

Efeito da tioredoxina bacteriana no influxo leucocitário em modelo murino.

Effect of bacterial thioredoxin in the leukocyte influx in a murine model.

Marjory Duarte Barbosa^{ab}, Eliana Faquim de Lima Mauro^b.

a: Faculdade de Biomedicina, Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas; Av. Santo Amaro, 1239, Vila Nova Conceição, São Paulo, Brasil. CEP: 04505-001.

b: Instituto Butantan, Laboratório de Imunopatologia; Av. Vital Brasil, nº 1500, Butantã, São Paulo – SP 05503-900.

RESUMO

O organismo aeróbio está constantemente exposto às espécies reativas de oxigênio (EROS), as quais em baixas proporções estão envolvidas na manutenção do organismo como a proliferação e diferenciação celular. No entanto, seu excesso pode levar a apoptose celular. Nosso organismo possui diversas proteínas antioxidantes como tioredoxina, glutaredoxina e glutathione, que são responsáveis pela contenção das EROS secretadas por fagócitos. Caso essa ação antioxidativa não seja capaz de suprir esse mecanismo de ação das EROS, acaba ocorrendo o estresse-oxidativo, levando a apoptose celular. Inúmeras doenças são causadas pela falha desse mecanismo, como inflamação exacerbada, doenças neurodegenerativas e algumas doenças crônicas. Estudos com a tioredoxina humana recombinante (rhTrx) têm mostrado sua ação anti-inflamatória, como no caso da pancreatite crônica em camundongos. Neste projeto a tioredoxina bacteriana (Trx) foi produzida e avaliada quanto ao seu efeito sobre o influxo leucocitário induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS) em modelo de bolsa de ar em camundongos. Para tanto, seguimos alguns protocolos a fim de obter a proteína recombinante livre de LPS. Os resultados obtidos permitiram verificar eficiência na produção da Trx bacteriana. Além disso, verificamos que a injeção intravenosa da Trx *in vivo* mostrou-se satisfatória na inibição do influxo leucocitário induzido pela injeção de LPS em bolsa de ar no dorso de camundongos em comparação ao obtido em camundongos injetados somente com LPS. Pôde ser observado ainda, que esse influxo de leucócitos foi predominantemente de neutrófilos. Deste modo, os resultados sugerem que a Trx bacteriana apresenta potencial anti-inflamatório como o descrito para a humana.

Palavras chave: Tiorredoxina bacteriana, Tiorredoxina humana, influxo leucocitário, efeito anti-inflamatório.

SUMMARY

The aerobic organisms are constantly exposed to reactive oxygen species (ROS), which in lower concentrations are involved in the homeostasis of the organism such as the cellular proliferation and differentiation. However, the ROS at higher concentration can induce cell apoptosis. Distinct antioxidative proteins such as thioredoxin, glutaredoxin and glutathione are responsible by the containment of ROS secreted by phagocytes. If this higher production of ROS is not suppressed by these proteins, it is observed the oxidative stress, which results in cellular apoptosis. Several diseases are resulting by a fault in this ROS control such as chronic inflammation, neurodegenerative diseases and some chronic diseases. It has been showed that recombinant human thioredoxin (rhTrx) has an anti-inflammatory effect, as described in chronic pancreatite developed in mice. In this work, it was produced the bacterial thioredoxin (Trx) and analyzed its effect in the leukocyte influx induced by lipopolysaccharide (LPS) injection in air pouch model in mice. Some protocols were done to obtain the recombinant thioredoxin LPS free. The results showed that the intravenous injection of Trx presented a satisfactory effect in to inhibit the leukocyte influx induced by LPS injection when compared with those observed in LPS injected mice. Furthermore, it was observed that the neutrophils were predominant in the pouch air of mice. In this way, the results suggest that the bacterial Trx presents a promise anti-inflammatory effect such as described for the human Trx.

Key words: Anti-inflammatory effect, bacterial thioredoxin, human Thioredoxin, leukocyte influx.

Introdução

Ao longo de milhões de anos de evolução os animais vertebrados desenvolveram elaborados mecanismos de defesa contra a presença de patógenos no organismo. Os fagócitos profissionais (neutrófilos e monócitos, quando na corrente sanguínea e macrófagos quando no tecido) desempenham papel essencial nesses mecanismos que garantem a homeostasia e sobrevivência do organismo. Os neutrófilos são oriundos das células hematopoiéticas pluripotentes da medula óssea, compreendem a maior porcentagem dos glóbulos brancos na circulação (50-70%) e apresentam como características principais núcleo multilobulado com citoplasma contendo grânulos, sendo, essas células essenciais para resposta inflamatória aguda e capazes de reconhecer, fagocitar e eliminar grande parte dos patógenos que entrem em contato com o nosso organismo¹. Os neutrófilos circulantes são recrutados para o sítio de infecção por sinais quimiotáticos². Ao chegar no local da infecção, o neutrófilo envolve o patógeno com sua membrana formando, o fagossomo, processo conhecido como fagocitose. Esse fagossomo por sua vez se funde com a vesícula lisossomal, formando o fagolisossomo. Dentro dessa vesícula estão as EROS, que são moléculas responsáveis pela ação microbicida¹.

