



ANÁLISE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE CÉLULAS dTHP-1 TRATADAS COM URATO OXIDADO

Antônio Paulo Siqueira Pratti

Flávia Carla Meotti

Universidade de São Paulo

antonio.pratti@usp.br

Objetivos

Sendo derivado do produto de degradação das purinas, o ácido úrico vem sendo relacionado com doenças de perfil inflamatório crônico, como a aterosclerose, tendo também o macrófago como uma célula fundamental na gênese dessa doença¹. Sabe-se que macrófagos são células do sistema imune inato, que respondem a estímulos oxidantes ativando duas principais vias inflamatórias: via do NF- κ B e via do Nrf2, sendo o passo inicial de ambas as vias a translocação dos fatores de transcrição NF- κ B e Nrf2 para o núcleo^{2,3}. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos causados nessas vias pelo hidroperóxido de urato (HOOU), um oxidante sintetizado no burst oxidativo inflamatório pela enzima mieloperoxidase, a partir do ácido úrico⁴. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a resposta de sinalização de Células Leucêmicas Humanas Monocíticas diferenciadas (dTHP-1) frente ao tratamento com HOOU, comparando os níveis de expressão de NF- κ B e Nrf2 nas frações citosólica e nuclear, permitindo, dessa forma, entender melhor o efeito biológico do HOOU frente a um processo inflamatório. Assim, também buscamos esclarecer o papel do ácido úrico na inflamação crônica.

Métodos e Procedimentos

Foram realizados tratamentos com 1 μ g/mL LPS, 5 ng/mL TNF α , 20 μ M tBHQ, 50 μ M HOOU ou fase móvel (FM) para obtenção de duas frações: uma enriquecida em conteúdo citoplasmático e outra em conteúdo nuclear. Esse enriquecimento foi obtido por meio da lise inicial do citoplasma, seguida da precipitação do núcleo, coleta do sobrenadante e, por fim, lise do núcleo precipitado. A expressão de NF- κ B e NRF2 foi avaliada em ambas as frações por Western Blot, e a eficácia da separação foi determinada pela detecção exclusiva de β -ACTINA na fração citosólica e de LÂMINA B1 apenas na fração nuclear, visto que essas proteínas são específicas desses compartimentos. Além disso, utilizando os mesmos tratamentos, mas sem a separação das frações, foi determinado o efeito do HOOU na produção de TNF- α por ELISA, bem como na expressão de *gpx1*, *hmox1*, *tnfa*, *gclc* e *nqo1* por RT-PCR.

Resultados

Inicialmente, avaliou-se a eficácia da metodologia de fracionamento celular (**Figura 1**), confirmando o enriquecimento das frações citosólica e nuclear por meio da detecção de proteínas específicas de cada compartimento: β -ACTINA (citosólica) e LÂMINA B1 (nuclear).

Os resultados demonstraram boa eficiência no enriquecimento nuclear, evidenciada pela ausência quase completa de β -ACTINA em todos os grupos de tratamento. Entretanto, foi detectada LÂMINA B1 em frações citosólicas, que passou a ser indetectável após a adição de uma etapa de lavagem no protocolo. Na análise da expressão parcial dos fatores de transcrição (**Figura 2**), NF- κ B apresentou resultados inconsistentes em ambas as frações, enquanto NRF2 exibiu um aumento aparente em relação ao controle, tanto na fração citosólica quanto na nuclear, quando avaliado diretamente na membrana. Complementando esses achados, a análise por RT-qPCR (**Figura 3**) indicou aumento da expressão relativa de *gpx1*, gene antioxidante regulado por NRF2 e envolvido na redução de peróxidos via glutationa, sugerindo uma possível modulação dessa via em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo HOOU. Por fim, o ensaio de ELISA (**Figura 4**) revelou um aumento na secreção de TNF- α pelas células tratadas, indicando que o HOOU pode ativar também a via do NF- κ B em algum momento anterior à ativação da via do NRF2.

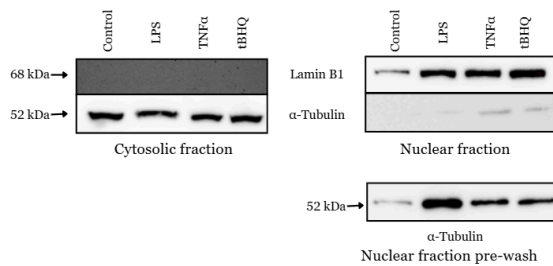


Figura 1: Validação do método de fracionamento por western-blot.

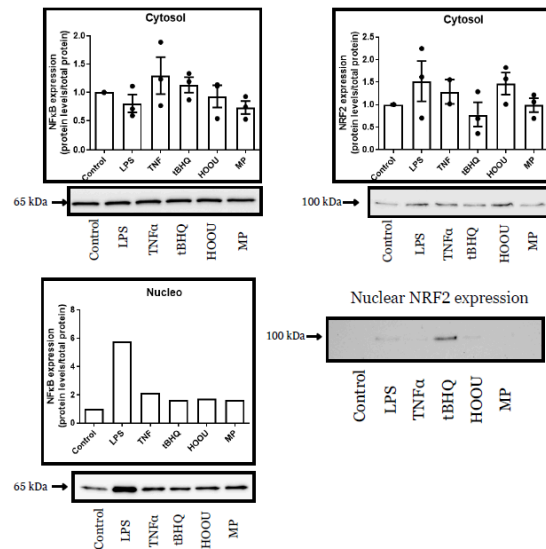


Figura 2: Análise da expressão parcial de NF- κ B (65kDa) e NRF2 (100 kDa) após o tratamento com HOOU, por western-blot.

