

NETS: A CONTRIBUIÇÃO DAS HISTONAS NO COMBATE A INFECÇÕES E À SUPER-RESISTÊNCIA BACTERIANA

SANTANA, Maria Caroline Vivan¹; GODOY, Sara Mataroli de²

Palavras-chave: Armadilhas extracelulares de neutrófilos. Microbicida. Resistência antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

A descoberta de antibióticos estagnou, enquanto a resistência bacteriana aumenta, causando infecções letais. Por essa razão, é urgente desenvolver novas estratégias antimicrobianas, explorando mecanismos naturais de defesa para criar abordagens terapêuticas inovadoras (Doolin et al., 2020; Duong et al., 2020). Neste contexto encontram-se os neutrófilos, células do sistema imunológico que atuam como primeira linha de defesa contra patógenos, cuja ação se dá por três mecanismos distintos: fagocitose, degranulação e liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs – Neutrophil Extracellular Traps) (Zharkova et al., 2019).

NETs são grandes estruturas extracelulares semelhantes a teias, compostas por proteínas granulares montadas em arranjos de cromatina (DNA) descondensada, as quais prendem, neutralizam e matam bactérias, fungos, vírus e parasitas, prevenindo sua disseminação (Negreros; Flores-Suárez, 2021). A NETose (liberação das NETs), inicialmente vista como morte celular dos neutrófilos, pode ser de três tipos: suicida, vital e mitocondrial. Na suicida, ocorre a morte celular e liberação de NETs; na vital, as NETs são liberadas sem morte; e na mitocondrial, apenas o DNA mitocondrial é liberado (Borregaard, 2010; Yipp; Kubes, 2013; Yousefi et al., 2009).

As NETs são compostas de finas fibras de cromatina decoradas com cerca de 30 proteínas de neutrófilos, enzimas de origem granular e histonas nucleares (Ortmann; Kolaczowska, 2017). Dentre esses componentes, as histonas, pequenas proteínas nucleares inicialmente descritas como empacotadoras de DNA, se destacam. Nos nucleossomos, as histonas interagem com ácidos nucleicos devido à

¹ Acadêmica do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. santvivancaroline@gmail.com

² Professora Doutora do curso de Biomedicina da Faculdade de Apucarana – FAP. godoy.sm@hotmail.com

X Congresso Multidisciplinar/ XVIII Fórum Científico/ IV Simpósio Internacional da FAP/ 2024 - Apucarana, PR

sua carga positiva, controlando a transcrição do DNA (Moiana et al., 2021; Szatmary et al., 2018). No entanto, também estão presentes no citoplasma, membranas celulares e fluido extracelular, atuando na defesa do hospedeiro e promovendo respostas inflamatórias (Li et al., 2022). Sendo hidrofóbicas e catiônicas, formam estruturas α -helicoidais anfipáticas, compartilhando características dos peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPS), o que as torna importantes componentes antimicrobianos das NETs (Agak et al., 2021).

OBJETIVO

O trabalho visa elucidar o papel da carga positiva das histonas em suas propriedades microbidas, ampliando o entendimento da resposta imunológica e contribuindo para novas abordagens terapêuticas no combate a infecções.

METODOLOGIA

Este trabalho é uma revisão narrativa, que sintetiza literatura diversificada e que se faz importante para ensinar, identificar lacunas e orientar pesquisas futuras (Sukhera, 2022). Para atender o objetivo proposto nesse estudo foram utilizadas as seguintes palavras-chaves e operadores booleanos: ("Antimicrobial" OR "Anti-Infective Agents") e "Histones" e ("extracellular traps" OR "Neutrophil extracellular traps" OR "Netosis") e ("Anti-Infeciosos" AND "Histonas" AND "Extracellular Traps"). As buscas foram realizadas nas bases de dados: Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), PubMed e Portal de Periódicos da CAPES, utilizando como critérios de inclusão: artigos em Inglês e Português que tenham sido publicados nos últimos 6 anos. Como critério de exclusão, não foram selecionados textos não revisados por pares (peer review). Após realizadas as buscas, foram selecionados os artigos que contribuíam significativamente para construção do “estado da arte” sobre o tema proposto.