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no centro dos átomos de oxigênio³. O mecanismo oxidativo se inicia quando o ânion superóxido (O_2^{-}) oxida o complexo nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato-oxidase (NADPH-oxidase) causando a “explosão respiratória”³. Essas EROS são produzidas continuamente na cadeia respiratória das mitocôndrias⁴. No organismo, os radicais livres estão envolvidos na fagocitose (como já citado), regulação de crescimento celular, sinalização intercelular e apoptose. No entanto, o excesso de EROS acarreta efeitos prejudiciais, como lipoperoxidação de membrana e oxidação de proteínas, podendo também danificar macromoléculas como DNA, levando a morte celular⁴. Sob certas circunstâncias, esse efeito das EROS pode ser reversível, porém em 80% dos casos não é possível corrigi-lo⁵. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre as moléculas

oxidantes e antioxidantes, que pode ser causado por um distúrbio na produção, distribuição ou por superabundância das EROS e ainda por fontes danosas ou ambientais (como por exemplo, a radiação). Deste modo o estresse oxidativo tem sido vinculado com várias patologêses que variam de cardiovasculares a neurodegenerativas até alguns tipos de câncer e envelhecimento. As EROS podem atuar tanto como causa quanto como consequência de patologias humanas³. Diante disso, mecanismos são observados no sentido de conter os danos oxidativos resultantes da ação das EROS que inclui a produção de enzimas antioxidantes⁶. A regulação da síntese/neutralização de EROS é mediada pela produção de proteínas antioxidantes como tiorredoxina (Trx), glutarredoxina e glutatona. Essas proteínas apresentam funções tiol-dependentes que visam a manutenção do ambiente intracelular reduzido e assim o controle do estresse e da indução de apoptose⁷.

As Tiorredoxinas (Trx) são proteínas termoestáveis, de baixo peso molecular (cerca de 12 kDa). As Trxs catalisam reações de óxido-redução por um mecanismo de transferência de elétrons de um grupo ditiol para dissulfetos de várias proteínas alvos através de duas cisteínas ativas, que estão separadas por um par de aminoácidos os quais formam um sítio catalítico conservado (CYS-GLY-PRO-CYS)⁸. O sistema tiorredoxina é composto por Trx, Trx redutase e NADPH, descrito por Reichard e colaboradores em 1964, como um sistema de redução de ácido ribonucleico (RNA) em ácido desoxirribonucleico (DNA)⁹. A sequência da Trx bacteriana revelou um sítio ativo também altamente conservado formado pela sequência Cys32-Gly-Pro-Cys35 que é encontrado tanto em genomas procariotos quanto em eucariotos¹⁰.

A ação da Trx contra o estresse oxidativo se dá pela eliminação das EROS e estudos demonstraram que a Trx é capaz de suprimir a inflamação, regulando o influxo de neutrófilos apresentando assim, ação anti-inflamatória.

Seguindo essa linha, estudos demonstraram que o uso da Tiorredoxina humana recombinante (rhTrx), tem capacidade em bloquear a quimiotaxia induzida por lipopolissacarídeos (LPS) em modelo de bolsa de ar em murinos¹⁰.

Tendo em vista essas observações o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da Trx bacteriana sobre o influxo leucocitário induzido pela injeção de LPS em bolsa de ar no dorso de camundongos. O estudo proposto visa contribuir para desvendar o potencial anti-inflamatório da Trx de *E. Coli* em relação aos estudos realizados com a Trx humana. Nesse sentido, a Trx bacteriana poderá ter uma aplicação economicamente interessante para estudos voltados para desenvolvimento de alvos terapêuticos de desordens imunológicas.

Métodos

Expressão da Tiorredoxina

Para a obtenção da Trx bacteriana foi utilizado o vetor pet-32, que já traz o gene da Trx clonado¹¹. No pET-32 a Trx é expressa como uma proteína de fusão recombinante, contendo seis caudas de histidinas, o que permite a purificação da proteína por afinidade ao Níquel¹². Portanto, bactérias BL21(DE3) pLyS (50 µL), previamente congeladas foram transformadas com o vetor pET32 (5 µL) por eletroporação utilizando o eletroporador (SONICS) que através de choque elétrico desestabilizou a membrana da bactéria permitindo a entrada do vetor. Após essa etapa, foi acrescentado 1 mL do meio de cultura Luria-Bertani (LB) composto por Triptona, extrato de levedura e água bi-distilada (Milli-Q) e realizada a incubação a 37°C/30 minutos, para recuperação da bactéria. Em seguida, foram acrescentados 15 mL de meio LB contendo 100 µg/mL do antibiótico ampicilina (AMP) na suspensão bacteriana e realizada incubação a 37°C/16 horas (pré-inóculo).

