

Sinalização via mTOR em neutrófilos em modelo experimental de inflamação associada à obesidade

Cristiane Naffah de Souza

Abstract: Neutrophils are key cells in innate immunity and the first line of host defense. Through countless effector mechanisms as phagocytosis, ROS, NO and NETs release, these cells can kill a range of microbes. In sepsis, neutrophils are the main cells involved in inflammatory response and crucial to patient survival. Recently, new adverse factors have been described as important to sepsis's patient survival, among them, obesity. mTOR pathway is not only related to metabolic pathways because it was already shown that mTOR can be activated via TLRs. Although studies regarding mTOR pathway in innate immune cells are in progress, a lot is left to be explored, mainly regarding neutrophils. Considering the importance of these cells to host defense, we formulated the hypothesis that mTORC1/2 complexes can modulate neutrophils effector functions, and external factors as obesity could signal via mTOR in neutrophils leading to an impactful crosstalk to disease course..

INTRODUÇÃO: Os neutrófilos são importantes células da imunidade inata e a primeira linha de resposta no sítio da infecção. Por meio de inúmeros mecanismos efetores, como fagocitose, liberação de ROS, NO e formação de NETs, estas células são capazes de eliminar diversos tipos de microrganismos. Na sepse, os neutrófilos são as principais células envolvidas na resposta inflamatória e determinantes na sobrevida do paciente. Mais recentemente, novos fatores adversos foram descritos como impactantes na sobrevida de pacientes com sepse, dentre eles, a obesidade. A via mTOR não está relacionada apenas com vias metabólicas, sendo verificada sua ativação também a partir da sinalização via TLRs. Embora os estudos relacionando os complexos mTOR e células da imunidade inata estejam avançando, há muito a ser descrito, principalmente em relação aos neutrófilos. Tendo isto em vista, e também a importância destas células para a defesa do organismo, nós formulamos a hipótese de que os complexos mTORC1/2 podem modular funções efetoras dos neutrófilos, e que fatores externos como a obesidade poderia sinalizar via mTOR nos neutrófilos, gerando um crosstalk impactante para o curso da doença.

OBJETIVO:

Investigar como a via mTOR pode influenciar as funções efetoras dos neutrófilos em modelo de sepse associada à obesidade.

METAS ESPECÍFICAS:

Avaliar o perfil fenotípico e funcional dos neutrófilos no modelo de sepse e/ou obesidade e a importância dos complexos mTORC1/2 específicos destas células, utilizando os camundongos MRP8cre⁺ (molécula expressa apenas em granulócitos) neste modelo; e

In vitro:

Avaliar a participação de mTORC1/2 no fenótipo e função dos neutrófilos após estímulos, pela inibição de cada complexo, utilizando camundongos Raptorflox/flox MRP8cre⁺ ou Rictor flox/flox MRP8cre⁺.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

