

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOMEDICINA

EFEITO DA NORADRENALINA, UM NEUROTRANSMISSOR RELACIONADO AO ESTRESSE, NA FUNÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

¹Bruna Souza Teixeira (IC-UNIRIO); ¹Taissa de Matos Kasahara (Mestrado-CAPES); ¹Thaís Bezerra Ferreira (Doutorado- CAPES); ¹Cleonice Alves de Melo Bento; ¹Landi Veivi Guillermo Costilla; ¹Vera Carolina Bordallo Bittencourt (orientador)

1-Depto de Microbiologia e Parasitologia – Instituto Biomédico – UNIRIO.

Apoio financeiro: FAPERJ

Palavras- chave: Neutrófilo; Noradrenalina; Candida albicans.

INTRODUÇÃO

Estresse pode ser definido como qualquer situação capaz de abalar a homeostase. O homem está sujeito a dois tipos de estresse: o estresse agudo que tem duração limitada, início e término nítido e é desencadeado pelo perigo iminente e o estresse crônico, que tem duração prolongada, sem final nítido, altera a habilidade do indivíduo em lidar com fatos de seu cotidiano acometendo com frequência o homem moderno [1].

O estado de estresse crônico tem sido atrelado à maior suscetibilidade a doenças infecciosas [2;3] e auto-imunes [4;5], mas a maioria dos estudos enfoca os efeitos do estresse no sistema cardiovascular. Neurotransmissores associados ao estresse, como as catecolaminas noradrenalina (NA) e dopamina, são os responsáveis pelas ações deletérias do estresse crônico no sistema imunológico através da interação com receptores beta 2 adrenérgicos, alterando o perfil da resposta imune, particularmente dentro do compartimento da imunidade específica mediada pelas células T. Poucos estudos relatam os efeitos de neurotransmissores sobre as células da imunidade inata. Sabe-se que os neutrófilos expressam os receptores beta 2 adrenérgicos e que a administração de seus agonistas eleva a produção de espécies reativas de oxigênio e aumenta a síntese de fator ativador de plaquetas [6]. Catecolaminas em doses farmacológicas, que são menores do que as relacionadas ao estresse, induziram a diminuição na expressão de CD11b e CD62L em neutrófilos, moléculas de superfície envolvidas na adesão e migração para o sítio de inflamação [7]. Sookhai e colaboradores (1999) [8] demonstraram que a dopamina induz a apoptose de neutrófilos e modula a função destas células em indivíduos normais e em pacientes com Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica. Neste contexto, como neurotransmissores circulantes, os neuromediadores relacionados ao estresse poderiam exercer uma influência significativa sobre a sensibilização e ativação dos leucócitos, entre eles, os neutrófilos que são as células mais abundantes do sangue humano, sendo essenciais para a proteção contra infecções bacterianas e fúngicas [9]. Poucos estudos demonstram o impacto do estresse frente a infecções fúngicas, mesmo que seja comum a ocorrência de candidíase pós episódios de estresse.

OBJETIVO

Avaliar o efeito da noradrenalina na função de neutrófilos de indivíduos saudáveis.

METODOLOGIA

1- Participantes:

Adultos jovens foram convidados a participar do estudo. Após a explicação do projeto os que aceitaram deram o seu consentimento por escrito assinando o Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam o Questionário de Morbidades Psiquiátricas de Adultos (QMPA). A esse questionário incluíram-se perguntas para avaliar o status imunológico geral do voluntário, como a ocorrência de doenças infecciosas, alérgicas e auto-imunes. Para a coleta de sangue selecionamos os indivíduos saudáveis que, segundo o QMPA, não preenchiam os critérios de ansiedade e depressão. Foram excluídos os que faziam uso de qualquer fármaco imunomodulador.

2- Microrganismo e condição de cultivo:

Candida albicans, cepa ATCC 10.231 foi cultivada em meio Sabouraud (peptona 1%, glicose 4%) líquido, em temperatura ambiente. Após 24h, as células foram coletadas por centrifugação a 3.500 rpm por 10 minutos, lavadas com PBS e ressuspensas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich). Por fim, as leveduras foram contadas em câmara de Neubauer.

3- Isolamento de células mononucleares e granulócitos por gradiente descontínuo:

Sangue periférico (15mL) foi coletado com seringas e tubos heparinizados estéreis (BD-Biosciences). Para os experimentos de apoptose e fagocitose o sangue foi depositado sobre gradiente descontínuo histopaque 1077 e 1119 (Sigma- Aldrich) em um tubo falcon. Esses tubos foram centrifugados por 30 minutos a 2800 rpm. Ao final da centrifugação a nuvem de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foi recolhida da interface plasma/histopaque 1077 e a nuvem de granulócitos da interface histopaque 1077/histopaque 1119. As duas nuvens foram colocadas em tubos falcon distintos e lavadas duas vezes com solução de Hank's (Sigma-Aldrich), ressuspensas em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. As células foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 1x10⁶ células/mL.