Após essa incubação foram acrescentados 250 mL de meio LB contendo AMP (100 µg/mL) e nova incubação foi realizada a 37°C sob agitação, por aproximadamente 2 horas. Ao final desse período, foi realizada a leitura da Densidade Óptica (DO) da cultura utilizando o filtro de 600 nm em espectrofotômetro (SpectraMax M2). Após atingir a DO desejada (0,6 a 0,8), uma amostra da cultura bacteriana foi coletada para análise em SDS-PAGE (Tempo 0 de indução da expressão-T0). No restante da cultura foram adicionados 15 µL de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG - 1mM/mL)

para a indução da expressão da proteína e realizada a incubação sob agitação a 37°C/4 horas. Ao final desse período, a cultura foi centrifugada 8.000 xg/10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento armazenado. Uma amostra dessa cultura foi coletada para análise da expressão da proteína após a indução com IPTG (Tempo de indução-Ti).

Purificação da proteína recombinante por IMAC

O sedimento foi ressuspenso em 10 mL de Tampão Fosfato de Sódio 20 mM + NaCl 0,5 M (tampão de lavagem e equilíbrio) . Em gelo a amostra foi submetida a um ciclo de sonicação por 1 minuto e repouso de 4 minutos (etapa repetida por 4 vezes). Esse processo permitiu a lise bacteriana e o lisado foi, então centrifugado a 8.000 xg/10 minutos. O sobrenadante do lisado foi utilizado para purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade a metal. Para isso, o lisado foi incubado com 2 mL da resina de Níquel previamente tratada com Tampão de Lavagem por 30 minutos em homogeneizador para tubos tipo Carrossel. Feito isso foi realizada a lavagem com Tampão de Lavagem (Fosfato de Sódio 20 mM+ NaCl 0,5 M+Imidazol 70mM) por quatro vezes. A eluição da proteína ligada à resina foi realizada com a aplicação de 4 mL de Tampão de Eluição (Fosfato de Sódio 20 mM+NaCl 0,5 M+Imidazol 1M) por meio da incubação por 1 hora em Carrossel. O material eluído foi dialisado contra 1 litro de tampão salina tamponada com fosfato (PBS) por 16 horas.

Remoção de Lipopolissacarídeos (LPS) em coluna de Polimixina-B

Para a remoção de conteúdo de LPS da amostra de Trx todas as soluções foram preparadas com material apirogênico e os procedimentos realizados em ambiente estéril. A metodologia utilizada foi baseada em protocolo fornecido pelo fabricante (Thermo Scientific). A coluna de polimixina foi previamente preparada, através de centrifugação de 500 xg/1 minuto para retirada do álcool.

Foram transferidos 9 mL de NaOH 0,2M mantidos em posição vertical a temperatura ambiente por 18 horas. Em seguida, a coluna foi centrifugada a 500 xg/1 min. a solução coletada por centrifugação e o sobrenadante

descartado. O mesmo procedimento foi repetido e em seguida, a coluna foi lavada com PBS. Ao final, a amostra contendo a Trx foi adicionada à coluna e realizada a incubação por 1 hora.

Após esse procedimento a coluna foi centrifugada a 500 xg/1 min. e o volume contendo a Trx livre de LPS foi coletado. Novamente foram acrescentados 2 mL de PBS à coluna e realizada a centrifugação. O material foi coletado e armazenado.

Remoção de Lipopolissacarídeos (LPS) pelo detergente Triton X-114

Para 1 mL da Trx foram acrescentados 100 µL do Triton seguida de homogeneização com auxílio de micropipeta. A amostra foi incubada em gelo por 30 minutos, com agitações em vórtex a cada 10 minutos. Após esse procedimento, a amostra foi incubada em banho maria 37°C/5 minutos seguida de centrifugação por 13.000 rpm/5 minutos. A solução no tubo tornou-se bifásica e foi retirada a fase aquosa contendo a Trx de maneira cuidadosa. Esse processo foi repetido por 6 vezes de acordo com o protocolo previamente estabelecido no laboratório. A amostra de Trx foi dialisada contra 1 litro de PBS, sob agitação por 18 horas e posteriormente estocada a 4° C.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

SDS-PAGE (*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*). O gel de SDS-PAGE foi utilizado diversas vezes para identificar o perfil eletroforético da Trx.

As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 15% sob condições redutoras com tampão de amostra redutor (2,5 % DTT; 350 mM de Tris/HCl; 10% de SDS; 30% de glicerol; 1,2 mg de azul de bromofenol; 9,3% de 2-mercaptoetanol) fervidas no banho seco à 99°C por 5 minutos. As amostras obtidas foram aplicadas no gel e submetidas às seguintes condições de corrida: 110V, 55mA por 3 horas. Após a eletroforese os géis foram corados com azul de Coomassie R-250¹³ e o marcador molecular das amostras foi o Page Ruler.

Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

Foi utilizado o método de dosagem de proteínas proposto por Marion Bradford (1976), que é um método rápido e sensível. Onde o reagente *Comassie Brilliant Blue B-250* se associa as macromoléculas da proteína e os aminoácidos associados ao reagente, se excitam e absorvem o feixe de luz emitido a 595 nm pelo espectrofotômetro¹⁴. Foi feita a diluição seriada em duplicata, avaliando a Curva de calibração realizada com Albumina de Soro Bovino (BSA). A curva padrão foi iniciada com a amostra de BSA na concentração de 1 mg/ml. As amostras foram diluídas com PBS e em concentrações diferentes em placa de 96 poços na razão pura, 1:5 e 1:10, (volume final de 50 µL/poço). Foram acrescentados 150 µL do reagente de Bradford (SIGMA) em cada poço. Em seguida, as placas foram lidas em espectrofotômetro utilizando o filtro de 595 nm.