DESENVOLVIMENTO

A ação antibacteriana das histonas foi observada pela primeira vez em 1942 (Duong et al., 2020) e, com a descoberta das NETs, a ação microbida dessas proteínas passou a ser investigada. As histonas H2A, H3 e H4, por exemplo, mostraram atividade anti-estafilocócica a partir de diferentes mecanismos, como

danos à membrana com formação de bolhas e poros ou perturbação celular sem alterações morfológicas evidentes (Pietrocola et al., 2019). Também a interação das histonas H2A, H2B, H3 e H4 com os lipopolissacarídeos, sugere atividade antibacteriana mediada pela ligação à membrana celular (Li et al., 2022).

Ainda que o mecanismo exato pelo qual as histonas eliminam bactérias nas NETs não esteja completamente claro, sabe-se que a interação das histonas com membranas celulares depende da sua carga, pois, ao passo que essas cargas são bloqueadas, há redução da atividade antimicrobiana do DNA (Doolin et al., 2020; von Köckritz-Blickwede; Winstel, 2022). Histonas ricas em arginina, por exemplo, perturbam diretamente a membrana bacteriana devido à sua carga positiva, ligando-se preferencialmente a fosfolipídios aniônicos, como cardiolipina e fosfatidilserina, mas não a fosfolipídios zwitteriônicos, como fosfatidilcolina (Stobernack et al., 2018; Szatmary et al., 2018).

Afim de demonstrar o funcionamento das NETs, Song et al. (2019) criaram microteias (microwebs) antimicrobianas sintéticas de DNA-histona inspiradas em NETs para capturar *Escherichia coli*. As microteias sintéticas com diferentes concentrações de histonas (25%, 40%, 50% e 57%) foram testadas, e as microteias carregadas positivamente capturaram mais bactérias que as neutras ou negativamente carregadas (Song et al., 2019). Também foi observado que algumas células de *E. coli* encolheram e perderam a integridade da membrana. Desta maneira, os autores concluíram que o aprisionamento bacteriano por microteias depende da interação eletrostática entre a parede celular bacteriana e histonas catiônicas, sendo maior a captura de bactérias quanto maior for a fração de histonas (Song et al., 2019).

Também Yang et al. (2023) desenvolveram biomateriais que mimetizam as NETs, com uma formulação bioquímica que replica seus principais componentes, incluindo as enzimas antimicrobianas elastase de neutrófilos (NE) e mieloperoxidase (MPO). Os resultados mostraram que as histonas danificaram a parede celular bacteriana, distorcendo-as em formas filamentosas.

Sabe-se que a histona H4 medeia a atividade antimicrobiana através da destruição da membrana celular (Agak et al. 2021). Esta ação pode ser explicada pela atividade da sua extremidade N-terminal (H4n). Lee et al. (2021) expuseram que a porção N-terminal da histona H4 derivada de NETs tem a capacidade de gerar curvatura gaussiana negativa (NGC) em membranas lipídicas. Tal curvatura resulta

da dobra da membrana em direções opostas (semelhante à uma sela de cavalo), o que leva à permeação da membrana e formação de poros, culminando na morte celular. Além disso, a presença de colesterol aumenta essa capacidade, intensificando a morte celular lítica conforme o conteúdo desse lipídeo aumenta (Lee et al., 2021).

Um estudo realizado por Doolin et al. (2020) mostra que, ao contrário da H4n, que pode formar poros, a H2A não possui essa capacidade. Em vez disso, a H2A parece aumentar a formação de poros mediada pelo peptídeo antimicrobiano (AMP) LL-37, que é derivado da catelicidina humana. Os pesquisadores sugeriram que a histona H2A pode afetar os gradientes de íons através da membrana celular, impactando a produção de ATP. Usando um sensor óptico de prótons (PROPS), observaram que células tratadas com H2A e os AMPs LL-37 ou Polimixina B (PMB) exibiram maior fluorescência, indicando que a H2A provoca despolarização intensa da membrana e rompe a força próton-motriz, comprometendo a produção de energia celular (ATP). Embora a formação de poros mediada apenas por AMPs tenha um impacto bactericida significativo, o estudo evidencia que as bactérias podem se recuperar dessa ação. Contudo, quando H2A e AMPs atuam juntos, a morte das bactérias é sinérgica e irreversível (Doolin et al., 2020).

