

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

**NATÁLIA DE AGUIAR MONTENEGRO**

**METABÓLITOS LIPÍDICOS DE MICROBIOTA INTESTINAL PARA TRATAMENTO  
DE SÍNDROME METÁBOLICA**

**BRASÍLIA, DF**  
**2024**

**NATÁLIA DE AGUIAR MONTENEGRO**

**METABÓLITOS LIPÍDICOS DE MICROBIOTA INTESTINAL PARA  
TRATAMENTO DE SÍNDROME METÁBOLICA**

**Orientador: Prof. Guilherme Martins Santos**

**Tese de doutorado apresentada  
como requisito à obtenção do título  
de Doutor em Patologia Molecular pelo  
Programa de Pós-Graduação em Patologia  
Molecular da Universidade de Brasília.**

**BRASÍLIA, DF**

**2024**

**NATALIA DE AGUIAR MONTENEGRO**

**BRASÍLIA, 2024**

**METABÓLITOS LIPÍDICOS DE MICROBIOTA INTESTINAL PARA  
TRATAMENTO DE SÍNDROME METÁBOLICA**

**Tese de doutorado apresentada  
como requisito à obtenção do título  
de Doutor em Patologia Molecular pelo  
Programa de Pós-Graduação em Patologia  
Molecular da Universidade de Brasília**

---

**Ana Carolina Migliorini Figueira**

---

**Andreza Fabro de Bem**

---

**Christian Hoffmann**

---

**Francisco de Assis Rocha Neves**

## Resumo

A diversidade da microbiota é essencial para a homeostase metabólica do hospedeiro. Os mecanismos que conectam a microbiota intestinal à obesidade e doenças metabólicas associadas destacaram o potencial do transplante fecal de microbiota (TFM) como estratégia terapêutica. No entanto, a transferência de organismos patogênicos e resistentes limita o seu potencial terapêutico. Como alternativa ao TFM, os metabólitos da microbiota surgem como uma estratégia promissora. Dentre esses metabólitos, a classe lipídica desempenha um papel importante na modulação dos efeitos metabólicos do hospedeiro. Neste estudo, utilizamos o modelo de obesidade induzida por dieta rica em gordura (HFD) para investigar o efeito de um extrato fecal (NL) de camundongos alimentados com dieta normolipídica (CD) no peso corporal, na homeostase da glicose e no perfil lipídico. Após 3 semanas de tratamento com NL, os camundongos obesos não apresentaram alterações no peso corporal, na tolerância à glicose ou na sensibilidade à insulina. No entanto, de forma inesperada, o NL atenuou a doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica (MASLD) induzida por HFD, conforme indicado pela histologia hepática e quantificação de triglicerídeos. A análise lipidômica revelou grupos de lipídios presentes apenas em NL, que potencialmente podem estar envolvidos na atenuação da doença hepática. Análises em modelos celulares mostraram que o NL pode afetar a viabilidade celular, a regulação da atividade do receptor nuclear PPAR $\gamma$  e a diferenciação de adipócitos. Esses resultados sugerem que o NL possui moléculas que são potenciais ligantes de receptores nucleares, como o PPAR $\gamma$ , regulando assim importantes vias inflamatórias.

Em anexo a este trabalho, desenvolvido paralelamente ao dos metabólitos lipídicos de microbiota intestinal, apresento dados do estudo sobre a expressão e reconstituição do octâmero de histonas humanas recombinantes. Trabalho fundamental para a continuidade da compreensão bioquímica e funcional de nucleossomos e cromatina.

Palavras chave: microbiota, lipídios, síndrome metabólica, metabólitos

## Abstract

Microbiota diversity is essential for host metabolic homeostasis. The mechanisms connecting gut microbiota to obesity and associated metabolic diseases have highlighted the potential of fecal microbiota transplantation (FMT) as a therapeutic strategy. However, the transfer of pathogenic and resistant organisms limits its therapeutic potential. As an alternative to TFM, microbiota metabolites emerge as a promising strategy. Among these metabolites, lipid class plays an important role in modulating host metabolic effects. In this study, we used the high-fat diet (HFD)-induced obesity model to investigate the effect of a fecal extract (NL) from mice fed a normolipid diet (CD) on body weight, glucose homeostasis and lipid profile. After 3 weeks of NL treatment, obese rats showed no changes in body weight, glucose tolerance or insulin sensitivity. However, unexpectedly, NL attenuated steatotic liver disease associated with HFD-induced metabolic dysfunction (MASLD), as indicated by liver histology and triglyceride quantification. Lipidomic analysis revealed groups of lipids present only in LN, which could potentially be involved in the attenuation of liver disease. Analyzes in cellular models have shown that LN can affect cell viability, regulation of PPAR $\gamma$  nuclear receptor activity and adipocyte differentiation. These results suggest that NL has molecules that are potential ligands for nuclear receptors, such as PPAR $\gamma$ , thus regulating important inflammatory pathways.

Attached to this work, developed in parallel with that on lipid metabolites from intestinal microbiota, I present data from the study on the expression and reconstitution of the octamer of recombinant human histones. Fundamental work for the continuity of the biochemical and functional understanding of nucleosomes and chromatin.

Keywords: microbiota, lipids, metabolic syndrome, metabolites

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao professor Guilherme Santos pela orientação, ao programa de pós graduação em patologia molecular e as agências de fomento Capes, CNPq e FAP-DF pelo auxílio financeiro.

A todos os colegas que auxiliaram de forma técnica e emocional. Obrigado especial a Rilva, Bruna, Pamela, Júlia, Mariana, Lidia.

Ao Laboratório de Farmacologia molecular, todos os alunos e aos professores que sempre estavam disponíveis para discussões científicas. Especialmente ao professor Luiz por toda a amizade.

Aos meus familiares, que me apoiaram e me escutaram durante todo esse processo, esse trabalho só é possível por conta de vocês. Obrigada Monserrat, Ulisses e Mateus.

Aos meus amigos que foram extremamente pacientes comigo: Marina, Amanda, Julia, Pedro, Kaian, Simone, Fran, Paula, Gabriel e muitos outros que participaram desse processo.

À Victória, que divide a vida, três gatos e muitos planos comigo.

*“Educação é uma descoberta  
progressiva de nossa própria  
ignorância.” (Voltaire)*

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. MICROBIOTA INTESTINAL.....	22
1.2. MICROBIOTA INTESTINAL E OBESIDADE.....	23
1.3. MICROBIOTA, OBESIDADE E DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA A DISFUNÇÃO METABÓLICA.....	24
1.4. LIPÍDIOS E MICROBIOTA INTESTINAL.....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. OBJETIVO GERAL.....	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. MATERIAIS.....	33
4.2. MÉTODOS.....	35
4.2.1. EXTRAÇÃO LIPÍDICA.....	35
4.2.2. MODELO ANIMAL.....	36
4.2.3. GELATINA.....	37
4.2.4. HISTOLOGIA.....	38
4.2.2. MENSURAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS NO FÍGADO.....	39
4.2.3. RT- PCR.....	39
4.2.4. TESTES DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E À INSULINA.....	39
4.2.5. ANÁLISES DE SORO.....	40
4.2.6. LIPIDÔMICA.....	40



4.2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1. EFEITOS DE NL NA MASSA CORPORAL, RESISTÊNCIA À INSULINA E À GLICOSE.....	42
5.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS DO SORO E MENSURAÇÕES DOS TECIDOS.....	46
5.3. HISTOLOGIA, CONTEÚDO DE TRIGLICERÍDEOS E MASSA DO FÍGADO.....	48
5.4. EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À ADIPOGÊNESE, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO.....	50
5.5. LIPIDÔMICA E POTENCIAIS LIPÍDIOS DE INTERESSE.....	53
6. CONCLUSÃO.....	59
7. PERSPECTIVAS.....	60
<b>CAPÍTULO 2-</b> .....	61
1. INTRODUÇÃO.....	62
1.1. RECEPTORES NUCLEARES.....	62
2. JUSTIFICATIVA.....	64
3. OBJETIVOS.....	65
3.1. OBJETIVO GERAL.....	65
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	65
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
4.1. EXTRAÇÃO LIPÍDICA.....	66
4.2. CULTIVO CELULAR.....	66
4.3. VIABILIDADE CELULAR.....	67
4.4. GENE REPÓRTER.....	67
4.5. DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS 3T3-L1.....	68
4.6. RT-PCR.....	68
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
5.1. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS LIPÍDICOS FECAIS E DIETÉTICOS .....	70
5.2. ENSAIO DE GENE REPÓRTER.....	72
5.3. DIFERENCIAÇÃO EM CÉLULAS 3T3-L1.....	74
6. CONCLUSÃO .....	76
8. Referências .....	77
Apêndice 1 .....	86
Apêndice 2 .....	87
ANEXO I – Artigo de revisão.....	88
1. ANEXO II – PROJETO PARALELO – EXPRESSÃO E RECONSTITUIÇÃO DE OCTÂMERO DE HISTONAS HUMANAS RECOMBINANTES PARA ESTUDOS DA AÇÃO ENZIMÁTICA DO NUCLESSOMO.....	101
1. INTRODUÇÃO.....	101
1.1. CROMATINA.....	101
2. OBJETIVOS.....	104
2.1. OBJETIVO GERAL .....	104
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	104
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	105
3.1. PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES .....	107
3.2. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA .....	108
3.3. EXPRESSÃO DE HISTONAS.....	108
3.4. PURIFICAÇÃO DE HISTONAS EM CORPOS DE INCLUSÃO .....	109
3.5. CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA.....	110
3.6. RECONSTITUIÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS.....	111
3.7. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO .....	112
3.8. OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA WIDOW 601.....	112
3.9. RECONSTITUIÇÃO DE NUCLEOSSOMO .....	113

3.10.	ENSAIO ENZIMÁTICO HISTONAS E COBRE .....	114
4.	RESULTADOS .....	115
4.1.	PURIFICAÇÃO DE HITONAS.....	115
4.2.	RECONSTITUIÇÃO MONONUCLEOSSOMO.....	116
4.3.	ENSAIO ENZIMATICO COBRE.....	118
5.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....	119
6.	REFERÊNCIAS .....	120

## 1. LISTA DE FIGURAS

**Figura 1. Progressão de MASLD.** Desenvolvimento da doença a partir do fígado saudável, com o acúmulo de gordura superior a 5% tem-se a esteatose, em seguida há a presença de inflamação sendo chamada de esteatose associada a síndrome metabólica (EAM) que pode evoluir para carcinoma hepatocelular ou cirrose. Imagem adaptada de BACKER et al., 2023. .... 25

**Figura 2. Abordagem terapêutica fundamentada em lipídios bioativos associados à microbiota intestinal.** Os lipídios provenientes da dieta passam por metabolização pela microbiota do hospedeiro, saudável ou disbiótica. Em ambos os cenários, os lipídios associados à microbiota do hospedeiro, a própria microbiota ou os lipídios não metabolizados exibem diferentes concentrações, influenciando, assim, uma modulação distinta de vias de sinalização. A transferência ou suplementação de lipídios bioativos de doadores saudáveis emerge como uma inovadora oportunidade terapêutica para doenças relacionadas à disbiose. Abreviações: PUFA, ácido graxo poli-insaturado; Figura adaptada de CARNEIRO et al., 2022 ..... 27

**Figura 3. Terapêuticas baseadas em microbiota.** Uma dieta baseada em plantas (1), como nas comunidades rurais africanas, é pobre em gordura e proteína animal, rica em amido, fibras e polissacarídeos vegetais, favorecendo uma microbiota mais diversificada e abundante, com enriquecimento de Bacteroidetes. A dieta ocidental (1), rica em proteína animal, açúcar, amido e gordura, e pobre em fibras, promove a abundância de Firmicutes e disbiose. A variação de bactérias nesse cenário resulta em diferentes conteúdos de metabólitos gerados pela microbiota (2). Metabólitos, incluindo lipídios, estão presentes nas fezes (3). Este material de doadores saudáveis pode ser processado de diferentes maneiras. Pode ser produzido em laboratório selecionando bactérias específicas para criar probióticos. Além disso, os lipídios podem ser isolados do material fecal. A extração de lipídios com clorofórmio:metanol (2:1) como solvente extrai lipídios gerais, metanol 75% extrai ácidos biliares e acetonitrila:água (50:50) extrai ácidos graxos de cadeia curta. Após o isolamento dos lipídios, um suplemento lipídico pode ser preparado. Procedimentos de transplante fecal de microbiota (FMT) também podem ser preparados a partir das fezes. A combinação de probióticos, lipídios fecais e terapia direcionada à microbiota é uma

estratégia promissora para o desenvolvimento terapêutico personalizado (4). Os lipídios podem atuar por meio de diferentes vias celulares, ativando receptores nucleares (PPAR $\gamma$ , PXR, FXR, RXR e VDR) e receptores de membrana (GPCR e MINCLE), além de reprimir a atividade de HDAC1 e HDAC2 (5). Abreviações: BA, ácido biliar; FMT, transplante fecal de microbiota; FXR, receptor X hepático; GPCR, receptor acoplado à proteína G; PPAR $\gamma$ , receptor ativado por proliferadores de peroxissoma  $\gamma$ ; PXR, receptor X pregnano; RXR, receptor X retinóide; SCFA, ácido graxo de cadeia curta; VDR, receptor de vitamina D. Figura adaptada de CARNEIRO et al., 2022 ..... 29

**Figura 4. Extração lipídica fecal.** Coleta manual de fezes de camundongos CB57BL/6 que posteriormente são levados ao pilão que é utilizado para macerar as fezes, que são solubilizadas em solução salina 0,9% e clorofórmio: metanol, centrifugadas e com a separação de fases é deito um furo na porção inferior do Falcon para retirada do material lipídico que posteriormente será secado e solubilizado em óleo de soja..... 35

**Figura 5. Esquema de tratamento dos animais.** Os animais foram divididos em três grupos. O primeiro grupo foi designado como grupo controle, recebendo uma dieta normolipídica. O segundo grupo foi o grupo obeso, alimentado com uma dieta hiperlipídica, porém sem qualquer tipo de tratamento adicional. O terceiro grupo foi o grupo tratado, alimentado com dieta hiperlipídica, que recebeu administração de extrato lipídico. Os animais foram alocados em gaiolas contendo 3 ou 4 animais cada. As fezes do grupo controle alimentado com a dieta normal foram coletadas para a obtenção do extrato lipídico. Esse extrato lipídico foi administrado aos camundongos do grupo tratamento. Todos os grupos eram compostos por 10 animais..... 36

**Figura 6. Modelo esquemático dos tratamentos.** À esquerda, estão representados os grupos estudados, onde as fezes do grupo controle foram utilizadas para a fabricação da gelatina do grupo NL. À direita, está ilustrado o processo de extração dos lipídios das fezes, inicialmente com maceração, seguida de diluição em solução salina e clorofórmio: metanol. Após centrifugação, ocorreu a separação de fases, sendo apenas a fase inferior retirada e ressuspendida em óleo de soja..... 38

**Figura 7. Fenótipo dos animais do grupo controle ao longo do experimento.** Na imagem (a), camundongo submetido à dieta normolipídica, enquanto na imagem (b), camundongo submetido à dieta hiperlipídica ..... 42

**Figura 8. Efeito do NL no peso corporal, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina** a) Desenho do estudo: Camundongos C57Bl/6 machos alimentados com uma dieta rica em gordura receberam NL (50 mg/kg/d) ou veículo por três EMPanas. b) Ganho de peso em porcentagem durante o experimento, c) Consumo energético antes, durante e após o tratamento. Glicose basal do animal durante a administração de gelatina (D), níveis de glicemia de jejum durante o tratamento, níveis de glicose no sangue durante o TTI (E) e TTG (F), e a área sob a curva do TTI e TTG (g). N = 10/grupo; dados apresentados como média ± EMP. Análise estatística realizada por meio de ANOVA de duas vias seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey (B,C,D,E e F) ou ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey (G) ( $p < 0,05$ ). TTG: teste de tolerância à glicose; TTI: teste de tolerância à insulina. .... 44

**Figura 9. Análise bioquímica de medições séricas e teciduais.** Os parâmetros medidos foram colesterol total (a), colesterol LDL (b), colesterol HDL (c), GOT(e) e GPT(f). As proporções de LDL/HDL(d) e GOT/GPT(g) também foram calculadas. Para a análise tecidual, foram medidos o comprimento do intestino (h) e a massa do BAT (i), do WAT subcutâneo (j) e do WAT visceral (k) após a eutanásia. N=6/grupo para análise bioquímica e N=10/grupo para análise do tamanho dos órgãos; dados apresentados como média ± SEM. Análise estatística realizada por meio de ANOVA ONE-Way seguida de testes de comparações múltiplas de Tukey, ( $p < 0,05$ ). LDL: Lipoproteína de baixa densidade; HDL: Lipoproteína de alta densidade; TGO: transaminase glutâmica oxaloacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; TAM: tecido adiposo marrom; TAB SC: tecido adiposo branco subcutâneo; TAB Vis: tecido adiposo branco visceral..... 46

**Figura 10. Histologia, conteúdo de triglicerídeos e peso do fígado.** a) Lâmina histológica representativa dos fígados de animais submetidos a dieta normal (CTRL) e dieta hiperlipídica (OBS e NL). Foram examinados n=5/grupo, e para cada fígado foram obtidas e analisadas 3 lâminas. No painel direito, as imagens são mostradas com ampliação de 10x e escala de 200µm. No painel esquerdo, eles são exibidos com ampliação de 20x e escala de 100µm. A área das células hepáticas (b) foi medida. c) Teor de triglicerídeos hepáticos, n=8/grupo. d) Massa de fígado de camundongo n=10/grupo. Dados apresentados como média ± EMP. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA ONE-Way seguida pelo teste de Kruskall-Wallis (b) ou testes de comparações múltiplas de Tukey (c e d),  $p < 0,05$ . .... 49

**Figura 11. Expressão gênica mensurada em fígados tratados com NL.** Em a) e b) estão os genes relacionados a adipogênese, Fabp4 e Pparg, respectivamente. Em c) o gene CPT1a que é relacionado ao estresse oxidativo. Já em d) e e) estão os genes relacionados a inflamação. Foi realizado o teste student T test,  $p < 0.05$  e  $n = 5$ .

..... 52

**Figura 12. Análises lipídicas e potenciais lipídios relevantes.** a) Dispersão de grupos lipídicos de NL em comparação com a dieta alimentar (CD). b) Mapa de calor ilustrando os grupos lipídicos de CD e NL. c) Distribuição em porcentagem da composição lipídica do extrato de NL. Lipídios presentes no extrato lipídico NL potencialmente presentes na patologia, como PC, LPC, PE e LPE (d), Ceramidas (e), e PUFAs (f), que desempenham papéis essenciais nos processos biológicos relacionados a doenças. Estes incluem a proporção de PC/PE na membrana plasmática (g), exercendo influência direta nos processos que impactam o MASLD (h) e metabolismo da colina (i). Os dados foram transformados para  $\log_2 \times \text{NL/CD}$  para gráfico de vulcão e foi realizado teste t de Student múltiplo,  $p < 0,05$ . Para o mapa de calor, os dados foram transformados em  $\log_2(x)$ . Dados apresentado como média  $\pm$  EPM. .... 56

**Figura 13. Diagrama de extratos lipídicos.** Camundongos C57Bl/6 foram submetidos a uma dieta hiperlipídica ou normolipídica. Extratos foram obtidos a partir das rações e fezes dos camundongos. Em azul, representam-se os extratos dos camundongos saudáveis. Em vermelho, estão indicados os extratos dos camundongos obesos. CD - dieta normolipídica, NL - extrato fecal normolipídico, HFD - dieta hiperlipídica e HL - extrato fecal hiperlipídico. .... 66

**Figura 14. Viabilidade celular por método de MTT em diferentes linhagens celulares para extratos normais.** Comportamento de linhagens celulares em diferentes concentrações de extrato. Células submetidas aos extratos NL, CD, HL e HFD, linhagens: HeLa (a), HepG2(b), MSC (c) e submetidas somente aos extratos NL e CD, Linhagens: Raw (d), Ishikawa (e), PC3 (f) e 3T3-L1 (g) Dados analisados com GraphPad Prism, two way ANOVA,  $P < 0,05$ . Média  $\pm$ SD ( $n = 5$ ). As significâncias entre os grupos na mesma dose representadas por \* e entre controle (sem extrato) e concentração por #..... 71

**Figura 15. O extrato NL funciona como um agonista parcial de PPAR.** O ensaio de gene repórter foi conduzido em células HeLa, utilizando os extratos NL (a) e CD (b), tanto associados quanto não associados ao seu agonista total, rosiglitazona, em

concentrações de 100 µg/mL, 300 µg/mL e 500 µg/mL. Os dados foram analisados com o software GraphPad Prism, utilizando one way ANOVA, com um valor de  $P < 0,05$  considerado significativo. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3)..... 72

**Figura 16 .Extratos HFD e HL apresentam atividade de antagonismo no receptor PPAR $\gamma$ .** O ensaio de gene repórter foi conduzido em células HeLa, utilizando os extratos HFD (a) e HL (b), tanto associados quanto não associados ao seu agonista total, rosiglitazona, em concentrações de 100 µg/mL, 300 µg/mL e 500 µg/mL. Os dados foram analisados com o software GraphPad Prism, utilizando one way ANOVA, com um valor de  $P < 0,05$  considerado significativo. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=2)..... 73

**Figura 17. Diferenciação de células 3T3-L1.** A) Poços após serem corados com Oil Red O, quanto mais intensa for a cor dos poços maior a diferenciação das células. B) Expressão do gene Pparg nos tratamentos descritos Dados analisados com GraphPad Prism, ONE way ANOVA,  $P < 0,05$ . Média  $\pm$ SD (n=3)..... 74

**Figura 18. Análise histológica do fígado de camundongos C57BL/6 em aumento de 10x.** A primeira linha representa o grupo controle, na segunda linha, grupo dos animais submetidos à obesidade. A terceira linha retrata o grupo obeso tratado com NL. Lâminas coradas com hematoxilina e eosina ..... 86

**Figura 19. Análise histológica do fígado de camundongos C57BL/6 em aumento de 20x.** A primeira linha representa o grupo controle, na segunda linha, grupo dos animais submetidos à obesidade. A terceira linha retrata o grupo obeso tratado com NL. Lâminas coradas com hematoxilina e eosina ..... 87

**Figura 20. Organização hierárquica da cromatina.** A cromatina começa a se organizar partindo do DNA livre, que começa a se ligar ao octâmero de histonas formando o colar de contas de 10nm, onde há grande taxa de transcrição. A fibra começa a se compactar mais formando a fibra se 30nm, em que não há grande taxa de transcrição já que o DNA se encontra bloqueado. A compactação continua até alcançar a forma de cromossomo. .... 101

**Figura 21. Representação estrutura de nucleossomo.** O nucleossomo com vista frontal, lateral e superior. Em Laranja estão destacadas as histonas H2A, em azul H2B, vermelho H3, azul claro H4 e em cinza o DNA. Estrutura obtida com o software PyMol viewer TM, PDB:1KX5 (DAVEY et al., 2002) ..... 102



**Figura 22. Histonas e complexos proteicos purificados.** Em (a), um gel SDS-PAGE 15% exibe as proteínas purificadas. A primeira linha mostra o marcador molecular, com a banda de 17 kDa destacada, seguido pelo octâmero de galinha, H2A, H2B, H3 e H4. Em (b), são apresentados os complexos proteicos, com a primeira linha mostrando o marcador molecular, seguido por frações do octâmero recombinante, tetrâmeros e dímero. DIM - dímero, TET – tetrâmero, MM-marcador molecular e OCT - octâmero. .... 115

**Figura 23. Reconstituição de nucleossomo.** Gel de acrilamida 7% corado com brometo de etídio indicando a formação de nucleossomo com complexo proteico de octâmero de histonas humanas recombinantes. DNA livre está na linha inferior e os monucleossomos na linha superior. MWM- Marcador molecular. (Molecular Weight marker)..... 116

**Figura 24. Cinética de aparecimento de Cu<sup>1+</sup>.** Curvas de aparecimento de Cu<sup>1+</sup> partindo de Cu<sup>2+</sup>. Em azul temos neocuproine sem histonas, em verde octâmero, em vermelho tetrâmero e em roxo o dímero. .... 118

## 2. LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1. Materiais utilizados para estudos de extratos lipídicos provenientes de microbiota ou de ração de camundongos C57BL/6.</b> A direita estão os reagentes e a esquerda seus respectivos fabricantes. ....	33
<b>Tabela 2. Equipamentos utilizados para estudos de extratos lipídicos provenientes de microbiota ou de ração de camundongos C57BL/6.</b> A direita estão os reagentes e a esquerda seus respectivos fabricantes. ....	34
<b>Tabela 3. Composição ração hiperlipídica e normolipídica.</b> Valores referentes a dieta. Fonte: Pragsoluções Biociências. ....	37
<b>Tabela 4. Reagentes utilizados para a obtenção de histonas recombinantes humanas e ensaios enzimáticos de redução de cobre.</b> A esquerda estão os reagentes e a direita os fabricantes .....	105
<b>Tabela 5. Equipamentos utilizados para a obtenção de histonas recombinantes humanas e ensaios enzimáticos</b> de redução de cobre. A esquerda estão os equipamentos e a direita os fabricantes. ....	107
<b>Tabela 6. Soluções utilizadas em purificação de corpos de inclusão.</b> A esquerda estão os tampões utilizados e a direita suas composições respectivamente. ....	110
<b>Tabela 7. Soluções utilizadas em cromatografia de troca iônica.</b> A esquerda está o tampão de eluição com alta concentração de sal e a direita tampão B. ....	111
<b>Tabela 8. soluções usadas para criar complexos.</b> A esquerda o tampão que realizará a desnaturação das proteínas e a direita o tampão que realizará a renaturação para a formação de complexos proteicos. ....	112

### 3. LISTA DE ABREVIATURAS

FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
HCC	<i>Hepatocarcinoma celular</i>
HFD	<i>High fat diet</i>
HL	<i>Hiperlipidic</i>
MASLD	<i>Metabolic associated syndrome liver disease</i>
NL	<i>Normolipidic</i>
OBS	Obeso
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
TAB SC	Tecido adiposo branco subcutâneo
TAB Vis	Tecido adiposo branco visceral
TAM	Tecido adiposo marrom



## **CAPÍTULO 1**

# **ESTUDOS DO EFEITO DO EXTRATO LIPÍDICO FECAL DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA NORMOLIPÍDICA SOBRE CAMUNDONGOS OBESOS INDUZIDO POR DIETA RICA EM GORDURA.**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota é composta por arqueias, fungos, bactérias e vírus e é encontrada em diversos sistemas do corpo humano, como pele, pulmão, trato respiratório, trato reprodutivo e sistema gastrointestinal. A microbiota é considerada um órgão (O'HARA; SHANAHAN, 2006) e possui aproximadamente 150 vezes o número de genes que do organismo humano (URSELL et al., 2014), sendo composta por mais de  $10^{14}$  organismos no trato gastrointestinal de cada indivíduo (MINEMURA, 2015).

A microbiota intestinal normal é dominada por bactérias, contendo entre 500-1000 espécies de uma pequena gama de filos conhecidos. Entre os mais evidentes destacam-se: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacterias, Verrumicrobia e Fusobacteria (ARUMUGAM et al., 2011). A relação entre microbiota e hospedeiro está sendo construída mutualmente há milhares de anos, o que leva a uma interação em que a microbiota modula o metabolismo do hospedeiro e este proporciona um ambiente para que ela viva, estabelecendo uma relação simbiótica (HOOPER; MACPHERSON, 2015).

Diversas funções fisiológicas do hospedeiro são atualmente atribuídas à microbiota, como por exemplo: sinalização a via do apetite, função imune estrutural, , metabólicas, absorção de nutrientes, captação de energia e (CANI; DEWEVER; DELZENNE, 2004; GEUKING et al., 2011; GILL et al., 2006; TURNBAUGH et al., 2006).

O desequilíbrio na composição da microbiota do hospedeiro (disbiose), pode alterar importantes vias de sinalização celulares do hospedeiro, incluindo alterações metabólicas. A composição da microbiota pode ser modificada por vários elementos externos, como exercícios, alimentação, medicamentos e ambiente, além de fatores internos, como genética e epigenética (HUGHES, 2020).

A modulação da microbiota intestinal pela dieta determina o conteúdo de metabólitos que podem ser reabsorvidas pelo trato gastrointestinal (DAVID et al., 2014). Uma alimentação rica em gordura resulta em diversas alterações na microbiota intestinal, promovendo o aumento de Firmicutes e proteobacterias, além da redução de Bacteroidetes (HILDEBRANDT et al., 2009). . Essas mudanças ocorrem rapidamente, com perturbações na microbiota devido à dieta gordurosa observadas em camundongos em apenas 3.5 dias(CARMODY et al., 2015). ). Além disso, a natureza da gordura consumida provoca modificações específicas em depósitos de gordura e inflamação (HUANG et al., 2013). A microbiota de camundongos obesos consegue extrair mais energia da dieta (TURNBAUGH et al., 2006). Em mulheres obesas, foi relatado o aumento de *Eubacterium rectale-Clostridium coccoides*, que está associado à eficiência na absorção de nutrientes no intestino (MUNUKKA et al., 2012).

## **1.2. MICROBIOTA INTESTINAL E OBESIDADE**

. A microbiota tem sido associada a um amplo espectro de doenças, incluindo obesidade, doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica, diabetes, síndrome do intestino irritável e cirrose (WANG et al., 2017).

A condição da obesidade resulta no acúmulo excessivo de gordura, ultrapassando a capacidade dos adipócitos de armazenamento. Conseqüentemente, triglicerídeos, em sua maioria, entram na corrente sanguínea e passam a se acumular nos músculos esqueléticos e no fígado, perturbando a regulação da oxidação lipídica. Esse acúmulo desencadeia uma resposta inflamatória nos tecidos adiposos (REILLY; SALTIEL, 2017), contribuindo para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e também para doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica (MASLD) (CANFORA et al., 2019). Essa interconexão entre o acúmulo de gordura, inflamação e o subsequente impacto metabólico destaca a complexidade dos mecanismos subjacentes às complicações associadas à obesidade.

A composição da microbiota intestinal varia entre pessoas obesas e não obesas, sendo observada uma diminuição de Bacteroidetes em indivíduos obesos, o que favorece o crescimento de Firmicutes (LEY et al., 2006). Em um elegante estudo, foi observado que a composição da microbiota intestinal de crianças de uma comunidade rural africana, que possui dieta com baixo teor de gordura e proteína animal, rica em amido, fibras e polissacarídeos, difere significativamente da microbiota de crianças da Europa Ocidental, com dieta rica em gordura, proteína animal e menos fibras. As africanas revelaram maior presença de Bacteroidetes em contraste com uma abundância de bactérias Firmicutes nas crianças europeias (DE FILIPPO et al., 2010).

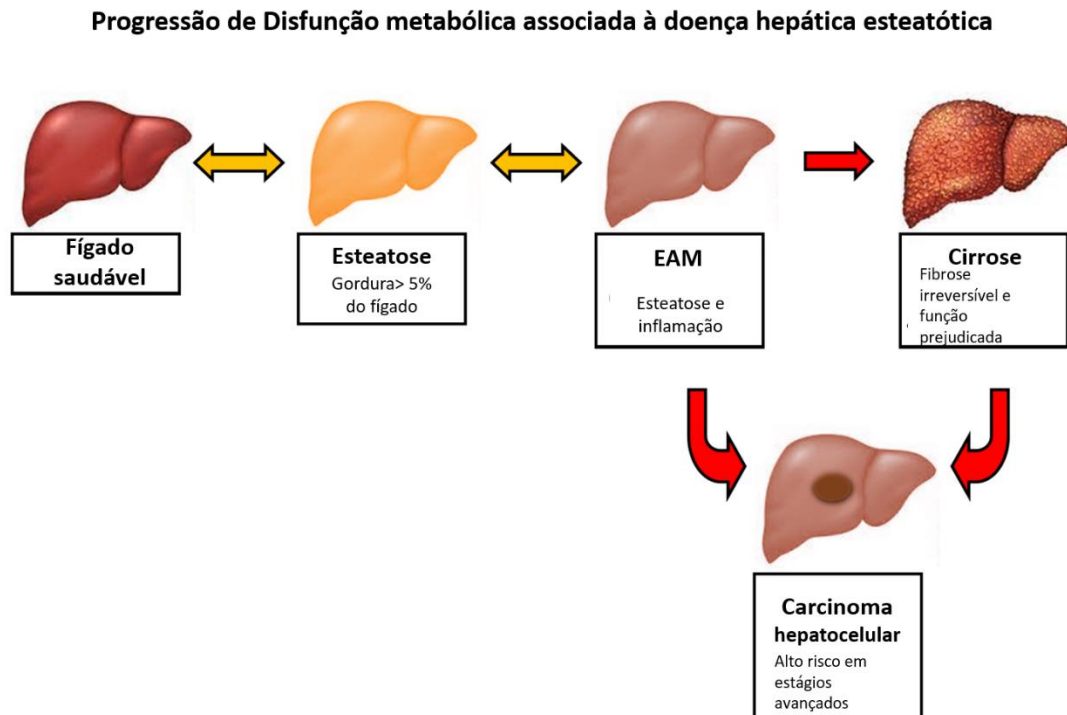
### **1.3. MICROBIOTA, OBESIDADE E DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA A DISFUNÇÃO METABÓLICA**

A síndrome metabólica é um quadro que engloba a presença de obesidade abdominal, disglícemia, dislipidemia e hipertensão. Concomitante, a estas manifestações, a doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica (MASLD) (CHALASANI et al., 2018). Embora a obesidade seja considerada um fator de risco significativo para o desenvolvimento da MASLD é notável que cerca de 30% das pessoas obesas não apresentam distúrbios metabólicos associados (WILDMAN et al., 2008). Esta complexa relação entre obesidade, síndrome metabólica e MASLD destaca a necessidade de uma compreensão abrangente e individualizada dos fatores de risco subjacentes e dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa condição hepática.