Quantificação de proteínas através do Nanodrop

Os espectrofotômetros requerem um volume de amostra muito grande e curvas de calibração. O nanodrop é capaz de analisar concentrações proteicas a 280nm em volumes de amostras de 0,5-2,0 µL¹⁵. Assim, analisamos a concentração proteica nas diferentes amostras de Trx utilizando esse equipamento. Para isso, solução PBS foi usada como calibrador do equipamento considerando que as amostras de Trx foram dialisadas e diluídas nessa solução. Foram analisadas as amostras: Trx pós-diálise; Trx livre de LPS pelo método de Polimixina e Trx livre de LPS utilizando o método de incubação com Triton X-114.

Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos machos com 7-8 semanas da linhagem BALB/c, obtidos no biotério Central do Instituto Butantan. O uso dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais - Instituto Butantan (CEUAIB) nº 993/12.

Os animais foram mantidos no biotério do laboratório. No dia -7 foi realizada a pesagem de todos os animais para preparo da bolsa de ar e cálculo

da solução anestésica (quetamina 80 mg/kg e xilasina 10 mg/kg). No dia -3 foi realizada uma nova pesagem dos animais para a anestesia dos mesmos.

Modelo de Bolsa de ar

Nos dias -7 e -3 foi aplicada anestesia previamente calculada, como citado acima, no peritônio como descrito por Nakamura e colaboradores (2001)¹⁶, após surtir o efeito da anestesia. A bolsa de ar foi induzida pela injeção subcutânea de 4 mL de ar estéril.

Indução de Infiltrado Leucocitário

No dia 0 os animais foram separados em grupos (n=5). Dois grupos experimentais receberam 1µg/2mL de LPS na bolsa de ar e 300 µL de Trx (40 µg) ou PBS no plexo retroorbital. Dois outros grupos receberam 2 mL de PBS na bolsa de ar e 300 µL de Trx (40 µg) ou PBS no plexo retroorbital (controles negativos). Após 4 horas, 1mL de PBS foi injetado na bolsa de ar e em seguida os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Em seguida, o volume contido na bolsa de ar foi coletado com o auxílio de pipeta Pasteur, colocado em tubo cônico e mantido em gelo.

Contagem total de leucócitos

A concentração das células no lavado da bolsa de ar foi determinada em câmara de Neubauer. Para tanto, as amostras foram diluídas na razão 1:2 com Azul de Tripán 0,2%. Essa amostra foi transferida pra câmara de Neubauer e realizada a leitura para contagem total de Leucócitos em microscópio ótico (Nikon) com objetiva de aumento de 40 vezes.

Contagem do Diferencial de Leucócitos

A partir da contagem total foram realizados os cálculos para preparo das lâminas para análise diferencial das populações celulares. Para isso, 4×10^4 células foram submetidas à centrifugação em CytoSpin (500 xg/5 minutos) em lâminas. Após a secagem das lâminas, estas foram coradas pelo método

Panótico Rápido e analisado no microscópio óptico com objetiva de aumento 100x com auxílio do óleo de imersão¹⁷.

Resultados

Produção e purificação da tiorredoxina

O vetor pET-32 (Figura 1) é utilizado na clonagem de sequências de peptídeos fusionadas ao complexo proteína-tiorredoxina 109aa Trx·Tag, fazendo com que haja altos níveis de expressão e que a proteína seja solúvel.

Assim sendo, utilizamos este vetor para obter a proteína de interesse, Trx, o pET-32 possui a região promotora T7 que é reconhecida pela T7 RNA polimerase do fago λ , o gene desta polimerase encontra-se inserido no cromossomo das bactérias designadas como DE3 sob controle do promotor *lacI*¹⁸ que foi induzido pelo IPTG, o que induziu a bactéria a expressar a proteína recombinante. A expressão da Trx foi realizada em bactéria *E.coli* BL21 (DE3) pLys à 37° C. Em cada etapa da expressão da Trx assim como após a purificação, amostras foram coletadas para a análise em gel de SDS-PAGE 15%.

Na Figura 2 observa-se a presença de uma banda com massa molecular entre 12 e 20 KDa (Trx) que pode ser observada no gel em menor intensidade na amostra T0 e em maior intensidade, após a indução com IPTG(Ti). Após a expressão da proteína na linhagem bacteriana descrita acima, seguiu-se para o processo de purificação desta á partir do extrato bacteriano, utilizando a cromatografia de afinidade em resina de Níquel-sepharose. A proteína recombinante, mostrou-se solúvel e após a determinação da concentração proteica por Bradford e Nanodrop foi observada a produção de 24,25 mg/250 mL de cultura. Para a obtenção da Trx livre de LPS, foram avaliados dois métodos, afinidade à Polimixina-B e incubação com Triton X-114. Após os procedimentos, as amostras de Trx obtidas foram analisadas em gel SDS-PAGE 15% como mostra a Figura 2. Ainda na Figura 2 pode ser observado que os procedimentos realizados não interferiram na integridade da proteína visto que o perfil eletroforético se manteve tanto na amostra antes dos

procedimentos como nas amostras livres de LPS. Após a determinação do conteúdo proteico nas amostras obtidas foi verificado que o protocolo de utilização da polimixina resultou em perda de 24,5 % da Trx. No entanto, a dosagem proteica da amostra de Trx submetida à incubação com Triton X-114 foi maior que a da amostra de pré-incubação, sugerindo que resíduos de Triton X-114 na amostra podem ter interferido nas análises. Considerando esses resultados, a amostra de Trx obtida após incubação com polimixina foi manipulada em esterilidade e utilizada nos procedimentos seguintes.

