



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica submetido
para avaliação no Edital: 04/2022

Título do projeto: Tratamento com Sulforafano na modulação de células dendríticas em doenças inflamatórias

Palavras-chave do projeto: Imunologia celular; célula dendrítica, Sulforafano

Área do conhecimento do projeto: Imunologia

Sumário

- 1 Resumo
- 2 Introdução e Justificativa
- 3 Objetivos
- 4 Metodologia
- 5. Cronograma de atividades
- 6. Referências

1 Resumo

O sistema imunológico dos seres humanos é altamente especializado e bem desenvolvido. Tal mecanismo confere proteção contra agentes patogênicos intracelulares e extracelulares, oferecendo dois tipos diferentes de recursos especializados para reconhecimento e proteção contra essas duas categorias de agentes infecciosos. Em geral, as respostas imunes podem ser divididas em duas fases: a primeira em que ocorre o reconhecimento do antígeno e a segunda na qual é feita a erradicação desse antígeno. Dentro dessas categorias, destacaremos nesse trabalho o papel que um tipo celular, denominado células dendríticas, possui no processo de mediação dentro do mecanismo de respostas imunes. Durante um processo infeccioso, por exemplo, essas células apresentam a função primária de apresentação desse agente infectante para outro grupo celular, localizado em pontos específicos do corpo dos vertebrados, o qual vai ser responsável por levar adiante parte da cadeia de acontecimentos químicos e físicos até o fim do processo e a eliminação desse fator danoso. Fatores externos, químicos por exemplo, também podem mediar esse processo, como drogas ou fármacos. Nesse contexto, vamos estudar também as ações, mecanismos e meios que um fitoquímico específico chamado Sulforafano, proveniente de uma família vegetal de grande disponibilidade e já conhecido, em parte, pelas suas ações na modulação das respostas imunes, pode contribuir para maior e melhor entendimento da modulação das respostas imunes, filiado a um novo mecanismo de hidrogéis termossensíveis para melhor distribuição do Sulforafano nas células dendríticas

2 Introdução e Justificativa

Denominam-se células dendríticas (ou *Dendritic Cells* – DCs) aquele grupo celular cuja função é a captura de antígenos e seu transporte para os órgãos linfoides periféricos; encontradas nos epitélios da pele, órgãos linfóides, nos tratos gastrointestinais e respiratórios, são em sua maioria de linhagem monocítica e responsáveis também pela iniciação de respostas dos linfócitos T. Esse grupo celular possui projeções membranosas que facilitam sua identificação (quanto a sua morfologia) e também podem ser separadas em duas categorias dependendo da sua localização no organismo: as DCs imaturas estão localizadas nos epitélios da pele e dos tratos gastrointestinal e respiratório, portais pelos quais a entrada de microrganismos

é facilitada, e quando migram para os órgãos linfóides podem ser classificadas como DCs maduras. (ABBAS et al., 2005)

Durante um processo de infecção por agentes microbianos, ocorre a produção de citocinas inflamatórias ao longo do processo inato de reações imunes; a combinação dessas citocinas com a presença de microrganismos ativa as DCs, que por sua vez perdem a sua adesividade ao epitélio, enquanto simultaneamente aumentam a expressão do receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7), auxiliando no processo de migração para as regiões de linfócitos T dos linfonodos (ROQUILLY, 2022).

Nesse processo de migração (por exemplo, dos epitélios para os linfonodos para a apresentação dos antígenos) as DC's passam por um processo de maturação e começam a expressar altos níveis de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) da classe II juntamente com aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias, tais como CD80, CD86 e CD40, que interagirão com os linfócitos T *naïve* (que ainda não foram expostos a nenhum antígeno). Por conta da sua localização estratégica em possíveis pontos de entrada para agentes estranhos, do processo de migração para a região dos linfonodos rica em linfócitos T e também devido ao fato de expressarem receptores que facilitam a captura de microrganismos as DC's são as células apresentadoras de antígeno mais eficazes para iniciar as respostas iniciais dos linfócitos T (ABBAS et al., 2005); em suma, as DCs são as responsáveis pela ponte entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa, conectando o sistema imunológico natural com o adquirido (MALE, D. et al., 2014).

O sulforafano (SFN) é um composto químico da família dos isotiocianatos conhecido por ter ação anti-inflamatória, quimiopreventiva (como por exemplo em algumas neoplasias) (RIBEIRO, T. et al., 2021) e antioxidante. Presente na família Cruciferae (ou Brassicaceae) e em cultivares comuns como o repolho, brócolis e couve-de-bruxelas, o SFN demonstra ser um fitoquímico versátil e com diferentes potenciais (no que tange o seu papel de ação e interação nos organismos) (CONZATTI, A., 2013). A biodisponibilidade de SFN é abundante se comparada com outros fitoquímicos e isso o faz um elemento de interesse para pesquisa (MAHN, A. et al, 2021). Segundo Hyon-Jeen Kim e Berenice Barajasa, a ativação química que o SFN promove também é capaz de recuperar parte do decréscimo natural e relacionado à idade da imunidade conferida pelas células T helper tipo 1 (Th1) (HYON-JEEN et al., 2008; GEISEL, J., 2014; YIN, X. et al, 2021). Todos os papéis desempenhados pelo SFN na mediação das respostas imunes ainda não foram completamente elucidados, e isso abre as perspectivas para que novas abordagens possam ser descritas.

