

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUÍS ALBERTO SOUTO SOARES DE SOUSA

REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DO RECEPTOR NUCLEAR PPAR POR LIPÍDEOS
EXTRAÍDOS DE FEZES DE CAMUNDOGOS SOB DIETA NORMAL E HIPERLIPÍDICA

BRASÍLIA

2021

LUÍS ALBERTO SOUTO SOARES DE SOUSA

REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DO RECEPTOR NUCLEAR PPAR POR LIPÍDEOS
EXTRAÍDOS DE FEZES DE CAMUNDOGOS SOB DIETA NORMAL E HIPERLIPÍDICA

Trabalho apresentado ao curso de graduação em
Farmácia da Universidade de Brasília, como
requisito parcial para aprovação na disciplina de
Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Santos

BRASÍLIA

2021

LUÍS ALBERTO SOUTO SOARES DE SOUSA

REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DO RECEPTOR NUCLEAR PPAR POR LIPÍDEOS
EXTRAÍDOS DE FEZES DE CAMUNDOGOS SOB DIETA NORMAL E HIPERLIPÍDICA

Trabalho apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como
requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso.

Aprovado em 29 de outubro de 2021.

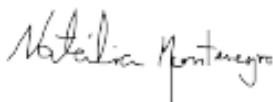
Banca de avaliação



Prof. Guilherme Martins Santos – Universidade de Brasília



Dr. Kaian Amorim Teles – Universidade de Brasília



Ma. Natália de Aguiar Montenegro – Universidade de Brasília

RESUMO

O estudo sobre as espécies que compõem a microbiota intestinal é cada vez mais amplo e importante, já que a mesma está relacionada com o desfecho fenotípico. Recentemente, observou-se que metabólitos da microbiota intestinal tem um papel na regulação da sinalização inflamatória e no sistema imune. Dentre esses metabólitos, lipídeos de cadeia curta já foram isolados e caracterizados *in vivo* como reguladores de diversas vias de sinalização celular. Assim, surge a hipótese de que tais metabólitos possam ter potencial terapêutico, possivelmente através da modulação de receptores nucleares (RN), que são proteínas chave na regulação do metabolismo celular. Aqui, usamos ensaios de gene repórter para observar se extratos fecais de lipídeos positiva e negativamente carregados podem modular a ação do receptor dos proliferadores peroxissomais (PPARs, alfa e gama), que possuem grande impacto na clínica médica, assim como o receptor glicocorticóide (GR). O extrato normolipídico apresentou, na concentração 400 µg/mL, um efeito antagonista mais proeminente que o hiperlipídico sobre os receptores testados, PPAR γ e PPAR α . Os extratos lipídicos das rações não tiveram atividade estatisticamente relevante na ativação dos receptores na concentração avaliada. Os resultados do estudo indicam que metabólitos da microbiota intestinal de camundongos podem modular PPAR α e PPAR γ . Os extratos fecais, e não os extratos da dieta, inibiram a atividade transcricional dos receptores quando estimulados com agonistas totais, possivelmente caracterizando o efeito de agonismo parcial. Espera-se que estes resultados contribuam para o avanço dos estudos sobre a relação dos metabólitos da microbiota intestinal e fisiologia celular, com potencial aplicação terapêutica.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTABELECIMENTO DE CURVA DOSE RESPOSTA	12
FIGURA 2 – CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE HFS DIMINUEM ATIVAÇÃO DO RECEPTOR PPAR ALFA	13
FIGURA 3 – CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE HFS DIMINUEM ATIVAÇÃO DO AGONISTA BEZAFIBRATO	13
FIGURA 4 – HFS DEMONSTRA DIMINUIR EFEITO DA ATIVAÇÃO DO AGONISTA BEZAFIBRATO	14
FIGURA 5 – HFS E NFS ANTAGONIZAM ATIVAÇÃO DO AGONISTA ROSIGLITAZONA DEMONSTRANDO POSSÍVEL AGONISMO PARCIAL EM PPAR GAMA	15
FIGURA 6 – EFEITOS DOS EXTRATOS NO GR NÃO DEMONSTRAM RELEVÂNCIA ESTATÍSTICA	16

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3. METODOLOGIA.....	8
3.1 TRANSFORMAÇÃO, CRESCIMENTO E PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS	8
3.2 EXTRAÇÃO LIPÍDICA DE AMOSTRA FECAL E DA RAÇÃO.....	9
3.3 CULTURA CELULAR	10
3.4 ENSAIO DE TRANSFECCÃO E GENE REPÓRTER.....	10
4. RESULTADOS	11
4.1 EFEITO DOS EXTRATOS NORMAL E HIPER LIPÍDICOS (NORMAL-FAT STOOL E HIGH-FAT STOOL) NO RECEPTOR PPAR ALFA	11
4.1.1 ESTABELECIMENTO DE CURVA DOSE RESPOSTA.....	11
4.1.2 CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE HFS DIMINUEM ATIVAÇÃO DO RECEPTOR PPAR ALFA	12
4.1.4 HFS DEMONSTRA DIMINUIR EFEITO DA ATIVAÇÃO DO AGONISTA BEZAFIBRATO	14
4.2 EFEITO DOS EXTRATOS NORMAL E HIPER LIPÍDICOS (NFS E HFS) E DIETAS NORMAL E HIPER-LIPÍDICAS (HFD E NFD) NO RECEPTOR PPAR GAMA	14
4.2.1 HFS E NFS ANTAGONIZAM ATIVAÇÃO DO AGONISTA ROSIGLITAZONA DEMONSTRANDO POSSÍVEL AGONISMO PARCIAL EM PPAR GAMA.....	15
4.3 EFEITO DOS EXTRATOS NORMAL E HIPER LIPÍDICOS (NFS E HFS) E DIETAS NORMAL E HIPER LIPÍDICAS (HFD E NFD) NO RECEPTOR GLICOCORTICÓIDE (GR)	16
4.3.1 EFEITOS DOS EXTRATOS NO GR NÃO DEMONSTRAM RELEVÂNCIA ESTATÍSTICA.....	16
5. DISCUSSÃO	17
6. CONCLUSÃO.....	19
7. REFERÊNCIAS	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DBD DNA Binding Domain