Recentemente, houve uma modificação na nomenclatura da doença do fígado gorduroso não alcoólico para doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica (MASLD). Esse novo termo engloba tanto a doença causada pelo consumo de álcool quanto casos nos quais os pacientes apresentam esteatose associada a pelo menos um fator de risco cárdio metabólico (RINELLA et al., 2023). A MASLD é uma condição que afeta 1 em cada 4 adultos e está intimamente relacionada à diabetes e obesidade (RAMOS et al., 2021).



O início da condição é marcado pelo acúmulo anormal de gordura, conhecido como esteatose, que pode avançar de um fígado saudável para a esteatose associada à síndrome metabólica, desencadeando inflamação. A partir desse estágio, há o risco



**Figura 1. Progressão de MASLD.** Desenvolvimento da doença a partir do fígado saudável, com o acúmulo de gordura superior a 5% tem-se a esteatose, em seguida há a presença de inflamação sendo chamada de esteatose associada a síndrome metabólica (EAM) que pode evoluir para carcinoma hepatocelular ou cirrose. Imagem adaptada de BACKER et al., 2023.

de desenvolvimento de cirrose, caracterizada por fibrose e declínio na função hepática. Adicionalmente, a cirrose pode evoluir para hepatocarcinoma celular (HCC), sublinhando a complexidade e gravidade potencial da trajetória da doença (Fig.1).

Atualmente, não há um tratamento específico estabelecido para a MASLD. No entanto, na prática clínica, são adotadas algumas abordagens para minimizar seus impactos. Por exemplo, melhorar a dieta ingerindo a quantidade de calorias e gorduras recomendadas diariamente (PROMRAT et al., 2010) e incorporar a prática de exercícios físicos (KISTLER et al., 2011; PROMRAT et al., 2010). Adicionalmente, está sendo investigada a incorporação de medicamentos, tais como sensibilizadores

de insulina, terapias baseadas na incretina, agentes redutores de lipídios, crioprotetores e antioxidantes (BEATON, 2012) , como estratégias no tratamento da MASLD.

A microbiota desempenha um papel crucial em várias patologias, sendo notável a associação com a microbiota em MASLD. Em estudos sobre MASLD, observou-se uma alteração na composição da microbiota em pacientes, evidenciando uma redução significativa da abundância de Bacteroidetes e um aumento notável de bactérias pertencentes ao filo Firmicutes, especialmente do gênero Ruminococcus (BOURSIER et al., 2016). A microbiota intestinal desempenha um papel no processo de MASLD, no qual o transplante da microbiota de camundongos C57BL/6 com MASLD para animais sem a patologia resultou no desenvolvimento da doença. (LE ROY et al., 2013)

#### **1.4. LIPÍDIOS E MICROBIOTA INTESTINAL**

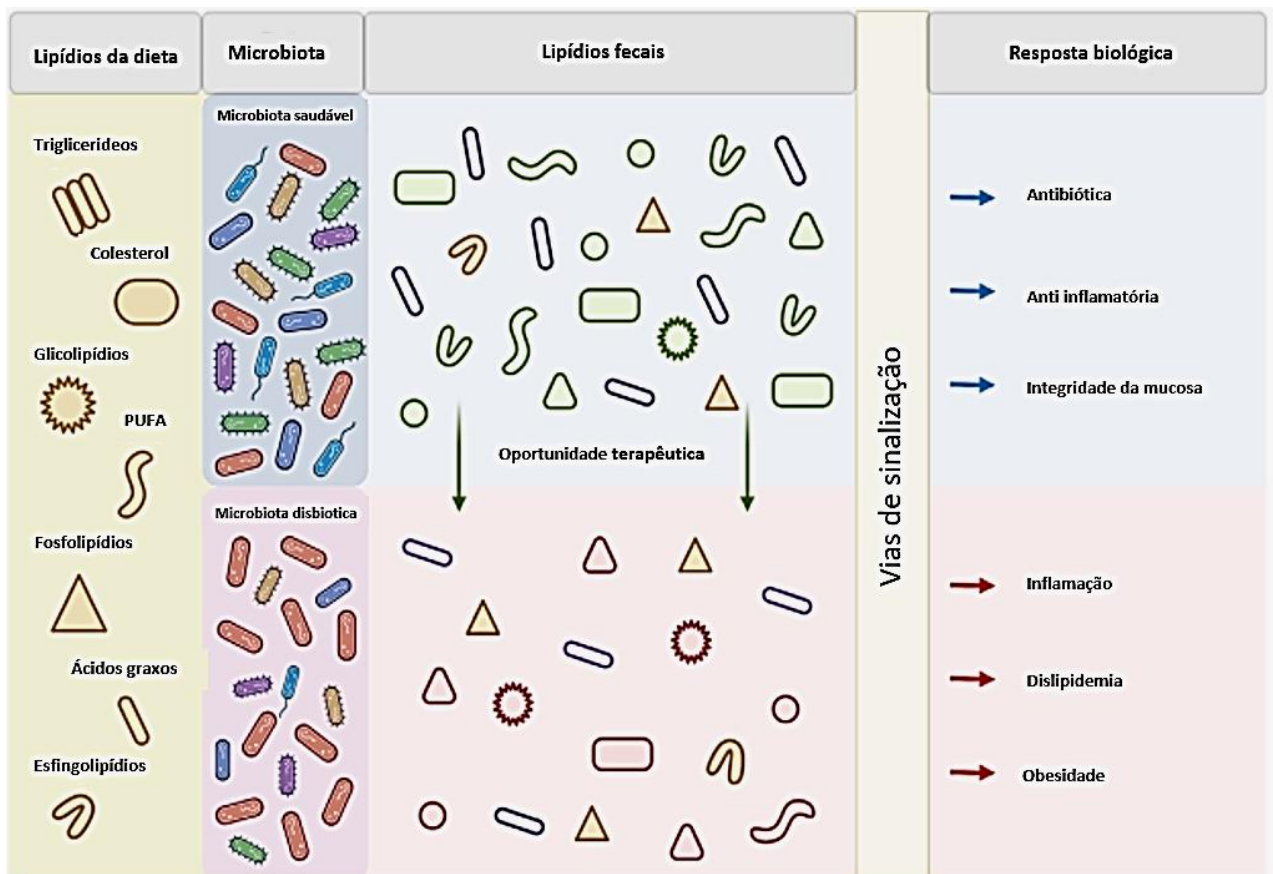
Os mecanismos que conectam a microbiota intestinal à obesidade e doenças metabólicas associadas destacaram o potencial do transplante fecal de microbiota (TFM) como estratégia terapêutica. A regulação da sinalização celular do hospedeiro a princípio ocorre devido a ação metabólitos. Dentre esses metabólitos, a classe lipídica desempenha um papel importante na modulação dos efeitos metabólicos do hospedeiro.

Os lipídios são moléculas sinalizadoras cruciais que desempenham papéis significativos em vários processos celulares. Participam de diversas cascatas sinalizadoras que frequentemente convergem entre si. A sinalização lipídica desempenha um papel relevante em processos patológicos, como na síndrome metabólica, em que está relacionada com a progressão de processos inflamatórios contribuindo para a progressão agravada de diabetes, aterosclerose e doenças cardiovasculares(WYMAN; SCHNEITER, 2008).

Em recente revisão do grupo do professor Guilherme Santos, foi discutido como os metabólitos lipídicos da microbiota poderiam ser considerados como uma nova estratégia terapêutica. Ao focar nesses compostos, revisamos como os lipídios bioativos associados a microbiota intestinal afetam o funcionamento celular e os resultados clínicos. Investigamos a microbiota intestinal como uma ferramenta biotecnológica de ponta para a rápida engenharia metabólica de lipídios

significativos, oferecendo uma terapia personalizada inovadora. (CARNEIRO et al., 2022).

Na Figura 2, observamos o processo de metabolização dos lipídios provenientes da dieta pela microbiota, considerando sua condição saudável ou disbiótica. Notavelmente, uma microbiota saudável é capaz de gerar uma diversidade maior de lipídios em comparação com uma microbiota em estado de disbiose. Esses lipídios apresentam variações significativas, incluindo lipídios dietéticos, lipídios metabolizados pelo hospedeiro e lipídios da própria microbiota. Diante dessa diversidade, os lipídios provenientes da microbiota saudável destacam-se como importantes sinalizadores. As ações dos lipídios bioativos provenientes de cada cenário da dieta são distintos, resultando em efeitos positivos para uma microbiota saudável e negativos (patológicos) para uma microbiota em disbiose.

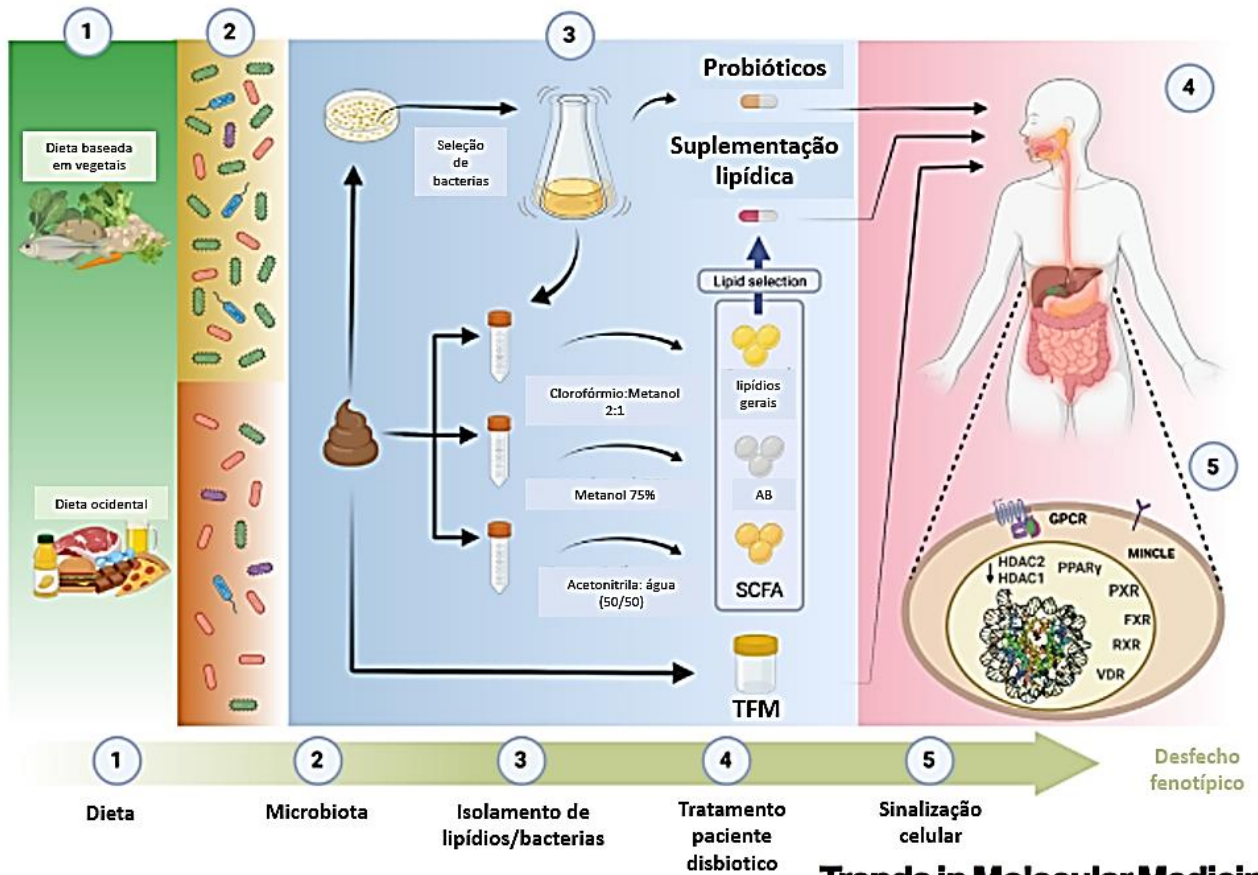


**Figura 2. Abordagem terapêutica fundamentada em lipídios bioativos associados à microbiota intestinal.** Os lipídios provenientes da dieta passam por metabolização pela microbiota do hospedeiro, saudável ou disbiótica. Em ambos os cenários, os lipídios associados à microbiota do hospedeiro, a própria microbiota ou os lipídios não metabolizados exibem diferentes concentrações, influenciando, assim, uma modulação distinta de vias de sinalização. A transferência ou suplementação de lipídios bioativos de doadores saudáveis emerge como uma inovadora oportunidade terapêutica para doenças relacionadas à disbiose. Abreviações: PUFA, ácido graxo poli-insaturado; Figura adaptada de CARNEIRO et al., 2022

Entre os muitos lipídios da dieta, cabe ressaltar os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) estão associados a alterações na diversidade da microbiota intestinal. Os  $\omega$ -6 (n-6) PUFAs, como o ácido linoleico (LA), presentes em óleos vegetais, nozes, sementes, carnes e ovos, têm sido associados ao crescimento de bactérias pró-inflamatórias, como *Muscispirillum schaedleri* e *Lactobacillus murinus*, em estudos de modelos murinos (SELMIN et al., 2021). Já os  $\omega$ -3 (n-3) PUFAs, encontrados em peixes, e o ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), presente em sementes de plantas, foram associados positivamente a bactérias produtoras de butirato, como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Roseburia*, no intestino de voluntários saudáveis (HENRY WATSON et al., 2018).

Os PUFAs n-3, como o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA), estão relacionados a sinais anti-inflamatórios e ativam o PPAR $\gamma$ , um receptor nuclear chave na via de sinalização do metabolismo de lipídios. Conseguem inibir TLR4 pelo receptor GPR120 e assim inibir a via NF- $\kappa$ B (BROWN; MUTCH, 2020). A suplementação desses lipídios é considerada para tratar a inflamação, entretanto não há efeitos a longo prazo para essa suplementação (AJABNOOR et al., 2021).

Os metabólitos derivados dos PUFAs produzidos pela microbiota também são considerados moléculas essenciais no metabolismo. A microbiota desempenha um papel fundamental na transformação dos PUFAs dietéticos em moléculas que não possuem atividade pró-inflamatória.



## Trends in Molecular Medicine

**Figura 3. Terapêuticas baseadas em microbiota.** Uma dieta baseada em plantas (1), como nas comunidades rurais africanas, é pobre em gordura e proteína animal, rica em amido, fibras e polissacarídeos vegetais, favorecendo uma microbiota mais diversificada e abundante, com enriquecimento de Bacteroidetes. A dieta ocidental (1), rica em proteína animal, açúcar, amido e gordura, e pobre em fibras, promove a abundância de Firmicutes e disbiose. A variação de bactérias nesse cenário resulta em diferentes conteúdos de metabólitos gerados pela microbiota (2). Metabólitos, incluindo lipídios, estão presentes nas fezes (3). Este material de doadores saudáveis pode ser processado de diferentes maneiras. Pode ser produzido em laboratório selecionando bactérias específicas para criar probióticos. Além disso, os lipídios podem ser isolados do material fecal. A extração de lipídios com clorofórmio:metanol (2:1) como solvente extrai lipídios gerais, metanol 75% extrai ácidos biliares e acetonitrila:água (50:50) extrai ácidos graxos de cadeia curta. Após o isolamento dos lipídios, um suplemento lipídico pode ser preparado. Procedimentos de transplante fecal de microbiota (FMT) também podem ser preparados a partir das fezes. A combinação de probióticos, lipídios fecais e terapia direcionada à microbiota é uma estratégia promissora para o desenvolvimento terapêutico personalizado (4). Os lipídios podem atuar por meio de diferentes vias celulares, ativando receptores nucleares (PPAR $\gamma$ , PXR, FXR, RXR e VDR) e receptores de membrana (GPCR e MINCLE), além de reprimir a atividade de HDAC1 e HDAC2 (5). Abreviações: BA, ácido biliar; FMT, transplante fecal de microbiota; FXR, receptor X hepático; GPCR, receptor acoplado à proteína G; PPAR $\gamma$ , receptor ativado por proliferadores de peroxissoma  $\gamma$ ; PXR, receptor X pregnano; RXR, receptor X retinóide; SCFA, ácido graxo de cadeia curta; VDR, receptor de vitamina D. Figura adaptada de CARNEIRO et al., 2022

Na figura 3, mostramos dietas que podem provocar alterações na microbiota (1), resultando em microbiota saudável ou disbiótica (2). Aqui, mostramos as fezes como uma potencial terapia, podendo ser utilizadas para (i) o transplante fecal de microbiota, (ii) a utilização de probióticos e (iii) a suplementação lipídica (3).

(i) O transplante fecal de microbiota tem sido empregado na prática clínica para o tratamento de *Clostridium difficile* (VAN NOOD et al., 2013). No entanto, é importante destacar que essa abordagem apresenta riscos significativos. Em 2019 o FDA proibiu o TFM, pois um paciente veio a óbito e outro foi hospitalizado devido a interações com bactérias resistentes que foram transplantadas (DEFILIPP et al., 2019).

(ii) Os probióticos são largamente utilizados na clínica médica, através do uso de iogurtes e outros produtos disponíveis no mercado. No entanto, estes produtos não oferecem um tratamento baseado na necessidade individual do paciente. Para que as fezes possam ser exploradas como probiótico seria necessária a seleção de bactérias a partir das fezes de um doador saudável.

(iii) Os metabólitos lipídicos das fezes de doadores saudáveis se apresentam promissores como alternativas a estas duas estratégias mencionadas. Após análise do conteúdo lipídico fecal ou bactérias selecionadas, a extração lipídica se tornaria uma fonte rica de compostos terapêuticos.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A compreensão dos mecanismos terapêuticos do transplante fecal avança enormemente em diversas áreas da clínica médica. No entanto, a transferência de organismos patogênicos e resistentes limita o seu potencial terapêutico. Como alternativa ao TFM, os metabólitos da microbiota surgem como uma estratégia promissora. Os metabólitos lipídicos da microbiota possuem importante atividade na modulação da fisiologia do hospedeiro. Assim, a identificação de lipídios bioativos provenientes da microbiota intestinal é uma promissora estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar o efeito do extrato lipídico proveniente de fezes de camundongos C57BL/6 saudáveis (NL) sobre os desfechos fenotípicos de camundongos obesos induzidos por meio de uma dieta hiperlipídica.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aferir a massa corpórea, resistência à insulina e tolerância a glicose em animais obesos tratados com NL;
- Dosar colesterol e enzimas hepáticas dos animais obesos tratados com NL;
- Analisar possíveis alterações dos diferentes tecidos dos camundongos como fígado, tecido adiposo e intestino;
- Realizar a análise global de lipídios presentes no extrato NL por espectrometria de massa para identificar possíveis lipídios bioativos.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAIS

Todos os materiais utilizados neste trabalho estão descritos nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1. Materiais utilizados para estudos de extratos lipídicos provenientes de microbiota ou de ração de camundongos C57BL/6.** A direita estão os reagentes e a esquerda seus respectivos fabricantes.

<b>Reagente</b>	<b>Fabricante</b>
Cloreto de Sódio	Dinâmica Química Contemporânea LTDA, BRA
Clorofórmio	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Metanol	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Isopropanol	Dinâmica Química Contemporânea LTDA, BRA
GoTaq® 2-Step RT-qPCR System	Promega, BRA
Óleo de Soja	Liza, BRA
Ração normolipídica	PragSoluções, BRA
Ração hiperlipídica	PragSoluções, BRA
Essência de baunilha	Dr Oetker, BRA
Essência de Morango	Mix, BRA
Kit triglicerídeos	Cayman, USA
Trizol	Life Technologies,USA
Insulina	Novo Nordisk, BRA
Sacarose	Fischer scientific company, USA
Paraplast	Sigma Aldrich Co., USA
Paraformaldeído	Merck, DEU
Cloreto de Sódio	Dinâmica Química Contemporânea LTDA, BRA
Clorofórmio	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Metanol	Vetec Química Fina Ltda, BRA
DMSO	Sigma Aldrich Co., USA
Isopropanol	Dinâmica Química Contemporânea LTDA, BRA
DMEM	Sigma Aldrich Co., USA

Tripsina	Sigma Aldrich Co., USA
MTT	Life Technologies, USA
GoTaq® 2-Step RT-qPCR System	Promega, BRA
Oil Red O	Sigma Aldrich Co., USA
Ácido clorídrico	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Lipofectamina	Invitrogen, BRA
Trizol	Life Technologies,USA

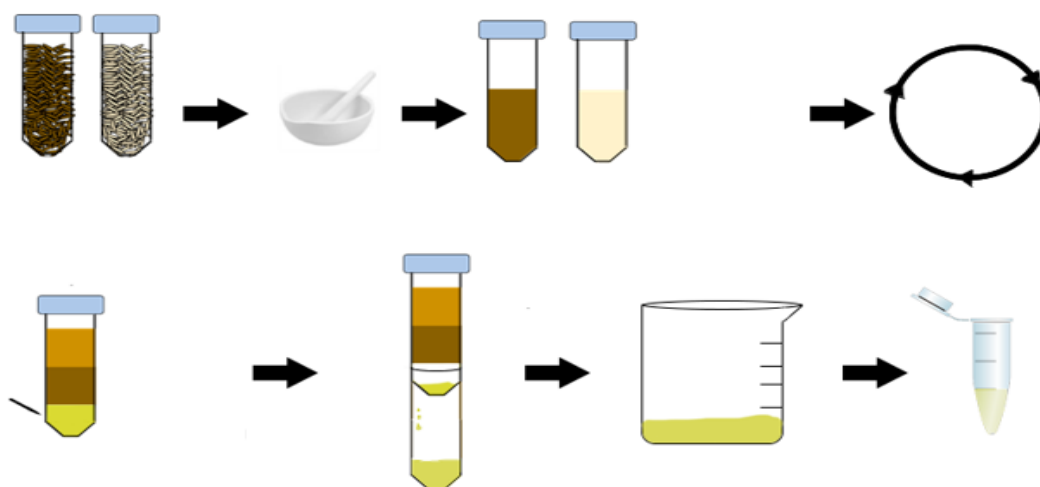
**Tabela 2. Equipamentos utilizados para estudos de extratos lipídicos provenientes de microbiota ou de ração de camundongos C57BL/6.** A direita estão os reagentes e a esquerda seus respectivos fabricantes.

<b>Equipamentos</b>	<b>Fabricantes</b>
Balança semi-analítica	Sartorius, ALE
Banho-maria	Braun Biotech International, ALE
Espectrofotômetro UV-Vis	Shimadzu do Brasil, BRA
PHmetro	Kasvi, BRA
Centrífuga 5702	Eppendorf, BRA
DTX 800 Multimolder Detector	Beckman Coulter, EUA
Fluxo Laminar Biosec12	Grupo Veco, BRA
Incubadora	Grupo Veco, BRA
T100 Thermal Cycler	Biosystems, EUA
Step one plus	Applied Biosystem , EUA
Glomax 20/20 Luminometer	Promega BRA
Leica RM 2125RT	Leica, ALE

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. EXTRAÇÃO LIPÍDICA

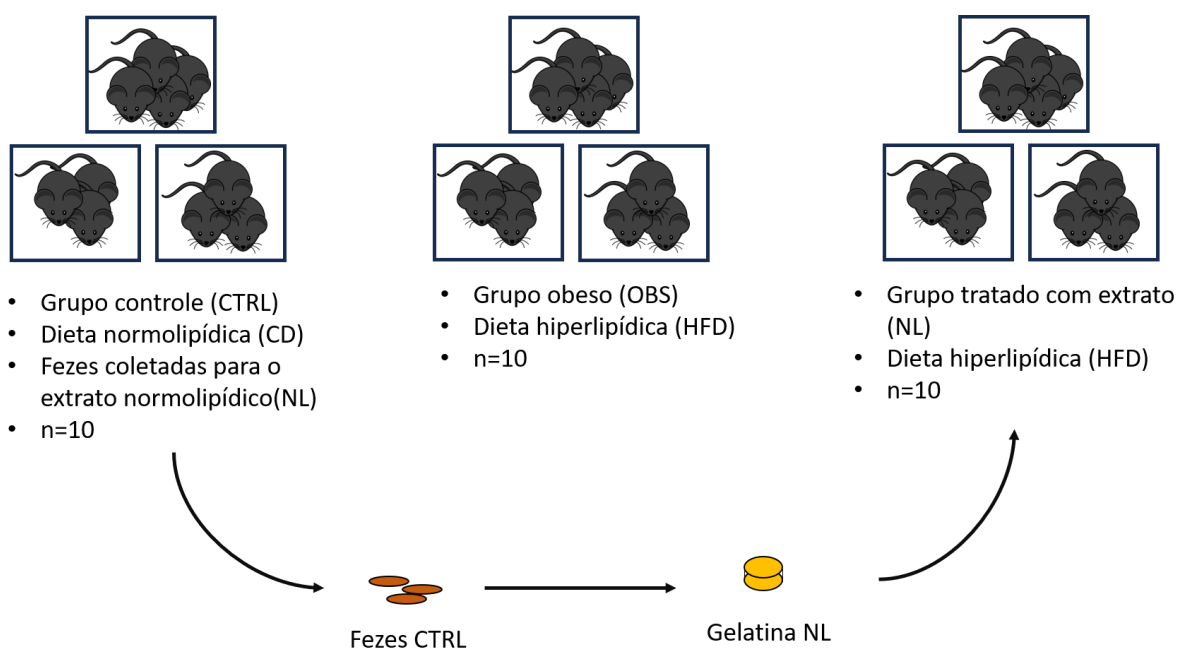
O material fecal foi coletado da maravalha dos animais entre a 9<sup>a</sup> e a 18<sup>a</sup> semana de vida, uma vez por semana, durante o experimento, somente dos camundongos alimentados com a dieta normolipídica. A coleta era realizada manualmente, utilizando uma pinça. Posteriormente, as amostras foram maceradas em um pilão. Após esse processo mecânico, foi adicionado solução salina 0,9% e clorofórmio: metanol (m/v), a solução foi centrifugada a 2000 rpm em Centrífuga 5702 (ependorf, BRA). Realizando a separação de fases, a fase inferior contendo os lipídios em clorofórmio metanol foi retirada por meio de um furo feito com agulha. Essa solução foi separada e, em seguida, foi seca, uma vez que os líquidos eram voláteis. Os lipídios foram pesados e, posteriormente, solubilizados em óleo de soja (Liza) na concentração de 100 mg/mL.(KRAUS; YANG; KAHN, 2015) (Fig. 4).



**Figura 4. Extração lipídica fecal.** Coleta manual de fezes de camundongos CB57BL/6 que posteriormente são levados ao pilão que é utilizado para macerar as fezes, que são solubilizadas em solução salina 0,9% e clorofórmio: metanol, centrifugadas e com a separação de fases é feito um furo na porção inferior do Falcon para retirada do material lipídico que posteriormente será seco e solubilizado em óleo de soja.

#### 4.2.2. MODELO ANIMAL

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética de uso de animais com título “Extrato lipídico de material fecal como estratégia terapêutica alternativa para síndrome metabólica” SEI n°: 23106.079840/2022-36. Os camundongos utilizados foram o C57BL/6 (CEMIB-Unicamp) machos e foram alocados no biotério do núcleo de medicina tropical da Universidade de Brasília. Os animais chegaram com 6 semanas de vida, foram mantidos em isolamento durante uma semana e na semana seguinte foram realocados em gaiolas contendo 3 ou 4 animais (Fig 5). Foram utilizados 30 animais para o estudo.



**Figura 5. Esquema de tratamento dos animais.** Os animais foram divididos em três grupos. O primeiro grupo foi designado como grupo controle, recebendo uma dieta normolipídica. O segundo grupo foi o grupo obeso, alimentado com uma dieta hiperlipídica, porém sem qualquer tipo de tratamento adicional. O terceiro grupo foi o grupo tratado, alimentado com dieta hiperlipídica, que recebeu administração de extrato lipídico. Os animais foram alocados em gaiolas contendo 3 ou 4 animais cada. As fezes do grupo controle alimentado com a dieta normal foram coletadas para a obtenção do extrato lipídico. Esse extrato lipídico foi administrado aos camundongos do grupo tratamento. Todos os grupos eram compostos por 10 animais.

Eles eram mantidos em gaiolas acrílicas separadas em sistema de ar filtrado, com ciclo claro escuro 12/12h, iniciando-se o ciclo claro as 6h e o escuro as 18h, temperatura controlada de 21°C. A ração e a água eram *ad libitum*. Os animais foram manipulados somente em fluxo laminar, preservando assim sua esterilidade. Foram submetidos a dieta hiperlipídica (60%) ou dieta normolipídica (Pragsoluções) (Tab. 3).

**Tabela 3. Composição ração hiperlipídica e normolipídica.** Valores referentes a dieta. Fonte: Pragsoluções Biociências.

	Normolipídica	Hiperlipídica
Ingrediente	%kcal	%kcal
Amido de milho	39,8%	11,9%
Caseína	20,0%	15,0%
Amido Dextrinizado	13,2%	7,5%
Sacarose	10,0%	7,5%
Óleo de Soja	15,8%	6,7%
Mix de vitaminas AIN	1%	0,7%
L-cistina	0,3%	0,2%
Banha	0%	50,5%

A partir da 17<sup>a</sup> semana de vida, além da dieta, os animais ingeriram gelatina. A primeira semana foi dedicada a um treino, seguida por três semanas em que foram alimentados diariamente com gelatina. Nas últimas duas semanas, foram conduzidos os testes de resistência à glicose e à insulina. Em seguida, na 23<sup>a</sup> semana de vida, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de câmara de isoflurano.

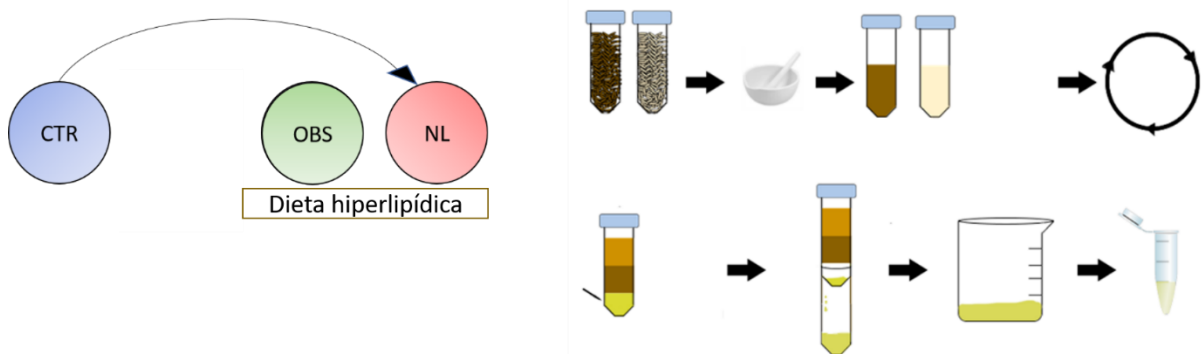
#### **4.2.3. GELATINA**

O extrato lipídico foi obtido das fezes de animais normais ou somente do veículo. O extrato foi ressuspenso em óleo de soja, uma vez que o DMSO seria prejudicial aos animais. Assim, a gelatina foi preparada seguindo o protocolo de ZHANG (2021), com modificações realizadas para a solubilização do óleo e para garantir maior precisão na concentração dos compostos estudados.