Para melhor aproveitamento das funções imunomoduladoras do SFN, para tratar doenças inflamatórias por exemplo, e diminuir as limitações físico-químicas e/ou biofarmacêuticas dessa molécula, se faz necessário o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas com potencial de inovação tecnológica. Nesse contexto, a utilização de sistemas nanocarreadores como hidrogéis termosensíveis micelares, apresenta-se como uma estratégia eficaz com potencial farmacoterapêutico. Dentre os sistemas termoresponsivos recentes, destacam-se aqueles a base de co-polímeros tribloco, como os poloxâmeros (PL), constituídos por blocos de polietilenoglicol-polipropilenoglicol-polietilenoglicol. Uma das principais vantagens desses sistemas é a formação de géis em temperaturas fisiológicas, em função da auto-organização das micelas devido a diferença de polaridade entre as unidades de polietilenoglicol e de polipropilenoglicol. Esse processo resulta em uma variação em suas propriedades reológicas, formando hidrogéis termosensíveis, com capacidade de bioadesão e

propriedades biocompatíveis, especialmente aquelas constituídas por poloxâmero 407 (PL407) (KLOUDA, L., 2015). Tendo em vista que o SFN pode exercer papel anti inflamatório e que as DCs são cruciais para o estabelecimento da resposta imune, a hipótese deste trabalho é que o tratamento com SFN reduzirá a maturação/ativação das DCs *in vitro*.

Nós acreditamos que este projeto poderá trazer novas abordagens terapêuticas para tratar doenças inflamatórias, descrevendo os efeitos moleculares do SFN, além de avançar no conhecimento dos fatores que modulam a resposta de células imunes.

3 Objetivos

- O objetivo principal é avaliar os efeitos do tratamento com SFN e de suas formulações de hidrogéis termosensíveis, assim como determinar os possíveis mecanismos de atuação desse fitoquímico na regulação da resposta imune;

3.1 Objetivos específicos

- Revisar a literatura acerca do uso do SFN para tratamento em células do sistema imune, com enfoque para as DCs;
- Realizar a geração e maturação/ativação das DCs com lipopolissacarídeo (LPS);
- Avaliar a expressão de moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e CD40 pós ativação com LPS;
- Avaliar se o tratamento com SFN influencia na maturação e ativação das DCs.

4 Metodologia

Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa maior, que tem o intuito de estudar o papel do SFN na rejeição ao transplante experimental. Portanto, o projeto já conta com aprovação no CEUA da UFABC sob o número 3694011119.

4.1 Busca em banco de dados públicos:

A busca será feita através de artigos publicados no PUBMED que realizaram experimentos de RNAseq de células DC nos últimos 10 anos. Em paralelo, será realizada consulta no repositório Gene Expression Omnibus (GEO) (BARRETT, et al, 2012; EDGAR, 2002), onde buscaremos dados públicos de RNAseq de células DC.

4.2 Análise de expressão diferencial das células dendríticas em processos inflamatórios:

A análise de expressão diferencial será realizada no software GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>), em que iremos comparar os grupos de diferentes processos inflamatórios que tenham como foco a DC, filtrando os transcritos diferencialmente expressos, $p \leq 0,05$ e $\log FC \geq 1$ ou ≤ -1 . Alguns outros softwares de análises de dados de bioinformática serão utilizados a fim de completar a análise de expressão diferencial, como construção de mapa de calor, que será gerado usando o software Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>), com base nos valores de alteração de dobra \log_2 -fold. Além disso, utilizaremos o software Metascape (ZHOU, 2019), em que iremos analisar as vias enriquecidas através do banco de dados KEGG Pathway e GO Biological Process com base

nas listas DEGs UP regulados $\log_2\text{-fold change} \geq 1$ e down ≤ -1 obtidas anteriormente através do GEO2R.

4.3 Cultura Celular

Será feita diferenciação celular para DC *in vitro* na presença de sulforafano e formulação de hidrogel, para avaliar o potencial modulador da molécula nesse subtipo celular. Células Dendríticas Derivadas da Medula Óssea (BM-DC) serão diferenciados da medula óssea na presença de GM-CSF (20 ng / mL) em placas de 6 poços com fundo chato por uma semana. A BMDC será tratada com SFN e formulação de hidrogel por 24h e também será estimulada com LPS (100 ng / mL) por 24h para ativação e confirmação da ação do SFN.

A formulação de hidrogel que será utilizada já está pronta, devido a tese da aluna ao qual este projeto está afiliado. Foi feito uma solução de poloxamer PL407 na concentração de 20% m/v (PL 407, Sigma-Aldrich), contendo ácido hialurônico 0,5% m/v (AH, massa molar 15 KDa, Sigma-Aldrich) e dispersão direta de SFN (1mg/mL). As formulações foram mantidas a 4°C, sob agitação (100 rpm) até completa dissolução de homogeneização dos polímeros. Após a preparação, as amostras foram armazenadas de 4-8 °C até posterior uso.