Efeito da Trx sobre o influxo Leucocitário induzido pelo LPS

Para avaliar a atividade da Trx sobre o influxo leucocitário, foi utilizado o modelo de bolsa de ar induzida no dorso de camundongos. Para tanto, a Trx ou PBS foi injetado via endovenosa em camundongos e imediatamente após, uma amostra de LPS diluída em PBS estéril foi injetada na bolsa de ar. Como controle negativo, PBS ou Trx foi injetado via endovenosa e PBS foi injetado na bolsa de ar de camundongos. Após 4 horas, os animais receberam 1 mL de PBS na bolsa de ar, massageados e em seguida eutanasiados em câmara de CO₂. Através de um pequeno corte no dorso do animal, foi retirado o lavado da bolsa e a partir desse material realizada a contagem total e diferencial das células inflamatórias. Como pode ser observado na Figura 3A, o LPS induziu o influxo leucocitário ($68 \times 10^5/\text{mL}$) na bolsa de ar dos camundongos em relação ao obtido na bolsa de ar dos camundongos injetados somente com PBS ($24,5 \times 10^5/\text{mL}$). Portanto, o LPS induziu aumento de 3 vezes no número de células em relação ao PBS. Por outro lado, os animais que receberam a injeção de LPS no dorso e Trx endovenosa apresentaram migração leucocitária de $23 \times 10^5/\text{mL}$ o que mostra que em comparação ao controle positivo (LPS) a Trx foi eficaz em inibir a migração leucocitária em até 3 vezes. Na figura 3B, foram avaliadas as populações leucocitárias migradas para a bolsa de ar dos grupos de camundongos. Tendo em vista que os neutrófilos respondem pela população encontrada em maior quantidade na corrente sanguínea, essas células, quando no tecido se mostraram elevadas em todos os grupos em comparação as outras populações encontradas.

A contagem do diferencial de células revelou que os camundongos que receberam LPS no dorso apresentaram neutrofilia em comparação aos que receberam PBS. Já os camundongos tratados com a Trx, conseguiram conter a migração de neutrófilos para a bolsa de ar estimulada com LPS, em relação ao grupo salina/LPS. Os resultados mostraram ainda que os animais que receberam LPS tiveram menor número de linfócitos e macrófagos em relação aos outros grupos experimentais. A população de linfócitos se mostrou elevada nos camundongos que receberam LPS na bolsa de ar e Trx endovenosa em comparação aos animais não tratados com Trx ou que receberam PBS na bolsa de ar. Os camundongos que receberam LPS na bolsa de ar, os tratados e os não tratados com Trx endovenosa, apresentaram uma diminuição de eosinófilos quando comparados aos animais que receberam PBS na bolsa de ar. As populações celulares como macrófago, linfócito e eosinófilo, não conseguiram estabelecer relação do efeito anti-inflamatório da Trx, como o neutrófilo conseguiu.

Discussão

A produção das espécies reativas de oxigênio (EROS) é parte integrante do organismo aeróbio e está inserida em diversas condições fisiológicas.

Sendo assim, as EROS possuem importante papel nas funções biológicas, como a fagocitose, momento em que essas espécies são produzidas para eliminação do patógeno. EROS são moléculas de oxigênio que possuem um elétron desemparelhado em sua camada orbital externa.

Essas moléculas são capazes de colidir com outras moléculas, retirando os elétrons dessas substâncias, alterando sua conformidade molecular¹⁹. Os principais tipos de EROS são Radical Superóxido (O_2^-); Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2); Radical hidroxila e Oxigênio Singlete (O_2^1).

Tem-se um interesse grande pelas EROS, por estas estarem ligadas a inúmeras doenças como resposta inflamatória sistêmica, transplante de órgãos, insuficiência cardíaca e respiratória, entre outros²⁰. No entanto, altas concentrações de EROS podem resultar em danos celulares e teciduais.

Para o controle dessas situações, proteínas antioxidantes exercem papel fundamental na manutenção da homeostasia²¹⁻²². Dentre essas proteínas, a tioredoxina apresenta cerca de 12 KDa e exerce sua função antioxidante de maneira tiol-dependente, possuindo um sítio conservado, com cisteínas em suas extremidades (Cys-Gly-Pro-Cys)¹⁰. Além disso, achados na literatura tem descrito a ação anti-inflamatória da Trx, segundo Nakamura e colaboradores (2001)¹⁶ níveis elevados de Trx na circulação, interferem na quimiotaxia dos neutrófilos para o local da lesão. Resultados preliminares já conseguiram relatar seu auxílio em lesões por isquemia.