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO Dimetilsufóxido

GR Glicocorticóide

HeLa Células de câncer de colo uterino humano

LBD Ligand Binding Domain

PBS Solução salina tamponada com fosfato

PPAR Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais

RN Receptor Nuclear

SFB Soro Fetal Bovino

UAS Upstream Activating Sequence

1. INTRODUÇÃO

O trato intestinal possui diversas espécies de microrganismos, que formam o que é conhecido como microbiota intestinal. Sabe-se que a microbiota possui importante papel na determinação do fenótipo do indivíduo e está relacionada com algumas funções do sistema imune (CHERVONSKY A, 2009) (SHREINER AB et al, 2015). Apesar dos avanços na compreensão do impacto da microbiota intestinal sobre a fisiologia celular, ainda há lacunas no conhecimento sobre os mecanismos de ação das bactérias nas possíveis vias de sinalização molecular.

A disbiose consiste em qualquer mudança na composição qualitativa e quantitativa das colônias bacterianas que residem no intestino. (TURNBAUGH et al., 2006). Essa condição pode ser consequência de diversas enfermidades, como obesidade, doença de Crohn, colite ulcerosa e diabetes (PETERSEN C., ROUND J. L., 2014). Além disso, a microbiota intestinal pode ser profundamente modificada pela dieta, conforme observado em indivíduos sob dieta rica em gordura (TURNBAUGH et al., 2006).

Recentemente, observou-se que metabólitos provenientes da microbiota intestinal, principalmente lipídeos, têm a capacidade de regular diferentes via de sinalização (COHEN LJ. et al, 2017). Esse estudo sugere que a microbiota intestinal possa ser capaz de produzir pequenas moléculas com potencial terapêutico. É plausível que, assim como a composição da microbiota, os metabólitos produzidos também sejam sujeitos a diversas variações e, através da interação com determinados receptores presentes no intestino, modulem o desfecho inflamatório. (SERINO, 2012; KASER A et al., 2010).

A família de receptores nucleares (RN) é composta por fatores de transcrição regulados por ligantes lipofílicos. (EVANS RM, BARISH GD, WANG YX., 2004). Essa família possui grande relevância clínica, com ligantes sendo utilizados no tratamento de diversas doenças, como o glicocorticoide e estrogênio. Alguns desses RN são considerados sensores lipídicos e têm participação na homeostase energética, como é o caso dos receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) (EVANS RM, BARISH GD, WANG YX., 2004).

Os PPARs apresentam-se em três subtipos, codificados por diferentes genes, PPAR alfa, gama e beta/delta (LAUDET V. 1992). O PPAR α é expresso no intestino (MICHALIK L, 2006), e sua ativação está correlacionada com o metabolismo de lipoproteínas e melhora da sensibilidade insulínica (LEFEBVRE P et al., 2006, KIM H et al., 2003).

Essas características do receptor, seu uso clínico já estabelecido no controle inflamatório, sua afinidade com moléculas lipídicas e os achados que indicam influência de tais moléculas lipídicas na modulação da microbiota intestinal, reforçam a hipótese de que o PPAR tenha papel importante no mecanismo de sinalização entre microbiota e intestino. (COHEN LJ et al., 2017).

O PPAR gama possui duas isoformas expressas pelo mesmo gene (ZHU Y. et al, 1995). Uma das diferenças entre PPAR γ 1 e PPAR γ 2 é que a primeira é abundantemente expressa em diferentes tipos celulares como tecido adiposo, cardíaco e também no intestino grosso, enquanto PPAR γ 2 tem sua expressão limitada ao tecido adiposo. Além disso, (VIDAL-PUIG A.J. et al, 1997, WANG L et al. 2014).

Além do PPAR, o receptor de glicocorticoide (GR) possui grande importância no desfecho inflamatório e resposta imune (KADMIEL M., CIDLOWSKI J.A., 2013) e é expresso em diversos tecidos. Sua presença no intestino e sua já estabelecida importância como alvo farmacológico no âmbito clínico fez com que o mesmo fosse considerado como uma das possíveis vias de sinalização analisadas no presente projeto.

Dessa forma, a exemplo do já observado para receptores acoplados a proteína G (COHEN LJ et al., 2017), a identificação de metabólitos, principalmente lipídeos, com ação sobre receptores nucleares, é fundamental para a compreensão dos diversos efeitos da microbiota intestinal sobre a fisiologia celular e patogenia de uma grande variedade de doenças.