4.4 Citometria de fluxo

Os grupos DC controle, DC LPS, DC SFN, DCLPS+SFN serão coletados e transferidos para tubo cônico de 15mL. Serão centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C. Após, o sobrenadante será coletado e armazenado a -80°C e o *pellet* de células será ressuspensionado em PBS1X e transferido para placa de 96 poços, fundo U. Novamente as amostras serão centrifugadas a 1500 rpm, 5 minutos a 4°C e incubadas com anticorpos específicos conjugados com diferentes fluorocromos para análise por citometria de fluxo. Para tanto, anticorpos específicos para CD80, CD86, CD40 e CD11c serão diluídos em tampão FACS (PBS1X e 2% soro fetal bovino), na diluição de 1:200. Para cada poço, será adicionada 25 µL da mistura dos anticorpos e incubados por 30 minutos no escuro. Após, será adicionado 150 µL de tampão facs, submetido a centrifugação a 1500 rpm, por 5 min, a 4 °C. Após, será descartado o sobrenadante e as células serão ressuspensionadas em 200 µL de tampão FACS. As amostras serão adquiridas no citômetro de fluxo FACS Canto II, utilizando o software DIVA, e as análises serão realizadas utilizando o Flow Jo.

4.4 Análises estatísticas

A análise estatística será feita com recursos do software GraphPad Prism 8. Para comparação entre dois grupos será aplicado teste T e três ou mais grupos os parâmetros avaliados serão aplicados o teste ANOVA. Para avaliação dos genes diferencialmente expressos, que será feito através das análises de bioinfo, as diferenças consideradas estatisticamente significantes serão as que tiverem valor de $p \leq 0,05$ e $\log_2\text{ fold change (logFD)} \geq 1$ para genes up regulados ou $\log_2\text{ fold change (logFD)} \leq -1$ para genes down regulados. Para as análises experimentais, utilizaremos teste T para dois grupos e ANOVA quando analisarmos 3 ou mais grupos. A significância estatística será considerada para valores de $p \leq 0.05$.

6 Cronograma de atividades

1. Etapa 1 – Participação nas reuniões científicas

- a. Etapa 1.a. – Leitura e discussão de artigos com o grupo
 - b. Etapa 1.b. – Apresentação de dados nas reuniões
 - c. Etapa 1.c. – Busca por referências bibliográficas
2. Etapa 2 – Revisão Bibliográfica
 - a. Etapa 2.a. – Busca por dados em banco (RNAseq)
 - b. Etapa 2.b. – Análise de expressão dos dados
 - c. Etapa 2.c. – Análise de enriquecimento dos dados
 - d. Etapa 2.d – Elaboração do relatório parcial
3. Etapa 3 – Cultura celular
 - a. Etapa 3.a. – Avaliação da ação de SFN e formulação de hidrogel
 - b. Etapa 3.b. – Avaliação de ação do SFN com LPS
 - c. Etapa 3.c – Citometria de fluxo
 - d. Etapa 3.d. – Elaboração do relatório final

Tabela 1 – Exemplo de cronograma de atividades previstas

Etapa	Mês											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1.a.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1.b.		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1.c.	X	X	X	X	X							
2.a.		X	X	X	X	X						
2.b.				X	X	X	X					
2.c.					X	X	X	X				
2.d.					X	X	X					
3.a.							X	X	X			
3.b.								X	X	X		
3.c.								X	X	X		
3.d.									X	X	X	X

Referências

- ABBAS, K. et al. *Imunologia celular e molecular*. Elsevier, Rio de Janeiro, Brasil, 2005
- ROQUILLY, A.; Spatiotemporal Adaptations of Macrophage and Dendritic Cell Development and Function. *Annual Review of Immunology*, 40:525–57, 2022
- MALE, D. et al. *Imunologia*. Elsevier, Rio de Janeiro, Brasil, 2014
- RIBEIRO, T.; Quimioprevenção do carcinoma hepatocelular com compostos bioativos dos alimentos: o potencial do sulforafano e suas perspectivas revisadas. 2021.
- CONZATTI, A.; Evidências clínicas e moleculares do consumo de brócolis, glicorafanina e sulforafano em humanos. LUME UFRGS, 2013
- MAHN, A.; Potential of Sulforaphane as a Natural Immune System Enhancer: A Review. *Molecules*; 26(3): 752, 2021

HYON-JEEN, K.; Nrf2 activation by sulforaphane restores the age-related decrease of TH1 immunity: Role of dendritic cells. *Science Direct*, 2008

GEISEL, J.; Sulforaphane Protects from T Cell–Mediated Autoimmune Disease by Inhibition of IL-23 and IL-12 in Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 192 (8) 3530-3539, 2014

YIN, X.; Dendritic Cell Regulation of T Helper Cells: *Annual Review of Immunology*, 39:1, 759-790, 2021

KLOUDA, L. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications: A seven-year update. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 338-349, 2015