Nesse sentido, foi produzida a Trx bacteriana e avaliado o seu efeito sobre o influxo leucocitário induzido pelo LPS em modelo de bolsa de ar em camundongos. Os protocolos de expressão e purificação aqui utilizados permitiram a obtenção da Trx na forma solúvel e com alto rendimento.

Considerando que a Trx foi produzida em bactérias e que o conteúdo de LPS nestas amostras podem induzir ativação do sistema imune ou ainda levar à choque endotóxico, realizamos a eliminação das endotoxinas nas amostras de Trx. Os resultados permitiram verificar que os protocolos utilizados não alteraram a integridade da Trx, o que possibilitaram a realização dos experimentos *in vivo*. Os resultados aqui obtidos, conseguiram reforçar o que relata a literatura. Uma vez que a Trx se mostrou eficiente tanto para ação antioxidante quanto para o efeito anti-inflamatório.

Conclusões

Os resultados obtidos sugerem que apesar da Trx bacteriana apresentar potencial anti-inflamatório como o observado com a Trx humana, apesar de ambas apresentarem baixa homologia. Além disso, esses resultados abrem novas perspectivas de estudo do mecanismo de ação desta proteína em outros modelos de inflamação aguda resultante de excessivo estresse oxidativo que acarreta inúmeras doenças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mayer AS, Averhoff P, Zychlinsky A. How do neutrophils and pathogens interact? *Current Opinion in Microbiology* 2004;7(1):62-6.
2. Kobayashi SD, Jovanka MV, Frank RD. Regulation of the neutrophil mediated inflammatory response to infection. *Microbes and Infection* 2003;5(14):1337-44.
3. Silva DC, Cerchiaro G, Monório KM. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. *Química Nova* 2011;34(2):300-5.
4. Sbarra AJ, Karnovsky ML. The biochemical basis of phagocytosis: I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 1959;234(6):1355-62.
5. Orr A.L, Lohse L.A, Drew K.L, Hermes-Lima M. Physiological oxidative stress after arousal from hibernation in Arctic ground squirrel. *Comparative Biochemistry and Physiology part A: molecular and integrative Physiology* 2009;153(2):213-21.
6. Lima YAR, Domingos FC, Jesuíno RSA. Estudo da proteína tioredoxina na resposta ao estresse oxidativo em *Paracoccidioides brasiliensis*. Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC; junho 2006; Santa Catarina, Brasil. Florianópolis: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Iniciação científica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás/UFG.
7. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine* 2001;31(11):1286-312.
8. Meyer Y, Buchanan BB, Reichheld JP. Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annual Review of Genetics* 2009;43:335-67.
9. Laurent TC, Moore EC, Reichard P. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides, IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *The Journal of Biological Chemistry* 1964;239(10):3436-44.
10. Bertini R, Howard OM, Dong HF, Oppenheim JJ, Bizzarri C, Sergi R, *et al.* Thioredoxin, a Redox Enzyme Released in Infection and Inflammation, Is a Unique Chemoattractant for Neutrophils, Monocytes, and T Cells. *Journal of Experimental Medicine* 1999;189(11):1783-9.

11. LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. New York Biotechnology Association 1993;11(2):187-93.
12. Liu ZQ, Yang PC. Construction of pET-32 α (+) expression vector and protein purification. North American Journal of Medical Sciences 2012;4(12):651-5.
13. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature Publishing Group 1970;227(5259):680-5.
14. Marion MB. A rapid and sensitive method for the quantification microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry 1975;72(1):248-54.
15. Desjardins P, Hansen JB, Allen M. Microvolume protein concentration determination using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer. Journal of Visualized Experiments 2009;4(33):1610.
16. Nakamura H, Herzenberg LA, Bai J, Araya S, Kondon N, Nishinaka Y, et al. Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis. Proceedings of the National Academy of Sciences 2001;98(26):15143-8.
17. Arouca ME, Miranda LB, Lopes RS, Takahira RK, Kohayagawa A, Ciarlini PC, et al. Valores hematológicos de capivaras (*Hydrochoerus Hydrochaeris*) criadas em cativeiro no município de Botucatu, SP. Ciência Rural 2000;30(5):813-17.
18. Novagen. Vectors pET-32 a-c (+). [citado 09 de Abril 2014]. Disponível em: <http://biochem.web.utah.edu/hill/links/pET32.pdf>.
19. Valdez LB, Bustamante SLAJ, Alvarez S, Costa LE, Boveris A. Free radical chemistry in biological systems. Biological Research 2000;33(2):65-70.
20. Júnior DRA, Souza RB, Santos AS, Andrade DR. Os Radicais livres de Oxigênio e Doenças Pulmonares. Jornal brasileiro de Pneumologia 2005;31(1):60-8.

21. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova* 2007;30(5):1323-38.

22. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408(6809):239-47.