A elaboração da gelatina ocorreu da seguinte maneira: utilizando plástico filme, foram cobertas placas de 96 poços para facilitar a retirada da gelatina. Após a cobertura da placa, a gelatina foi preparada com 8% de gelatina em pó (dinâmica), 2% de sucrose (Sigma), 20% de óleo de soja (Liza) com 50 mg/kg de NL ou apenas óleo para o grupo de controle, 3,7% de essência de baunilha (Dr. Oetker) ou morango (mix). A gelatina foi aquecida para que se solubilizasse com o óleo; em seguida, a mistura foi submetida a 30 segundos em vórtex para uma

melhor homogeneização. A gelatina foi então inserida nos poços da placa previamente preparada e colocada em banho de gelo sob agitação até sua completa gelificação.

Para o grupo de tratamento, a gelatina foi preparada com o extrato, conforme descrito anteriormente, obtido das fezes dos camundongos alimentados com a dieta normal. A Figura 6 detalha como a extração lipídica foi conduzida e como os grupos foram alimentados e tratados.



**Figura 6. Modelo esquemático dos tratamentos.** À esquerda, estão representados os grupos estudados, onde as fezes do grupo controle foram utilizadas para a fabricação da gelatina do grupo NL. À direita, está ilustrado o processo de extração dos lipídios das fezes, inicialmente com maceração, seguida de diluição em solução salina e clorofórmio: metanol. Após centrifugação, ocorreu a separação de fases, sendo apenas a fase inferior retirada e ressuspenso em óleo de soja.

#### 4.2.4. HISTOLOGIA

O fígado foi armazenado em solução de formaldeído a 3,7% em 1x PBS a 4°C. As amostras foram cortadas manualmente com bisturi em fatias de aproximadamente 1 mm de espessura. Foram parafinizados seguindo a sequência: 30 min em água corrente para remoção de formaldeído, 30 min em etanol 70% , 30 min em etanol 80%, 30 min em etanol 90%, 30 min em etanol 100%, 30 min em etanol 100%, 30 min de etanol e xilol (1:1), 30 min de xilol, 30 min de xilol, 15 min de xilol:parafina, 1h de parafina, 1 hora de parafina. Os blocos de parafina contendo o tecido foram mantidos a -20°C por pelo menos 24 horas. Os blocos foram cortados em fatias de 10 µm em micrótomo Leica RM 2125RT. Em cada montagem de lâmina foi adicionada gelatina para melhor adesão do tecido à lâmina. As lâminas foram coradas por hematoxilina e eosina. Os slides foram digitalizados no *Apperio Scanner* e analisados no software QuPath.

#### **4.2.2. MENSURAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS NO FÍGADO**

Conteúdo de triglicerídeos hepáticos do lisado de fígado usando um kit enzimático comercial (Triglyceride Colorimetric Assay Kit - Cayman Chemical Company) seguindo as recomendações do fabricante.

#### **4.2.3. RT- PCR**

Para a coleta do RNA de tecido, o fígado foi coletado após eutanásia, macerado em turrax(Ultra Stirrer) em 1mL de Trizol e o RNA foi coletado conforme informações do fabricante. Após medição de 260/280 e 260/230 para verificação da qualidade do RNA, a síntese de cDNA e qPCR foram realizadas utilizando o kit Gotaq 2-step (Promega) conforme informações do fabricante, no equipamento Step one plus (Applied Biosystem). As sequências iniciadoras foram as seguintes: Ppar $\gamma$ : F 5'-TTTTCCGAAGAACCATCCGAT-3', R 5'-ATGGCATTGTGAGACATCCCC-3'; Fapb4: F 5'-ATCAGCGTAAATGGGGATTTG-3', R 5'-GTCTGCGGTGATTTTCATCGAA-3'; Dcn: F 5'-TCACAGAAGCGGTAACGAGC-3', R 5'-TCATGTATTTTCACGACCTTCTGA-3'; Vcam: F 5'-ATGTCAACGTTGCCCAA-3', R 5'-GCTGTCTGCTCCACAGGATT-3'; Cpt1a: F 5'-CTCAGTGGGAGCGACTCTTCA-3', R 5'-GGCCCTGTGGTACACGACAA-3'; Gapdh: F 5'-GGTCCTCAGTGTAGCCAAG-3', R 5'-AATGTGTCCGTCGTGGATCT-3'.

#### **4.2.4. TESTES DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E À INSULINA**

Os testes de tolerância à glicose e à insulina foram realizados após jejum de 6 horas diárias, sem restrição de acesso à água. Amostras de sangue foram coletadas da cauda para determinação da glicemia basal (0 min), seguida da administração de solução de glicose (1g/kg) ou insulina (0,5 UI/kg) por via intraperitoneal, para o Teste de tolerância à glicose (TTG) e teste de tolerância à insulina (TTI), respectivamente. Amostras de sangue da cauda foram coletadas após 30, 60, 90 e 120 minutos. Os níveis de glicemia foram analisados com glicosímetro e tiras reagentes (Accu-Check).

#### 4.2.5. ANÁLISES DE SORO

O sangue foi obtido por punção cardíaca. As amostras foram centrifugadas a 1.500 x g por 10 min a 4°C e os níveis de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicerídeos, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase foram medidos em serviço realizado pelo Laboratório de Análises Veterinárias da Universidade de Brasília.

#### 4.2.6. LIPIDÔMICA

A lipidômica foi realizada pelo *Salk institute*, Califórnia-EUA, os lipídios foram extraídos usando uma versão modificada do método (BLIGH; DYER, 1959). Resumidamente, as amostras foram agitadas manualmente em um frasco de vidro com 1 mL de PBS, 1 mL de metanol e 2 mL de clorofórmio contendo padrões internos (<sup>13</sup>C16-ácido palmítico, d7 -Colesterol) por 30 seg. A mistura resultante foi agitada com vórtex durante 15 seg e centrifugada a 2.400 x g durante 6 min para induzir a separação de fases. A camada orgânica (inferior) foi recuperada usando uma pipeta Pasteur, seca sob uma corrente suave de nitrogênio e reconstituída em 2: 1 clorofórmio: metanol para análise LC / MS.

A análise lipidômica foi realizada em um HPLC Vanquish online com um espectrômetro de massa quadrupolo-orbitrap Q-Exactive equipado com uma fonte de íons de eletropulverização (Thermo). Os dados foram adquiridos nos modos de ionização positivo e negativo. O Solvente A consistia em 95: 5 de água: metanol, o Solvente B era 70: 25: 5 isopropanol: metanol: água. Para o modo positivo, os solventes A e B continham formato de amônio 5 mM com 0,1% de ácido fórmico; para o modo negativo, os solventes continham 0,028% de hidróxido de amônio. Uma coluna XBridge (Waters) C8 (5 µm, 4,6 mm × 50 mm) foi usada. O gradiente foi mantido em 0% B entre 0 e 5 min, aumentado para 20% B em 5,1 min, aumentado linearmente de 20% para 100% B entre 5,1 e 55 min, mantido em 100% B entre 55 min e 63 min, retornou a 0% B em 63,1 min e manteve-se em 0% B até 70 min. A taxa de fluxo foi de 0,1 mL / min de 0 a 5 min, 0,3 mL / min entre 5,1 min e 55 min e 0,4 mL / min entre 55 min e 70 min. A tensão de pulverização foi de 3,5 kV e 2,5 kV para os modos de ionização positivo e negativo, respectivamente; O nível de RF da lente S é 65. Os gases da bainha, auxiliares e de varredura foram 50, 10 e 1, respectivamente. A temperatura capilar foi de 325 ° C e a temperatura



do aquecedor de gás auxiliar era de 200 ° C. Os dados foram coletados em MS / dd-MS2 completo (top 10). MS completo foi adquirido de 150–1500 m / z com resolução de 70.000, alvo AGC de 1x10<sup>6</sup> e um tempo máximo de injeção de 100 ms. MS2 foi adquirido com resolução de 17.500, uma primeira massa fixa de 50 m / z, alvo AGC de 1x10<sup>5</sup> e um tempo máximo de injeção de 200 ms. As energias de colisão normalizadas escalonadas foram de 20, 30 e 40%.

A identificação de lipídios foi realizada com *LipidSearch* (Thermo). A precisão de massa, cromatografia e integração de pico de todos os lipídios identificados pelo *LipidSearch* foram verificados com o software Skyline (MACLEAN et al., 2010). As áreas de pico foram usadas no relatório de dados, os dados foram normalizados usando padrões internos.

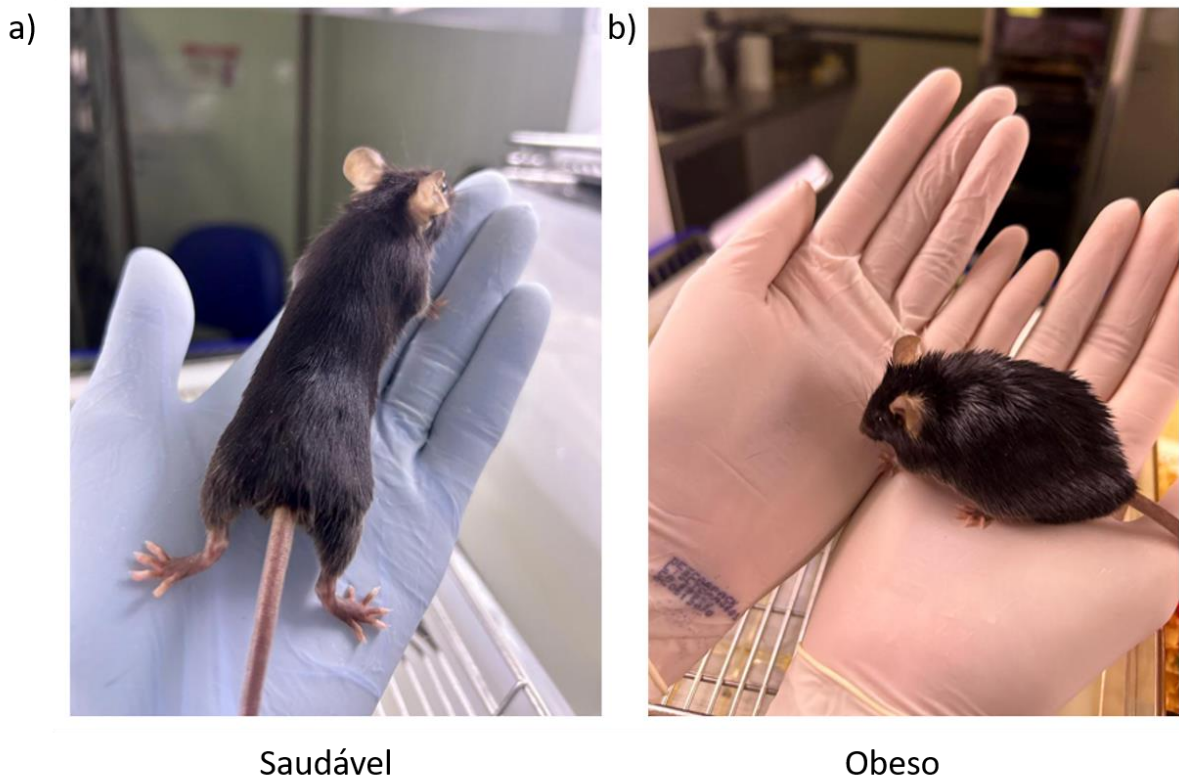
#### **4.2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os dados foram testados quanto à distribuição normal com o teste de Shapiro Wilk. Caso os dados passassem no teste de normalidade, foi aplicado o teste T de Student ou ANOVA unidirecional ou ANOVA bidirecional, caso os dados apresentassem mais de uma variável. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado em dados não normais com vários grupos. Os dados são mostrados como Média ± SEM. Para o gráfico de vulcão foi realizado o teste T de Student. A análise foi feita no software GraphPad Prism. A significância foi considerada quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

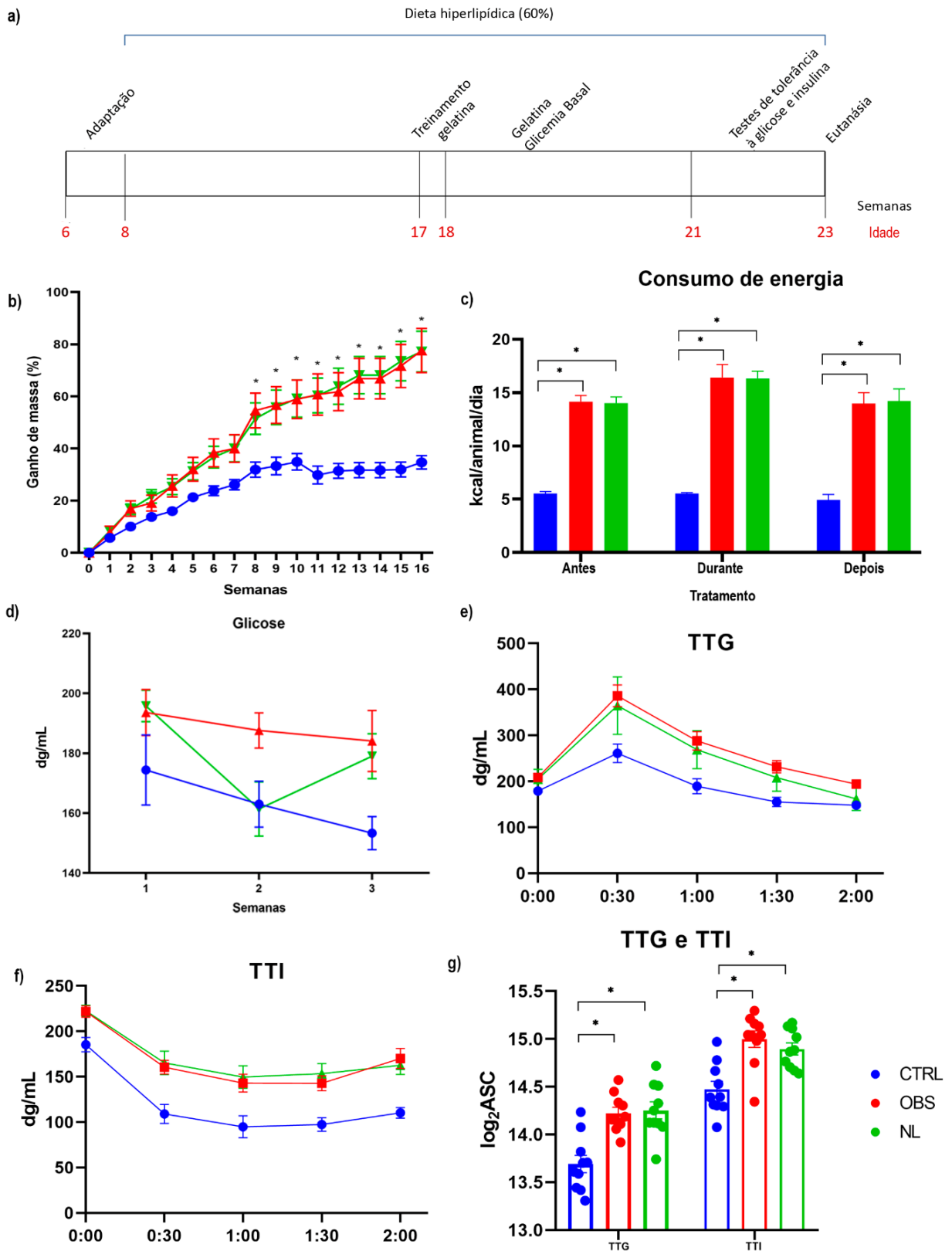
### 5.1. EFEITOS DE NL NA MASSA CORPORAL, RESISTÊNCIA À INSULINA E À GLICOSE

O experimento teve duração de 15 semanas, das quais 3 envolveram o tratamento com extrato lipídico. Os grupos experimentais foram os seguintes: controle (CTRL), alimentado com dieta normolipídica, obeso (OBS), alimentado com dieta hiperlipídica, e tratado (NL), alimentado com dieta hiperlipídica e tratado com gelatina contendo 50 mg/kg de NL. Os grupos OBS e NL atingiram a obesidade (Fig 7), apresentando diferenças significativas em relação ao grupo CTRL. Quanto à ingestão calórica, as diferenças foram observadas desde o início



**Figura 7. Fenótipo dos animais do grupo controle ao longo do experimento.** Na imagem (a), camundongo submetido à dieta normolipídica, enquanto na imagem (b), camundongo submetido à dieta hiperlipídica

da administração da dieta hiperlipídica, enquanto para o peso, as diferenças significativas surgiram a partir da 8ª semana de experimento.



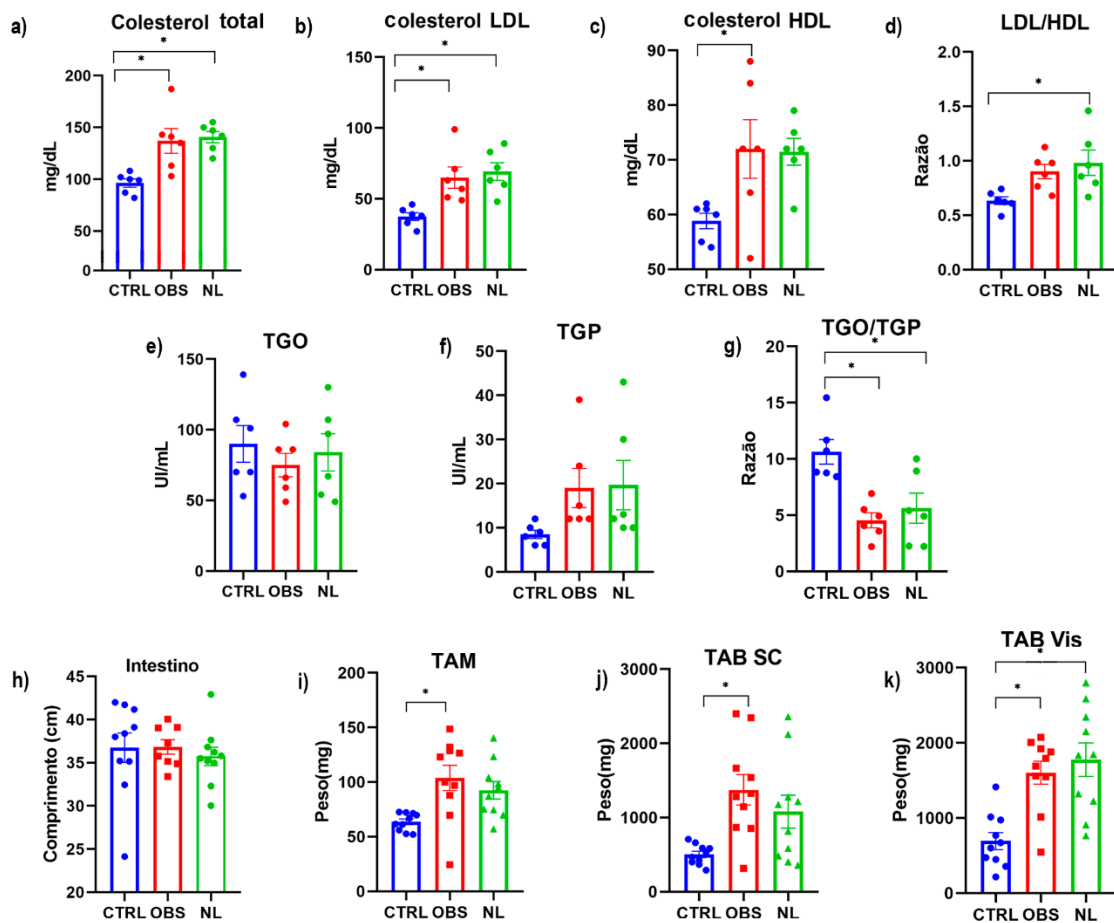
**Figura 8. Efeito do NL no peso corporal, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina** a) Desenho do estudo: Camundongos C57Bl/6 machos alimentados com uma dieta rica em gordura receberam NL (50 mg/kg/d) ou veículo por três EMPANAs. b) Ganho de peso em porcentagem durante o experimento, c) Consumo energético antes, durante e após o tratamento. Glicose basal do animal durante a administração de gelatina (D), níveis de glicemia de jejum durante o tratamento, níveis de glicose no sangue durante o TTI (E) e TTG (F), e a área sob a curva do TTI e TTG (G). N = 10/grupo; dados apresentados como média  $\pm$  EMP. Análise estatística realizada por meio de ANOVA de duas vias seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey (B,C,D,E e F) ou ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey (G) ( $p < 0,05$ ). TTG: teste de tolerância à glicose; TTI: teste de tolerância à insulina.

Camundongos machos C57Bl/6 alimentados com uma dieta hiperlipídica por 10 semanas foram submetidos a tratamento com veículo ou NL (50 mg/kg/d) por três semanas (Figura 8A), a partir das 18 semanas de idade. Conforme esperado em comparação com a dieta normolipídica, a dieta hiperlipídica (HFD) resultou em ganho de peso significativo (Figura 8B), aumento da ingestão calórica, redução da tolerância à glicose (Figura 8F e 8G) e diminuição da sensibilidade à insulina (Figura 8E e 8G), conforme esperado em comparação com a dieta alimentar normolipídica. A administração de NL a camundongos alimentados com

dieta hiperlipídica não alterou o ganho de peso, a ingestão calórica, a intolerância à glicose ou a sensibilidade à insulina (Figura 8B e 8G).

## 5.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS DO SORO E MENSURAÇÕES DOS TECIDOS

Na 23<sup>a</sup> semana de vida, os animais foram submetidos à eutanásia e foram coletados diferentes tecidos e o soro dos animais.



**Figura 9. Análise bioquímica de medições séricas e teciduais.** Os parâmetros medidos foram colesterol total (a), colesterol LDL (b), colesterol HDL (c), GOT(e) e GPT(f). As proporções de LDL/HDL(d) e GOT/GPT(g) também foram calculadas. Para a análise tecidual, foram medidos o comprimento do intestino (h) e a massa do BAT (i), do WAT subcutâneo (j) e do WAT visceral (k) após a eutanásia. N=6/grupo para análise bioquímica e N=10/grupo para análise do tamanho dos órgãos; dados apresentados como média  $\pm$  SEM. Análise estatística realizada por meio de ANOVA ONE-Way seguida de testes de comparações múltiplas de Tukey, ( $p < 0,05$ ). LDL: Lipoproteína de baixa densidade; HDL: Lipoproteína de alta densidade; TGO: transaminase glutâmica oxaloacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; TAM: tecido adiposo marrom; TAB SC: tecido adiposo branco subcutâneo; TAB Vis: tecido adiposo branco visceral.

A Figura 9, mostra as análises bioquímicas realizadas: colesterol total (a), colesterol LDL (b), colesterol HDL (c), razão entre LDL/HDL (D), Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO) (e), transaminase glutâmico pirúvica (TGP) (f) e razão entre TGO/TGP (g). As análises bioquímicas apresentaram diferenças significativas para os grupos obesos (OBS e NL) e controle para colesterol total, colesterol LDL e razão TGO/TGP. O LDL em pacientes obesos apresentam taxas normais ou pouco elevadas (GRUNDY, 2004), o que em nosso trabalho apresentou aumento nos grupos obesos.

O HDL é um dos fatores de risco para doenças cardiovasculares e tem suas taxas alteradas em obesidade. Já foi visto que a forma de HDL 3 está aumentada em pacientes obesos (STADLER et al., 2021). A obesidade também afeta a qualidade do HDL, fazendo com que ele perca sua atividade protetiva o que mostra leva a complicações na obesidade ocasionando em infecção, inflamação, diabetes e doenças cardiovasculares (SMITH, 2010). Aqui percebemos que somente o grupo OBS apresentou diferença significativa em relação ao CTRL, enquanto o NL não apresenta diferença.

As alterações das transaminases glutâmico pirúvica (TGP) e glutâmica oxaloacética (TGO), também conhecidas como alanina amino transferase e aspartato amino transferase respectivamente, estão relacionadas a severidade da doença do fígado associada a disfunção metabólica (CLARK; BRANCATI; DIEHL, 2003). A proporção de TGO/TGP está associada as possíveis injúrias no fígado (COHEN; KAPLAN, 1979). Em pacientes com dependência de álcool, quanto menor a razão maiores eram as injúrias. Como o esperado, as razões TGO/TGP foram menores nos grupos submetidos à obesidade.

A Figura 9 também apresenta os resultados da mensuração do comprimento do intestino (h), Tecido Adiposo Marrom (TAM) (i), Tecido Adiposo Branco Subcutâneo (TAB SC) (j) e Tecido Adiposo Branco Visceral (TAB VIS) (k). Não foram observadas alterações significativas no tamanho dos intestinos.

Observamos diferença significativa entre o grupo controle e o grupo obeso, tratado ou não com NL, para TAM e TAB SC (Fig. 10), mas não houveram diferenças significativas entre os grupos NL e OBS. Interessantemente, o grupo

tratado com NL não mostrou-se diferente do OBS no TAB Vis, mas inibiu o aumento de peso do TAM e TAB SC.

Apesar da ação do NL no peso do TAM e TAB SC, todos os outros resultados não sugeriram uma significativa ação do NL sobre o fenótipo dos camundongos obesos. Estes resultados não foram promissores para considerar o NL como potencial terapia para obesidade. Apesar disto, seguimos para investigação dos tecidos.

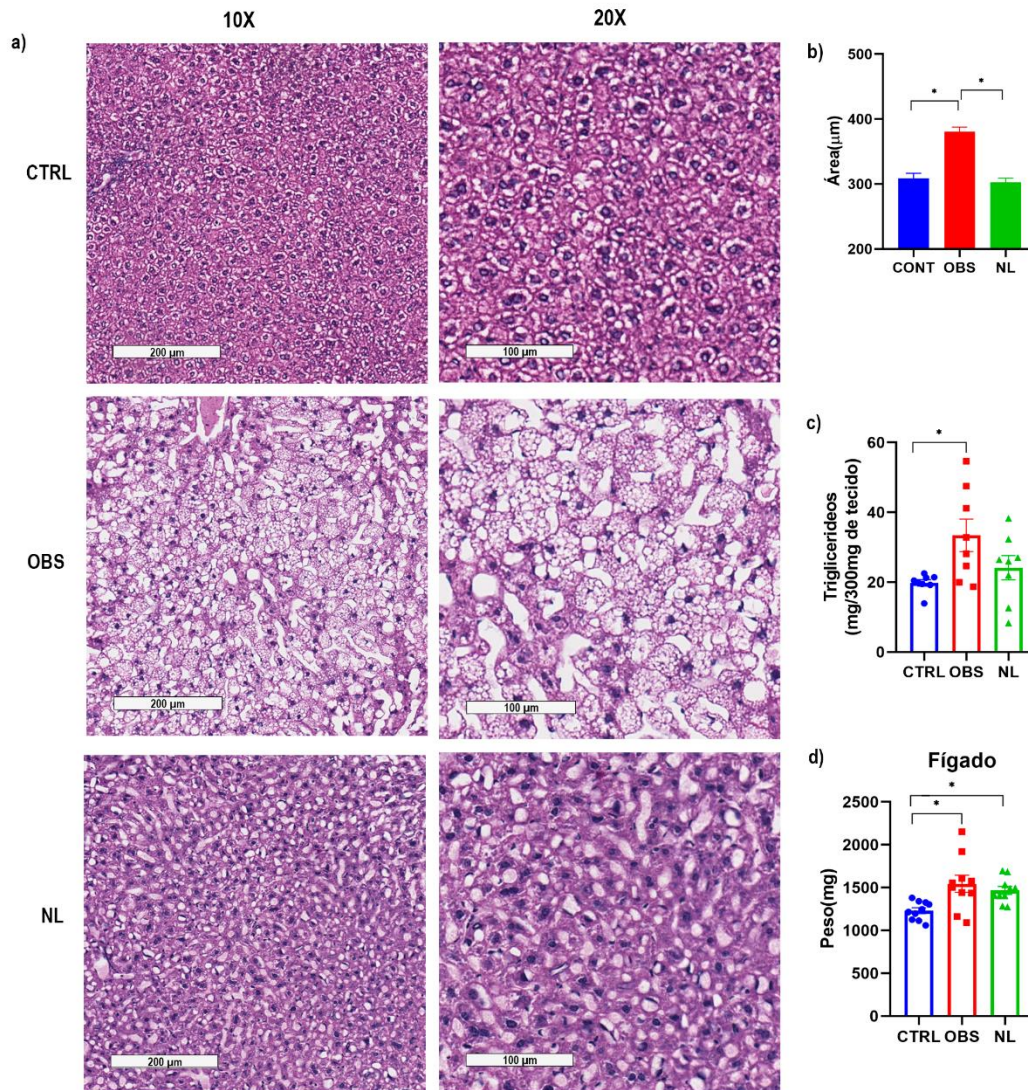
### **5.3. HISTOLOGIA, CONTEÚDO DE TRIGLICERÍDEOS E MASSA DO FÍGADO**

Para observar se o NL poderia ter afetado o fígado, realizamos análises histológicas do tecido hepático. Surpreendentemente, o tratamento com NL atenuou o acúmulo de gordura hepática induzido pela dieta hiperlipídica (Fig. 10A e Apêndice 1 e 2). Camundongos obesos tratados com NL e camundongos alimentados com ração normolipídica exibiram características histológicas do fígado e diâmetro médio dos hepatócitos semelhantes (Fig. 10B). Observamos também que o conteúdo de triglicerídeos hepático foi significativamente diminuído pelo tratamento com NL, para níveis comparáveis aos de camundongos alimentados com dieta normolipídica (Fig. 10C). A massa do fígado aumentou significativamente em camundongos obesos em comparação ao controle (Fig. 10D). Estes achados que mostram que o NL atenuou o acúmulo hepático de triglicerídeos sem modificar o ganho de peso induzido pela dieta ou a intolerância à glicose sugerem que possivelmente as vias de sinalizações entre a disfunção metabólica causada pela obesidade e esteatose hepática possam ser dissociadas.

Até o momento, não temos conhecimento de uma terapia farmacológica eficaz para MASLD, independentemente do seu efeito sobre o peso ou disfunção metabólica. No caso dos agonistas do receptor GLP-1, drogas emergentes no tratamento da obesidade, podem atenuar a MASLD, mas este efeito está associado



a perda de peso e correção da disfunção metabólica (TARGHER; MANTOVANI; BYRNE, 2023).



**Figura 10. Histologia, conteúdo de triglicerídeos e peso do fígado.** a) Lâmina histológica representativa dos fígados de animais submetidos a dieta normal (CTRL) e dieta hiperlipídica (OBS e NL). Foram examinados n=5/grupo, e para cada fígado foram obtidas e analisadas 3 lâminas. No painel direito, as imagens são mostradas com ampliação de 10x e escala de 200µm. No painel esquerdo, elas são exibidas com ampliação de 20x e escala de 100µm. A área das células hepáticas (b) foi medida. c) Teor de triglicerídeos hepáticos, n=8/grupo. d) Massa de fígado de camundongo n=10/grupo. Dados apresentados como média ± EMP. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA ONE-Way seguida pelo teste de Kruskal-Wallis (b) ou testes de comparações múltiplas de Tukey (c e d), p<0,05.

HALLSWORTH et al., (2011) mostrou em adultos sedentários que possuíam MASLD que exercícios de resistência conseguem diminuir os lipídios no fígado, oxidação lipídica e melhorar o controle da glicose e a resistência à insulina sem reduzir o peso dos indivíduos. Além disto, um estudo em pessoas de meia idade com gordura hepática com a intervenção de manter a ingestão calórica igual e cortar carboidratos, aumentando a taxa de proteínas, é possível ver a redução de gordura no fígado,

mesmo que acompanhada de uma pequena diminuição na gordura corporal, sem alteração na circunferência do abdome trazendo também alterações a microbiota dos indivíduos (MARDINOGLU et al., 2018).

Outros tipos de mudança na dieta, associadas ou não ao exercício também trazem melhorias acompanhadas de redução de peso. Em um estudo camundongos C57BL/6 foram induzidos a obesidade e separados em quatro grupos: sedentários, sedentários com dieta normolipídica, prática de exercícios sem alteração de dieta e prática de exercícios com alteração para dieta normolipídica. Tanto a alteração de dieta quanto a inserção de exercícios trouxeram benefícios isoladamente, porém somente o exercício não apresentou mudança significativa na redução de peso, enquanto a dieta apresentou, já as duas práticas associadas apresentaram o melhor cenário. Em todos os casos, houve redução dos triglicerídeos hepáticos (OK; KO; BAE, 2018).