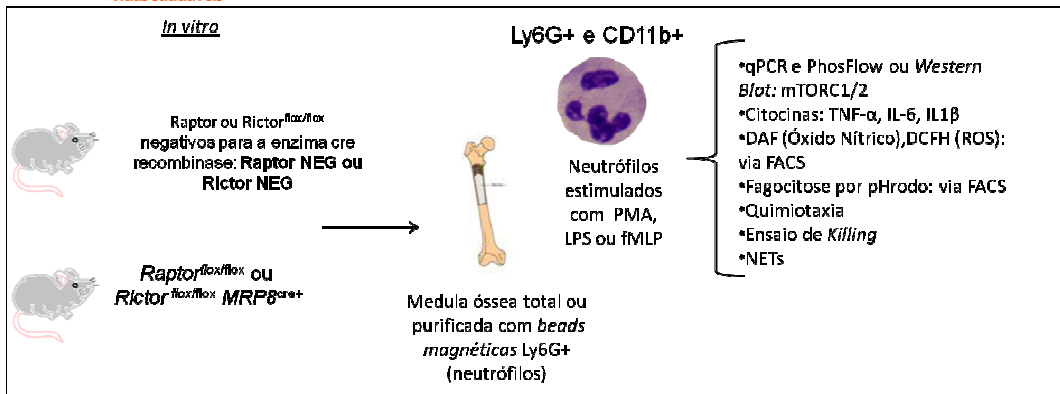


Figura 1. Neutrófilos da medula total ou purificados por beads magnéticas Ly6G⁺ serão estimulados para posteriores ensaios funcionais ou imunofenotipagem. Para a imunofenotipagem usaremos marcações de superfície (Ly6G, CD11b, CXCR2 e CD62L) e intracelulares para verificar a produção de citocinas (TNF α , IL-6, IL10, IL-17, IL-1 β). Para avaliação da produção de ROS e NO, utilizaremos medula óssea total e marcaremos os neutrófilos com anticorpos Ly6G e CD11b. O produto da reação do DAF (NO) ou ROS (DCFH) é lido no canal do FITC. Para os ensaios de fagocitose, quimiotaxia, killing e formação de NETs, utilizaremos neutrófilos purificados. Para o ensaio de fagocitose utilizaremos um kit (pHRodo). Por esta técnica, utilizamos a citometria de fluxo para detectar as bactérias fagocitadas, pois elas fluorescem (FITC) após a mudança no pH que ocorre dentro dos fagolisossomos. Visto que não é possível obter um grande número de neutrófilos após a purificação com beads, utilizaremos o Phosflow para detectarmos a ativação da via mTOR nestas células após estímulo.

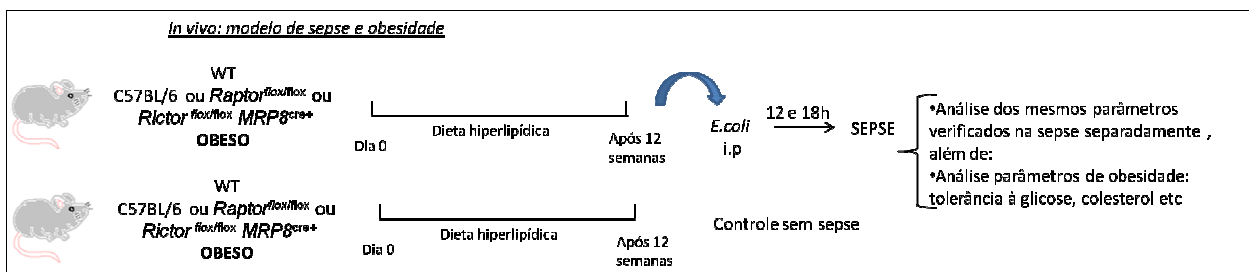
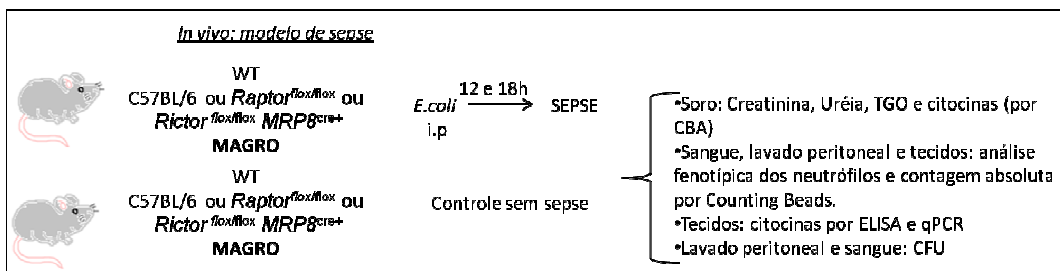


Figura 2. Experimentos in vivo serão realizados para verificar a importância da via mTOR nos neutrófilos frente à sepse associada ou não à obesidade. Após indução da sepse, uma série de análises serão feitas para determinar o curso da doença nos camundongos com a via mTOR afetada nos neutrófilos. Avaliaremos o perfil de citocinas no plasma por CBA, visto que a quantidade de sangue obtida dos camundongos com sepse é limitada devido à hipovolemia. Avaliaremos, via FACS, a expressão de receptores de superfície (Ly6G, CD11b, CXCR2 e CD62L) nos neutrófilos do sangue, lavado peritoneal e tecidos (rim, fígado, pulmão e tecido adiposo). Além disso, para contagem



Ajudando as
pessoas a viverem
vidas saudáveis

BD Biosciences Pesquisador SBI 2015 Projeto Vencedor Categoria Jovem Talento SBI

absoluta das células, utilizaremos counting beads no momento da aquisição das amostras. Verificaremos também o perfil de citocinas nos órgãos, pelo método de ELISA e de outras moléculas por qPCR. Faremos também a contagem do número de bactérias (CFU) no peritônio e sangue dos animais. Análise de parâmetros bioquímicos (ureia, creatinina, TGO, glicose) também será realizada.

Com relação à técnica de citometria de fluxo, as marcações serão divididas de acordo com o estudo e a capacidade de leitura do citômetro. As amostras serão analisadas no aparelho FACSCantoll, utilizando o software FACSDIVA (BD Biosciences), e então analisadas com o *software* FlowJo.

O concurso BD Biosciences Pesquisador SBI visa o reconhecimento e apoio aos pesquisadores que promovem o constante avanço científico através do incentivo à técnica de Citometria de Fluxo com Múltipla Marcação no Brasil.

Saiba mais em bdbiosciences.com/br/pesquisador