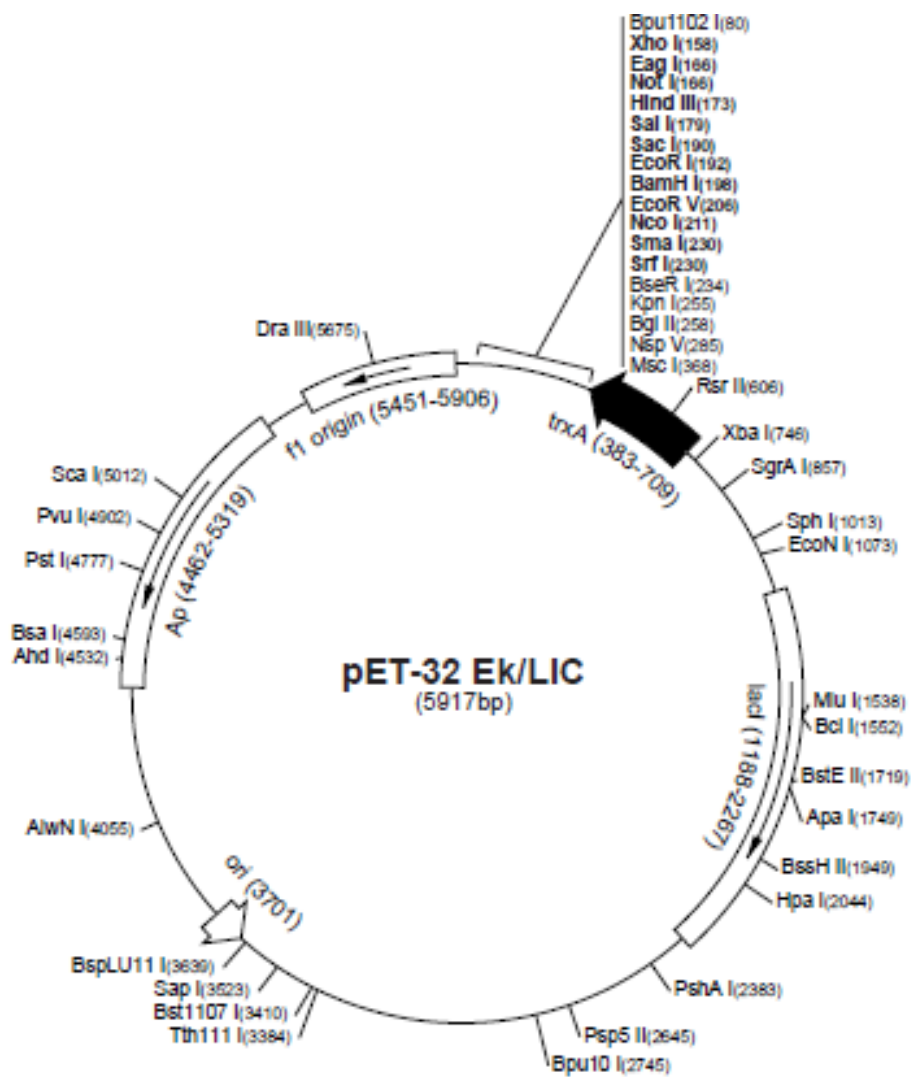


Figura 1 – Esquema do vetor pET-32 com seus sítios de clonagem e resistência. Proteína de fusão Tiorredoxina, identificada pela seta preta¹⁹.