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

4- Padronização das condições de interação entre neutrófilos e *Candida albicans*:

Células de sangue total (250µL) foram incubadas com diferentes concentrações de *C. albicans* por 15, 30 ou 60 minutos a 37°C em 5% de CO₂. Após os períodos de incubação, as células receberam 5µL dos seguintes monoclonais conjugados a fluorocromos: CD16b (BD-Biosciences), CD63 (BioLegend), CD66b (BioLegend), TLR-2 (RD - System) e CD62L (BD-Biosciences) e foram deixadas por 30 minutos a 4°C. Após o tempo de marcação, procedeu-se a lise dos eritrócitos com 1mL de solução de lise de eritrócitos (BD-Biosciences) em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 10 minutos. Ao final do processo, as células foram centrifugadas e lavadas com 1mL de PBS com 1% de soro fetal bovino e ressuspendidos em 300µL de solução FACS para leitura no citômetro de fluxo Accuri (BD-Becton-Dickinson).

5- Impacto da noradrenalina (NA) na expressão de moléculas de superfície:

Células de sangue total (250µL) após serem incubadas com NA 80ng/mL por: 1, 3, 6 ou 16 horas, foram estimuladas com *C. albicans* por mais 30 minutos a 37°C em 5% de CO₂. Depois do tempo de incubação total todos os tubos receberam 5µL dos seguintes monoclonais conjugados a fluorocromos: CD16b, TLR-2, CD62L, Dectina-1 (BioLegend) e CD66b e passaram pelos procedimentos de lise de eritrócitos e lavagens descritos previamente.

6- Obtenção de sobrenadante da cultura de CMSP

As CMSP foram estimuladas com fitohemaglutinina (PHA – Sigma-Aldrich) 1ng/mL ou PHA e NA por 72 horas a 37°C em 5% de CO₂. Ao final dos 3 dias o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e utilizado para incubar os neutrófilos nos ensaios de fagocitose.

7- Efeito do sobrenadante de CMSP incubadas com NA na fagocitose:

Os granulócitos foram incubados com o sobrenadante da cultura de CMSP por 1 hora e estimulados com *C. albicans* marcadas com 0,01% de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich). por 15 ou 30 minutos a 37°C em 5% de CO₂. As células foram lavadas com PBS gelado, centrifugadas a 1500 rpm por 4 minutos, ressuspendidos em 300µL de PBS gelado e analisadas em citômetro de fluxo. Após a leitura cada tubo recebeu 100µL de azul de trypan 0,4% (Sigma-Aldrich), e foi mantido no gelo por 10 minutos. As células foram novamente lavadas como descrito e analisada por citometria de fluxo.

8- Efeito da NA sobre a apoptose e necrose de neutrófilos:

Os granulócitos foram incubados por 1h com NA 80ng/mL e estimulados com *C. albicans*, por 30 minutos a 37°C em 5% de CO₂. Ao final da incubação os neutrófilos foram marcados com 5µL de CD16b-PE por 30 minutos a 4°C. Após a marcação, as células foram lavadas com solução de lavagem FACS, ressuspendidas em 200µL da mesma solução e incubadas com 5µL de Anexina V (Biolegend) em temperatura ambiente, protegidas da luz, por 15 minutos. Posteriormente foram adicionados 300µL de tampão para Anexina V (Biolegend) e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo. Após a leitura, as células receberam 10µL de PI (Biolegend) e foram novamente analisadas.

9- Análise dos dados:

Os dados obtidos na citometria de fluxo foram analisados com o programa FlowJo 10.0 (Tree Star). A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Primeiro verificou-se a distribuição dos valores e então foi empregado o teste T de Student pareado para comparação de médias entre os estímulos onde a distribuição dos dados era paramétrica. O teste U de Mann Whitney foi utilizado onde a distribuição dos dados era não paramétrica. A significância em todos os experimentos foi definida como $p < 0,05$.

RESULTADOS

Observamos nos experimentos de padronização da interação entre neutrófilo e *C. albicans* que em 30 minutos de interação ocorreu o maior nível de expressão dos marcadores de superfície TLR-2, CD63 e CD66b. A queda na expressão de CD62L, que reflete a ativação celular, ocorreu mais rapidamente, em 15 minutos de incubação e após este tempo, as células retomaram a sua expressão, porém não retornam aos níveis normais. Com relação à multiplicidade de infecção, podemos ver que a relação de 3 *C. albicans* para 1 neutrófilo elevou mais a expressão dos marcadores no tempo de 30 minutos, do que a interação de 1 *C. albicans* para 1 neutrófilo. Desta forma, o estímulo da *C. albicans* sobre os neutrófilos foi padronizado na proporção 3:1 por 30 minutos, condição que foi empregada em todos os demais experimentos. Neutrófilos estimulados com *C. albicans* por 30 minutos apresentaram um perfil fenotípico ativado, aumentando a expressão de TLR-2, Dectina-1, CD63 e CD66b e diminuindo a expressão da molécula de adesão CD62L. A incubação dos neutrófilos com noradrenalina por 1h não afetou a modulação provocada pela incubação com o fungo. Considerando que 1h poderia não ser tempo suficiente para que fossem observados os efeitos da noradrenalina na expressão de moléculas envolvidas na ativação celular, aumentamos o tempo de incubação com o neurotransmissor para 3, 6 e 16 horas. Foi observada uma redução tempo-dependente no nível de expressão das moléculas de superfície nos neutrófilos ativados pelo estímulo com *C. albicans*. Este mesmo padrão tempo-dependente de redução da expressão de moléculas de superfície não foi observado nos neutrófilos incubados apenas com o neurotransmissor. Diante destas observações, é possível que esta redução tempo-dependente na expressão das moléculas de membrana seja efeito do rompimento da membrana celular que ocorre durante o processo de NETose estimulado pela levedura.