Além de despolarizar o potencial de membrana e aumentar os efeitos da formação de poros, a histona H2A mata bactérias em conjunto com AMPs reorganizando o DNA cromossômico bacteriano e reprimindo sua transcrição (Doolin et al., 2020). A entrada de histonas, por meio dos poros, desregula a função das proteínas H-NS, responsáveis pela estrutura e regulação cromossômica bacteriana (Duong et al., 2020, 2021). Como resultado, as bactérias são incapazes de manter a expressão de genes que são essenciais para o crescimento, duplicação, e reparo dos poros da membrana. A inibição transcricional também suprime genes que poderiam fornecer resistência a AMPs e histonas, incluindo bombas de fluxo de drogas e componentes modificadores de carga de membrana (Duong et al., 2020).

CONCLUSÃO

As NETs, estruturas liberadas pelos neutrófilos, têm papel crucial na defesa contra patógenos, prendendo, neutralizando e matando microrganismos invasores. A carga positiva das histonas nas NETs causa danos às membranas bacterianas e inibe genes essenciais à sua sobrevivência. Compreender esses mecanismos

naturais pode oferecer novas alternativas terapêuticas e auxiliar no combate a bactérias resistentes, enfrentando a crescente crise global de resistência antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

- AGAK, G. W. et al. Extracellular traps released by antimicrobial TH17 cells contribute to host defense. **Clin Invest**, v. 131, e141594, 2021.
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, p. 657-670, 2010.
- DOOLIN, T. et al. Mammalian histones facilitate antimicrobial synergy by disrupting the bacterial proton gradient and chromosome organization. **Nat. Commun.**, v. 11, p. 3816-3888, 2020.
- DUONG, L. et al. A novel antibacterial strategy: Histone and antimicrobial peptide synergy. **Microbial Cell**, v. 7, p. 309-311, 2020.
- DUONG, L. et al. Developing antimicrobial synergy with AMPs. **Front. Med. Technol.**, v. 3, 640981, 2021.
- LEE, M. W. et al. Apolipoprotein mimetic peptide inhibits neutrophil-driven inflammatory damage via membrane remodeling and suppression of cell lysis. **ACS Nano**, v. 15, p. 15930-15939, 2021.
- LI, X. et al. Histones: the critical players in innate immunity. **Front. Immunol.**, v. 13:1030610, 2022.
- NEGREROS, M.; FLORES-SUÁREZ, L. F. A proposed role of neutrophil extracellular traps and their interplay with fibroblasts in ANCA-associated vasculitis lung fibrosis. **Autoimmun Rev**, v. 20, 102781, 2021.
- ORTMANN, W.; KOLACZKOWSKA, E. Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation. **Cell Tissue Res.**, v. 371, p. 473-488, 2018.
- PIETROCOLA, G. et al. Fibronectin-binding protein B (FnBPB) from *Staphylococcus aureus* protects against the antimicrobial activity of histones. **J. Biol. Chem.**, v. 294, p. 3588-3602, 2019.
- SONG, Y. et al. Antimicrobial microwebs of DNA–Histone inspired from neutrophil extracellular traps. **Adv Mater.**, v. 31, e1807436, 2019.
- STOBERNACK, T. et al. A secreted bacterial peptidylarginine deiminase can neutralize human innate immune defenses. **mBio**, v. 9, e01704-18, 2018.
- SUKHERA, J. Narrative Reviews: flexible, rigorous, and practical. **J. Grad. Med. Educ.**, v. 14, p. 414-417, 2022.
- SZATMARY, P. et al. Biology, role and therapeutic potential of circulating histones in acute inflammatory disorders. **J Cell Mol Med.**, v. 22, p. 4617-4629, 2018.
- von KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M.; WINSTEL, V. Molecular prerequisites for neutrophil extracellular trap formation and evasion mechanisms of *Staphylococcus aureus*. **Front Immunol**, v. 13, 836278, 2022.
- YANG, T. et al. Synthetic neutrophil extracellular traps dissect bactericidal contribution of NETs under regulation of α -1-antitrypsin. **Sci Adv.**, v. 9, eadf2445, 2023.
- YIPP, B. G.; KUBES, P. NETosis: how vital is it? **Blood**, v. 122, p. 2784-2794, 2013.
- YOUSEFI, S. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell Death Differ**, v. 16, 1438-1444, 2009.
- ZHARKOVA, O. et al. A flow cytometry-based assay for high-throughput detection and quantification of neutrophil extracellular traps in mixed cell populations. **Cytometry A**, v. 95, p. 268–278, 2019.