Sendo assim, decidimos investigar a ação de extratos fecais de lipídeos positiva e negativamente carregados provenientes de camundongos alimentados com diferentes dietas, nos receptores previamente listados. Os lipídeos positiva e negativamente carregados são assim chamados devido à carga que eles adquirem durante espectrometrias de massa, ou seja, a carga só está presente no momento da análise de espectroscopia. (REIS, A. et al. 2013)

A escolha de investigar tais lipídeos em específico, envolve seu método de extração, uma vez que a metodologia nesse caso é relativamente mais simples do que a padronizada para outros tipos, além de não envolver lipídeos estruturalmente mais frágeis, como é o caso dos lipídeos de cadeia curta, por exemplo. (REIS, A. et al. 2013)

Hipotetizamos que, fisiologicamente, os diferentes lipídeos provenientes da ação do metabolismo gastrointestinal e sua microbiota, em suas diferentes concentrações, promovem

diferentes interações com os receptores nucleares; e que os presentes ensaios possam sugerir a natureza de tais interações, assim como os próximos passos para mais profunda investigação, incluindo análises do conteúdo do extrato, sua toxicidade e também seu efeito em outros receptores. O esclarecimento de tal mecanismo, acompanhado de estudos em âmbito clínico, pode estabelecer novas funções terapêuticas para os receptores nucleares, já tradicionais alvo farmacológicos.

2. OBJETIVOS

Investigar a presença de interações entre receptores nucleares e moléculas lipídicas positiva e negativamente carregadas no ambiente intestinal; analisando os efeitos extratos lipídicos provenientes das dietas dos animais, assim como do material fecal de camundongos expostos a dietas normolipídicas e hiperlipídicas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a extração lipídica de material fecal proveniente de camundongos expostos à dietas com alto teor lipídico, com teor lipídico normal e como controle, das próprias dietas;
- Ensaio de gene repórter com GAL4 PPAR alfa, GAL4 PPAR gama e GR em células de mamíferos tratadas com os extratos.

3. METODOLOGIA

3.1 TRANSFORMAÇÃO, CRESCIMENTO E PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

A transformação foi feita em células E.Coli (DH5 α), com os plasmídeos hGR, GAL4 PPAR alfa e GAL4 PPAR gama, previamente tratadas com cloreto de cálcio, tornando-as competentes para absorção de DNA exógeno.

As células foram retiradas da refrigeração -80°C , descongeladas no gelo, e tratadas com uma amostra contendo 100ng de DNA plasmidial, e incubadas no gelo por 30 minutos. Posteriormente foi realizado choque térmico no banho-maria a 42°C por 1 minuto e 30

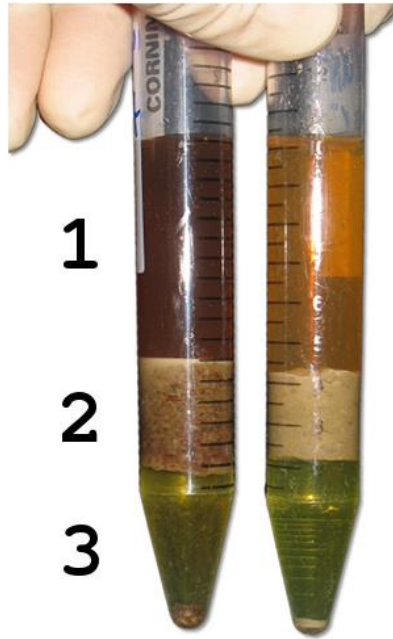
segundos. Em seguida, voltaram a ser incubadas no gelo por 2 minutos. Logo após, foram adicionados 500 µL de meio Lúria Bertani (LB) e a amostra foi incubada a 37°C, por uma hora. Ao fim da incubação, 200 µL do meio contendo a amostra foram plaqueados em meio ágar contendo ampicilina (60 µg/mL), a que o plasmídeo confere resistência. A placa foi incubada novamente por 16 horas, a 37°C.

A ampliação das células DH5α foi efetuada com a inoculação de uma das colônias da placa em um tubo contendo 5mL de meio LB com ampicilina (60 µg/mL), por 16 horas a 37°C. Posteriormente, a solução foi transferida para um erlenmeyer com 500mL de meio LB com ampicilina (60 µg/mL) novamente por 16 horas a 37°C. As bactérias foram pelletadas por centrifugação a 6000 x g por 15 minutos.

Por fim, a extração e purificação dos plasmídeos foi realizada com o kit maxi-prep QIAGEN de acordo com as recomendações do fabricante.