#### **5.4. EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À ADIPOGÊNESE, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO**

Com o objetivo de analisar o efeito do NL na expressão dos genes associados à adipogênese, inflamação e estresse oxidativo no fígado, focamos nos seguintes genes: FABP4, CPT1A, PPAR $\gamma$ , VCAM e DCN.

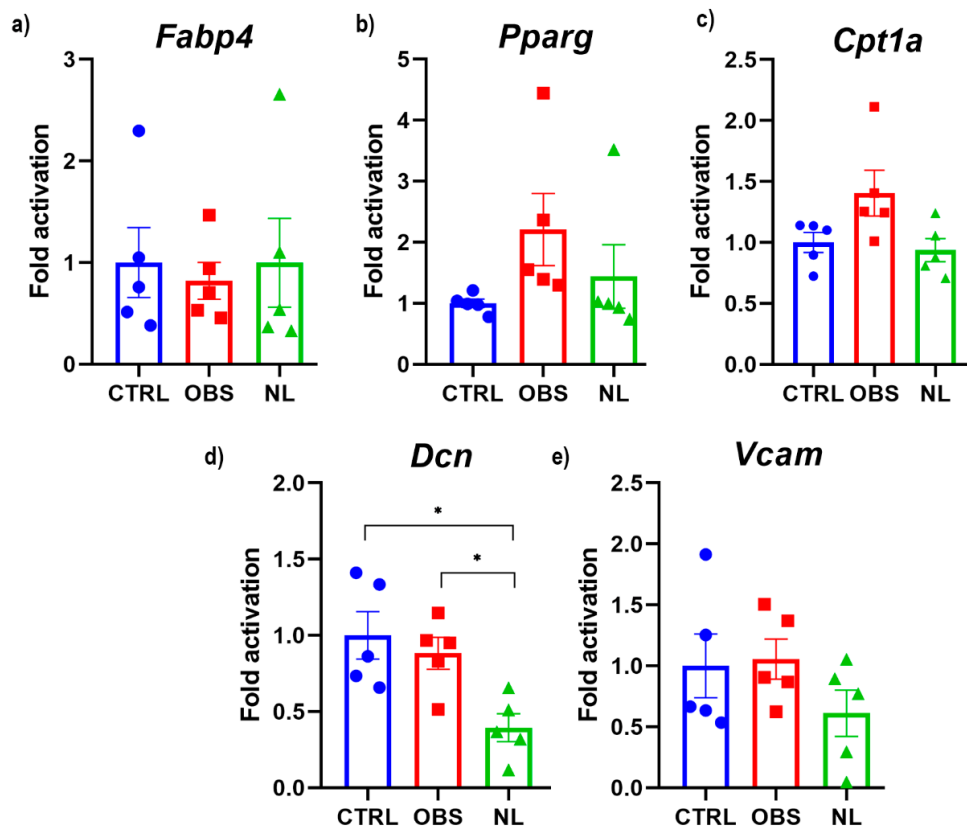
O gene FABP4, responsável pela codificação da Proteína de Ligação a Ácidos Graxos 4, está intrinsecamente associado à adipogênese. Por meio de análises e espectrometria de massa associada a proteômica, sua vinculação com a obesidade e a síndrome metabólica também foi estabelecida, como um importante bio marcados no plasma, visto que em obesos a sua concentração era maior. Em pacientes com diabetes tipo 2, a quantificação da proteína no soro, está relacionada a severidade para casos de MASLD (HYUN KOH et al., 2009). Em estudos realizados em humanos, verificou-se um aumento na expressão deste gene no fígado de pacientes com doença do fígado associado a síndrome metabólica em amostras de biópsia (GRECO et al., 2008).

No entanto, nossos resultados não mostraram diferenças significativas entre os grupos controle e tratamento (Fig 11a). Possivelmente, se aumentássemos o

número de amostras analisadas observaríamos uma diferença significativa. Ou ainda, talvez o tempo de tratamento pode não ter sido suficiente para modificar a expressão desse gene.

O *Peroxisome proliferator active receptor* (PPAR) é um receptor nuclear importante para homeostase de lipídios e glicose (GRYGIEL-GÓRNIAK, 2014). Pacientes obesos e com esteatose hepática mostram um aumento na expressão genética do PPAR $\gamma$  (PETTINELLI; VIDELA, 2011). Apesar da ausência de diferenças significativas nos nossos resultados (Fig 11b), a observação da dinâmica de expressão do PPAR $\gamma$  sugere que talvez aumentando o número de amostras analisadas as diferenças estatísticas se tornem aparentes. Novos experimentos serão necessários para observar com clareza o envolvimento do PPAR na atenuação da MASLD

O gene CPT1a é responsável pela expressão da proteína palmitoiltransferase carnitina 1A, a qual desempenha um papel crucial no transporte de ácidos graxos do citoplasma para a mitocôndria. A isoforma  $\alpha$  desta proteína está predominantemente presente no fígado. Em camundongos com MASLD, observou-se um aumento na expressão desse gene hepático em células T CD4<sup>+</sup> levando a apoptose, e com a inibição dos genes CPT há uma prevenção da progressão de MASLD levando ao hepatocarcinoma (BROWN et al., 2018). De forma semelhante ao PPAR $\gamma$ , o Cpt1a não apresentou diferença significativa entre os grupos (Fig 11c), o que talvez seja mudado pelo aumento no número de amostras analisadas.



**Figura 11. Expressão gênica mensurada em fígados tratados com NL.** Em a) e b) estão os genes relacionados a adipogênese, *Fabp4* e *Pparg*, respectivamente. Em c) o gene *CPT1a* que é relacionado ao estresse oxidativo. Já em d) e e) estão os genes relacionados a inflamação. Foi realizado o teste student T test,  $p < 0.05$  e  $n = 5$ .

O gene *DCN* é responsável pela síntese da proteína decorina, importante na via da inflamação (JÄRVINEN; RUOSLAHTI, 2019) e metabolismo celular (ZHENG et al., 2021). No entanto, observamos uma diminuição na expressão no grupo NL, sendo inferior tanto ao grupo de controle quanto ao grupo de indivíduos obesos (Figura 11d).

O gene *VCAM* (*vascular cell adhesion molecule 1*) codifica uma proteína responsável por induzir a adesão e extravasamento de monócitos nos vasos sanguíneos. No transcriptoma do fígado de camundongos com esteato hepatose, observa-se que *VCAM* está com a expressão aumentada em MASLD e está associado a progressão da doença, se tornando um importante alvo para a MASLD (FURUTA et al., 2021). Nossos resultados não mostraram diferença significativa entre os grupos, apesar do NL ter diminuído a expressão de *VCAM* (Fig 11e). Aqui, novamente, um maior número de amostras poderia ter auxiliado a esclarecer as diferenças

## 5.5. LIPIDÔMICA E POTENCIAIS LIPÍDIOS DE INTERESSE

Com a finalidade de identificar os lipídios possivelmente envolvidos na atenuação do MASLD de camundongos obesos induzido por dieta hiperlipídica, foi realizado a lipidômica global da dieta normolipídica (CD) e extrato fecal normolipídico.

Enfatizo que estes experimentos foram realizados no *Salk Institute*, San Diego, Califórnia. Ou seja, apesar de ser a mesma linhagem de camundongos da Universidade de Brasília, as fezes coletadas foram de animais mantidos e alimentados no biotério da Universidade da Califórnia. Os resultados obtidos foram enviados ao nosso grupo para que as análises pudessem ser realizadas.

Foram identificados um total de 551 lipídios, que foram distribuídos em 31 subclasses (Fig. 12A). As subclasses lipídicas encontradas em NL diferiram daquelas identificadas na dieta alimentar (Fig. 12A e 12B). A distribuição de grupos lipídicos específicos em NL é apresentada na Figura 13C. Apesar da abundância de triglicerídeos (TG) em NL, é notável a presença de ceramidas (Cer), ácidos graxos (FA) e lisofosfatidilserina (LPS).

Identificamos uma elevada proporção de fosfatidilcolina (PC) em relação à fosfatidiletanolamina (PE) em NL (Figura 12D). A taxa entre PC e PE é relevante para a integridade da membrana celular. Estudos anteriores demonstraram que camundongos, alimentados com uma dieta normolipídica e deficientes em PE N-metiltransferase (PEMT<sup>-/-</sup>), responsável pela conversão de PC em PE, desenvolveram acúmulo de gordura hepática, inflamação e insuficiência hepática aguda (LI et al., 2006). Este último resultado foi associado à diminuição da proporção de PC para PE na membrana, resultando na perda de integridade da membrana. Isso, por sua vez, aumentou a permeabilidade da membrana, desencadeando a liberação de citocinas pró-inflamatórias e promovendo o desenvolvimento de MASLD (Figura 12G) (LI et al., 2006; VAN DER VEEN et al., 2017).

Além disso, abordagens para restabelecer a relação PC/PE, seja por meio da suplementação de colina ou pela redução da síntese de PE, conseguiram reverter a inflamação hepática, embora não tenham afetado a esteatose hepática (LI et al., 2006). Portanto, é razoável especular que a abundância de PC em NL pode ter contribuído para a redução observada no MASLD. Embora camundongos CD sem

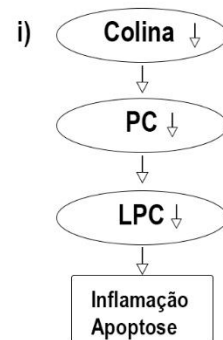
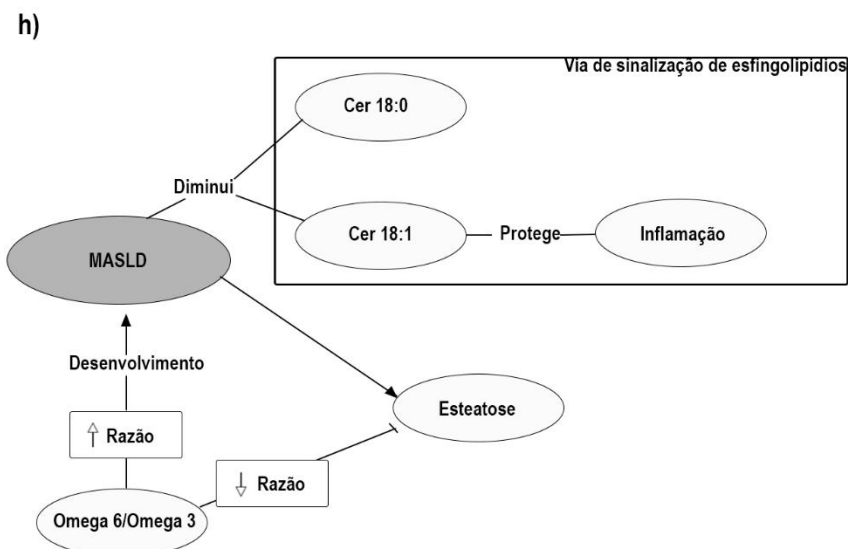
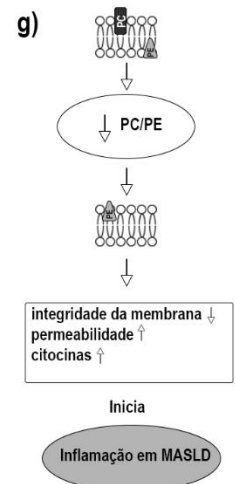
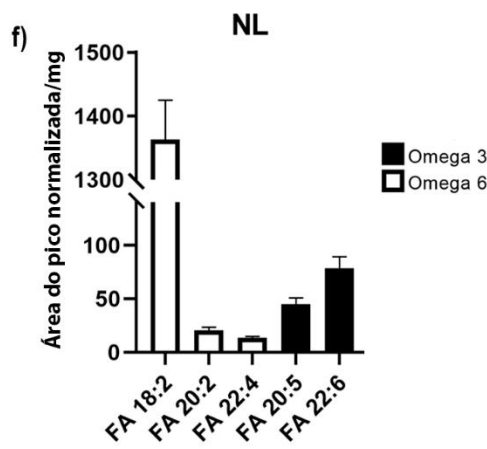
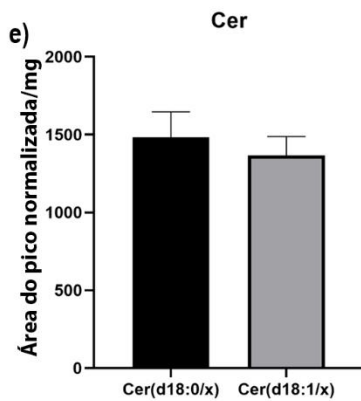
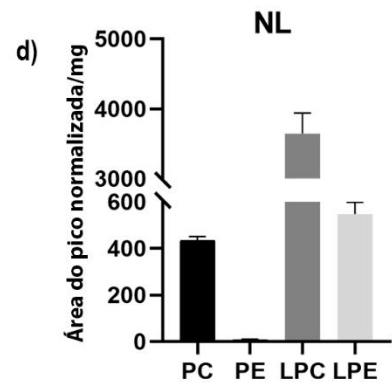
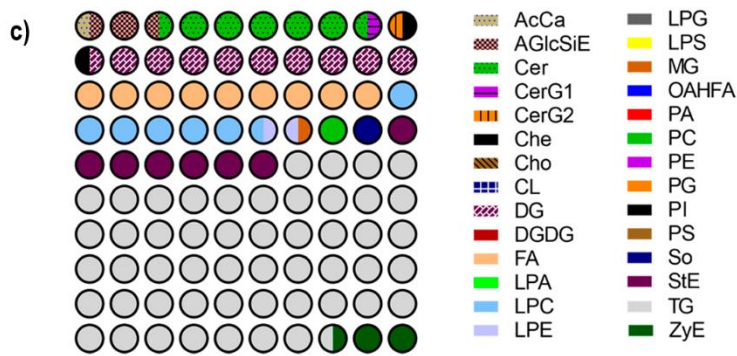
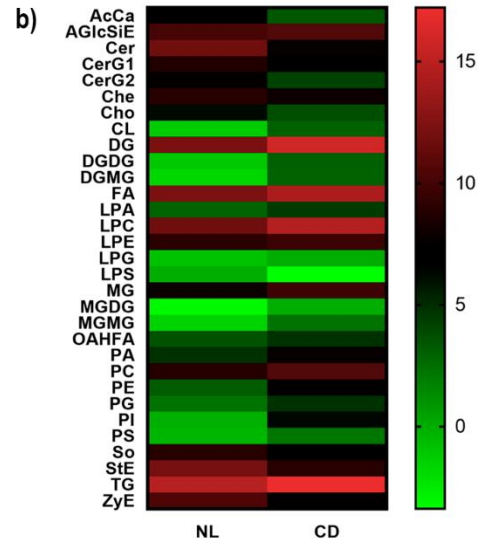
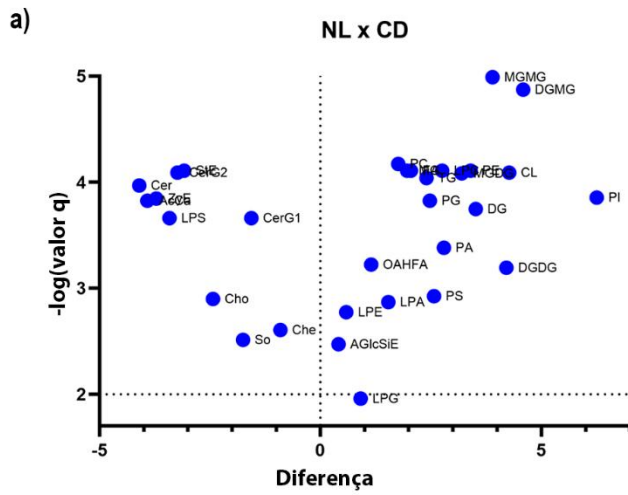
PEMT, submetidos a intervenções para aumentar a relação PC/PE, tenham apresentado melhora na inflamação, mas não na esteatose, ao contrário do que observamos, não é possível descartar a possibilidade de que em um modelo menos grave de MASLD, tais intervenções possam melhorar o acúmulo de gordura hepática, conforme observado neste estudo.

Da mesma maneira, a administração de PC em ratos com esteatose hepática associada à disfunção metabólica induzida por ácido orótico resultou na diminuição do acúmulo de triglicerídeos no fígado. Esse efeito foi acompanhado pela redução da atividade de enzimas envolvidas na síntese de triglicerídeos e pelo aumento da atividade da CPT1A7. Descobertas semelhantes foram registradas em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica e esteatose hepática associada à disfunção metabólica (WEBER et al., 2020). Com base em dados de modelos animais, foi recentemente evidenciado que uma maior ingestão dietética do precursor da fosfatidilcolina, a colina, estava associada a um menor risco de esteatose hepática avaliada por elastografia hepática em seres humanos (CHAKRABARTY et al., 2021).

A colina é uma molécula relevante para a homeostase do corpo. Está envolvida em diversos processos metabólicos, entre eles: a participação no neurotransmissor acetil colina, estrutura a membrana celular e mitocôndria e é uma grande influenciadora no metabolismo lipídico (CORBIN; ZEISEL, 2012). É a precursora da fosfatidilcolina (PC) e da lisofosfatidilcolina (LPC) que apresenta papéis essenciais nas células, principalmente no fígado. Outros grupos lipídicos de destaque são a fosfoetanolamina (PE) e a lisofosfoetanolamina (LPE) e esses estão presentes em NL (Fig 12D).

Lisofosfolípidios (LFL) são produtos de desacetilação de fosfolípidios produzidos a partir da ação da enzima fosfolipase, tanto 1 quanto 2 (MAKIDE et al., 2009). Em NL há a presença de LPC e LPE. A razão entre LPC e LPE em pacientes que desenvolveram MASLD foi diminuída (PAPANDREOU et al., 2017). Entretanto, o papel de LPE ainda não foi completamente elucidado. Existem trabalhos que discutem como essas moléculas influenciam o acúmulo lipídico em células hepáticas (YAMAMOTO et al., 2022) e por outro lado como há uma diminuição desses lipídios em plasma de pacientes com MASLD (TIWARI-HECKLER et al., 2018).





**Figura 12. Análises lipídicas e potenciais lipídios relevantes.** a) Dispersão de grupos lipídicos de NL em comparação com a dieta alimentar (CD). b) Mapa de calor ilustrando os grupos lipídicos de CD e NL. c) Distribuição em porcentagem da composição lipídica do extrato de NL. Lipídios presentes no extrato lipídico NL potencialmente presentes na patologia, como PC, LPC, PE e LPE (d), Ceramidas (e), e PUFA's (f), que desempenham papéis essenciais nos processos biológicos relacionados a doenças. Estes incluem a proporção de PC/PE na membrana plasmática (g), exercendo influência direta nos processos que impactam o MASLD (h) e metabolismo da colina (i). Os dados foram transformados para  $\log_2 \times \text{NL/CD}$  para gráfico de vulcão e foi realizado teste t de Student múltiplo,  $p < 0,05$ . Para o mapa de calor, os dados foram transformados em  $\log_2(x)$ . Dados apresentado como média  $\pm$  EPM.

Os lipídios PC e LPC são associados ao metabolismo de colina. O metabolismo de colina em câncer já é bem descrito na literatura (GLUNDE; BHUJWALLA; RONEN, 2011). Levando em consideração que o desenvolvimento de MASLD resulta em HCC, é um importante via de sinalização para a doença. Em pacientes com HCC há um aumento de PC e diminuição de LPC associados a progressão da doença (COTTE et al., 2019). Entretanto, foram vistos em pacientes com MASLD a diminuição de PC em lipidômica do fígado (MÄNNISTÖ et al., 2019)

O metabolismo de colina curiosamente sofre uma diminuição em MASLD (CORBIN; ZEISEL, 2012), e essa diminuição leva consequentemente a diminuição de PC e de LPC que são grupos lipídicos envolvidos principalmente na parede celular. Essa diminuição de LPC leva a inflamação e apoptose nas células hepáticas (Fig 13 I) (PAUL; LEWINSKA; ANDERSEN, 2022), o que consequentemente causa uma maior deteriorização desse tecido.

É crucial observar que a conversão da colina na via de fosfatidilcolina (PC) foi associada ao desenvolvimento do câncer. O aumento nos níveis de colina e seus metabólitos é reconhecido como um marcador estabelecido para o câncer (GLUNDE; BHUJWALLA; RONEN, 2011). Além disso, na MASLD, há uma diminuição na produção de fosfatidilcolina (PC), o que contribui para o acúmulo de gordura. Também é observada uma redução na lisofosfatidilcolina (LPC), que desencadeia inflamação, estresse oxidativo e apoptose. Esses mecanismos, quando combinados, aceleram a progressão da doença.

Possivelmente, ao repor os metabólitos derivados da colina, esse ciclo de eventos pode ser reduzido, prevenindo a apoptose e, consequentemente, a progressão da MASLD para o carcinoma hepatocelular. Esses lipídios desempenham um papel crucial tanto na apoptose quanto nas vias do câncer (GUO et al., 2005).



A presença significativa de ceramidas com cadeias de 18 carbonos, tanto saturadas quanto insaturadas, foi notada em NL (Figura 12E). Notavelmente, uma análise lipídica prévia do fígado revelou uma diminuição na abundância de Cer(18:0) no MASLD(MONTEFUSCO et al., 2022). Além disso, estudos demonstraram que Cer(18:0) reduz a inflamação hepática em um modelo de rato com MASLD(WANG et al., 2020). Portanto, é plausível que a presença de Cer(18:0) em NL tenha contribuído, pelo menos parcialmente, para a melhoria observada no MASLD neste estudo. O desequilíbrio nos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), incluindo os ácidos graxos ômega-3 e ômega-6, também pode desempenhar um papel no desenvolvimento de doenças. Uma proporção elevada de ômega-6/ômega-3 está associada a uma maior suscetibilidade ao MASLD, enquanto uma proporção mais baixa se correlaciona com a redução da esteatose hepática (Figura 13H).

A mudança evolutiva na proporção de ácidos graxos ômega-3 para ômega-6 representa um fenômeno significativo. Durante a era Paleozóica, essa proporção era mantida em níveis de 1:1. No entanto, na dieta ocidental contemporânea, essa proporção sofreu uma mudança dramática para 15:1. É digno de nota que os ácidos graxos ômega-3 presentes em fontes naturais podem desempenhar um papel suplementar crucial na restauração do equilíbrio entre ômega-6 e ômega-3. Embora essa relação tenha sido estabelecida em modelos animais, ainda não foi demonstrada uma associação clara entre a proporção ômega-6/3 e a progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (MAFLD) em seres humanos(HEINZER et al., 2022).

Yasuda et al. (2020) previamente caracterizaram os lipídios derivados da microbiota intestinal. Ao eliminar a microbiota intestinal com uma combinação de antibióticos, os pesquisadores identificaram centenas de moléculas lipídicas nas fezes associadas à microbiota(YASUDA et al., 2020). Quatorze dessas moléculas foram detectadas em nossa análise lipidômica de NL, incluindo PE (15:0/15:0), Cer (16:0/16:0), Cer (18:0/18:0), PE (15:0/18:2), LPE (15:0), Cer (17:0/16:0), Cer (18:0/16:0), PG (15:0/16:0), PG (18:0/18:1), PG (18:1/18:1), PE (15:0/16:0), FA (18:0), FA (18:1), FA (18:2). Os metabólitos do ácido linoleico FA(18:0), FA (18:1) e FA(18:2) foram anteriormente associados a Yasuda et al. (2020) relacionados a *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium pseudolongum*<sup>13</sup>. PE e LPE foram previamente relacionados

ao filo Bacteroidetes, bem como aos filios Firmicutes e Proteobacteria, enquanto os ácidos biliares primários (LCA, CA e  $\alpha$ -MCA), AcylCer (Cer (18:0/18:0) ), Cer-BDS (Cer (18:0/16:0)) e PG (PG (15:0/16:0), PG (18:0/18:1), PG (18:1/18:1)) estavam relacionados à presença intestinal de Bacteroidetes(YASUDA et al., 2020).

Existem evidências crescentes que associam a microbiota intestinal à produção de moléculas que podem causar danos hepáticos ou desencadear inflamação no fígado(SCOTT, 2017). Intervir nos fatores ambientais que impactam a microbiota intestinal pode ser uma abordagem útil na prevenção e tratamento de MASLD.

Acreditamos que estes resultados da lipidômica possam auxiliar na identificação dos lipídios responsáveis pela atenuação da MASLD. Entretanto, temos que ter cautela, pois conforme mencionado, as amostras utilizadas para lipidômica e para tratamento não tiveram a mesma procedência

## 6. CONCLUSÃO

Em resumo, observamos uma ação surpreendente do extrato NL na atenuação da MASLD induzida pela dieta hiperlipídica em camundongos C57BL/6 machos. Este efeito não foi acompanhado por qualquer modificação na massa corporal ou na homeostase da glicose, indicando um efeito específico no fígado dissociado dos resultados metabólicos sistêmicos.

Estes resultados sugerem que lipídios bioativos de microbiota intestinal, possa ter efeitos diretos no fígado, ou da absorção de lipídios na circulação, exercendo efeitos diretos no fígado. Embora a identificação exata dos lipídios responsáveis por esse efeito seja desafiadora, acreditamos que a combinação desses vários lipídios revelados pela lipidômica possa contribuir para a melhora da MASLD.

## **7. PERSPECTIVAS**

Apresentamos aqui uma nova perspectiva de tratamento para a MASLD, que pode se tornar uma base essencial para avançar na compreensão dos mecanismos subjacentes à doença e desenvolver novas estratégias terapêuticas.

Primeiramente, pretendemos realizar novos experimentos de lipidômica. Nestes ensaios avaliaremos os extratos lipídicos das fezes dos camundongos obesos, controle e dietas, provenientes da mesma instituição. Isto evitará viés da utilização de diferentes animais.

Em seguida, após a identificação de possíveis lipídios envolvidos na MASLD, realizaremos tratamos animais obesos com diferentes combinações lipídicas. Caso consigamos alcançar uma combinação promissora, ensaios clínicos em indivíduos obesos com MASLD serão realizados.

**CAPÍTULO 2-**  
**ESTUDOS BASEADOS EM CÉLULAS: INVESTIGAÇÃO DO**  
**EFEITO DE EXTRATO LIPÍDICO FECAL (NL) SOBRE A**  
**ATIVIDADE DO RECEPTOR NUCLEAR PPAR $\gamma$  E**  
**DIFERENCIAÇÃO CELULAR.**

## 1. INTRODUÇÃO

Concomitante aos estudos *in vivo*, descritos no capítulo 1, utilizamos modelos celulares com o objetivo de dissecar as possíveis vias de sinalização envolvidas na ação de extratos lipídicos fecais.

Desta forma, primeiramente realizamos ensaios de viabilidade celular (MTT), para analisar a toxicidade dos extratos lipídicos. Em seguida, verificamos a atividade do PPAR $\gamma$ , um receptor nuclear crucial chave na regulação do metabolismo celular, utilizando ensaios de gene repórter. Além disto, verificamos a ação do NL sobre a diferenciação de células 3T3-L1.

### 1.1. RECEPTORES NUCLEARES

Receptores nucleares são uma super família de proteínas que estão localizados no núcleo celular, que podem ser regulados por pequenos ligantes lipofílicos. Eles estão envolvidos em diversos processos fisiológicos como metabolismo, proliferação e resposta imunológica (MAZAIIRA et al., 2018).

Além de estarem presentes em processos metabólicos cruciais para o funcionamento do organismo, os receptores nucleares também estão envolvidos em diversos processos patológicos, como por exemplo: obesidade, diabetes, câncer e doenças cardiovasculares. (MAZAIIRA et al., 2018).

O Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomas (PPAR) é uma família de receptores nucleares responsáveis por diversos processos metabólicos, incluindo a homeostase de lipídios e glicose (GRYGIEL-GÓRNIAK, 2014). Esta família é composta por três isotipos: PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta/\delta$ .

O PPAR apresenta diversos ligantes naturais lipídicos, como ácidos graxos e eicosanoides (LEHRKE; LAZAR, 2005), desempenhando um papel crucial em condições como diabetes tipo 2 e obesidade. Tornou-se um alvo terapêutico, como evidenciado pelo uso de rosiglitazona e pioglitazona no tratamento do diabetes tipo 2. No entanto, em 2010, a FDA iniciou uma investigação sobre a pioglitazona devido a riscos para os seres humanos. PICCINNI et al., (2011) analisaram os relatórios da FDA de 2004 a 2009 e observaram que a droga estava associada ao câncer de bexiga. Para avaliar os riscos de doenças cardiovasculares WERTZ et

al., (2010) compararam as drogas rosiglitazona e pioglitazona, mostrando que ambas apresentavam o mesmo risco para problemas cardiovasculares.

O PPAR $\gamma$  é um importante regulador da expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico, inflamação induzida pela obesidade, síndrome metabólica, além de estimular a diferenciação de pré adipócitos para adipócitos(DARWISH et al., 2022). Dessa forma, a investigação de ligantes de PPAR $\gamma$ , potencialmente presentes no NL, se torna evidente.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A análise da toxicidade dos extratos lipídicos é de extrema relevância para estabelecer a concentração do NL que inibe a viabilidade celular. Após a determinação da dose tóxica para as células, a verificação da capacidade dos extratos lipídicos em ativarem o receptor nuclear PPAR $\gamma$  é fundamental para compreensão da atividade do NL sobre regulação do metabolismo lipídico e na diferenciação de adipócitos.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar efeitos de extratos lipídicos obtidos a partir de ração e amostras fecais de camundongos C57BL/6, submetidos a dietas normolipídica e hiperlipídica, em modelos celulares.

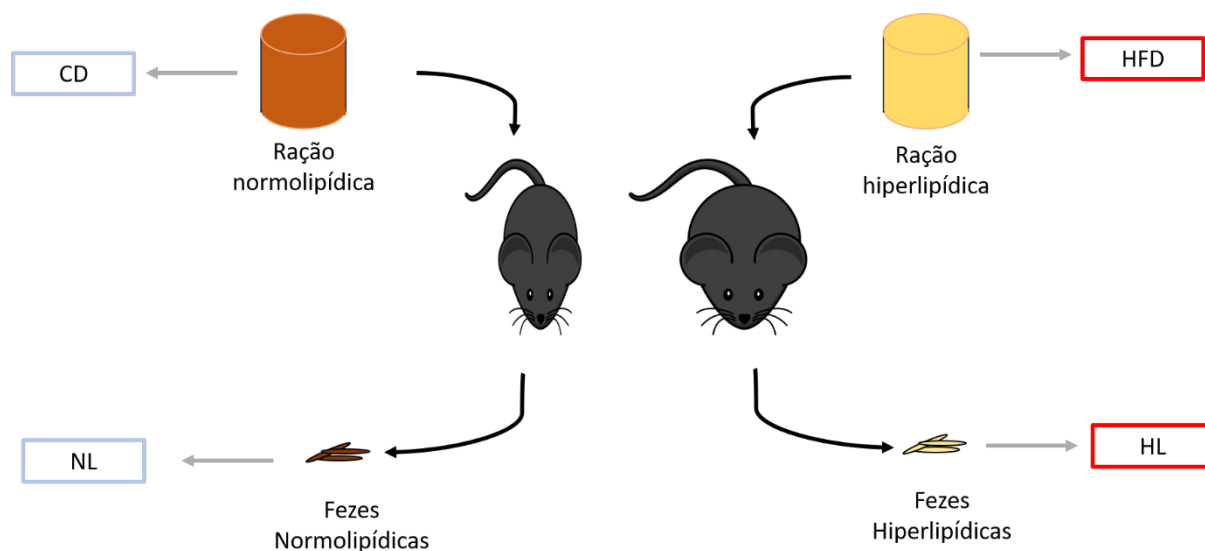
#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a influência na viabilidade celular de extratos lipídicos em diversas linhagens celulares pelo método de MTT;
- Investigar a ação de extratos lipídicos sobre a atividade do receptor nuclear PPAR $\gamma$  em células HeLa pelo método de gene repórtes;
- Analisar a influência de extratos lipídicos fecais na diferenciação de pré- adipócitos em células 3T3-L1.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. EXTRAÇÃO LIPÍDICA

Os lipídios foram extraídos de material fecal de camundongos CB57BL/6, com 15 semanas de vida, conforme descrito no item 4.2.1 do capítulo 1 dessa tese. Foram feitos extratos de ração hiperlipídica (HFD), ração normolipídica (CD), fezes normolipídicas (NL) e fezes hiperlipídicas(HL) conforme figura 13.



**Figura 13. Diagrama de extratos lipídicos.** Camundongos C57Bl/6 foram submetidos a uma dieta hiperlipídica ou normolipídica. Extratos foram obtidos a partir das rações e fezes dos camundongos. Em azul, representam-se os extratos dos camundongos saudáveis. Em vermelho, estão indicados os extratos dos camundongos obesos. CD - dieta normolipídica, NL - extrato fecal normolipídico, HFD - dieta hiperlipídica e HL - extrato fecal hiperlipídico.