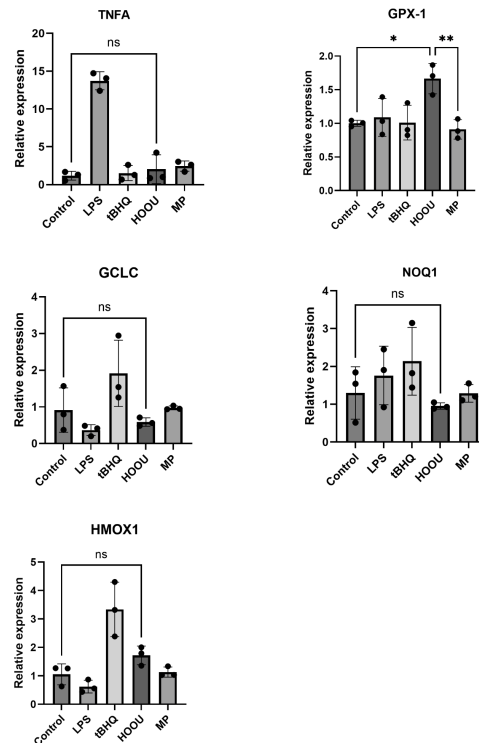


Figura 3: Expressão relativa de genes regulados pela via do NFκB (TNFA) e Nrf2 (HMOX, NOQ1, GCLC, GPX1) de dTHP-1 após o tratamento com HOOU.

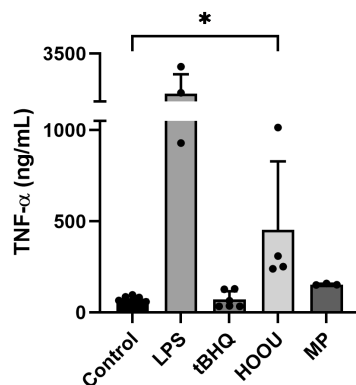


Figura 4: Análise dos níveis de TNF-α secretados pela dTHP-1 após tratamento com HOOU

Conclusões

Com os resultados atuais foi possível ter ideias preliminares sobre o efeito do HOOU em sistemas biológicos e um possível esclarecimento dos mecanismos por trás da relação do ácido úrico com o processo inflamatório. As análises por western-blot apresentam aumento da via do NRF2 após tratamento, indicando que, possivelmente, o HOOU pode ser pró-inflamatório por meio da indução de um estresse oxidativo. Corroborando com essa ideia, o ELISA mostrou que as células tratadas com HOOU secretam mais TNFα do que as não tratadas, porém esse aumento não foi observado na expressão relativa do mRNA do gene responsável pela citocina. No entanto, pelo RT-qPCR, foi possível observar o aumento de genes relacionados com a via do NRF2, como a GPX-1 e HO-1. Esses dados sugerem uma dinâmica no efeito do HOOU, que inicialmente pode induzir a via do NFκB, e como resposta secundária ao estresse oxidativo gerado tanto de forma direta do HOOU, como de forma indireta pela inflamação, ativa-se a via do NRF2 para combater a alta oxidação na célula.

Vale adicionar que, apesar da obtenção de baixas concentrações proteicas, o método de fracionamento foi eficaz e pode ser utilizado como alternativa a kits prontos, tornando certos projetos e experimentos mais viáveis financeiramente. Por fim, são necessários novos experimentos para comprovar essa hipótese, consistindo na utilização de gene reporter, contornando assim o problema encontrado com o anticorpo no western-blot. Também será necessário analisar diferentes tempos de tratamento para entender melhor a dinâmica da ativação das vias estudadas.

O autor declarou não haver conflito de interesses.

Todos os envolvidos aprovaram a versão final do resumo.

Agradecimentos (opcional)

Agradeço a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto.

Referências

- [1] MELLO, F. M. et al. Serum Uric Acid Levels and Subclinical Atherosclerosis: Results from the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Current Problems in Cardiology*, v. 48, n. 3, p. 101525–101525, 1 mar. 2023.
- [2] KABE, Y. et al. "Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus," *Antioxid Redox Signal*, vol. 7, no. 3–4, pp. 395–403, Mar. 2005, doi: 10.1089/ARS.2005.7.395.
- [3] AHMED, S. M. U. et al. "Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1863, no. 2, pp. 585–597, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.BBADIS.2016.11.005.
- [4] SILVA, R. P. et al., "Identification of urate hydroperoxide in neutrophils: A novel pro-oxidant generated in inflammatory conditions,"



Free Radical Biology and Medicine, vol. 126,
pp. 177–186, Oct. 2018, doi:
10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.011.