3.2 EXTRAÇÃO LIPÍDICA DE AMOSTRA FECAL E DA RAÇÃO

O protocolo de extração lipídica foi adaptado de acordo com o utilizado por KRAUS et al., 2015. Amostras de feze, provenientes de camundongos expostos a dietas hiperlipídicas e normalipídicas durante um período de 15 semanas, assim como a ração, foram coletadas e pesadas. Em seguida, elas foram masseradas, e utilizou-se uma solução salina NaCl 0,9%, e clorofórmio em metanol (volume 2:1) para solubilizar a amostra. Posteriormente, é feita centrifugação a 1000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente, resultando numa solução trifásica onde o clorofórmio concentra os lipídeos da amostra, por fim a extração do clorofórmio ocorre com seringas hipodérmicas descartáveis de 10mL e agulhas LL 0,70x25 22G 1". O mesmo processo foi feito com as rações dos camundongos. Tal processo resultou em extratos na concentração padrão de 400 µL/mL, uma vez que a mesma foi estabelecida. O resultado foi uma solução trifásica, similar ao demonstrado na imagem publicada por KRAUS et al., 2015:



Fonte: KRAUS et al., 2015

3.3 CULTURA CELULAR

Células HeLa (adenocarcinoma cervical humano) foram cultivadas em placas de cultura de 75 cm² em meio de cultura DMEM pH 7,4 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; *Meio MEM modificado por Dulbecco*) estéril suplementado com 10 % de SFB (Soro Fetal Bovino), 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 100 UI/mL PCN (Penicilina) e 100 µg/mL SN (estreptomicina), e mantidas em incubadoras a 37°C com 5% de CO₂.

3.4 ENSAIO DE TRANSFEÇÃO E GENE REPÓRTER

Células HeLa foram tripsinizadas e coletadas por meio de centrifugação (2000 x g por 5 minutos), e ressuspensas em meio de cultura DMEM pH 7,4 estéril não suplementado com SFB, e foram semeadas em placas de 48 poços (20.000 células por poço, contadas através de um contador de células manual). Após 16 horas a transfecção foi realizada utilizando lipofectamina (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent, da marca Termofisher) após a preparação de duas soluções. A primeira contendo DNA plasmidial numa proporção de 1:4

entre receptor nuclear e seu elemento responsivo (60ng e 240ng) e, além disso, 25 µL de DMEM por poço utilizado, e a segunda solução contendo 0,5µL de lipofectamina e 75µL de DMEM por poço. A primeira solução foi homogeneizada na segunda. O resultado da homogeneização foi um mix que foi incubado por 20 minutos na temperatura ambiente. Posteriormente, 100µL do mix de soluções foi pipetado em cada poço.

Após 6 horas da administração do mix de soluções, o meio de cultura foi removido e as células receberam tratamento com meio de cultura, veículo (DMSO), controle positivo referente ao receptor nuclear e o extrato fecal hiperlipídico e normolipídico. 20 horas depois, as células foram lisadas com 100µL de tampão de lise (100mM tris e 0,2% triton, pH 7,4) por poço, 10µL foram transferidos para um eppendorf onde foi adicionado mais 20µL de luciferina, dessa forma, as unidades relativas de luz (URL) são quantificadas através de um luminômetro GloMax 20/20. (YIMING CHEN et al., 2015)

A taxa de ativação foi calculada pela divisão entre os valores de emissão de luz referentes às células tratadas com extrato sobre os valores das células tratadas com o veículo. A análise estatística foi feita através do método ANOVA, através do software PRISM 6.

4. RESULTADOS

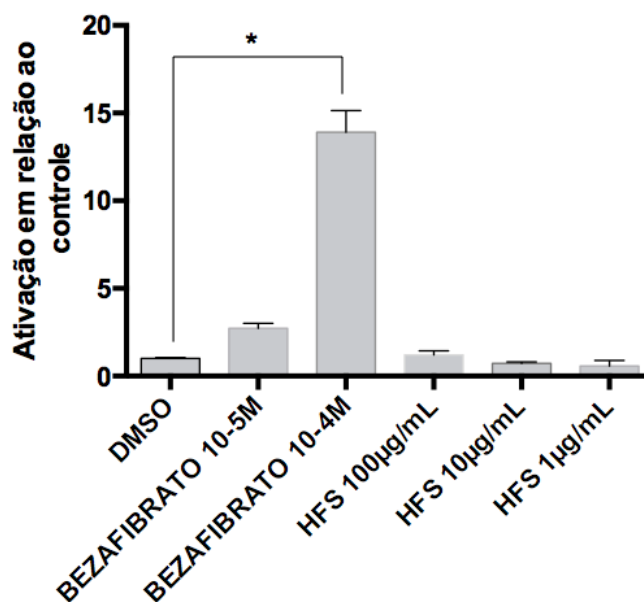
4.1 EFEITO DOS EXTRATOS NORMAL E HIPER LIPÍDICOS (NORMAL-FAT STOOL E HIGH-FAT STOOL) NO RECEPTOR PPAR ALFA

Investigou-se a resposta dos receptores PPAR alfa em células HeLa através da administração de concentrações crescentes dos extratos normo e hiperlipídico. Os resultados das transfecções demonstraram sensibilidade dos receptores às diferentes concentrações dos extratos, tendo sido estabelecida a concentração de 400ug/mL como padrão no terceiro experimento.