### 4.2. CULTIVO CELULAR

As células HeLa, HepG2, Célula mesenquimal (MSC), 3T3-L1, RAW, Ishikawa e PC3 foram mantidas em incubadora contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. A troca de meio e tripsinização eram realizadas quando células atingiam confluência maior que 70%. O meio utilizado para cultivo foi o DMEM High Glucose contendo 10% de Soro fetal bovino e 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina (v:v) exceto para a célula 3T3-L1 que para manutenção inicial foi utilizado meio DMEM High glucose contendo 10% de soro neonatal bovino e 1% de antibiótico.

Todas as soluções utilizadas em células foram filtradas em membrana de 0.22µm para manter a esterilidade e evitar contaminações, assim como todo o trabalho foi realizado em fluxo laminar vertical mantendo o ambiente estéril.

### 4.3. VIABILIDADE CELULAR

Para ensaios de viabilidade celular foi utilizado o reagente (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), método colorimétrico que se vale do metabolismo mitocondrial para converter o reagente MTT em cristais de formazan, os quais foram mensurados por absorvância. (BERRIDGE; TAN, 1993)

Após 24 horas de tratamento com os extratos lipídicos, o meio foi retirado e substituído por meio DMEM (10% Soro Fetal Bovino + 1% antibiótico) contendo 0,5mg/mL de MTT. As células foram incubadas por 4 horas em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período especificado a placa é retirada e os cristais são solubilizados em 100 µL de solução de isopropanol ácido, que contém 52µL de HCl para cada 13mL de isopropanol. A leitura dos poços é realizada no comprimento de onda de 570 nm em espectrofotômetro DTX 800 Multimolder Detector (Beckman Coulter). Os dados são tratados em software GraphPad Prism 8 por meio de ANOVA one-way, p<0.05.

### 4.4. GENE REPÓRTER

Para o ensaio de gene repórter, as células HeLa foram semeadas a uma densidade de 48.000 células por poço em placas de 48 poços. Realizou-se co-transfecção com vetores que continham cDNA para receptores nucleares, incluindo o LBD de PPARγ fusionado ao DBD do fator GAL4 (60ng) em um plasmídeo contendo o gene repórter luciferase (240ng). As transfecções foram conduzidas utilizando reagente Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific), conforme as instruções do fabricante. As células foram expostas ao veículo DMSO (Sigma), Rosiglitazona 10<sup>-5</sup>M (Cayman Chemical) e concentrações crescentes de extratos lipídicos. A atividade da luciferase foi medida em luminômetro Glomax 20/20 Luminometer (Promega) com o kit Reporter Luciferase Assay Kit (Promega), seguindo as orientações do fabricante. Os resultados foram expressos em relação à atividade da luciferase no veículo. Todos estes plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Paul Webb do *Methodist Research Institute* (Houston, EUA).

#### 4.5. DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS 3T3-L1

As células 3T3- L1 foram plaqueadas em placas de 6 poços na densidade de 48.000 células por poço. As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro neonatal até atingirem 100% de confluência. Dois dias após a confluência começou-se o processo de diferenciação celular adicionando ao meio o coquetel indutor (1ug/mL de insulina, 0,25uM de dexametasona e 0,5mM de IBMX e os ligantes propostos (NL, rosiglitazona e GW 9667). Após o primeiro dia o meio foi mantido somente com 1ug/ml de insulina durante os 15 dias de diferenciação. As concentrações foram administradas somente no primeiro dia e isso foi o suficiente para que ocorressem modificações na diferenciação das células 3T3-L1. As células foram fixadas em 3.7% de paraformaldeído e coradas com *Oil red o* de acordo com o protocolo descrito por (JANDEROVÁ et al., 2003)

#### 4.6. RT- PCR

O RNA total das células foi extraído utilizando trizol de acordo com as informações do fabricante. As células 3T3-L1 passaram pelo processo de diferenciação durante 15 dias e no 15º dia as células foram lisadas com trizol de acordo com as informações do fabricante. As amostras foram tratadas com DNase e o cDNA e qPCR foram realizadas com o kit Gotaq 2-step (Promega) de acordo com as informações do fabricante. Os primers tinham a sequência de  $\beta$ -actina F: 5'-GTGACGTTGACATCCGTAAG-3', R: 5'-GCCGGACTCATCGTACTCC-3', PPAR $\gamma$  F: 5'-TTTTCCGAAGAACCATCCGAT-3', R: 5'-ATGGCATTGTGAGACATCCCC-3', a qPCR foi feita no equipamento Step one plus (Applied Biosystem).

#### 4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram testados quanto à distribuição normal com o teste de Shapiro Wilk. Caso os dados passassem no teste de normalidade, foi aplicado o teste T de Student ou ANOVA unidirecional ou ANOVA bidirecional, caso os dados apresentassem mais de uma variável. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado em dados não normais com vários grupos. Os dados são mostrados como Média  $\pm$  SEM.

Para o gráfico de vulcão foi realizado o teste T de Student. A análise foi feita no software GraphPad Prism. A significância foi considerada quando  $p < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

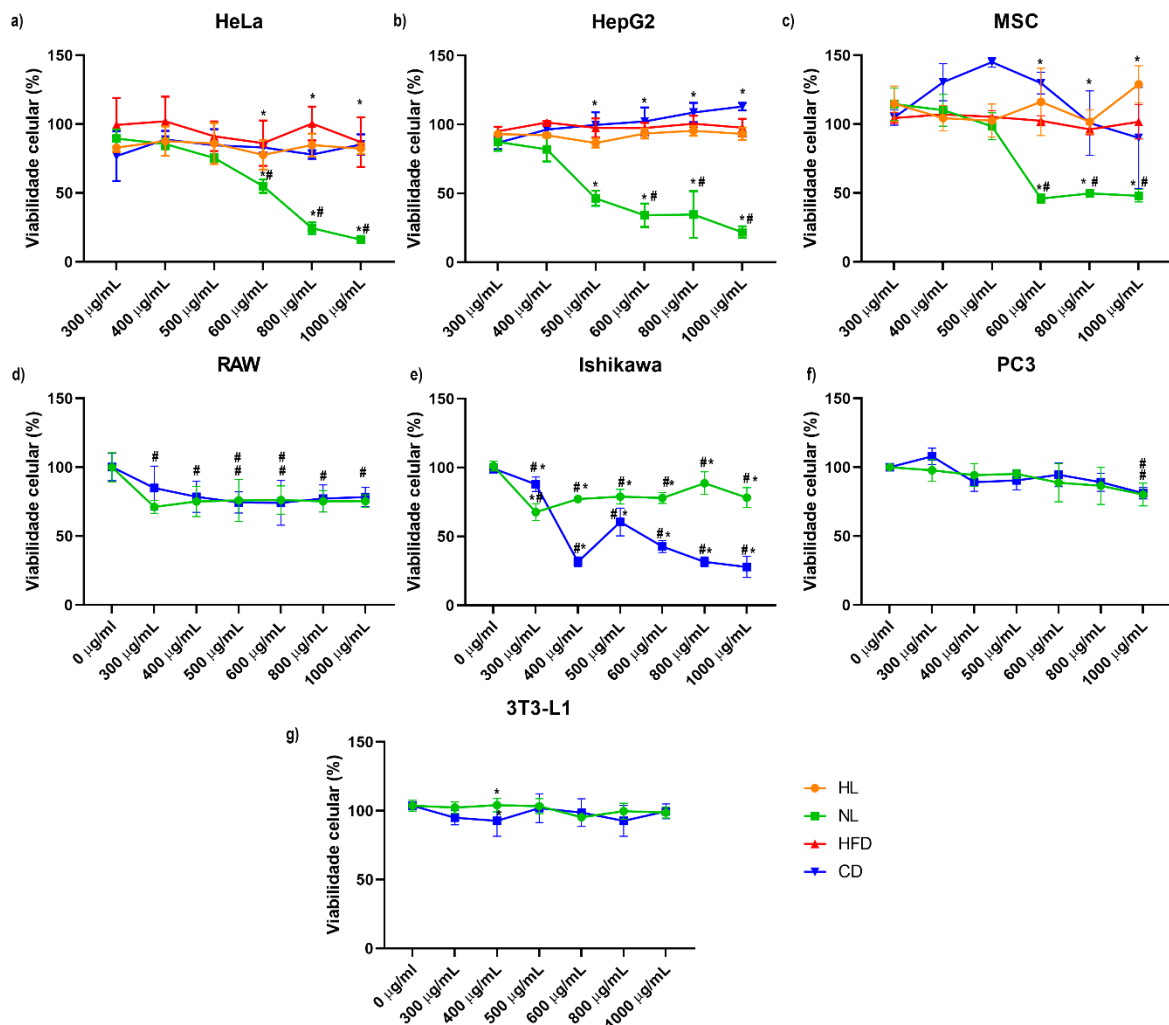
### **5.1. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS LIPÍDICOS FECAIS E DIETÉTICOS**

Para verificar a toxicidade dos extratos em células, foi realizado ensaio de MTT nas células HeLa (câncer cervical), HepG2 (câncer hepático), MSC (célula mesenquimal humana), PC3 (câncer de próstata), RAW (macrófago), Ishikawa (adenocarcinoma endometrial) e 3T3-L1 (fibroblasto).

As células HeLa (Fig. 14a), HepG2 (Fig. 14b) e MSC (Fig. 14c), foram tratadas com extratos lipídicos provenientes da dieta (hiperlipídica – HFD e normolipídica- CD) e fezes (animais obesos- HL e animais controle- NL). Somente o extrato NL induziu redução na viabilidade celular em uma comparação com o controle, revelando diferença significativa em relação aos demais extratos a partir de 600 µg/mL. Tais concentrações revelaram-se cruciais para as etapas subsequentes, contribuindo para a seleção das doses apropriadas a serem empregadas em outros ensaios.

Com foco no NLe CD, realizamos ensaios de MTT nas linhagens RAW, Ishikawa, PC3 e 3T3-L1. O CD e NL induziram uma diminuição na viabilidade celular nas linhagens RAW (Figura 14d) e Ishikawa (Figura 14e), sendo que, especificamente para a linhagem Ishikawa, CD promoveu uma drástica redução da viabilidade. Já na

linhagem PC3 (Figura 14f), CD e NL promoveram leve redução apenas na maior concentração utilizada.



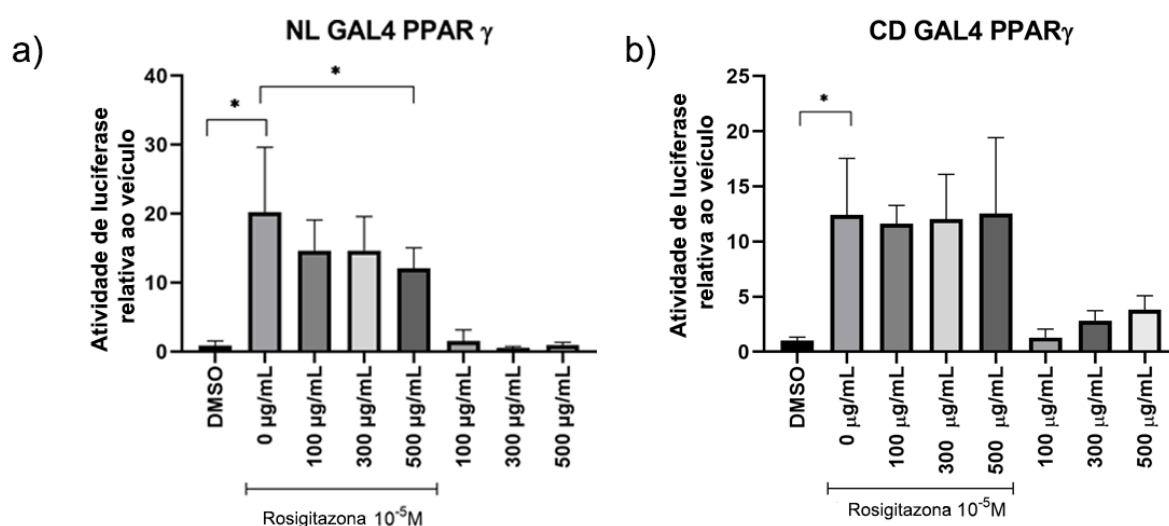
**Figura 14. Viabilidade celular por método de MTT em diferentes linhagens celulares para extratos normais.** Comportamento de linhagens celulares em diferentes concentrações de extrato. Células submetidas aos extratos NL, CD, HL e HFD, linhagens: HeLa (a), HepG2(b), MSC (c) e submetidas somente aos extratos NL e CD, Linhagens: Raw (d), Ishikawa (e), PC3 (f) e 3T3-L1 (g) Dados analisados com GraphPad Prism, two way ANOVA, P<0,05. Média ±SD (n=5). As significâncias entre os grupos na mesma dose representadas por \* e entre controle (sem extrato) e concentração por #.

As células 3T3-L1 (Fig 14g) não apresentaram diferença da viabilidade celular com o tratamento com CD e NL. O NL está induzindo uma significativa redução na viabilidade celular, especialmente em algumas linhagens, como Hela e Hepg2, em que a concentração máxima do extrato resulta na mortalidade de aproximadamente 80% das células. Para as demais linhagens, a diferença não é inferior a 50%.

Estudos anteriores demonstram uma variabilidade na citotoxicidade entre linhagens tumorais quando submetidas ao tratamento com ácidos graxos poli-insaturados, resultando em citotoxicidade a concentrações diferentes (DING et al., 2004). . Nossos resultados também sugerem que as linhagens celulares apresentam respostas distintas ao tratamento com metabólitos bioativos de microbiota. Entretanto, vale ressaltar que o extrato proveniente das fezes de animais alimentados com dieta normolipídica (NL) não foi citotóxico, mesmo em altas concentrações, para a maioria das linhagens apresentadas

## 5.2. ENSAIO DE GENE REPÓRTER

Para verificar se os extratos possuíam ação sob o receptor nuclear PPAR $\gamma$  foram realizados ensaios de gene reporter.

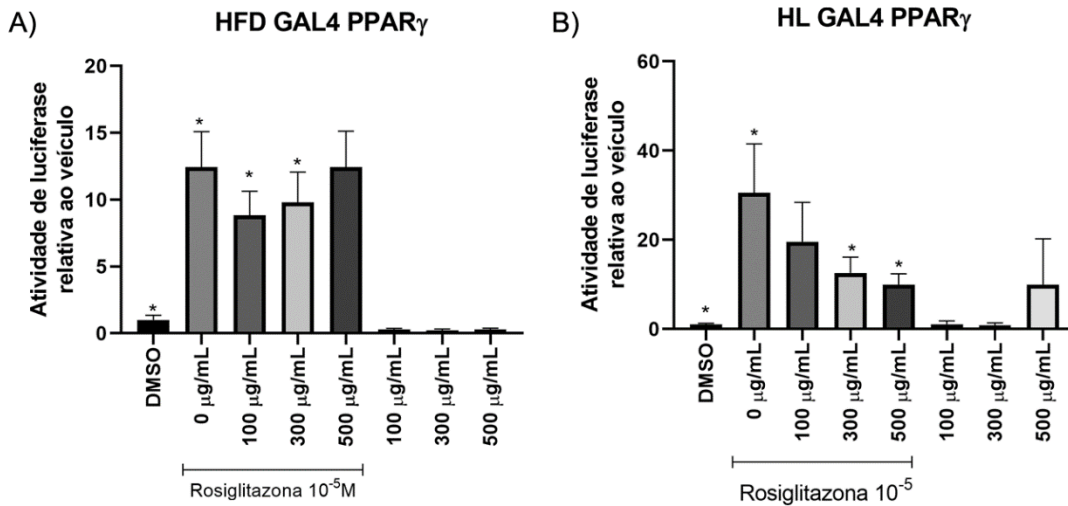


**Figura 15. O extrato NL funciona como um agonista parcial de PPAR.** O ensaio de gene repórter foi conduzido em células HeLa, utilizando os extratos NL (a) e CD (b), tanto associados quanto não associados ao seu agonista total, rosiglitazona, em concentrações de 100  $\mu\text{g/mL}$ , 300  $\mu\text{g/mL}$  e 500  $\mu\text{g/mL}$ . Os dados foram analisados com o software GraphPad Prism, utilizando one way ANOVA, com um valor de  $P < 0,05$  considerado significativo. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).

Para observar uma potencial ação antagonista dos extratos lipídicos, após as co-transfecções com o GAL4PPAR $\gamma$  e Luc, conforme descrito na metodologia, tratamos também as células com um agonista total do PPAR, a rosiglitazona. Os extratos NL e CD demonstraram respostas distintas em relação ao PPAR $\gamma$ . O extrato NL é capaz de reduzir a ativação induzida pela rosiglitazona, mas não exibe uma ativação significativa do receptor quando administrado isoladamente (Figura



15A). Por outro lado, o extrato CD não afetou a ação da rosiglitazona. Apesar de não observarmos diferenças estatísticas, o extrato CD promoveu um aumento dose-dependente da ativação do PPAR $\gamma$ . (Figura 15B). A inibição da atividade do PPAR $\gamma$  em presença da rosiglitazona sugere que possa existir um agonista fraco (antagonista competitivo) presente no NL.



**Figura 16 .Extratos HFD e HL apresentam atividade de antagonismo no receptor PPAR $\gamma$ .** O ensaio de gene repórter foi conduzido em células HeLa, utilizando os extratos HFD (a) e HL (b), tanto associados quanto não associados ao seu agonista total, rosiglitazona, em concentrações de 100  $\mu$ g/mL, 300  $\mu$ g/mL e 500  $\mu$ g/mL. Os dados foram analisados com o software GraphPad Prism, utilizando one way ANOVA, com um valor de  $P < 0,05$  considerado significativo. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=2$ ).

Ao examinar a influência do extrato proveniente da das fezes de camundongos obesos (HL), observamos também uma redução da atividade do PPAR $\gamma$  em presença da Rosiglitazona (Figura 16B). Por outro lado, o extrato proveniente da dieta hiperlipídica (HFD) não apresentou sinais de antagonismo na atividade do PPAR $\gamma$  (Figura 16A).

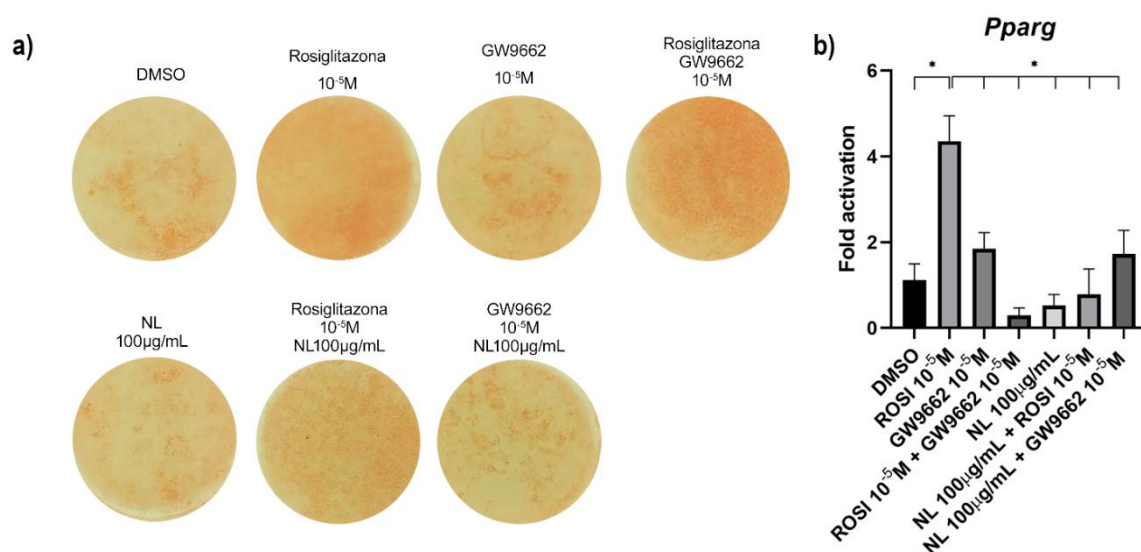
Ao analisar exclusivamente o HL na concentração de 500  $\mu$ g em comparação com o veículo (DMSO), não se observa diferença estatisticamente significativa ( $p=0,057$ , teste T de Student, *two tailed*). Isso reforça a hipótese de que o HL possa estar atuando como um antagonista competitivo (ou agonista

fraco), interferindo na ativação mediada pela rosiglitazona de maneira dose-dependente.

### 5.3. DIFERENCIAÇÃO EM CÉLULAS 3T3-L1

Para a diferenciação foram utilizadas células 3T3-L1, pré adipócitos que com o tratamento com o meio indutor se diferenciam em adipócitos. Para isso as células foram tratadas com o extrato NL, agonista (rosiglitazona) e antagonista (GW9662) de PPAR $\gamma$  (CHAWLA et al., 1994). Observa-se que a ação do antagonista na diferenciação é bastante próxima a do controle, ao passo que o agonista promove uma maior diferenciação das células. (Fig 17A).

O tratamento das células com NL induz causa uma leve diferenciação. Notavelmente, observamos uma diminuição da atividade da rosiglitazona quando em presença do NL. Menor diferença ainda quando uma menor diferenciação utilizada em conjunto com o antagonista GW9662.



**Figura 17. Diferenciação de células 3T3-L1.** A) Poços após serem corados com Oil Red O, quanto mais intensa for a cor dos poços maior a diferenciação das células. B) Expressão do gene *Pparg* nos tratamentos descritos. Dados analisados com GraphPad Prism, ONE way ANOVA, P<0,05. Média  $\pm$ SD (n=3).

A expressão de PPAR $\gamma$  é aumentada em diferenciação de 3T3-L1 (TEIXEIRA et al., 2022). Ao analisar a expressão de mRNA de PPAR $\gamma$  (Fig 17b), observamos o esperado conforme descrito na literatura, com um aumento devido ao agonista rosiglitazona e uma diminuição decorrente do antagonista GW9662.

Juntos, ensaios de gene repórter e diferenciação celular, estes resultados sugerem que o NL possa conter moléculas que regulem a atividade do PPAR $\gamma$ .

## **6. CONCLUSÃO**

Os metabólitos lipídicos provenientes da microbiota intestinal mostraram importantes ações moleculares. Os ensaios celulares evidenciaram a ação de moléculas presentes no NL capazes de interferir na atividade do receptor nuclear PPAR $\gamma$ .

Considerando tais resultados, os extratos lipídicos provenientes da microbiota intestinal surgem como uma alternativa terapêutica promissora para a suplementação e tratamento da síndrome metabólica, especialmente dada a ampla associação entre fatores como obesidade e doença hepática gordurosa. Destaca-se que o extrato oferece benefícios em relação às técnicas existentes, sendo seguro e não invasivo, ao contrário de abordagens como o transplante fecal de microbiota que podem promover a transferência de bactérias patogênicas ou resistentes.

## 8. Referências

- AJABNOOR, S. M. et al. Long-term effects of increasing omega-3, omega-6 and total polyunsaturated fats on inflammatory bowel disease and markers of inflammation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **European Journal of Nutrition**, v. 60, n. 5, p. 2293–2316, ago. 2021.
- ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature** **2011** **473:7346**, v. 473, n. 7346, p. 174–180, 20 abr. 2011.
- BEATON, M. D. Current treatment options for nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 6, p. 353–357, jun. 2012.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474–482, 1993.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- BOURSIER, J. et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 63, n. 3, p. 764–775, mar. 2016.
- BROWN, L. H.; MUTCH, D. M. Mechanisms underlying N3-PUFA regulation of white adipose tissue endocrine function. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 52, p. 40–46, 2020.
- BROWN, Z. J. et al. Carnitine palmitoyltransferase gene upregulation by linoleic acid induces CD4+ T cell apoptosis promoting HCC development. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 6, p. 1–14, 1 jun. 2018.
- CANFORA, E. E. et al. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 261–273, maio 2019.

CANI, P. D.; DEWEVER, C.; DELZENNE, N. M. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 521–526, set. 2004.

CARMODY, R. N. et al. Diet Dominates Host Genotype in Shaping the Murine Gut Microbiota. **Cell Host & Microbe**, v. 17, n. 1, p. 72–84, 14 jan. 2015.

CARNEIRO, P. V. et al. Lipids from gut microbiota: pursuing a personalized treatment. **Trends in Molecular Medicine**, v. 28, n. 8, p. 631–643, ago. 2022.

CHAKRABARTY, P. et al. P071 Silymarin-choline combination versus ursodeoxycholic acid in non-alcoholic fatty liver disease: a randomised double-blind clinical trial. **Gut**, v. 70, n. Suppl 3, p. A52–A52, 1 set. 2021.

CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 67, n. 1, p. 328–357, 2018.

CHAWLA, A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. **Endocrinology**, v. 135, n. 2, p. 798–800, 1994.

CORBIN, K. D.; ZEISEL, S. H. Choline Metabolism Provides Novel Insights into Non-alcoholic Fatty Liver Disease and its Progression. **Current opinion in gastroenterology**, v. 28, n. 2, p. 159–165, mar. 2012.

COTTE, A. K. et al. Phospholipid profiles and hepatocellular carcinoma risk and prognosis in cirrhotic patients. **Oncotarget**, v. 10, n. 22, p. 2161–2172, 15 mar. 2019.

DARWISH, N. M. et al. PPARG expression patterns and correlations in obesity. **Journal of King Saud University - Science**, v. 34, n. 6, p. 102116, 1 ago. 2022.

DAVID, L. A. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559–563, jan. 2014.

DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14691–14696, 17 ago. 2010.

DEFILIPP, Z. et al. Drug-Resistant E. coli Bacteremia Transmitted by Fecal Microbiota Transplant. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 21, p. 2043–2050, 21 nov. 2019.

DING, W.-Q. et al. Differential sensitivity of cancer cells to docosahexaenoic acid–induced cytotoxicity: The potential importance of down-regulation of superoxide dismutase 1 expression. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 9, p. 1109–1117, 14 set. 2004.

FURUTA, K. et al. Lipid-induced endothelial vascular cell adhesion molecule 1 promotes nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 6, 15 mar. 2021.

GEUKING, M. B. et al. Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 794–806, 27 maio 2011.

GILL, S. R. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1355–1359, 2 jun. 2006.

GLUNDE, K.; BHUJWALLA, Z. M.; RONEN, S. M. Choline metabolism in malignant transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 12, p. 835–848, dez. 2011.

GRECO, D. et al. Gene expression in human NAFLD. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, n. 5, p. G1281–G1287, maio 2008.

GRUNDY, S. M. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2595–2600, jun. 2004.

GRYGIEL-GÓRNIAK, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: Nutritional and clinical implications - A review. **Nutrition Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2014.

GUO, W.-X. et al. Mitochondrial dysfunction in choline deficiency-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 5, p. 641–650, 1 set. 2005.

HALLSWORTH, K. et al. Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. **Gut**, v. 60, n. 9, p. 1278–1283, 1 set. 2011.

HEINZER, K. et al. Dietary omega-6/omega-3 ratio is not associated with gut microbiota composition and disease severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Nutrition Research**, v. 107, p. 12–25, 1 nov. 2022.

HENRY WATSON et al. A randomised trial of the effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplements on the human intestinal microbiota. **Gut**, v. 67, n. 11, p. 1974, 1 nov. 2018.

HILDEBRANDT, M. A. et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1716–1724.e1–2, nov. 2009.

HOOPER, L. V.; MACPHERSON, A. J. Microbiota Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. 2015.

HUANG, E. Y. et al. Composition of dietary fat source shapes gut microbiota architecture and alters host inflammatory mediators in mouse adipose tissue. **JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition**, v. 37, n. 6, p. 746–754, nov. 2013.

HUGHES, R. L. A Review of the Role of the Gut Microbiome in Personalized Sports Nutrition. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, 10 jan. 2020.

HYUN KOH, J. et al. Serum Adipocyte Fatty Acid–Binding Protein Levels Are Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Type 2 Diabetic Patients. **Diabetes Care**, v. 32, n. 1, p. 147–152, 1 jan. 2009.

JANDEROVÁ, L. et al. Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. **Obesity Research**, v. 11, n. 1, p. 65–74, 2003.



JÄRVINEN, T. A. H.; RUOSLAHTI, E. Generation of a multi-functional, target organ-specific, anti-fibrotic molecule by molecular engineering of the extracellular matrix protein, decorin. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 1, p. 16–25, 2019.

KISTLER, K. D. et al. Physical Activity Recommendations, Exercise Intensity, and Histological Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **The American journal of gastroenterology**, v. 106, n. 3, p. 460–468, mar. 2011.

KRAUS, D.; YANG, Q.; KAHN, B. B. Lipid Extraction from Mouse Feces. **Bio-protocol**, v. 5, n. 1, p. e1375, 5 jan. 2015.

LE ROY, T. et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Gut**, v. 62, n. 12, p. 1787–1794, dez. 2013.

LEHRKE, M.; LAZAR, M. A. The many faces of PPAR $\gamma$ . **Cell**, v. 123, n. 6, p. 993–999, 2005.

LEY, R. E. et al. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1022–1023, dez. 2006.

LI, Z. et al. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 5, p. 321–331, 1 maio 2006.

MACLEAN, B. et al. Skyline: An open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. **Bioinformatics**, v. 26, n. 7, p. 966–968, 9 fev. 2010.

MAKIDE, K. et al. Emerging lysophospholipid mediators, lysophosphatidylserine, lysophosphatidylthreonine, lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylglycerol. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 89, n. 3–4, p. 135–139, 1 set. 2009.

MÄNNISTÖ, V. et al. Total liver phosphatidylcholine content associates with non-alcoholic steatohepatitis and glycine N-methyltransferase expression. **Liver International**, v. 39, n. 10, p. 1895–1905, 2019.

MARDINOGLU, A. et al. An Integrated Understanding of the Rapid Metabolic Benefits of a Carbohydrate-Restricted Diet on Hepatic Steatosis in Humans. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 3, p. 559- 571.e5, mar. 2018.

MAZAIRA, G. I. et al. The Nuclear Receptor Field: A Historical Overview and Future Challenges. **Nuclear Receptor Research**, v. 5, 2018.

MINEMURA, M. Gut microbiota and liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 6, p. 1691, 14 fev. 2015.

MONTEFUSCO, D. et al. Analysis of the Sphingolipidome in NAFLD. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2455, p. 279–303, 2022.

MUNUKKA, E. et al. Women with and without metabolic disorder differ in their gut microbiota composition. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 20, n. 5, p. 1082–1087, maio 2012.

O'HARA, A. M.; SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. **EMBO reports**, v. 7, n. 7, p. 688–693, 1 jul. 2006.

OK, D.-P.; KO, K.; BAE, J. Y. Exercise without dietary changes alleviates nonalcoholic fatty liver disease without weight loss benefits. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 1, p. 207, 1 set. 2018.

PAPANDREOU, C. et al. Serum metabolites in non-alcoholic fatty-liver disease development or reversion; a targeted metabolomic approach within the PREDIMED trial. **Nutrition & Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 58, 2 set. 2017.

PAUL, B.; LEWINSKA, M.; ANDERSEN, J. B. Lipid alterations in chronic liver disease and liver cancer. **JHEP Reports**, v. 4, n. 6, p. 100479, 26 mar. 2022.

PETTINELLI, P.; VIDELA, L. A. Up-Regulation of PPAR- $\gamma$  mRNA Expression in the Liver of Obese Patients: an Additional Reinforcing Lipogenic Mechanism to SREBP-1c Induction. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 5, p. 1424–1430, 1 maio 2011.

PICCINNI, C. et al. Assessing the association of pioglitazone use and bladder cancer through drug adverse event reporting. **Diabetes care**, v. 34, n. 6, p. 1369–1371, jun. 2011.

PROMRAT, K. et al. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 51, n. 1, p. 121–129, jan. 2010.

RAMOS, M. J. et al. In vitro models for non-alcoholic fatty liver disease: Emerging platforms and their applications. **iScience**, v. 25, n. 1, p. 103549, 4 dez. 2021.

REILLY, S. M.; SALTIEL, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 11, p. 633–643, nov. 2017.

RINELLA, M. E. et al. A multi-society Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. **Hepatology**, v. Publish Ahead of Print, 24 jun. 2023.

RUAN, J. W. et al. Dual-specificity phosphatase 6 deficiency regulates gut microbiome and transcriptome response against diet-induced obesity in mice. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 1–12, 28 nov. 2016.

SCOTT, A. Gut–liver axis: Menace in the microbiota. **Nature**, v. 551, n. 7681, p. S94–S95, 1 nov. 2017.