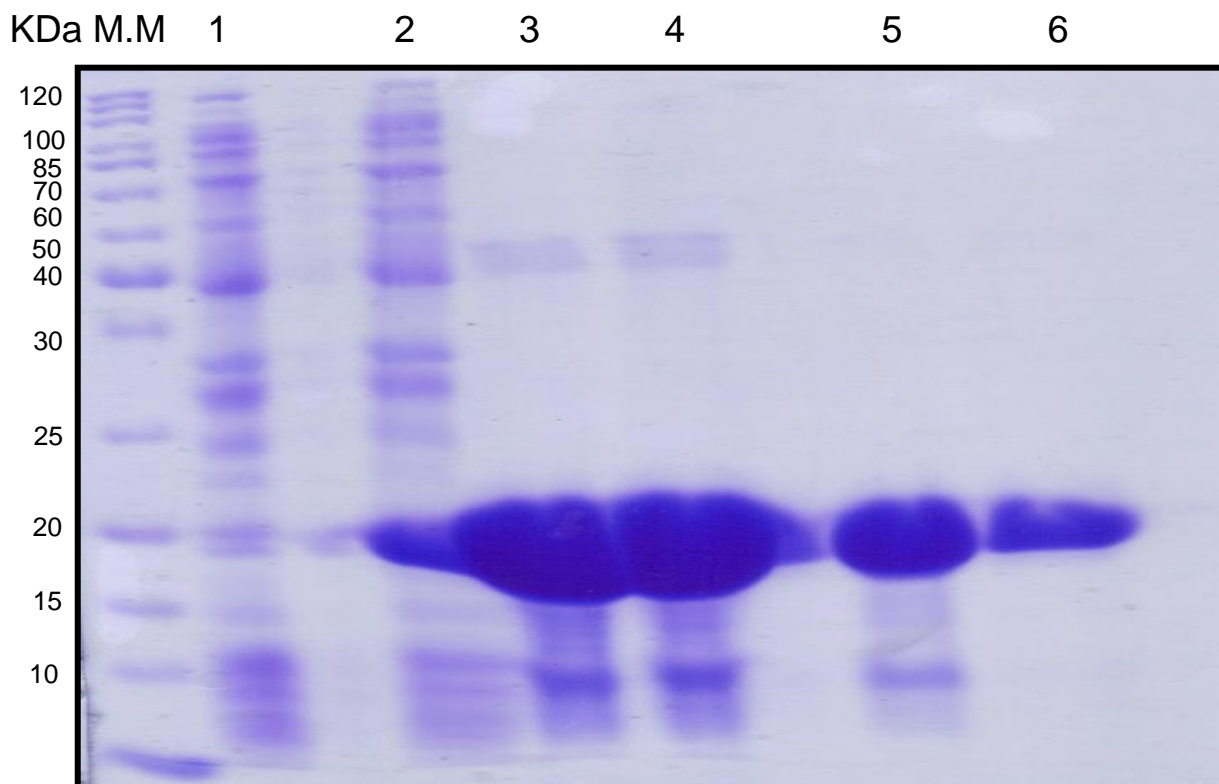


Figura 2 – Amostras de Trx antes e após a eliminação do LPS. MM – marcador molecular; 1 – T0, extrato bacteriano antes da indução com IPTG; T1, extrato bacteriano após indução com IPTG; 3 – Trx antes do processo de remoção de LPS; 4 – Trx após o processo de remoção de LPS com o detergente Triton-X114; 5 e 6– Trx após o processo de remoção de LPS em coluna de Polimixina – B. SDS – PAGE 15% condições de corrida: 110V, 55mA por 3 horas, gel foi corado com Azul de Comassie R-250¹³.

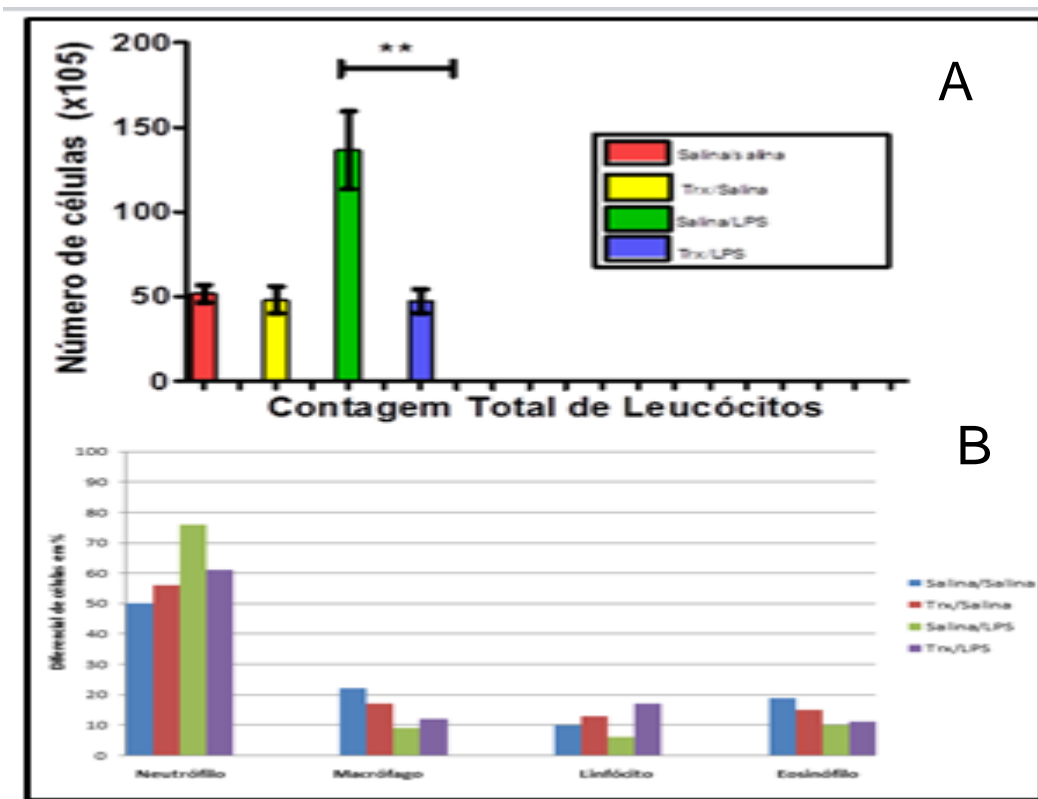


Figura 3. Influxo leucocitário em bolsa de ar em camundongos BALB/c.

A- Contagem de leucócitos no lavado da bolsa de ar em camundongos injetados com LPS ou PBS e que receberam Trx ou PBS via endovenosa. O influxo leucocitário foi avaliado após 4 horas da injeção do LPS e determinado pela contagem em câmara de Neubauer em microscópio ótico. Os resultados foram expressos como a média do número de células obtidos em 5 animais/grupo \pm desvio padrão. ** $p < 0,05$ grupo LPS comparado ao grupo LPS que recebeu Trx iv.

B- Porcentagem das diferentes populações celulares no lavado inflamatório obtido nas bolsas de ar de cada grupo experimental. Lâminas contendo 4×10^4 células dos lavados inflamatório foram coradas com álcool, eosina e hematoxilina e utilizadas para contagem diferencial de um total de 100 células.