4.1.1 ESTABELECIMENTO DE CURVA DOSE RESPOSTA

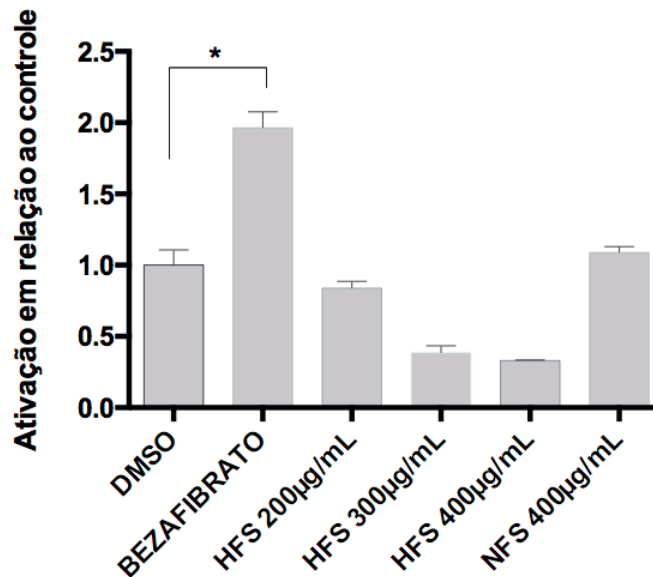
Figura 1. Efeito de concentrações crescentes de extrato hiperlipídico fecal (HFS) em células HeLa transfectadas com PPAR alfa. Nesse experimento, o agonista total bezafibrato foi utilizado como controle positivo, e houve diferença significativa entre a ativação entre as

células tratadas com ele e com o controle DMSO, demonstrando o funcionamento adequado do experimento. As concentrações utilizadas não apresentam qualquer modulação significativa em relação ao controle ou entre elas. Possivelmente, tal efeito ocorreu pois as concentrações não foram altas o suficiente. Assim, foi estabelecida a concentração mínima de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para ensaios seguintes. Por fim, a concentração de bezafibrato foi estabelecida em 10^{-4} mol/L.



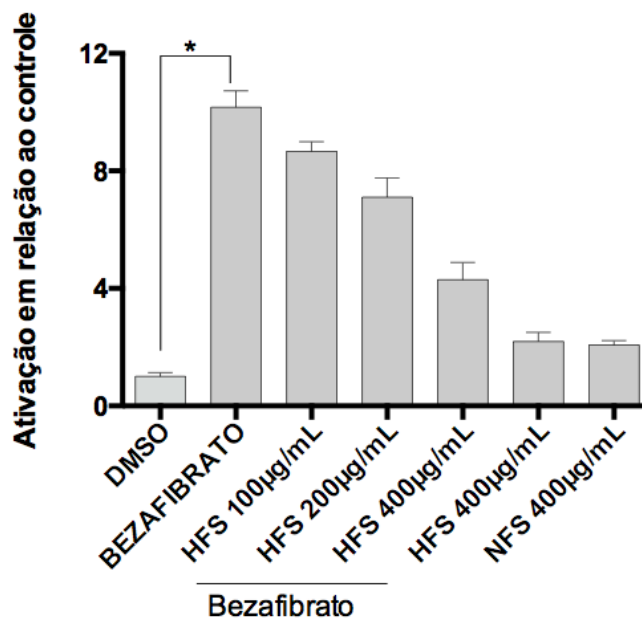
4.1.2 CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE HFS DIMINUEM ATIVAÇÃO DO RECEPTOR PPAR ALFA

Figura 2. Efeito de concentrações crescentes de extrato hiperlipídico fecal (HFS) e normolipídico fecal (NFS) em células HeLa transfectadas com PPAR alfa. Nesse ensaio, optou-se por tratar as células com concentrações de no mínimo 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$, tendo em vista que o experimento anterior não apresentou diferenças significativas na ativação quando utilizadas concentrações de até 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$. O declínio da resposta com o aumento progressivo da concentração do extrato hiperlipídico fecal sugere possível sensibilidade do PPAR alfa aos extratos. Este foi o primeiro experimento que também utilizou extrato normolipídico, apenas como controle, na concentração mais elevada (400 $\mu\text{L}/\text{mL}$). A diferença entre a ativação das células tratadas com extrato hiperlipídico e normolipídico foram o primeiro indício de que possível diferença no efeito deles no PPAR alfa.



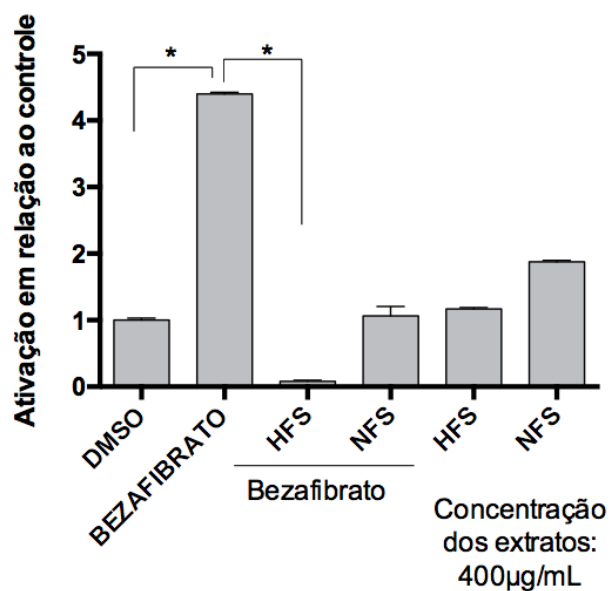
4.1.3 CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE HFS DIMINUEM ATIVAÇÃO DO AGONISTA BEZAFIBRATO

Figura 3. Efeito de concentrações crescentes de extrato hipelipídico fecal (HFS) e extrato normolipídico fecal (NFS) em células HeLa transfectadas com PPAR alfa. Neste experimento, é importante destacar que as diferentes concentrações dos extratos foram administradas junto com o agonista total, possibilitando a avaliação da combinação dos compostos. O resultado indicou correlação de concentrações crescentes com a diminuição da ativação do receptor, levantando a hipótese de um possível agonismo total por parte do extrato hiperlipídico fecal. Foi estabelecida a concentração 400µg/mL para ensaios seguintes. crescentes têm correlação com a diminuição da ativação do receptor. Foi estabelecida a concentração 400µg/mL para ensaios seguintes.