SELMIN, O. I. et al. N-6 high fat diet induces gut microbiome dysbiosis and colonic inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6919, 1 jul. 2021.

SMITH, J. D. Myeloperoxidase, inflammation, and dysfunctional high-density lipoprotein. **Journal of clinical lipidology**, v. 4, n. 5, p. 382–388, out. 2010.

STADLER, J. T. et al. Obesity Affects HDL Metabolism, Composition and Subclass Distribution. **Biomedicines**, v. 9, n. 3, p. 242, mar. 2021.

STIENSTRA, R. et al. PPARs, Obesity, and Inflammation. **PPAR Research**, v. 2007, 2007.

TARGHER, G.; MANTOVANI, A.; BYRNE, C. D. Mechanisms and possible hepatoprotective effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and other incretin receptor agonists in non-alcoholic fatty liver disease. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 2, p. 179–191, 1 fev. 2023.

TEIXEIRA, C. et al. Enhanced 3T3-L1 Differentiation into Adipocytes by Pioglitazone Pharmacological Activation of Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma (PPAR- $\gamma$ ). **Biology**, v. 11, n. 6, p. 806, jun. 2022.

TIWARI-HECKLER, S. et al. Circulating Phospholipid Patterns in NAFLD Patients Associated with a Combination of Metabolic Risk Factors. **Nutrients**, v. 10, n. 5, p. 649, 21 maio 2018.

TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, 21 dez. 2006.

URSELL, L. K. et al. The intestinal metabolome: An intersection between microbiota and host. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1470–1476, 1 maio 2014.

VAN DER VEEN, J. N. et al. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1859, n. 9, p. 1558–1572, 1 set. 2017.

VAN NOOD, E. et al. Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent Clostridium difficile. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 5, p. 407–415, 31 jan. 2013.

WANG, B. et al. The Human Microbiota in Health and Disease. **Engineering**, v. 3, n. 1, p. 71–82, 1 fev. 2017.

WANG, K. et al. Targeting alkaline ceramidase 3 alleviates the severity of nonalcoholic steatohepatitis by reducing oxidative stress. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 16 jan. 2020.

WEBER, M. et al. Liver CPT1A gene therapy reduces diet-induced hepatic steatosis in mice and highlights potential lipid biomarkers for human NAFLD. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 9, p. 11816–11837, 2020.

WERTZ, D. A. et al. Risk of Cardiovascular Events and All-Cause Mortality in Patients Treated With Thiazolidinediones in a Managed-Care Population. **Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes**, v. 3, n. 5, p. 538–545, set. 2010.

WILDMAN, R. P. et al. The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). **Archives of Internal Medicine**, v. 168, n. 15, p. 1617–1624, 11 ago. 2008.

WYMANN, M. P.; SCHNEITER, R. Lipid signalling in disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 162–176, fev. 2008.

XU, A. et al. Adipocyte Fatty Acid–Binding Protein Is a Plasma Biomarker Closely Associated with Obesity and Metabolic Syndrome. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 405–413, 1 mar. 2006.

YAMAMOTO, Y. et al. Lysophosphatidylethanolamine Affects Lipid Accumulation and Metabolism in a Human Liver-Derived Cell Line. **Nutrients**, v. 14, n. 3, p. 579, jan. 2022.

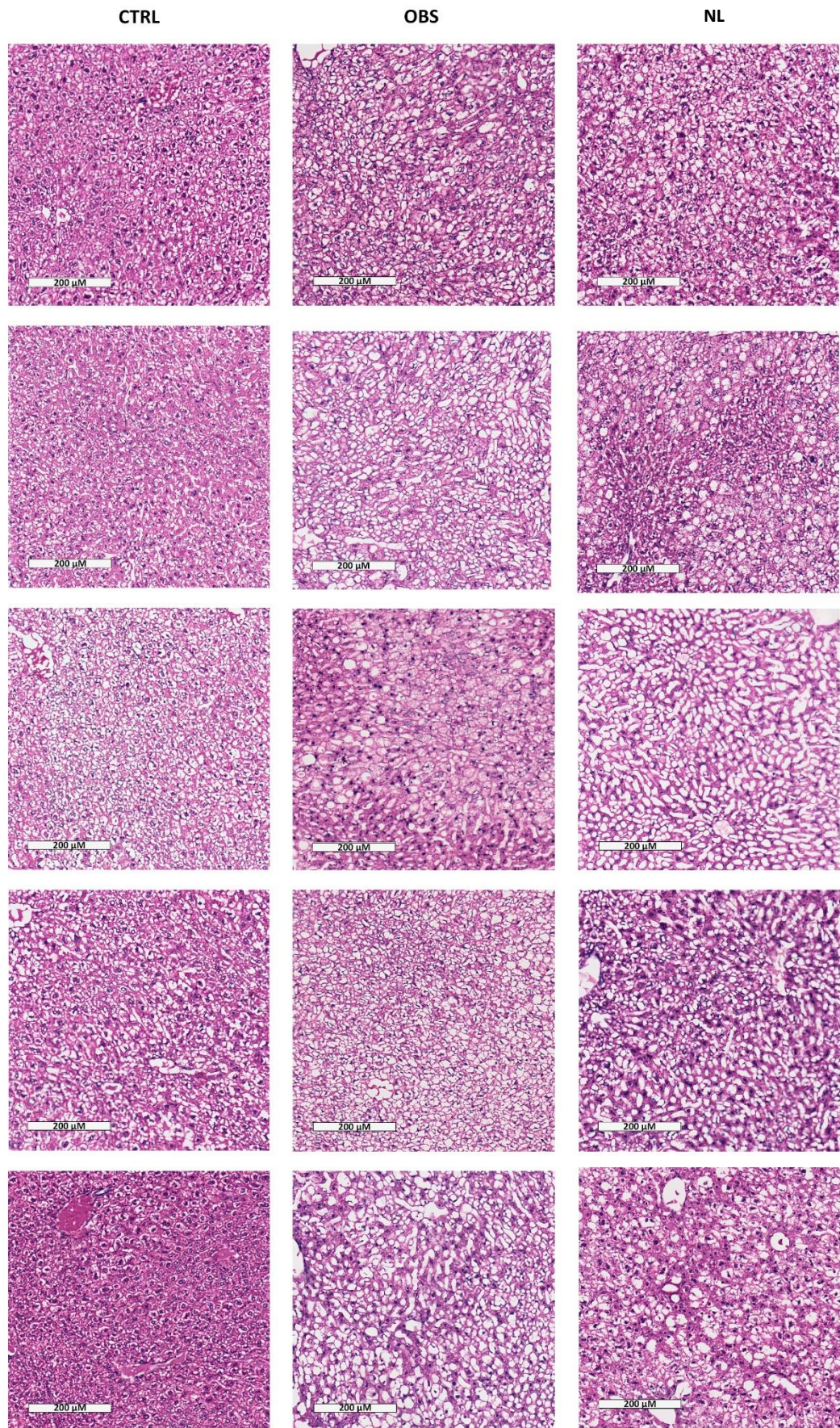
YASUDA, S. et al. Elucidation of Gut Microbiota-Associated Lipids Using LC-MS/MS and 16S rRNA Sequence Analyses. **iScience**, v. 23, n. 12, 18 dez. 2020.

ZHANG, L. Method for voluntary oral administration of drugs in mice. **STAR Protocols**, v. 2, n. 1, p. 100330, 19 mar. 2021.

ZHENG, Y. et al. Regulation of decorin by ursolic acid protects against non-alcoholic steatohepatitis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112166, nov. 2021.



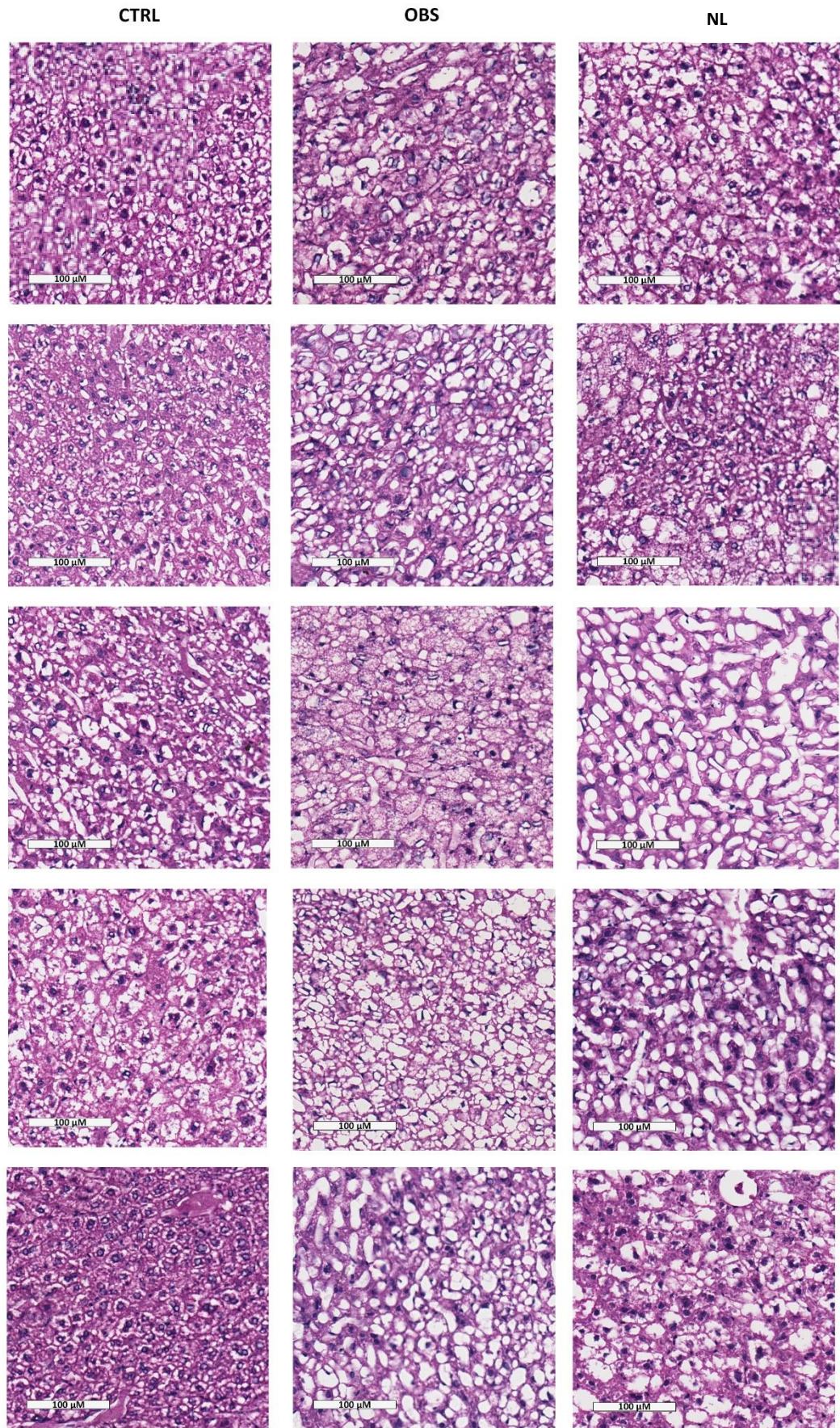
## Apêndice 1



**Figura 18. Análise histológica do fígado de camundongos C57BL/6 em aumento de 10x.** A primeira linha representa o grupo controle, na segunda linha, grupo dos animais submetidos à obesidade. A terceira linha retrata o grupo obeso tratado com NL. Lâminas coradas com hematoxilina e eosina



## Apêndice 2



**Figura 19. Análise histológica do fígado de camundongos C57BL/6 em aumento de 20x.** A primeira linha representa o grupo controle, na segunda linha, grupo dos animais submetidos à obesidade. A terceira linha retrata o grupo obeso tratado com NL. Lâminas coradas com hematoxilina e eosina



## Opinion

## Lipids from gut microbiota: pursuing a personalized treatment

Pamela V. Carneiro,<sup>1</sup> Natalia de A. Montenegro,<sup>1</sup> Addison Lana,<sup>2</sup>  
Angelica A. Amato,<sup>1</sup> and Guilherme M. Santos <sup>1,\*</sup>

**The discovery of microbiome metabolites has enlivened the field of fecal transplantation for therapeutic purposes. However, the transfer of pathogenic living organisms was recently observed to limit its therapeutic potential by increasing the risk of infection. Lipids produced by gut microbiota enter the circulation and control many phenotypic changes associated with microbiota composition. Fecal lipids significantly impact the regulation of several cell signaling pathways, including inflammation. Focusing on these molecules, we review how bioactive gut microbiota-associated lipids affect cellular functioning and clinical outcome. Here, we interrogate whether the gut microbiota can be considered a cutting-edge biotechnological tool for rapid metabolic engineering of meaningful lipids to offer a novel personalized therapy.**

#### Need to develop therapeutics that target the intestinal bacterial community

In physiological conditions, the gastrointestinal tract has a rich complex of **gut microbiota** (see [Glossary](#)), with a wide variation in the number and species of microorganisms, mainly bacteria, with a majority belonging to the phyla Firmicutes and Bacteroidetes [1]. A population imbalance in the intestinal bacterial community, so-called **dysbiosis**, is associated with phenotypic changes, such as chronic inflammatory and metabolic diseases [2].

Diet plays a critical role in shaping gut microbiota composition, and their interaction is bidirectional since a large portion of dietary nutrients is metabolized by the gut microbiota and absorbed by the gastrointestinal tract [3]. A comparative study between the microbiota of children from a rural African community and Western Europe revealed an increased presence of Bacteroidetes versus an abundance of Firmicutes bacteria, respectively. European children tend to have a high-fat diet, with animal protein and less fiber on average. As for African children, their diet tends to be low in fat and animal protein while rich in starch, fiber, and polysaccharides [4]. This study highlights that both genera are two of the most prevalent in the gut, and their colonization pattern is closely related to diet composition. In addition, host genetics and other environmental factors also affect gut microbiota composition and may modify how dietary factors modulate gut microbiota repopulation and impact cell physiology.

Different strategies using **probiotics**, **prebiotics**, and **fecal microbiota transplantation (FMT)** ([Box 1](#)) have been explored to repair gut dysbiosis to treat various diseases. However, novel approaches that avoid the detrimental effects of current strategies or increase gut dysbiosis treatment effectiveness are highly desired ([Figure 1](#)) (see [Outstanding questions](#)). Given the solid knowledge of gut microbiota composition and advanced technology to characterize microbiota-associated metabolic pathways, we can now identify many metabolites that affect host physiological processes. In this setting, gut microbiota-derived bioactive lipids have been shown to play a central role in regulating host signaling pathways. Therefore, thorough lipidomic

#### Highlights

Research on fecal microbiota transplantation (FMT) as a therapeutic tool has expanded to other clinical settings, such as metabolic, neurological, and behavioral disorders. However, microbiome-based drugs may also contain pathogenic organisms that could be lethal to the receiver.

In 2019, the US FDA released a safety alert and suspended several procedures using FMT due to infectious complications.

Gut microbiota-derived bioactive lipids hold great therapeutic potential. Rodent and human studies produced encouraging findings from using synthetic agonists to target the receptors for secondary bile acids and short-chain fatty acids in metabolic diseases.

Other, often underemphasized, lipids hold as much, if not more, relevance as short-chain fatty acids and bile acids. A glance at the gut microbiota-lipid-associated diseases highlights the role of these less-explored lipids, such as polyunsaturated fatty acids and sphingolipids.

<sup>1</sup>Laboratório de Farmacologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

<sup>2</sup>Department of Cellular and Molecular Medicine, University of California, San Diego, CA, USA

\*Correspondence: [gsantos@unb.br](mailto:gsantos@unb.br) (G.M. Santos).



**Box 1. FMT**

Microbiota-based approaches to managing disease are long known and have evolved from modulating its composition with the application of prebiotics and probiotics to treating diseases with fecal microbiota transplantation or selective transplantation of specific bacterial strains. FMT can correct dysbiosis by transferring the microbiome from a healthy donor, in a state of eubiosis, to a recipient.

The report of the positive influence of FMT on the health of an individual was made in the 4th century in China, when a traditional medical doctor used fecal material to treat food poisoning and diarrhea [78]. Much has been unraveled about the complexity of the gut microbiota and its interactions with the host, mostly with recent multiomics studies [29]. Despite its effectiveness in treating recurrent *Clostridium difficile* infection, well established in 2013, with data from a randomized controlled clinical trial [79] with a duodenal infusion of donor feces to treat recurrent *C. difficile* infection and the promising results from clinical trials involving other diseases, FMT poses challenges, such as the risk of infectious diseases and the possibility of transmission of noninfectious diseases related to the gut microbiome.

In 2019, two patients presented drug-resistant *Escherichia coli* bacteremia after FMT, one died, and the other became seriously ill [34]. This led the FDA to release a safety alert and suspend several procedures using fecal transplant therapy (<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/important-safety-alert-regarding-use-fecal-microbiotransplantation-and-risk-serious-adverse>).

An advancement towards safer administration of FMT was the foundation, in 2011, of an organization that functions as a blood bank but stores fecal material. The OpenBiome organization rigorously screened donor feces for potential complications [80]. Searching for common gut pathogens, such as antibiotic-resistant bacteria, limits the potential of pathogenic bacteria transfer.

Thus, safer approaches are beginning to be explored. Following this trend, several other companies were created to focus on developing over-the-counter treatments with microbes extracted from the stools of healthy fecal donors. Clinical trials of experimental drugs like CP101 (NCT05153499), currently in a Phase 3 double-blinded trial, and RBX2660 [81] containing microbiome samples from healthy donors, have shown promising results against recurrent *C. difficile* infection. A treatment in its Phase 3 trial, SER-109, which carries bacteria isolated from human fecal matter, is advancing this strategy [82]. In this direction, the future of microbiome-based drugs points to a tailored medication containing the missing or depleted species from the patient's gut to reverse dysbiosis.

analysis can unravel lipid profile imbalances leading to diseases that could each be addressed to fine-tuned treatment strategy.

**Bioactive gut microbiota-associated lipids: signaling**

Gut microbiota may not just convert dietary lipids but also produce bioactive lipids and lipid metabolites, which participate in several metabolic pathways; their role in maintaining host homeostasis remains indispensable. Therefore, alterations related to lipids from gut microbiota are implicated in the etiology of several diseases by targeting different signaling pathways in the host.

Research has sought to identify and characterize the metabolites that directly influence an individual's homeostasis and health status in the last decade. Some examples of metabolites are amino acids, polysaccharides, vitamins, and lipids, such as short and long-chain fatty acids and bile acids (BAs). Reviews discussing gut microbiota-derived metabolites [5,6] suggest that many more of such small molecules are still to be identified. Table 1 presents the main lipid metabolites identified to date, with their corresponding microbial genera, and Table 2 summarizes the current evidence for their biological responses and underlying mechanisms.

The present review is focused on bioactive lipid metabolites from gut microbiota, providing insight into the clinical relevance of these molecules (Figure 1).

It is essential to discern the lipid profiles in the gut in the available literature. In Box 2, we divided the most studied bioactive gut microbiota-associated lipids based on their origin: (i) dietary lipids that affect gut microbiota composition; (ii) cell-component-derived lipids; and (iii) microbiota-associated lipid metabolites.

**Glossary**

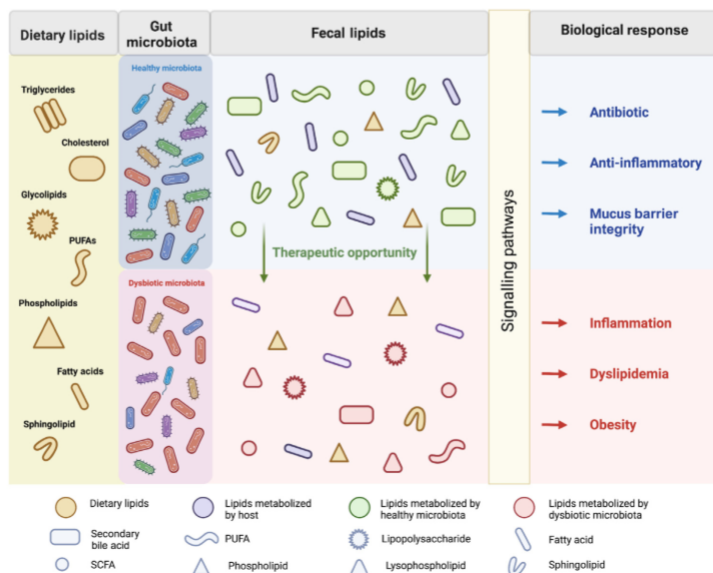
**Dysbiosis:** imbalance in the microbiota community that has been associated with phenotypical changes.

**Fecal microbiota transplantation:** the procedure of transferring microorganisms from a healthy donor's fecal sample into a patient can be performed by endoscopy, colonoscopy, retention enema, or orally through capsules.

**Gut microbiota:** community of microorganisms present in the gastrointestinal tract of vertebrates. They can be symbiotic, commensal, or pathogenic.

**Prebiotics:** substrates from food that modulate host microbiota growth and function, conferring health benefits. Carbohydrates, polyphenols, and PUFAs are the most characterized prebiotics. Gut bacteria that respond to prebiotics may affect microbiota composition through several mechanisms, such as the production of antimicrobial agents (e.g., peptides).

**Probiotics:** live microorganisms that confer a health benefit on the host. Recently, it was shown that an engineered probiotic *Escherichia coli* has an antitumor effect, leading to a metabolic modulation of the tumor microenvironment with immunotherapies potential [74]. There is also growing evidence that the gut microbiota could be of value in predicting response to drugs [75,76], function as diagnostic and prognostic biomarkers [39], and produce a myriad of metabolites with therapeutic potential (prebiotics and probiotics are reviewed in [77]).



Trends in Molecular Medicine

**Figure 1. Therapeutic strategy based on bioactive gut microbiota-associated lipids.** Dietary lipids are metabolized by the host's microbiota, healthy or dysbiotic. Host microbiota-associated lipids, microbiota, or unmetabolized lipids are different in concentration in both scenarios, dysbiotic or healthy, leading to differential modulation of distinct signalling pathways. The transfer or supplementation of bioactive lipids from healthy donors represents a new therapeutic strategy for dysbiosis-related diseases. Abbreviations: PUFA, polyunsaturated fatty acid; SCFA, short-chain fatty acid.

In the following sections, we focus on bioactive microbiota-associated lipid metabolites, polyunsaturated fatty acids (PUFAs), and sphingolipids (SLs), which have solid evidence to dissect the mechanisms of actions and present clinical relevance. Also, we give a glance on short-chain fatty acids (SCFAs) and BAs that are the most explored.

#### SCFAs and BAs

SCFA are produced from complex carbohydrate fibers or nondigestible proteins and peptides present in the diet that reach the colon without being absorbed or digested by mammalian enzymes. They can be used as an energy source and as substrates for lipogenesis, gluconeogenesis, and cholesterol synthesis when absorbed. The primary BAs, other lipid-type molecules, are synthesized in the liver and released into the duodenum. Importantly, small amounts (~5%) gain access to the colon, where they are converted to secondary BAs [7]. Like SCFAs, BAs can act through different pathways, including G-protein-coupled receptors (GPCRs) and nuclear receptors. Both SCFAs and BAs are the most characterized bioactive metabolites from gut microbiota and have been extensively reviewed elsewhere [8,9]. Their mechanisms of action and their clinical relevance are summarized in Table 1.

#### PUFAs

Dietary PUFAs are associated with changes in gut microbiota diversity.  $\omega$ -6 (n-6) PUFAs, like linoleic acid (LA), are found in vegetable oils, nuts, seeds, meats, and eggs, typical of a western

Table 1. Correlation of the main lipid metabolites with microbiota genus

Phylum	Genus	Lipid	Refs
Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	HYA	[19,20]
		13-hydroxy-9-cis-octadecenoic acid	[19]
	<i>Clostridium</i>	Deoxycholic acid (DCA)	[41]
		Lithocholic acid (LCA)	[41]
		Butyrate	[42]
	<i>Faecalibacterium</i>	Butyrate	[43]
	<i>Ruminococcus</i>	IsoDCA and IsoLCA	[44]
	<i>Eubacterium</i>	Butyrate	[45]
	<i>Roseburia</i>	Butyrate	[46]
	<i>Anaerostipes</i>	Butyrate	[47]
	<i>Coprococcus</i>	Butyrate	[48]
		Propionate	[49]
	<i>Blautia</i>	Propionate	[50]
	<i>Subdoligranulum</i>	Butyrate	[51]
	<i>Dialister</i>	Propionate	[52]
<i>Phascolarctobacterium</i>	Propionate	[53]	
	Acetate	[53]	
Verrucomicrobia	<i>Akkermansia</i>	Propionate	[54]
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>	$\alpha$ -Galactosylceramide	[27]
		Ceramide phosphorylethanolamine	[55]
		Ceramide phosphorylglycerol	[55]
		Arachidonic acid	[13]
		Dihydroceramides	[25]
		Acetate	[56]
		Propionate	[49]
	<i>Prevotella</i>	Ceramide phosphorylethanolamine	[55]
		Ceramide phosphorylglycerol	[55]
		Propionate	[56]
	Acetate	[56]	
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	Acetate	[57]

diet. Mouse model studies suggested that an n-6 PUFA-rich diet also leads to the growth of the proinflammatory bacteria *Muscispirillum schaedleri* and *Lactobacillus murinus* [10]. It is not trivial to translate these results since *M. schaedleri* is only found in minute amounts in humans.

By contrast,  $\omega$ -3 (n-3) PUFAs, which are found in fish, and  $\alpha$ -linolenic acid (ALA), found in plant seeds, are common in the Mediterranean diet and have been positively associated with *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Roseburia* – butyrate-producing bacteria – in the gut of healthy middle-aged volunteers [11]. According to compelling evidence in mice, their supplementation is being considered to treat low-grade inflammation related to obesity [12].

Arachidonic acid (AA) is an example of a diet-sourced and *Bacteroides fragilis*-produced n-6 PUFAs. Findings from mouse studies indicated that *B. fragilis* deficiency might lead to a decrease

Table 2. Bioactive microbiota-derived lipids signaling mechanism and the corresponding biological response<sup>a</sup>

Lipid Class	Lipid	Signaling	Biological response	Refs
SCFA	Butyrate	HDAC inhibitor	Modulation of Treg cell proliferation	[42,58]
		↑AMPK activity and accelerates the assembly of tight junctions	Maintains integrity of mucosal barrier	[59]
		Activates PPAR $\gamma$	Induces angiotensin-like protein 4 transcription and secretion	[60]
		Activates GPR109A	Induce differentiation of Treg cells and IL-10-producing T cells, and IL-18 secretion in colonic epithelium	[61]
	Acetate	Activates retinoid X receptor, upregulating <i>ApoE</i> , <i>C3</i> , and <i>Pla2g2a</i> genes	Control of cellular energy metabolism and anti-inflammatory response	[57]
		Activates GPCR43 receptors in adipocytes	Suppresses insulin signaling	[82]
	Propionate	Activates GPR41 that stimulates release of PYY and GLP-1	Appetite suppressor	[63,64]
		Activates GPR43	Adipogenesis	[65]
	Activates PPAR $\gamma$	Induces angiotensin-like protein 4 transcription and secretion	[60]	
Bile acids	DCA	Activates TGR5, a G-protein-coupled receptor, in macrophages inhibiting NF- $\kappa$ B activation via the cAMP signaling pathway, reducing TNF- $\alpha$ secretion	Anti-inflammatory	[41]
		Activates FXR that downregulates gene transcription of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1)	Regulates bile acid homeostasis	[66]
	LCA	Activates receptor VDR and modulates ROR $\gamma$ <sup>+</sup> Treg cells	Regulates intestinal inflammation	[67]
		Activates FXR that downregulates gene transcription of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1)	Regulate bile acid homeostasis	[66]
		Activates PXR, a transcription factor that suppresses NF- $\kappa$ B and downregulates chemokine expression	Anti-inflammatory	[68,69]
		Activates VDR upregulating TJ proteins and suppressing inflammation in the intestine through SIRT1 activation and NF- $\kappa$ B inhibition	Maintains integrity of mucosal barrier	[70,71]
		↓ <i>Cxcl16</i> expression (ligand of CXCR6 receptor) inhibiting NKT accumulation	Low susceptibility to autoimmune diseases	[72]
	IsoDCA and IsoLCA	Activates FXR increasing Foxp3 on dendritic cells	Treg cell differentiation	[68]
PUFA	HYA	Activates GPR40, inducing GLP-1 secretion	Appetite suppressor	[20]
		Activates GPR40 inducing ERK phosphorylation down-regulating TNFR2	Anti-inflammatory	[21]
	KetoC	Inhibited ERK and MEK phosphorylation, suppressing LPS-induced NO production and iNOS expression in BV-2 cells	Inhibition microglial activation	[22]
	13-hydroxy-9-cis-octadecenoic acid	Hydroxy fatty acids act as PPAR $\gamma$ ligand	Adipocyte differentiation	[19,24]
Sphingolipids	$\alpha$ -GalCer	Presentation of $\alpha$ -GalCer in early development reduces colonic iNKT cells in adulthood	Modulates susceptivness to inflammatory, autoimmune, and allergic diseases	[27]
Galactolipids	MGDG	Activates Minde receptor producing TNF, MIP-2, and IL-6, as well as inducing expression of NO synthase 2 and ROS production	Proinflammatory	[28]
N-acyl amides	N-palmitoyl serinol	Activates GPR119	Affects glucose homeostasis, gastric emptying and insulin signaling	[73]
	N-3-hydroxypalmitoyl ornithine	Activates S1PR4	Survival, proliferation, activation and, most prominently, migration of immune cells	[73]

(continued on next page)

Table 2. (continued)

Lipid Class	Lipid	Signaling	Biological response	Refs
	N-myristoyl alanine	Activates G2A	Regulates the cell cycle, proliferation, oncogenesis, and immunity	[73]
	N-acyloxyacyl glutamine	Antagonist of prostaglandin receptors PTGIR and PTGER4	Anti-inflammatory	[73]

<sup>a</sup>Abbreviations:  $\alpha$ -GalCer,  $\alpha$ -galactosylceramide; DCA, deoxycholic acid; GLP-1, glucagon-like peptide 1; HDAC, histone deacetylase; HYA, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid; iNOS, inducible NO synthase; IsoDCA, isodeoxycholic acid; IsoLCA, isolithocholic acid; Foxp3, forkhead box P3; FXR, farnesoid X receptor; KetoC, 10-oxo-trans-11-octadecenoic acid; LCA, lithocholic acid; MGDG, monoglucosyldiacylglycerol; Mincle, macrophage-inducible C-type lectin; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; iNKT, invariant natural killer T cell; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; PUFA, polyunsaturated fatty acid; PYY, peptide YY; PXR, pregnane X receptor; ROR $\gamma$ , RAR-related orphan receptor  $\gamma$ ; ROS, reactive oxygen species; SCFA, short-chain fatty acid; SIRT1, sirtuin 1; TGR5, Takeda G protein-coupled receptor 5; TJ protein, tight junction protein; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor; VDR, vitamin D receptor.

of AA and a consequent increase of corticosterone, the equivalent to cortisol in humans, elevating the risk of developing hypertension. The deficiency of *B. fragilis* was confirmed in fecal material of patients with hypertension [13]. AA metabolites, like N-arachidonoyl ethanolamine (anandamide) and 2-arachidonoylglycerol, are endogenous ligands of cannabinoid receptors CB1 [14] and CB2 [15], respectively. These metabolites, which are members of the endocannabinoid (eCB) system, are responsible for several gut motility, permeability, and inflammatory responses. Indeed, the mechanism linking gut microbiota to the eCB system in intestinal and adipose tissues has been established using *in vitro* and mouse models [16]. However, there is no clear connection made yet between AA metabolites from microbiota and human diseases.

N-3 PUFA-like eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are linked to anti-inflammatory signaling through various pathways. These lipids can activate PPAR $\gamma$ , promoting an anti-inflammatory response and the secretion of adipokines related to insulin sensitivity. Through the GPR120 receptor, n-3 PUFAs can inhibit TLR4 and consequently inhibit the NF- $\kappa$ B pathway, reducing the production of proinflammatory cytokines [17]. Although n-3 PUFA supplementation is reported to have beneficial effects, a systematic review highlights that there is little or no long-term effect of n-3 PUFA on inflammation in humans [18].

In addition to the recently associated role of dietary PUFAs as regulators of microbiota and cell signaling, PUFA-derived intermediate metabolites produced by gut microbiota [19] are increasingly being viewed as an essential metabolism-modulating molecule. Lactic-acid-producing bacteria generate hydroxy fatty acids, oxo fatty acids, conjugated fatty acids, and partially saturated *trans*-fatty acids as intermediates. Fatty acids derived from linoleic acid or oleic acids, such as 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA), 10-oxo-trans-11-octadecenoic acid (KetoC), and 13-hydroxy-9-cis-octadecenoic acid seem to be of the most significant importance.

