirc. 2018;68(2-3):263-299. doi: 10.3233/CH-189012. PMID: 29614637; PMCID: PMC6314308. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29614637/>

7. Bender MA, Carlberg K. Sickle Cell Disease. 2003 Sep 15 [Updated 2023 Dec 28]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1377/>

8. Pålsson-McDermott, E.M., O'Neill, L.A.J. Targeting immunometabolism as an anti-inflammatory strategy. Cell Res 30, 300–314 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0291-z>

9. Mathew, M., Nguyen, N. T., Bhutia, Y. D., Sivaprakasam, S., & Ganapathy, V. (2024). Metabolic Signature of Warburg Effect in Cancer: An Effective and Obligatory Interplay between Nutrient Transporters and Catabolic/Anabolic Pathways to Promote Tumor Growth. *Cancers*, *16*(3), 504. <https://doi.org/10.3390/cancers16030504>

10. Kornberg MD. The immunologic Warburg effect: Evidence and therapeutic opportunities in autoimmunity. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2020 Sep;12(5):e1486. <doi: 10.1002/wsbm.1486>. Epub 2020 Feb 27. PMID: 32105390; PMCID: PMC7507184

11. de Moura Antunes, B., Rossi, F. E., Inoue, D. S., Neto, J. C. R., & Lira, F. S. (2017). Imunometabolismo e Exercício Físico: Uma nova fronteira do conhecimento. Motricidade, 13(1), 85-98.

12. Khatib-Massalha, E., Bhattacharya, S., Massalha, H. et al. Lactate released by inflammatory bone marrow neutrophils induces their mobilization via endothelial GPR81 signaling. Nat Commun 11, 3547 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17402-2>

13. Daniel P. Schuster, Steven L. Brody, Zhaohui Zhou, Matt Bernstein, Robert Arch, Daniel Link, and Michael Mueckler. Regulation of lipopolysaccharide-induced increases in neutrophil glucose uptake. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 2007 292:4, L845-L851

14. Sadiku P, Willson JA, Ryan EM, Sammut D, Coelho P, Watts ER, Grecian R, Young JM, Bewley M, Arienti S, Mirchandani AS, Sanchez Garcia MA, Morrison T, Zhang A, Reyes L, Griessler T, Jheeta P, Paterson GG, Graham CJ, Thomson JP, Baillie K, Thompson AAR, Morgan JM, Acosta-Sanchez A, Dardé VM, Duran J, Guinovart JJ, Rodriguez-Blanco G, Von Kriegsheim A, Meehan RR, Mazzone M, Dockrell DH, Ghesquiere B, Carmeliet P, Whyte MKB, Walmsley SR. Neutrophils Fuel Effective Immune Responses through Gluconeogenesis and Glycogenesis. Cell Metab. 2021 Feb 2;33(2):411-423.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2020.11.016. Epub 2020 Dec 10. Erratum in: Cell Metab. 2021 May 4;33(5):1062-1064. doi: 10.1016/j.cmet.2021.03.018. PMID: 33306983; PMCID: PMC7863914