4.1.4 HFS DEMONSTRA DIMINUIR EFEITO DA ATIVAÇÃO DO AGONISTA BEZAFIBRATO

Figura 4. Efeito de 400µg/mL de extrato hiperlipídico fecal (HFS) e normolipídico fecal (NFS) em células HeLa transfectadas com PPAR alfa. Este, que foi o último experimento realizado com PPAR alfa no presente projeto, demonstra importante diferença entre os extratos fecais e o agonista total, sugerindo possível interferência na ação do agonista total por parte dos extratos. Além disso, a diferença entre nas respostas entre os extratos fecais, tanto com o agonista total quanto sem, sugere a existência de diferentes interações entre os mesmos, modulando o PPAR alfa de forma variada.



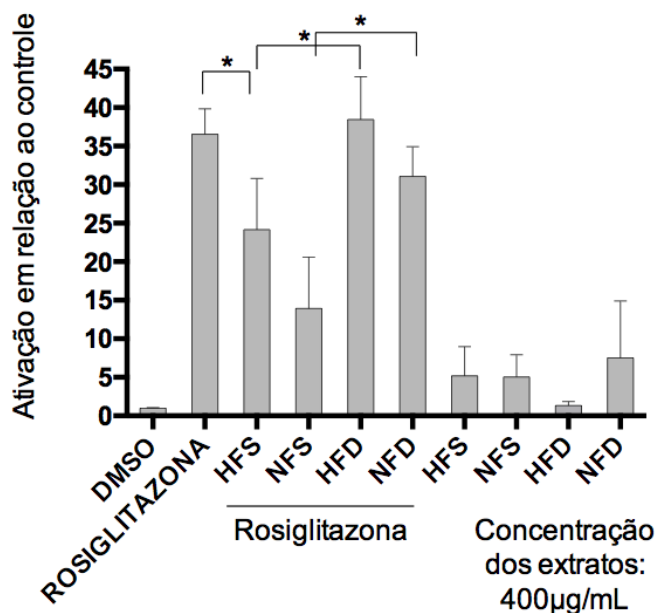
4.2 EFEITO DOS EXTRATOS NORMAL E HIPER LIPÍDICOS (NFS E HFS) E DIETAS NORMAL E HIPER-LIPÍDICAS (HFD E NFD) NO RECEPTOR PPAR GAMA

Investigou-se, também, a resposta dos receptores PPAR gama em células HeLa através da administração de concentrações crescentes dos extratos normo e hiperlipídico. Além disso, os experimentos com PPAR gama foram executados com as dietas dos camundongos. Os

resultados destas transfecções também demonstraram sensibilidade dos receptores às diferentes concentrações dos extratos, além de sugerir que os efeitos provém das amostras fecais e não das dietas.

4.2.1 HFS E NFS ANTAGONIZAM ATIVAÇÃO DO AGONISTA ROSIGLITAZONA DEMONSTRANDO POSSÍVEL AGONISMO PARCIAL EM PPAR GAMA

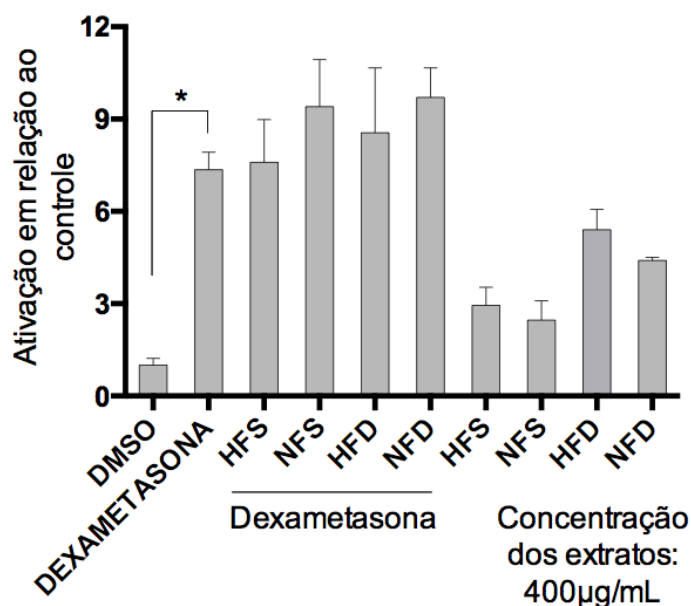
Figura 5. Efeito de 400µg/mL de extrato hiperlipídico fecal (HFS), normolipídico fecal (NFS) dieta hiperlídica (HFD) e dieta normolipídica (NFD) em células HeLa transfectadas com PPAR gama. O presente experimento foi feito em três ocasiões diferentes, permitindo avaliar diferenças estatísticas de forma mais eficiente que os ensaios anteriores. O presente ensaio, possivelmente pela maior responsividade do agonista total em relação ao controle DMSO, expressou mais claramente as interações por parte dos extratos fecais, e não dos da dieta, na ativação promovida pela rosiglitazona. Esse efeito também pode ser explicado por uma maior afinidade entre os lipídeos dos extratos com o PPAR gama, ainda que o resultado corrobore com as especulações geradas pelos ensaios com o PPAR alfa. As diferenças existentes nas respostas dos extratos fecais sugerem, assim como os ensaios da Figura 2 e Figura 4, diferença da interação entre o conteúdo dos mesmos e o receptor testado.