Although n-6 PUFAs may induce obesity, their metabolite HYA has been linked to high-fat-diet-induced obesity resistance in a mouse model. HYA reduced adipose tissue inflammation by activating GPR40 and GPR120, leading to glucagon-like peptide (GLP)-1 secretion and suppression of lipid absorption via EP3. Oral administration of HYA also suppresses blood glucose increase in contrast to linoleic acid (an n-6 PUFA) [20]. Therefore, the microbiota has a fundamental role in metabolizing dietary PUFAs into less-proinflammatory molecules, such as HYA. Its supplementation has shown promising results against metabolic disorders, such as obesity and type 2 diabetes mellitus. However, clinical trials are still awaited.

Anti-inflammatory properties of HYA through regulation of TNFR2 expression via the GPR40-MEK-ERK pathway in a dextran sulfate sodium colitis model, were reported to ameliorate

**Box 2. The gut bioactive lipids based on origin**

Dietary lipids influence the composition of gut microbiota and, therefore, the bioactive lipids profile produced by the gut. Considering the therapeutic potential of these lipids, it is important, yet confusing in the available literature, to understand how lipid profiles differ between food and cell (bacteria or host) origin [83,84]. Thus, based on their origin, the most studied lipids that affect host physiology were divided into three classes: (i) dietary lipids that affect gut microbiota composition; (ii) microbiota-associated lipid metabolites; and (iii) cell-component-derived lipids.

**(i) Dietary lipids: most dietary lipids described to affect the gut microbiota are fatty acids**

1. n-3 LC PUFA (mainly EPA and DHA) and n-6 LC PUFA (mainly linoleic acid and arachidonic acid) – precursors of eicosanoid composed of prostaglandins and thromboxane, and have marine products, fish oils, milk, egg, milk, plants and microorganisms (fungi, algae and bacteria) as sources.
2. Monounsaturated fatty acids (mainly oleic acid and palmitoleic acid) – fatty acids that have only one unsaturated carbon bond, found in plant-based oils.
3. Saturated fatty acids – contain no double bond; derived from animal and plant oils.

**(ii) Microbiota metabolites: lipids that are produced by gut bacteria and affect host metabolism**

1. SCFAs – acetate, propionate, and butyrate; gut microbiota metabolites derived from fermentation of fibers in the colon.
2. Secondary BAs – primary BAs are conjugated to taurine or glycine in the liver. Bacteria mediate deconjugation of the glycine or taurine group. Colonic bacteria metabolize deconjugated BAs to secondary BAs through dehydrogenation, dehydroxylation and epimerization.
3. PUFA-derived intermediate metabolites –HYA, an initial linoleic acid-related gut-microbial metabolite.
4. SLs – produced by hepatic *de novo* pathways from dietary products and by gut bacteria, mainly of the phylum Bacteroidetes.

**(iii) Cell-component-derived lipids: present in feces, structural components of cell structures**

1. Phospholipids – present in bacterial and eukaryotic membranes, lipoproteins, and extracellular environment.
2. Lysophospholipids – produced as metabolic intermediates from membrane degradation, or in phospholipid synthesis, from the Gram-negative bacteria envelope.
3. LPS – from outer membrane of Gram-negative bacteria.
4. Cardiolipin – from bacterial membranes and inner mitochondrial membranes of eukaryotes.

epithelial barrier impairment [21]. As supported by the previous mechanism, it was observed that HYA and KetoC, another PUFA intermediate, have anti-inflammatory effects in murine microglial cells via inhibition of MEK/ERK phosphorylation [22]. This particular effect shown in brain tissue may be investigated in clinical trials as a therapy for neurodegenerative diseases in which inflammation and microglial activation play a critical role in pathogenesis or progression. One example is Alzheimer's disease, which has already been directly related to PUFA ingestion but not PUFA metabolites [23].

13-Hydroxy-9-*cis*-octadecenoic acid is related to the presence of gut microorganisms [19] but their biological relevance is not yet fully categorized, although it is speculated that they may act as a PPAR $\gamma$  ligand [24].

**SLs**

SLs can be produced by hepatic *de novo* pathways from dietary products and gut bacteria, mainly of the phylum Bacteroidetes. The most abundant Bacteroidetes-derived SLs are dihydroceramides (DHCers), ceramide phosphoethanolamines (CerPEs), and ceramide phosphoinositol (CerPIs) [25]. Altered levels of SLs have been shown to modulate host lipid pathways. Recent data show that gut SLs affect *de novo* host SL production and increase liver ceramide accumulation [26], functioning as an endogenous source of SLs. However, its mechanisms are not fully elucidated.

Host-produced SLs are inversely correlated with gut-derived SLs in inflammatory bowel disease. Decreases in Bacteroidetes-derived CerPEs, DHCers, and sphinganine are reported to increase



intestinal inflammation, and its presence is negatively correlated with active colitis [25]. Exposure to  $\alpha$ -galactosylceramide from *B. fragilis* in early-life modulates invariant natural killer T (iNKT) cells by binding to CD1d antigen-presenting molecules regulating adult immune homeostasis and protecting against colitis susceptibility [27]. Both findings lead to the assumption that SLs are vital to host–microbiota homeostasis by interacting with the innate immunity responses.

The regulatory roles of other gut microbiota-derived lipid metabolites have also been characterized, as is the case of  $\alpha$ -galactosylceramide [27] and monoglucosyl diacylglycerol [28] in immune response and SLs [25] in intestinal homeostasis. Moreover, the advances in lipidomic analysis have revealed a new microbiota-specific lipid subclass, acyl  $\alpha$ -hydroxy fatty acids [29], and may reveal many more soon.

### Gut microbiota: a biotechnology tool

A great deal of information is already known about dysbiosis as a key to predisposition to various diseases and that bioactive lipids from gut microbiota play a central role in regulating cell signaling. Tables 1 and 2 summarize the current evidence correlating bacteria phylum and bioactive metabolite-associated biological response.

FMT is one therapeutic strategy for dysbiotic scenarios. Other strategies like fecal virome transplantation or fecal filtrate transplantation have recently been proposed to limit the transfer of living material. However, little is discussed regarding the use of specific signaling molecules produced by gut microbiota.

Following clear identification of either bacterial or lipid deficiency in a patient, in the gut, or even in the stool, it is reasonable to interrogate whether it is possible to produce relevant lipids in controlled cell culture for supplementation in order to influence the clinical outcome (Figure 2, Key figure). Furthermore, would it be feasible to consider the transfer of bioactive gut microbiota-associated metabolites isolated from the feces of a healthy donor to a patient with dysbiotic gut microbiota? Based on this perspective, the gut microbiota could be considered a cutting-edge biotechnology tool for the rapid metabolic engineering of meaningful bioactive metabolites (Figure 1). However, pharmacokinetic concerns would also need to be assessed as some of the considered lipids could be digested before reaching their receptors. Encapsulation, for controlled release, may need to be considered to ensure their distribution.

### Combinatorics of microbiota lipids

As the catalog of many lipids from gut microbiota rapidly increases, the pathway map of molecular interaction networks correlating each lipid's direct function will also grow, thus complicating the design of an optimal lipid supplementation cocktail for therapeutic purposes.

For lipidomic analysis and potential therapeutic application, the methods for fecal lipids isolation differ according to their chemical properties. SCFAs can be extracted using 50:50 acetonitrile: water. BAs are extracted in 75% methanol. Positively and negatively charged lipids are extracted from feces using a chloroform:methanol (2:1) method. Thus, a careful approach is advised to determine the correct lipid profile of a given patient.

Crosstalk between many signaling pathways regulated by different gut lipid types shows that purposeful attention must be placed into designing the right combination of lipids for a treatment prescribed for any given patient or disease. Therefore, the lipid types and the proper stoichiometry concentrations of these lipids in a capsule will have to be carefully considered to ensure treatment effectiveness and safety. For example, considering a condition affecting just *Bacteroides* genus

### Clinician's corner

Currently, there are 483 trials registered in [Clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) investigating FMT for a variety of infectious, gastrointestinal (inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, primary sclerosing cholangitis, and liver cirrhosis), metabolic (obesity, diabetes, and nonalcoholic fatty liver disease), neuropsychiatric (Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, epilepsy, and bipolar disorder), immunologic (graft-versus-host disease), and neoplastic conditions. Despite the promising results from many trials, there are safety concerns related to pathogenic organisms in the fecal material [80].

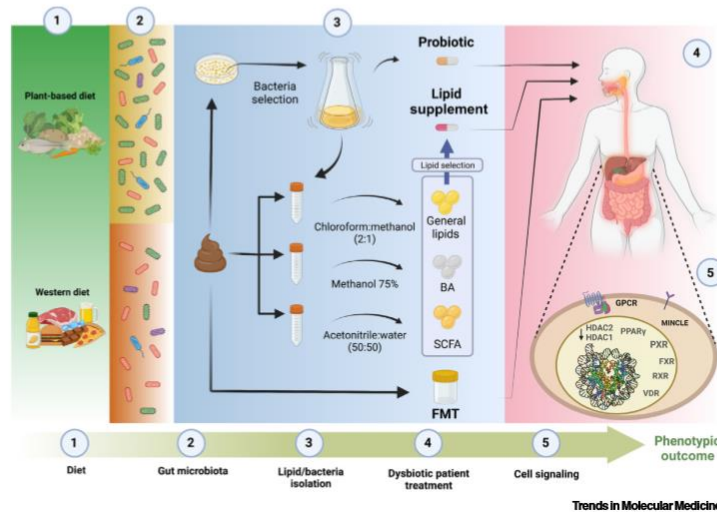
There are two approaches for supplying fecal samples for FMT: patient-selected donors and stool banking. The patient-selected donor approach comprises screening the donor and processing the fecal sample by health professionals. Stool banks are centralized facilities that conduct donor screening and fecal processing. The banks provide clinicians and researchers with FMT preparations and monitor the safety and efficacy of FMT. Centralization by stool banks has the advantages of increasing accessibility to FMT preparations and fulfilling more rigorous safety standards [85].

The pitfalls of FMT have increased the interest in gut microbiome-derived small molecules to restore the balance of signaling pathways that are disrupted in the setting of gut dysbiosis and may directly impact disease development. These molecules include lipid species such as SCFAs, secondary BAs, PUFA, and SLs.

SCFAs are end-products of microbial fermentation of dietary fiber, and their fecal and circulating levels are reduced in humans with obesity and diabetes [86]. Different approaches to increasing SCFA levels promote improved metabolic health. Supplementation of fermentable fibers was shown to protect against metabolic syndrome-related abnormalities in overweight humans [87]. Circulating levels of SCFAs were also correlated with response to cancer therapy in humans. Higher circulating levels of butyrate and propionate were associated with reduced response to the anti-CTLA-4 blocking monoclonal antibody ipilimumab

## Key figure

## Personalized strategies for gut metabolites shortage



among patients with advanced multiple myeloma [40].

Data from preclinical studies indicate that gut bacteria metabolize dietary PUFAs into HYA, and the latter plays an active role in protecting the host against obesity. Moreover, bacteria-derived sphingolipids were shown to play an active role in suppressing the intestinal inflammatory response. Future studies are needed to address the role of these lipids in human physiology.

**Figure 2.** A plant-based diet (1), as in rural African communities, is low in fat and animal protein and rich in starch, fiber, and plant polysaccharides, favoring a diverse and more abundant microbiota with Bacteroidetes enrichment. Western diet (1), high in animal protein, sugar, starch, and fat and low in fiber, favors Firmicutes abundance and dysbiosis. Variation of bacteria in this scenario leads to different metabolite content generated by the microbiota (2). Metabolites, including lipids, are present in the stool (3). This material of healthy donors can be processed in different ways. It can be produced in the laboratory by selecting specific bacteria to make probiotics. Also, lipids can be isolated from fecal material. Lipid extraction with chloroform:methanol (2:1) as solvent extracts general lipids, methanol 75% extracts BAs, and acetonitrile:water (50:50) extracts SCFAs. After lipid isolation, a lipid supplement can be prepared. FMT procedures can also be prepared from stool. The combination of probiotics, fecal lipids, and targeted microbiota therapy is a promising strategy for personalized therapeutic development (4). Lipids can function through different cell pathways, activating nuclear receptors (PPAR $\gamma$ , FXR, FXR, and VDR) and membrane receptors (GPCR and MINCLE) and also repressing HDAC1 and HDAC2 activity (5). Abbreviations: BA, bile acid; FMT, fecal microbiota transplantation; FXR, farnesoid X receptor; GPCR, G-protein-coupled receptor; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; PXR, pregnane X receptor; RXR, retinoid X receptor; SCFA, short-chain fatty acid; VDR, vitamin D receptor.

decreases seven bioactive metabolites (Table 1), (i)  $\alpha$ -galactosylceramide, (ii) CerPE, (iii) ceramide phosphorylglycerol, (iv) AA, (v) DHCers, (vi) acetate, and (vii) propionate. A simple calculation of possibilities to combine all seven lipids in two different concentrations leads us to  $2^7 = 128$  potential therapeutic combinations. In general, if there are N lipids and K at different concentrations, this would lead us to  $K^N$  treatments to test, where N and K are natural numbers  $\geq 1$ .

#### Translational implications of microbiota-based therapies

Research on the transfer of minimally processed stool as a therapeutic tool, as previously discussed, has expanded to other clinical settings, such as noninfectious gastrointestinal diseases [30], metabolic diseases [31], neurological and behavioral disorders [32], and as an adjunct to



cancer therapy [33]. Accordingly, there are currently over 450 studies registered in [ClinicalTrials.org](https://www.clinicaltrials.org) investigating FMT for various conditions.

The pitfalls of FMT, especially the potentially infectious complications [34], have increased the efforts to establish and standardize methods to assure donor fecal material quality and safety and attracted attention to gut microbiota-derived bioactive metabolites. In parallel, a promising approach is using gut microbiota-derived lipid metabolites as therapeutic tools (see [Clinician's corner](#)). Notably, extensive evidence from clinical studies points to the association between fecal or serum levels of SCFAs and secondary BAs and disease. Moreover, findings from investigations assessing SCFAs and specific secondary BAs in metabolic diseases [35] and cancer [36] have been encouraging in rodents and human cell models.

Most studies addressing SCFAs in humans have used the approach to modulate their fecal and serum levels by dietary interventions or administration of prebiotics or probiotics, instead of their direct administration. However, evidence for the therapeutic potential of lipid metabolites from clinical studies is still limited and preliminary. It is reported that acute rectal administration of the SCFA acetate to hyperinsulinemic women increases peptide YY and GLP-1 levels and decreased TNF $\alpha$  levels compared with saline administration [37]. Secondary BAs were assessed in patients with multiple sclerosis (tauroursodeoxycholic acid, in Phase 2 clinical trials), BA diarrhea (obeticholic acid, Phase 2 clinical trials [38]), and postbariatric surgery (chenodeoxycholic acid, Phase 4). In face of the paucity of clinical studies addressing the therapeutic potential of gut microbiota-derived lipids, a much-needed breakthrough is to establish the effectiveness and safety of specific lipid species on diseases that have been unequivocally associated with their levels in clinical studies and for which there is strong mechanistic information from preclinical studies. Moreover, there is scope for exploring the combinatory effects of lipids to restore lipid balance and physiological signaling in the gut.

Beyond using lipid metabolites as therapeutic tools, they also hold value as prognostic biomarkers. Preliminary data from clinical studies indicate that SCFA levels predict the response to immune checkpoint inhibitors in patients with advanced cancer. Acetic acid, propionic acid, butyric acid, valeric acid fecal levels, and plasma isovaleric acid levels were positively correlated with higher response rates to programmed cell death-1 inhibitors and longer progression-free survival in 52 patients with solid tumors followed up for 2 years [39]. Conversely, higher plasma levels of butyrate and propionate were associated with resistance to the anti-CTLA-4 blocking monoclonal antibody ipilimumab in a cohort of 38 patients with advanced multiple myeloma [40]. Despite being in accordance with evidence from preclinical studies indicating the immunomodulatory actions of SCFAs in the host, these findings should be confirmed in larger cohorts enabling adjustment for confounding variables and assessing how they apply to different tumor types and different immune checkpoint inhibitors. Further studies using comprehensive and unbiased approaches to isolate and identify lipids should unravel whether other species can function as biomarkers.

Although the impacts of many microbiota-derived lipids on host phenotypes remain to be determined, these metabolites may unravel novel pathways to be explored as prognostic, diagnostic, and therapeutic targets.

### Concluding remarks

Although we have seen critical early developments in microbiota-based therapy, we are still far from implementing a direct and personalized treatment strategy. Recent evidence points to the crucial yet complex roles of lipids in many metabolic pathways. Advances in lipidomic technology open new ways to understand lipid homeostasis. Systematic characterization of microbiota

### Outstanding questions

How advanced are we in the development of microbiota-based therapy?

Is there still an opportunity to improve FMT as a therapeutic strategy?

Could we consider gut microbiota-derived metabolites as potential drugs or supplements? If so, how viable would this be?

Are SCFAs and BAs the most important bioactive lipids?

Do PUFAs, phospholipids, and SLs of fecal origin possess therapeutic potential?

Is it reasonable to consider the gut microbiota as a source of bioactive lipids for rapid metabolic engineering, and further refine lipid isolation methods to develop a reliable cutting-edge biotechnology tool?

Is developing a single pill, containing a personalized cocktail of bioactive lipids, feasible?

What would be the challenges and limitations of a personalized therapy based on the microbiota, associating prebiotics, probiotics, fecal transplantation and bioactive metabolites?

metabolites and their impacts on host homeostasis is a new study area. Although there is yet much to uncover, the potential for the discovery of novel diagnostic strategies and therapies based on microbiota metabolites brings hope for the treatment of complex health issues that have been linked to dysbiosis.

Obtaining gut microbiota-derived metabolites does not require working with living organisms. Among these metabolites, lipid molecules are promising as regulators of various cellular signaling pathways, mostly correlated with inflammation. Indeed, future characterization of diseases should include lipidomic and metabolomic assays to uncover health and disease biomarkers and novel therapeutic targets.

The main obstacle to using microbiota metabolites as a therapeutic strategy would be the clear identification of which metabolites are deficient or pathologically increased. Considering these lipids, this could be overcome by lipidomic analysis of fecal material. However, the cost of such analysis could be prohibitive. An alternative would be identifying which bacteria are insufficient or in excess amounts through analysis of the fecal material. Knowing which bacteria are dysregulated and to which extent and which lipid metabolites these bacteria produce under physiological circumstances, we could calculate therapeutic combinations of lipid metabolites.

However, we would still have to characterize the exact microbiota for routine clinical applications, which would currently be expensive. With advancing technology and subsequent technical cost reduction, we hope that these possibilities will no longer be speculative and become routine practice in the clinic.

Treatment based on the administration of bioactive lipid metabolites offers a new possibility for rapid intervention to restore physiological cell signaling. This treatment is potentially associated with other therapies already under development, such as FMT and probiotics. It will likely require multiple doses determined by accurate qualitative and quantitative lipidomic analysis to adjust the lipid cocktail accordingly while a patient undergoes treatment.

In conclusion, the combination of different strategies using probiotics, fecal lipids, and targeted microbiota therapy could generate a novel approach to personalized therapeutic development to treat various diseases.

#### Acknowledgments

We are grateful to Dr. Daniela Amato for the mathematical discussions. We thank the anonymous reviewers for important suggestions and corrections in the manuscript.

#### Declaration of interests

The authors have no conflicts of interest to declare.

#### Resources

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT05153499>

#### References

1. Qin, J. *et al.* (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65
2. Hand, T.W. *et al.* (2016) Linking the microbiota, chronic disease, and the immune system. *Trends Endocrinol. Metab.* 27, 831–843
3. David, L.A. *et al.* (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559–563
4. De Filippo, C. *et al.* (2010) Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14691–14696
5. Doria, M.S. and Fischbach, M.A. (2015) Small molecules from the human microbiota. *Science* (80-) 349, 1254766
6. Suez, J. and Elinav, E. (2017) The path towards microbiome-based metabolite treatment. *Nat. Microbiol.* 2, 1–5
7. Jones, B.V. *et al.* (2008) Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the

- human gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13580–13585
8. van der Hee, B. and Wells, J.M. (2021) Microbial regulation of host physiology by short-chain fatty acids. *Trends Microbiol.* 29, 700–712
  9. Thibaut, M.M. and Bindels, L.B. (2022) Crosstalk between bile acid-activated receptors and microbiome in entero-hepatic inflammation. *Trends Mol. Med.* 28, 223–236
  10. Selmin, O.I. *et al.* (2021) n-6 High fat diet induces gut microbiome dysbiosis and colonic inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 22
  11. Watson, H. *et al.* (2018) A randomised trial of the effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplements on the human intestinal microbiota. *Gut* 67, 1974–1983
  12. Kallannan, K. *et al.* (2015) A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Sci. Rep.* 5, 11276
  13. Yan, X. *et al.* (2020) Intestinal flora modulates blood pressure by regulating the synthesis of intestinal-derived corticosterone in high salt-induced hypertension. *Circ. Res.* 126, 839–853
  14. Devane, W.A. *et al.* (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946–1949
  15. Mechoulam, R. *et al.* (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50, 83–90
  16. Muccioli, G.G. *et al.* (2010) The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol. Syst. Biol.* 6, 392
  17. Brown, L.H. and Mutch, D.M. (2020) Mechanisms underlying N3-PUFA regulation of white adipose tissue endocrine function. *Curr. Opin. Pharmacol.* 52, 40–46
  18. Ajabnoor, S.M. *et al.* (2021) Long-term effects of increasing omega-3, omega-6 and total polyunsaturated fats on inflammatory bowel disease and markers of inflammation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Nutr.* 60, 2293–2316
  19. Kishino, S. *et al.* (2013) Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17808–17813
  20. Miyamoto, J. *et al.* (2019) Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids. *Nat. Commun.* 10, 1–5
  21. Miyamoto, J. *et al.* (2015) A gut microbial metabolite of linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, ameliorates intestinal epithelial barrier impairment partially via GPR40-MEK-ERK pathway. *J. Biol. Chem.* 290, 2902–2918
  22. Ikeguchi, S. *et al.* (2018) Inhibitory effect of the gut microbial linoleic acid metabolites, 10-oxo-trans-11-octadecenoic acid and 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, on BV-2 microglial cell activation. *J. Pharmacol. Sci.* 138, 9–15
  23. Bello-Corral, L. *et al.* (2021) The influence of nutrition in Alzheimer's disease: neuroinflammation and the microbiome vs. transmissible prion. *Front. Neurosci.* 15, 1–14
  24. Itoh, T. *et al.* (2008) Structural basis for the activation of PPAR $\gamma$  by oxidized fatty acids. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 924–931
  25. Brown, E.M. *et al.* (2019) Bacteroides-derived sphingolipids are critical for maintaining intestinal homeostasis and symbiosis. *Cell Host Microbe* 25, 668–680.e7
  26. Johnson, E.L. *et al.* (2020) Sphingolipids produced by gut bacteria enter host metabolic pathways impacting ceramide levels. *Nat. Commun.* 11, 1–11
  27. An, D. *et al.* (2014) Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells. *Cell* 156, 123–133
  28. Imai, T. *et al.* (2018) Lipoteichoic acid anchor triggers Mincle to drive protective immunity against invasive group A *Streptococcus* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E10662–E10671
  29. Yasuda, S. *et al.* (2020) Elucidation of gut microbiota-associated lipids using LC-MS/MS and 16S rRNA sequence analyses. *iScience* 23, 101841
  30. Johnson, P.H. *et al.* (2018) Faecal microbiota transplantation versus placebo for moderate-to-severe irritable bowel syndrome: a double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, single-centre trial. *Lancet. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 17–24
  31. Kootte, R.S. *et al.* (2017) Improvement of insulin sensitivity after lean donor feces in metabolic syndrome is driven by baseline intestinal microbiota composition. *Cell Metab.* 26, 611–619.e6
  32. Kang, D.W. *et al.* (2019) Long-term benefit of microbiota transfer therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci. Reports* 9, 1–9
  33. Baruch, E.N. *et al.* (2021) Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science* 371, 602–609
  34. DeFilippo, Z. *et al.* (2019) Drug-resistant *E. coli* bacteremia transmitted by fecal microbiota transplant. *N. Engl. J. Med.* 381, 2043–2050
  35. Agus, A. *et al.* (2021) Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut* 70, 1174–1182
  36. Trah, J. *et al.* (2020) Lithocholic bile acid induces apoptosis in human nephroblastoma cells: a non-selective treatment option. *Sci. Rep.* 10, 20349
  37. Freeland, K.R. and Wolever, T.M.S. (2010) Acute effects of intravenous and rectal acetate on glucagon-like peptide-1, peptide YY, ghrelin, adiponectin and tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Br. J. Nutr.* 103, 460–466
  38. Walters, J.R.F. *et al.* (2015) The response of patients with bile acid diarrhoea to the farnesoid x receptor agonist obeticholic acid. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 41, 54–64
  39. Nomura, M. *et al.* (2020) Association of short-chain fatty acids in the gut microbiome with clinical response to treatment with nivolumab or pembrolizumab in patients with solid cancer tumors. *JAMA Netw. Open* 3, e202895
  40. Coutzac, C. *et al.* (2020) Systemic short chain fatty acids limit antitumor effect of CTLA-4 blockade in hosts with cancer. *Nat. Commun.* 11, 1–13
  41. Wang, H. *et al.* (1999) Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol. Cell* 3, 543–553
  42. Furusawa, Y. *et al.* (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504, 446–450
  43. Duncan, S.H. *et al.* (2002) Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 2141–2146
  44. Devlin, A.S. and Fischbach, M.A. (2015) A biosynthetic pathway for a prominent class of microbiota-derived bile acids. *Nat. Chem. Biol.* 11, 685–690
  45. Rodriguez-Castaño, G.P. *et al.* (2019) Bacteroides *thetaiotaomicron* starch utilization promotes quercetin degradation and butyrate production by *Eubacterium ramulus*. *Front. Microbiol.* 10, 1145
  46. Duncan, S.H. *et al.* (2006) Proposal of *Roseburia faecis* sp. nov., *Roseburia hominis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov., based on isolates from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2437–2441
  47. Shetty, S.A. *et al.* (2020) Unravelling lactate-acetate and sugar conversion into butyrate by intestinal *Anaerobutyricum* and *Anaerostipes* species by comparative proteogenomics. *Environ. Microbiol.* 22, 4863–4875
  48. Duncan, S.H. *et al.* (2002) Acetate utilization and butyryl coenzyme A (CoA): acetate-CoA transferase in butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5186–5190
  49. Reichardt, N. *et al.* (2014) Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME J.* 8, 1323–1335
  50. Polansky, O. *et al.* (2016) Important metabolic pathways and biological processes expressed by chicken cecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1569–1578
  51. Holmstrom, K. *et al.* (2004) *Subdoligranulum variable* gen. nov., sp. nov. from human faeces. *Anaerobe* 10, 197–203
  52. Sakamoto, M. *et al.* (2020) *Dialister hominis* sp. Nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 589–595
  53. Wu, F. *et al.* (2017) *Phascolarctobacterium faecium* abundant colonization in human gastrointestinal tract. *Exp. Ther. Med.* 14, 3122
  54. Lukovac, S. *et al.* (2014) Differential modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organs. *MBio* 5, e01438–14

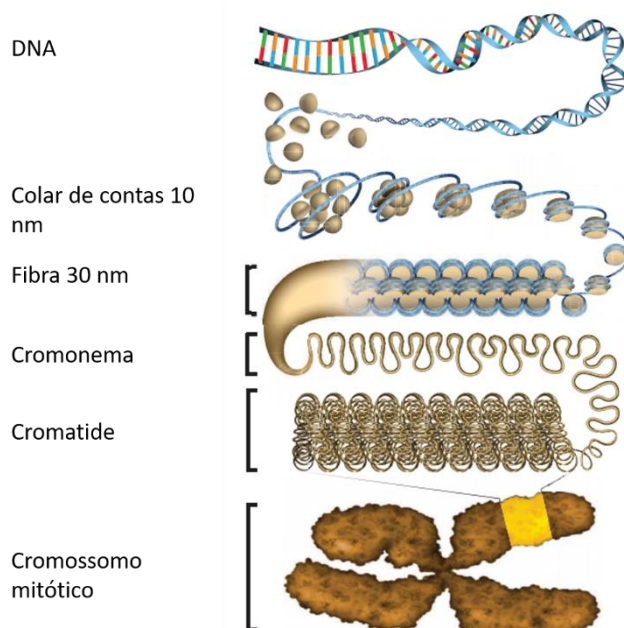
55. Kato, M. *et al.* (1995) Sphingolipid composition in *Bacteroides* species. *Anaerobe* 1, 135–139
56. Chen, T. *et al.* (2017) Fiber-utilizing capacity varies in *Prevotella*-versus *Bacteroides*-dominated gut microbiota. *Sci. Rep.* 7, 2594
57. Fukuda, S. *et al.* (2011) *Bifidobacteria* can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469, 543–549
58. Candido, E.P. *et al.* (1978) Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* 14, 105–113
59. Peng, L. *et al.* (2009) Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J. Nutr.* 139, 1619–1625
60. Alex, S. *et al.* (2013) Short-chain fatty acids stimulate angiotensin-like 4 synthesis in human colon adenocarcinoma cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Mol. Cell. Biol.* 33, 1303–1316
61. Singh, N. *et al.* (2014) Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* 40, 128–139
62. Kimura, I. *et al.* (2013) The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat. Commun.* 4, 1829
63. Chambers, E.S. *et al.* (2015) Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* 64, 1744–1754
64. Samuel, B.S. *et al.* (2008) Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 16767–16772
65. Hong, Y.H. *et al.* (2005) Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology* 146, 5092–5099
66. Parks, D.J. *et al.* (1999) Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284, 1365–1368
67. Song, X. *et al.* (2019) Microbial bile acid metabolites modulate gut FGF $\beta$  regulatory T cell homeostasis. *Nature* 577, 410–415
68. Huang, K. *et al.* (2018) Targeting the PXR-TLR4 signaling pathway to reduce intestinal inflammation in an experimental model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr. Res.* 83, 1031–1040
69. Okamura, M. *et al.* (2020) PXR functionally interacts with NF- $\kappa$ B and AP-1 to downregulate the inflammation-induced expression of chemokine CXCL2 in mice. *Cells* 9, E2296
70. Makishima, M. *et al.* (2002) Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* (80-) 296, 1313–1316
71. Yao, B. *et al.* (2019) The protective effect of lithocholic acid on the intestinal epithelial barrier is mediated by the vitamin D receptor via a SIRT1/Nrf2 and NF- $\kappa$ B dependent mechanism in Caco-2 cells. *Toxicol. Lett.* 316, 109–118
72. Ma, C. *et al.* (2018) Gut microbiome-mediated bile acid metabolism regulates liver cancer via NKT cells. *Science* (80-) 360
73. Cohen, L.J. *et al.* (2017) Commensal bacteria make GPCR ligands that mimic human signalling molecules. *Nature* 549, 48
74. Canelo, F.P. *et al.* (2021) Metabolic modulation of tumours with engineered bacteria for immunotherapy. *Nature* 598, 662–666
75. Pryor, R. *et al.* (2019) Host-microbe-drug-nutrient screen identifies bacterial effectors of metformin therapy. *Cell* 178, 1299–1312.e29
76. Artacho, A. *et al.* (2021) The pretreatment gut microbiome is associated with lack of response to methotrexate in new-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* 73, 931–942
77. Sanders, M.E. *et al.* (2019) Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 605–616
78. Zhang, F. *et al.* (2012) Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? *Am. J. Gastroenterol.* 107, 1755 author reply p.1755–6
79. van Nood, E. *et al.* (2013) Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* 368, 407–415
80. Kassam, Z. *et al.* (2019) Donor screening for fecal microbiota transplantation. *N. Engl. J. Med.* 381, 2070–2072
81. Dubberke, E.R. *et al.* (2018) Results from a randomized, placebo-controlled clinical trial of a RBX2660-A microbiota-based drug for the prevention of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 67, 1198–1204
82. Feuerstadt, P. *et al.* (2022) SER-109, an oral microbiome therapy for recurrent *Clostridioides difficile* infection. *N. Engl. J. Med.* 386, 220–229
83. Morkkala, K. *et al.* (2020) Interactions of dietary fat with the gut microbiota: Evaluation of mechanisms and metabolic consequences. *Clin. Nutr.* 39, 994–1018
84. Schoeler, M. and Caesar, R. (2019) Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 20, 461–472
85. Chen, J. *et al.* (2021) Stool banking for fecal microbiota transplantation: methods and operations at a large stool bank. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11
86. Maki, K. *et al.* (2018) The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell Host Microbe* 23, 705–715
87. Salazar, N. *et al.* (2015) Inulin-type fructans modulate intestinal *Bifidobacterium* species populations and decrease fecal short-chain fatty acids in obese women. *Clin. Nutr.* 34, 501–507

# 1. ANEXO II – PROJETO PARALELO – EXPRESSÃO E RECONSTITUIÇÃO DE OCTÂMERO DE HISTONAS HUMANAS RECOMBINANTES PARA ESTUDOS DA AÇÃO ENZIMÁTICA DO NUCLESSOMO.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CROMATINA

A cromatina é a forma na qual o DNA se organiza dentro do núcleo celular em eucariotos e é capaz de através de sua dinâmica controlar eventos fisiológicos como transcrição, replicação e reparo (VENKATESH; WORKMAN, 2015). A menor unidade presente na cromatina é o nucleossomo. Este é composto pelo octâmero de histonas H2A, H2B, H3 e H4 que formam entre si dois dímeros (H2A:H2B) e um tetrâmero (H3:H4) e pelo DNA, que se enrolara nesse complexo proteico globular por 145 a 147 pares de base realizando em torno de 1.7 voltas ao redor do octâmero (LUGER et al., 1997).