De acordo com os resultados obtidos a partir da análise dos processos de morte celular, a interação da levedura com os neutrófilos provoca desintegração da membrana

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

citoplasmática típica dos processos de necrose ou NETose e, interessadamente, foi verificado que a incubação com noradrenalina por 1 hora reduziu esse tipo de morte no neutrófilo incubado com o fungo. Não houve nenhuma alteração envolvendo apoptose.

Visto que a noradrenalina não teve efeito direto na modulação da ativação estimulada pelo fungo, não sendo capaz de alterar a expressão de receptores envolvidos no reconhecimento de fungos como o TLR-2 e Dectina-1, supomos que esse neurotransmissor não fosse alterar a capacidade de interação dos neutrófilos com *C. albicans*. Por este motivo, a possibilidade de haver efeito indireto da noradrenalina na função fagocítica do neutrófilo frente a *C. albicans* foi analisada. Levantou-se a hipótese da noradrenalina modular a produção de citocinas por CMSP ativadas e essas citocinas modularem a interação dos neutrófilos com o fungo, contudo esta hipótese não foi confirmada já que não houve efeito do sobrenadante de CMSP estimuladas com noradrenalina sobre a capacidade de adesão e internalização das leveduras pelos neutrófilos.

CONCLUSÃO

Levando em consideração os resultados obtidos até o momento sugerimos que a noradrenalina não tem efeito direto nem indireto sobre a modulação da ativação dos neutrófilos induzida por *C. albicans*. Contudo, ao reduzir a necrose nesses fagócitos, pode ser que a sensibilização com noradrenalina afete um importante mecanismo de contenção das infecções por *C. albicans*, a formação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Durante este processo de ataque às leveduras, os neutrófilos têm suas membranas rompidas e lançam seus filamentos de DNA associados a proteases capturando e degradando as leveduras no meio extracelular. Com isso esses fagócitos morrem por um mecanismo que vem sendo chamado de NETose, mas ainda conseguem exercer ação microbicida sobre o fungo. A inibição deste mecanismo de NETose pela noradrenalina poderia estar associada ao aumento da frequência de candidíase em pessoas com estresse crônico.

Apesar da adesão e internalização das leveduras não estarem sendo afetadas pela noradrenalina, é possível que a capacidade microbicida da célula possa estar alterada. Para avaliar isso faremos, para cumprir nosso último objetivo no projeto, experimentos em que a formação de compostos microbicidas como os radicais livres derivados do O₂ será analisada.

REFERÊNCIAS

1. BYRNES, D.M.; ANTONI, M.H.; GOODKIN, K.; EFANTIS-POTTE, J.; ASTHANA, D.; SIMON, T.; MUNAJ, J.; IRONSON, G.; FLETCHER, M. 1998 Stressful events, pessimism, natural killer cell cytotoxicity and cytotoxic/suppressor T cells in HIV+ Black women at risk for cervical cancer. *Psychosom. Med.* 60: 714-722.
2. GLASER, R.; PEARL, D.K.; KIECOLT-GLASER, J.K.; MALARKEY, W.B. 1994 Plasma cortisol levels and reactivation of latent Epstein-Barr virus in response to examination stress. *Psychoneuroendocrinology*. 19 (8): 765-772.
3. GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J. K. 2005 Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 243-251.
4. LEVINE, J.D.; CODERRE, T.J.; HELMS, C.; BASBAUM, A.I.; 1988 Beta 2-adrenergic mechanisms in experimental arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 4553-4556
5. NATHAN, C.; 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6:173-182.
6. WAHLE, M.; GREULICH, T.; BAERWALD, C.G.O.; HANTZSCHEL H.; KAUFMANN, A. 2005. Influence of catecholamines on cytokine production and expression of adhesion molecules on human neutrophils in vitro. *Immunobiology*. 210: 43-52.
7. TRABOLD, B.; GRUBER, M.; FROHLICH, D.; 2007 Synthetic inotropes inhibit the expression of adhesion molecules and augment the expression of L-selectin in polymorphonuclear neutrophils. *Resuscitation*. 74: 352-356.
8. SOOKHAI, S.; WANG, J.H.; MCCOURT, M.; O'CONNELL, D.; REDMOND, H.P.; 1999 Dopamine induces neutrophil apoptosis through a dopamine D-1 receptor-independent mechanism. *Surgery*. 126(2):314-322.
9. VELIN, A.K.; ERICSON, A.C.; BRAAF, Y.; WALLON, C.; SODERHOLM, J.D.; 2004 Increased antigen and bacterial uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats. *Gut*. 53: 494-500.