4.3 EFEITO DOS EXTRATOS NORMAL E HIPER LIPÍDICOS (NFS E HFS) E DIETAS NORMAL E HIPER LIPÍDICAS (HFD E NFD) NO RECEPTOR GLICOCORTICÓIDE (GR)

4.3.1 EFEITOS DOS EXTRATOS NO GR NÃO DEMONSTRAM RELEVÂNCIA ESTATÍSTICA

Figura 6. Efeito de 400µg/mL de extrato hiperlipídico fecal (HFS), normolipídico fecal (NFS) dieta hiperlipídica (HFD) e dieta normolipídica (NFD) em células HeLa transfectadas com GR. O presente ensaio foi feito em duas ocasiões diferentes e repetiu o modelo padronizado pelos ensaios feito com PPAR gama. O agonista dexametasona apresentou diferença estatisticamente relevante quando comparado com o controle DMSO. Entretanto, não foi possível verificar diferenças estatísticas entre as respostas tratadas com diferentes extratos lipídicos, sugerindo que, o receptor glicocorticóide não é tão sensível à ação dos extratos como foram os PPAR.



5. DISCUSSÃO

A microbiota intestinal compõe um sistema que influencia a fisiologia humana através de diversos mecanismos, tornando a análise de sua composição um importante alvo de estudos, cada vez mais numerosos e específicos. Para analisar os extratos, as transfecções foram feitas com híbridos GAL4 UAS. Tal processo constitui-se em inserções de dois plasmídeos nas células. Um deles contém o domínio de ligação do ligante (LBD) do receptor de interesse junto com o domínio do DNA (DBD) do GAL4, enquanto o outro contém GAL 4 UAS junto com o gene repórter. Sendo assim, uma vez que o LBD do receptor de interesse interage com alguma molécula que o ative, ocorre a formação do complexo GAL 4 DBD-RN-LBD. Esse complex, por sua vez, interage com a sequência promotora (UAS) do segundo plasmídeo, estimulando a transcrição do gene repórter. (PAGUIO A. et al., 2010; CHEN T. et al., 2003).

O mecanismo de funcionamento dos ensaios e seus resultados indicam que metabólitos dos microrganismos que residem no trato intestinal de camundongos são possíveis moduladores do PPAR, já que apenas os extratos fecais, e não os da ração, diminuíram a atividade transcricional dos receptores quando administrados junto à agonistas totais. Entretanto, é importante ressaltar que ensaios de transfecção e gene repórter tem suas limitações, principalmente pois seu mecanismo não ocorre no ambiente do núcleo celular, descartando a influência da cromatina.

A Figura 1 teve importância devido ao estabelecimento do que viria ser a concentração padronizada dos ensaios posteriores, tendo em vista que seus resultados mostraram que concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL eram baixas demais para apresentar diferença na ativação dos receptores.

As Figuras 2, 3 e 4, indicam influência por parte do extrato fecal hiperlipídico na ativação do PPAR alfa. A Figura 3, em específico, com sua resposta decrescente conforme o aumento das concentrações de extrato, demonstra um indício de que os lipídeos podem agir como agonistas parciais. Uma ação de agonismo parcial por parte dos lipídeos presentes nos extratos seria importante, pois corroboraria com a hipótese de que é através de receptores nucleares que a microbiota modula a resposta imune intestinal.

A Figura 5 possui efeitos mais visíveis, não somente por ter sido feita em ter sido feito três ocasiões, mas também pois a ativação promovida pelo agonista total do PPAR gama foi

maior que o do PPAR alfa. Sendo assim, as diferenças estatísticas presentes na Figura 5 sugerem, com maior robustez, que os extratos fecais, e não os da dieta, modulam o PPAR gama. Esse possível agonismo parcial corroboraria com os ensaios anteriores, constituindo outro indício de que os lipídeos passam por alterações no ambiente intestinal que os levam a interagir com receptores nucleares, já que a reação na ocorre da mesma forma com as rações.

A Figura 6 indicou que as ações moduladores vistas nos ensaios anteriores não são visíveis no receptor glicocorticoide, dada a falta de diferença estatisticamente relevante entre a ativação de células tratadas com o agonista dexametasona e as células tratadas com o agonista e os diferentes extratos. Sendo assim, hipotetizamos que esse último resultado demonstra falta de interação direta entre os lipídeos dos extratos e os receptores, da forma que ocorreu com o PPAR.