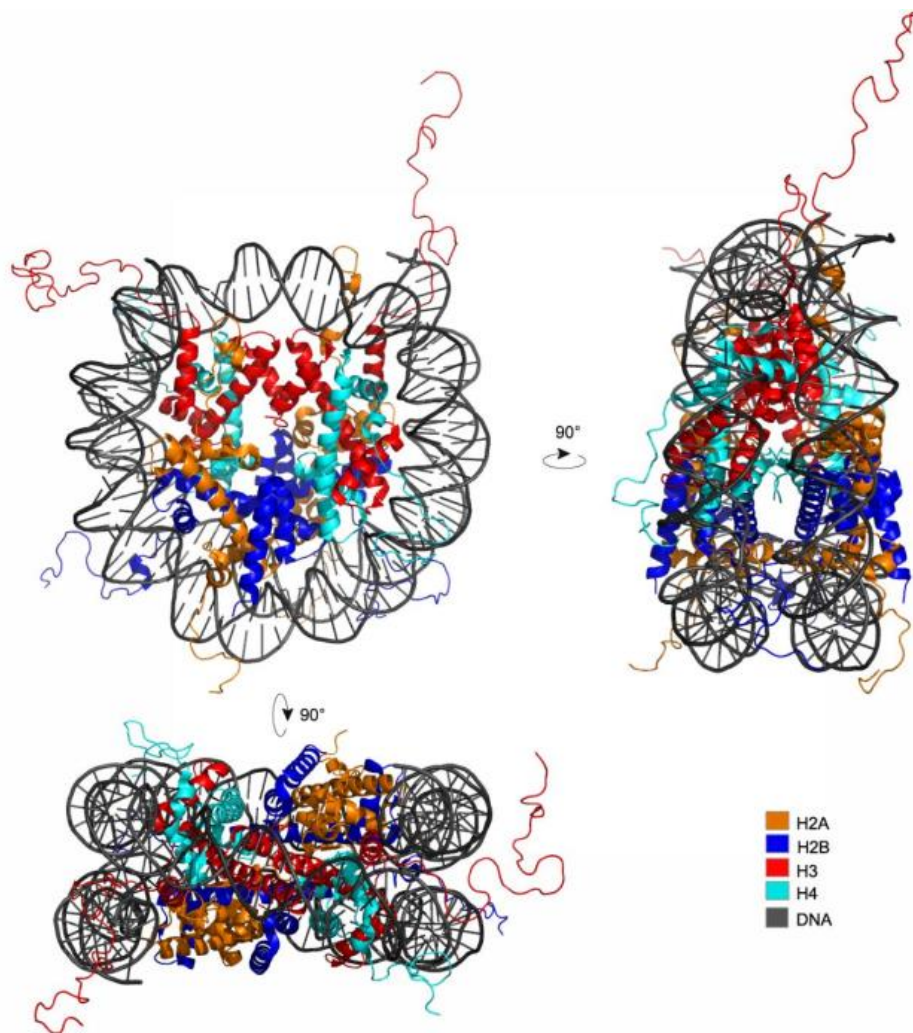


**Figura 20. Organização hierárquica da cromatina.** A cromatina começa a se organizar partindo do DNA livre, que começa a se ligar ao octâmero de histonas formando o colar de contas de 10nm, onde há grande taxa de transcrição. A fibra começa a se compactar mais formando a fibra de 30nm, em que não há grande taxa de transcrição já que o DNA se encontra bloqueado. A compactação continua até alcançar a forma de cromossomo.

A eucromatina é o estado em que há a menor compactação do DNA e com isso há o acesso da maquinaria transcricional deixando os genes ali presentes com maior



expressão gênica e a heterocromatina apresenta um estado mais condensado da cromatina o que leva a um determinado silenciamento (GREWAL; JIA, 2007) (Fig. 20).



**Figura 21. Representação estrutura de nucleossomo.** O nucleossomo com vista frontal, lateral e superior. Em Laranja estão destacadas as histonas H2A, em azul H2B, vermelho H3, azul claro H4 e em cinza o DNA. Estrutura obtida com o software PyMol viewer TM, PDB:1KX5 (DAVEY et al., 2002)

O nucleossomo (Fig 21) composto pelo octâmero de histonas e o DNA se liga a diversos fatores que levarão a modificações na dinâmica da cromatina. Existem regiões no nucleossomo que apresentam maior facilidade para que ocorram ligações, como por exemplo as caudas das histonas, em que geralmente ocorrem modificações pós-traducionais (RUTHENBURG et al., 2007), fatores que se ligam diretamente ao DNA (MCGINTY; TAN, 2014) e no *patch* ácido, formado

por resíduos de aminoácidos das histonas H2A e H2B, que tem potencial para ser um novo alvo farmacológico(DA SILVA; DE OLIVEIRA; SANTOS, 2015).

As histonas também foram descritas atualmente com função enzimática, sendo o tetrâmero formado pelas histonas H3/H4 um agente oxidante de cobre (ATTAR et al., 2020).

Entretanto, este trabalho não esclareceu se o octâmero de histonas e nucleossomo poderiam também atuar no processo enzimático de redução do cobre.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar o potencial papel do nucleossomo, octâmero e dímero na atividade enzimática do cobre.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Expressão de histonas humanas H2A, H2B, H3 e H4 em cultura de células bacterianas;
- Reconstituição do nucleossomo *in vitro*;
- Ensaio enzimático de redução de cobre utilizando octâmero de histonas.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

As tabelas 4 e 5 constam os materiais utilizados nesse projeto.

**Tabela 4. Reagentes utilizados para a obtenção de histonas recombinantes humanas e ensaios enzimáticos de redução de cobre.** A esquerda estão os reagentes e a direita os fabricantes

<b>Reagente</b>	<b>Fabricante</b>
Ácido acético	Sigma Aldrich Co., EUA
Ácido Clorídrico	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Ampicilina	Sigma Aldrich Co., EUA
Bromofenol	Merck, ALE
Cloranfenicol	Sigma Aldrich Co., EUA
Cloreto de guanidina	Sigma Aldrich Co., EUA
Cloreto de Sódio	Dinâmica Química Contemporânea LTDA, BRA
Coomassie blue	Merck, ALE
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma Aldrich Co., EUA
Ditiotreitol (DTT)	GE Healthcare, UK
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	Sigma Aldrich Co., EUA
EDTA	Dinâmica Química Contemporânea LTDA, BRA
Extrato de levedura	Neogen Corporation, EUA
Glicerol	Sigma Aldrich Co., EUA
Glicina	Sigma Aldrich Co., EUA
Hidróxido de Sódio	Héxis, BRA
Metanol	Vetec Química Fina Ltda, BRA
Persulfato de amônio (APS)	Bio-rad, EUA
PIC (Protease Inhibitor cocktail)	Sigma Aldrich Co., EUA
PMSF	Sigma Aldrich Co., EUA
Poliacrilamida	Sigma Aldrich Co., EUA
TEMED	Sigma Aldrich Co., EUA

Triptona	Neogen Corporation, EUA
Tris	Promega, EUA
Triton X-100	Sigma Aldrich Co., EUA
Ureia	Sigma Aldrich Co., EUA
$\beta$ -mercaptoetanol	Sigma Aldrich Co., EUA
Rosetta pLysS	Merck, ALE
Coluna HiTrap Q FF	GE Healthcare Life Science, UK
Coluna HiTrap SP FF	GE Healthcare Life Science, UK
Coluna HiTrap Superdex 200 26/60	GE Healthcare Life Science, UK
Neocuproine	Sigma Aldrich Co., EUA
Sulfato de cobre	Dinâmica Química Contemporânea LTDA, BRA
Tricina	Sigma Aldrich Co., EUA

---

**Tabela 5. Equipamentos utilizados para a obtenção de histonas recombinantes humanas e ensaios enzimáticos** de redução de cobre. A esquerda estão os equipamentos e a direita os fabricantes.

<b>Equipamento</b>	<b>Fabricante</b>
Balança analítica	Shimadzu do Brasil, BRA
Balança semi-analítica	Sartorius, ALE
Banho-maria	Braun Biotech International, ALE
Centrifuga de micro tubos	Hermle, ALE
Espectrofotômetro UV-Vis	Shimadzu do Brasil, BRA
Espectrofotômetro UV 1800	Shimadzu do Brasil, BRA
FPLC- ÄKTA TM Pure	GE Healthcare Life Sciences, UK
Homogeneizador circular de tubos	Taiyo Co., Ltda, JAP
Liofilizador JJM	JJ Científica
pHmetro	Kasvi, BRA
Shaker	New Brunswick Scientific, EUA
Sonicador	Sonics, EUA
Fotodocumentador Amersham Imager 600	GE Healthcare Life Sciences, UK
Aparato de eletroforese	Bio-rad, EUA

### **3.1. PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES**

O preparo de células competentes por  $\text{CaCl}_2$  com choque térmico foi realizado de acordo com protocolo estabelecido por (CHANG et al., 2017) e modificado pelo Laboratório de Farmacologia Molecular (TELES, 2017). Esse

método faz com que a bactéria tenha maior facilidade para incorporar o DNA, promovendo a inserção de DNA plasmidial a membrana da bactéria.

Foram inoculadas 10uL da cepa modificada de Rosetta™(DE3) pLysS em meio contendo 20ng/mL de cloranfenicol, já que a cepa possui resistência a esse antibiótico, em placa contendo meio Luria Bertani (LB) e ágar. Uma colônia foi isolada e transferida para 5 ml de meio LB contendo cloranfenicol 20ng/ml, em shaker a 150 rpm e 37°C durante período overnight. Após esse período, 3 ml foram transferidos para 100mL meio LB foi suplementado com 1% de antibiótico. As células foram centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min. O pellet solubilizado em solução de 50 mM CaCl<sub>2</sub> e incubado em gelo durante 15 min. As células foram centrifugadas novamente nos mesmos parâmetros anteriores e o pellet foi novamente solubilizado em 50mM CaCl<sub>2</sub> e glicerol para posterior uso.

### **3.2. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA**

A metodologia de transformação bacteriana utilizada foi a de choque térmico em células quimicamente competentes por CaCl<sub>2</sub> segundo protocolo de (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) padronizado pelo Laboratório de Farmacologia Molecular (FarMol).

Em 50uL de células competentes da cepa *Rosetta plyss* adicionou-se 1µg de DNA plasmidial, após homogeneização, as células foram incubadas durante 5 minutos em gelo e posteriormente 1,5 minutos a 42°C em banho seco e posteriormente novamente durante 5 minutos em gelo. Para recuperação, as células foram solubilizadas em 500uL de meio LB e incubadas durante 1 hora a 37°C. Após incubação, as células foram inoculadas em meio ágar LB contendo ampicilina 100ug/ml.

### **3.3. EXPRESSÃO DE HISTONAS**

A partir das cepas transformadas, uma colônia isolada foi coletada e transferida para 5 ml de meio LB suplementado com ampicilina 100ug/ml e mantidas em *shaker* a 150 rpm, 37°C, durante 8 horas. Após crescimento

bacteriano, 5 ml foram transferidos para 1 L de meio de cultura 2xTY suplementado com ampicilina 100ug/ml, a 150 rpm, 37°C, durante período *overnight*. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm durante 20 minutos. Uma amostra do extrato bacteriano foi recolhida e solubilizada em água a fim de verificar a super expressão das proteínas recombinantes de interesse. O extrato foi analisado por gel SDS-PAGE 15% e o pellet foi armazenado a 20°C para posterior purificação.

### **3.4. PURIFICAÇÃO DE HISTONAS EM CORPOS DE INCLUSÃO**

O pellet de bactérias foi solubilizado em tampão de lise conforme descrito na Tabela e passou por processo de sonicação (4°C, pulsos de 1 segundo seguido de intervalo de 1 segundo amplitude de 50, durante 3 minutos). A solução foi centrifugada a 4°C, durante 30 min, a 12000 rpm. O pellet foi ressuspendido em tampão de lise contendo 1% de Triton X-100 e novamente centrifugado nas mesmas condições, sendo esse processo repetido e depois mais duas centrifugações somente com o tampão de lise, foi acrescido ao tampão inibidor de protease.

O pellet foi solubilizado em DMSO e incubado durante 30 min a temperatura ambiente e os corpos de inclusão foram então extraídos por meio de tampão desnaturante (Tab 6) e levados a agitador circular durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para a retirada da guanidina foram feitas 3 diálises em tampão de ureia, em membrana SnakeSkin cut off 3.500 MWCO, sendo realizadas

trocas em intervalos de 1,3 e 16 horas.

**Tabela 6. Soluções utilizadas em purificação de corpos de inclusão.** A esquerda estão os tampões utilizados e a direita suas composições respectivamente.

<b>Tampão</b>	<b>Componentes</b>
Tampão de Lise	50 mM Tris pH 7,6 0,1 M NaCl 1 mM EDTA 5 mM $\beta$ -mercaptoetanol 0,2 mM PMSF 500 $\mu$ L Inibidor de protease 2 ml Triton X-100
Tampão desnaturante	6 M Cloreto de Guanidina 20 mM Tris pH 7,6 5 mM DTT
Tampão de diálise	7 M Ureia 0,1 M NaCl 1mM EDTA 5 mM $\beta$ -mercaptoetanol 0,2 PMSF 10mM Tris pH 8,0

### **3.5. CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA**

Após dialisadas, as amostras foram filtradas e injetada no equipamento ÄKTA™ Pure (GE Healthcare Life Sciences), em que as colunas HiTrap Q FF e HiTrap SP FF (aniônica e catiônica, respectivamente) já estavam conectadas e

equilibradas em tampão A. Para as histonas H2A e H2B a coluna foi equilibrada em Tampão A e 10% de Tampão B, já para as histonas H3 e H4, a coluna foi equilibrada em tampão A contendo 20% de tampão B. Tampões estão descritos em tabela 7. A coluna aniônica é conectada ao sistema para retirada de possíveis contaminantes proteicos com carga negativa, já a catiônica é utilizada para recuperar nossas proteínas de interesse já que elas apresentam carga positiva.

Após injetadas, as amostras foram recolhidas em frações de 2mL e foi feito eletroforese SDS-PAGE 15% para confirmação das frações. Após análise do gel, foram juntadas as frações próximas que continham a proteína de interesse o mais pura possível e foram novamente dialisadas em água milli Q para retirada de ureia. Foram feitas três trocas na diálise, a primeira *overnight*, segunda após 8 horas e terceira *overnight*, em 2 litros de tampão. As amostras foram liofilizadas em liofilizador LJM (JJ científica) e estocadas a -20°C para uso posterior.

**Tabela 7. Soluções utilizadas em cromatografia de troca iônica.** A esquerda está o tampão de eluição com alta concentração de sal e a direita tampão B.

<b>Tampão A</b>	<b>Tampão B</b>
7 M Ureia	7 M Ureia
1 mM EDTA	1 mM EDTA
10 mM Tris pH 8,0	10 mM Tris pH 8,0
1 mM DT	1 mM DTT
0,2 mM PMSF	0,2 mM PMSF
1 M NaCl	

### **3.6. RECONSTITUIÇÃO DOS COMPLEXOS PROTEICOS**

Após liofilizadas todas proteínas purificadas (H2A, H2B, H3 e H4), foram solubilizadas com água milli Q no menor volume possível, suas concentrações foram medidas no aparelho *nanovue*, no comprimento de onda de 280 nm e partindo do coeficiente de extinção disponível na literatura foi realizado o cálculo de concentração das histonas. As proteínas foram então misturadas em

concentrações equimolares e solubilizadas em tampão desnaturante (Tab. 8) e levadas a agitador circular durante 4 horas à temperatura ambiente. Após desnaturação, foram dialisadas em tampão renaturante (Tab. 8) e feitas 4 trocas, 6 horas, overnight, 8 horas, e *overnight*, as amostras foram filtradas em filtros de 0.45mm para retirar precipitados.

**Tabela 8. soluções usadas para criar complexos.** A esquerda o tampão que realizará a desnaturação das proteínas e a direita o tampão que realizará a renaturação para a formação de complexos proteicos.

<b>Tampão desnaturante</b>	<b>Tampão renaturante</b>
6 M Cloreto de Guanidina	10 mM Tris pH 7,5
20 mM Tris pH 7,5	1 mM EDTA
5 mM DTT	2 M NaCl
	5 mM $\beta$ -mercaptoetanol

### **3.7. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO**

O tampão utilizado para a cromatografia por exclusão de tamanho é o tampão renaturante descrito na tabela 8. Esse tampão propicia que as proteínas voltem a sua conformação. Pela afinidade que possuem, quando renaturadas formam o complexo. Após diálise e preparação das amostras, foram injetadas em equipamento de FPLC ÄKTA™ Pure (GE Healthcare Life Sciences) com a coluna HiLoad Superdex 200 26/600 (GE Healthcare Life Sciences) acoplada, já equilibrada.

Em seguida, as amostras foram recolhidas em frações de 4mL e realizada eletroforese SDS-PAGE 15% para confirmação das frações. Os picos de interesse foram identificados e armazenados em glicerol em -20°C para uso posterior

### **3.8. OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA WIDOW 601**

A metodologia de transformação bacteriana utilizada foi a de choque térmico em células quimicamente competentes por CaCl<sub>2</sub> segundo protocolo de



(SAMBROOK; RUSSELL, 2001) padronizado pelo Laboratório de Farmacologia Molecular.

Em 50uL de células competentes da cepa *DH5α* adicionou-se 1μg de DNA plasmidial, após homogeneização, as células foram incubadas durante 5 minutos em gelo e 1,5 minutos a 42°C em banho seco e posteriormente novamente durante 5 minutos em gelo.

Para recuperação das células a solução foi solubilizada em 500uL de meio LB e incubada durante 1 hora a 37°C. Após incubação, as células foram inoculadas em meio ágar LB contendo ampicilina 100ug/ml.

O plasmídeo utilizado foi o 167.80, contendo 80 vezes a sequência de DNA, que posteriormente sofreu digestão por meio da enzima *AVAI*, visto que o contruto contém sítios flanqueando as sequencias de DNA de interesse, e passou por posterior separação do esqueleto plasmidial por meio de PEG 8000. Após o DNA ficar livre da parte plasmidial que não era de nosso interesse ele sofreu purificação por fenol: clorofórmio para retirada de impurezas.

### **3.9. RECONSTITUIÇÃO DE NUCLEOSSOMO**

O mononucleossomo foi reconstituído por meio de dialise lenta de sal segundo protocolo de (HUYNH; ROBINSON; RHODES, 2005). Em tubos siliconizados foi adicionado 1ug de DNA Windom 601 contendo 167 pares de base. Foram adicionados em concentrações variadas de tampão de reação (2M NaCl, 10mM tris-HCl pH 7.4 e 1.5mM EDTA) e de histonas em concentrações crescentes os tubos foram posteriormente centrifugados e transferidos para tubos de vidro siliconizados com extremidade coberta com membrana de dialise de cut-off de peso molecular de 3-7 kDa (Snake Skin Pleated Dialysis Tubing – Thermo Scientific). As soluções foram transferidas para saco de diálise contendo mesma solução que do tubo. O saco de dialise foi transferido para um Becker contendo 4L

de solução (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA) para que a diálise fosse feita sob agitação a 4°C overnight.

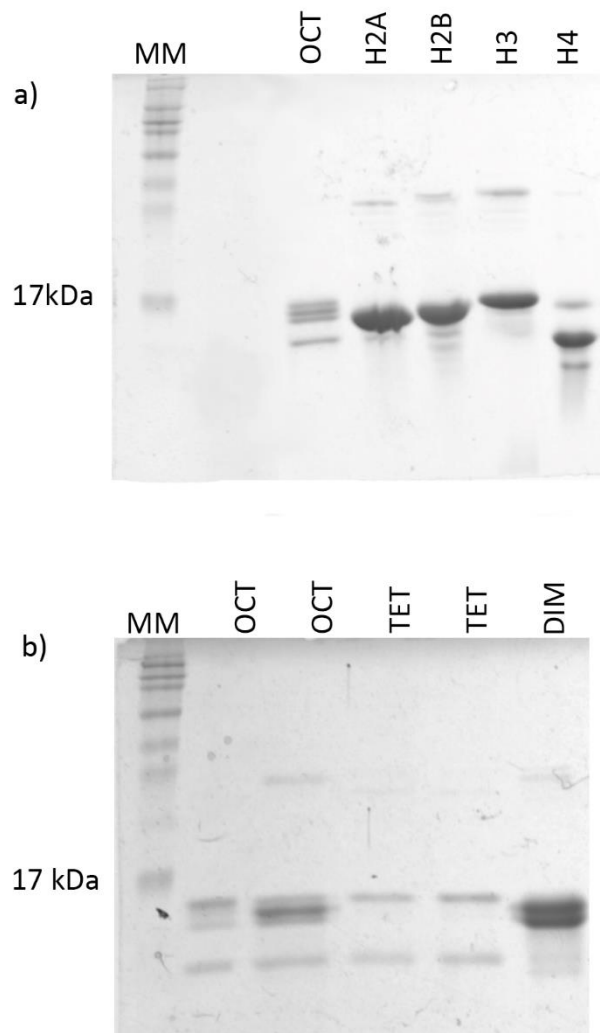
### **3.10. ENSAIO ENZIMÁTICO HISTONAS E COBRE**

Para ensaio dos complexos de histonas e se eles atuariam como possíveis redutores de cobre utilizamos protocolo adaptado descrito por (ATTAR et al., 2020). Os complexos utilizados foram dímero de histonas H2A/H2B, tetrâmero H3/H4 e octâmero de histonas em concentração de 1µM. Os complexos foram adicionados a solução para reação contendo 67µM Tris-HCl pH 7,5, 100mM NaCl, 1mM Neocuproine, 30 µM de DTT. Foi feita solução de CuSO<sub>4</sub> e Tricine pH 7.5. As soluções foram então solubilizadas para que ocorresse a redução do cobre e a absorbância foi medida na faixa de 448nm em equipamento UV-1800 (Shimadzu). A leitura foi realizada nessa faixa pois essa é a faixa em que conseguimos ver o Cu<sup>+1</sup> sendo formado e reagindo com o neocuproine e durante a leitura obteve-se a mensuração a cada 1 seg durante 5 minutos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. PURIFICAÇÃO DE HISTONAS

As histonas foram expressas seguindo um protocolo previamente descrito. Mesmo diante da presença de proteólise, ainda foi possível utilizá-las, uma vez que a taxa de proteólise é muito baixa em comparação com a concentração de histonas. Após a purificação por troca iônica, as histonas passaram por uma etapa adicional de purificação (exclusão de tamanho). O material resultante foi liofilizado e ressuspenso em água, sendo armazenado em 50% de glicerol. Para avaliar as histonas e os complexos formados, comparamos todos os resultados obtidos com o octâmero de galinha.



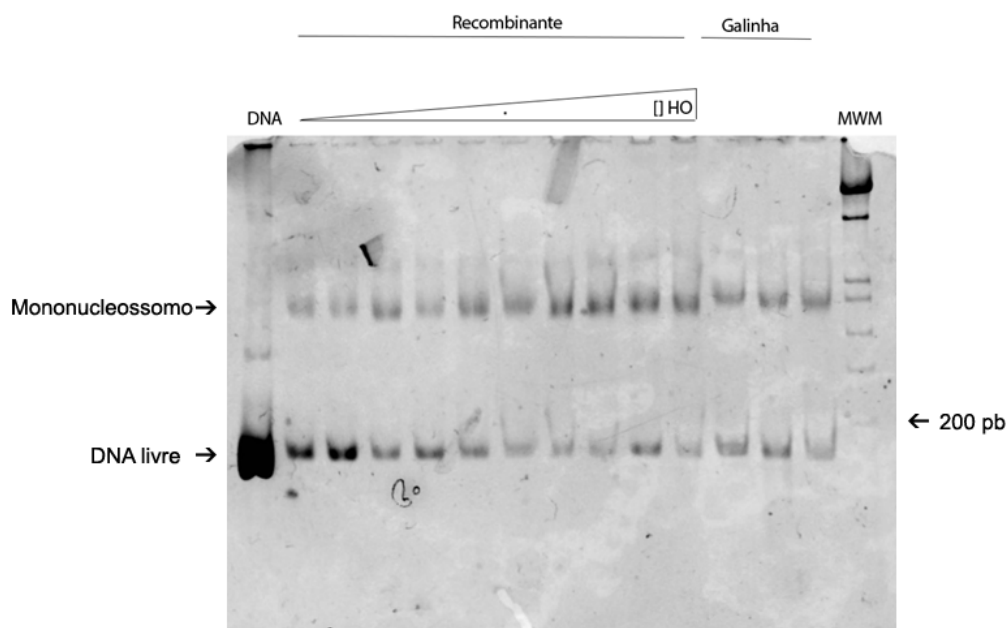
**Figura 22. Histonas e complexos proteicos purificados.** Em (a), um gel SDS-PAGE 15% exibe as proteínas purificadas. A primeira linha mostra o marcador molecular, com a banda de 17 kDa destacada, seguido pelo octâmero de galinha, H2A, H2B, H3 e H4. Em (b), são apresentados os complexos proteicos, com a primeira linha

mostrando o marcador molecular, seguido por frações do octâmero recombinante, tetrâmeros e dímero. DIM - dímero, TET – tetrâmero, MM-marcador molecular e OCT - octâmero.

Observamos que todas as proteínas apresentam pesos moleculares semelhantes (Figura 22). Dessa forma, a purificação das proteínas e os complexos foram formados de forma satisfatória.

#### 4.2. RECONSTITUIÇÃO MONONUCLEOSSOMO

Optamos pela utilização do DNA Widom 601 (LOWARY; WIDOM, 1998), devido à sua alta afinidade com o octâmero de histonas. Com a concentração do DNA fixada, procedemos ao aumento da concentração de histonas para determinar a concentração ideal que resultaria na máxima formação de mononucleossomos. Assim, conseguimos realizar a montagem bem-sucedida do mononucleossomo utilizando o octâmero de histonas humanas recombinantes (Figura 23).

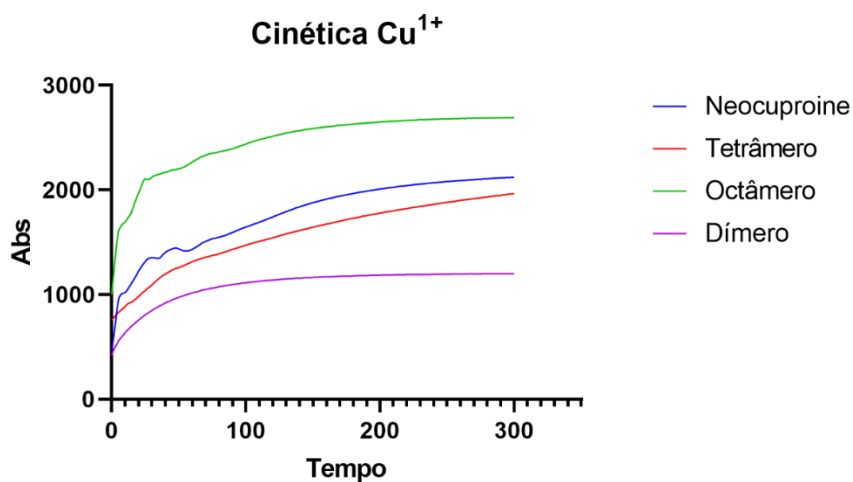


**Figura 23. Reconstituição de nucleossomo.** Gel de acrilamida 7% corado com brometo de etídio indicando a formação de nucleossomo com complexo proteico de octâmero de histonas humanas recombinantes. DNA livre está na linha inferior e os monucleossomos na linha superior. MWM- Marcador molecular. (*Molecular Weight marker*)

A obtenção do nucleossomo demonstrou eficiência, resultando na formação de um complexo octâmero de histonas com afinidade pelo DNA. Nesse contexto, inferimos que o processo de purificação e reconstituição das proteínas foi eficaz.

### 4.3. ENSAIO ENZIMATICO COBRE

Para análise da atividade enzimática, como redutor do cobre, mensuramos a absorvância a cada 1 segundo durante 300 seg na faixa de 448nm notando que há um aumento da velocidade da reação de redução do cobre visto que nesse comprimento de onda a formação de  $\text{Cu}^{1+}$  é sinalizada.



**Figura 24. Cinética de aparecimento de  $\text{Cu}^{1+}$ .** Curvas de aparecimento de  $\text{Cu}^{1+}$  partindo de  $\text{Cu}^{2+}$ . Em azul temos neocuproine sem histonas, em verde octâmero, em vermelho tetrâmero e em roxo o dímero.

Na Fig 24 observamos que o dímero não demonstra um aumento na cinética do cobre, conforme esperado, Por outro lado, o octâmero apresenta um aumento na formação de  $\text{Cu}^{1+}$ .

## 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Aqui tivemos êxito na reconstituição do nucleossomo com as histonas recombinantes humanas. Além disto, os ensaios preliminares sugerem que dímero H2A:H2B não possui atividade enzimática na redução do cobre. Por outro lado, o octâmero apresenta um aumento na formação de cobre 1+, corroborando com a ação descrita em 2023 por Vogelauer et al., que evidenciou a atividade enzimática do nucleossomo.

Estes trabalhos foram importantes para a continuação dos estudos estruturais e bioquímicos da cromatina realizado pelo grupo do Professor Guilherme Santos.

## 6. REFERÊNCIAS

ATTAR, N. et al. The histone H3-H4 tetramer is a copper reductase enzyme. **Science**, v. 369, n. 6499, p. 59–64, 3 jul. 2020.

CHANG, A. Y. et al. Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation. v. 1, 2017.

DA SILVA, I. T. G.; DE OLIVEIRA, P. S. L.; SANTOS, G. M. Featuring the nucleosome surface as a therapeutic target. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 5, p. 263–269, 1 maio 2015.

DAVEY, C. A. et al. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 319, n. 5, p. 1097–1113, 2002.

GREWAL, S. I. S.; JIA, S. Heterochromatin revisited. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 35, 1 jan. 2007.

HUYNH, V.; ROBINSON, P.; RHODES, D. A method for the in vitro reconstitution of a defined “30 nm” chromatin fibre containing stoichiometric amounts of the linker histone. **Journal of molecular biology**, v. 345, n. 5, p. 957–968, 4 fev. 2005.

LOWARY, P.; WIDOM, J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. **Journal of molecular biology**, v. 276, n. 1, p. 19–42, 13 fev. 1998.

LUGER, K. et al. Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria<sup>11</sup>Edited by A. Klug. **Journal of Molecular Biology**, v. 272, n. 3, p. 301–311, 1997.

MCGINTY, R. K.; TAN, S. Nucleosome Structure and Function. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 6, p. 2255–2273, 25 mar. 2014.

RUTHENBURG, A. J. et al. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 12, p. 983, dez. 2007.

SAMBROOK, J. F.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set)**. [s.l: s.n.]. v. 1



TELES, K. Mapeando a Superfície Do Nucleossomo Com Finalidade Terapêutica. 2017.

VENKATESH, S.; WORKMAN, J. L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 3, p. 178–189, 4 fev. 2015.

VOGELAUER, M. et al. **Zinc is Essential for the Copper Reductase Activity of Yeast Nucleosomes**. [s.l.] *Biochemistry*, 14 set. 2023. Disponível em: <<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.09.14.557765>>. Acesso em: 3 jan. 2024.