A hipótese de que a modulação dos níveis de expressão poderia estar sendo ocasionada pela toxicidade do extrato foi posteriormente descartada através de ensaios MTT realizados pelo grupo. Além disso, ensaios como a análise de transcriptoma global, realizada através de RNA-seq, foram posteriormente efetuados pelo grupo, com intuito de estabelecer os efeitos do extratos na atividade do receptor do tipo Toll 4 (TRL4). Tais ensaios corroboram com a ideia de que diferentes concentrações lipídicas e diferentes tipos de moléculas presentes nos extratos são importantes na regulação do sistema e imune. As concentrações também foram posteriormente analisadas através de ensaios de lipidômica, que demonstraram maiores concentrações de lipídeos relacionados à apoptose e necroptose nos extratos fecais quando comparados aos extratos das dietas, assim como menores concentrações de lipídeos relacionados a tumores.

Mais estudos são necessários para verificar a reprodutibilidade dos resultados, como ensaios *in vivo*, por exemplo. Espera-se que os resultados contribuam para estudos mais extensos, também relacionados às interações entre metabólitos da microbiota intestinal e receptores endógenos.

6. CONCLUSÃO

Ainda que o conteúdo dos extratos de lipídeos positiva e negativamente carregados possua centenas de diferentes lipídeos em sua composição, o agonismo parcial exercido pelas amostras fecais em relação às dietas demonstra a importância de tais moléculas na regulação metabólica. Sendo assim, maiores estudos da possível interferência no processo inflamatório por parte dos metabólitos da microbiota intestinal podem esclarecer o funcionamento desse sistema. Em conclusão, o presente projeto sugere a necessidade de ensaios clínicos *in vivo*, tendo em vista a possível elucidação de novos mecanismos de sinalização, que possam ser utilizados de forma terapêutica.

7. REFERÊNCIAS

1. CHEN T. et al. Coactivators in assay design for nuclear hormone receptor drug discovery. **Assay Drug Dev Technol.** v.1, 2003.
2. CHERVONSKY A. Innate receptors and microbes in induction of autoimmunity. **Curr Opin Immunol** v.21, p.641-647, 2009.
3. COHEN LJ. et al. Commensal bacteria make GPCR ligands that mimic human signaling molecules. **Nature** v.549, p.48-53, 2017.
4. EVANS RM, BARISH GD, WANG YX. PPARs and the complex journey to obesity. **Nat Med** v.10(4), p.355-61, 2004.
5. FOLCH J, LEES M, STANLEY GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol Chem.** v.1, p. 497-509, 1957.
6. KADMIEL, M., & CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends in Pharmacological Sciences** v.34(9), p.518-530, 2013.
7. KASER A, ZEISSIG S, BLUMBERG RS. Inflammatory bowel disease. **Annu Rev Immunol** v.28, p.573-621, 2010.
8. KIM H. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist treatment in a transgenic model of type 2 diabetes reverses the lipotoxic state and improves glucose homeostasis. **Diabetes**, v.52(7), p.1770-8, 2003.
9. KRAUS D. et al. Lipid Extraction from Mouse Feces. **Bio-protocol**, v.5, e1375, 2015.
10. LAUDET V. et al. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. **EMBO J** v.11, p.1003-1013, 1992.

11. LEFEBVRE P. et al. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. **J Clin Invest** v.116(3), p.571-80, 2006.
12. MICHALIK L. et al. International Union of Pharmacology. Peroxisome proliferator-activated receptors. **Pharmacol Rev** v.58(4), p.726-41, 2006.
13. OAKLEY RH, CIDLOWSKI JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. **J Biol Chem.** v,286, p.3177–3184, 2011.
14. PAGUIO A. et al. Improved dual-luciferase reporter assays for nuclear receptors. **Curr Chem Genomics.** v.4, p. 43-49, 2010.
15. PETERSEN C., ROUND J. L. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. **Cell. Microbiol** v.16, p.1024–1033, 2014.
16. PETERSON DA, FRANK DN, PACE NR, GORDON JI. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Cell Host Microbe** v.3, p.417-427,2008.
17. SERINO M, CHABO C, BURCELIN R. Intestinal MicrobiOMICS to define health and disease in human and mice. **Curr Pharm Biotechnol** v.12, p.746-758, 2012.
18. SHREINER AB et al. The Gut Microbiome in Health and in Disease. **Current opinion in gastroenterology** v.31.1, p.69-75, 2015.
19. REIS, A. et al. A comparison of five lipid extraction solvent systems for lipidomic studies of human LDL. **Journal of lipid research** v. 54,7, p. 1812-1824, 2013.
20. THAISS, C. A. et al. Persistent microbiome alterations modulate the rate of post-dieting

weight regain. **Nature** v.540, p.544-551, 22 December. 2016.

21. TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature** v.444, p.1027–1031, 2006.

22. VIDAL-PUIG A.J. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. **J Clin Invest** v.99, p.2416-2422, 1997.

23. WANG L. et al. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): A review. **Biochem. Pharmacol** v.92, p.73-89, 2014.

24. YIMING CHEN et al. Luciferase Reporter Gene Assay on Human 5-HT Receptor: Which Response Element Should Be Chosen? **Scientific Reports** v. 5, 2015.

25. ZHU Y. et al. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. **Proc Natl Acad Sci USA** v.92, p.7921-7925, 1995