

Identificação de Genes Regulados por Ácidos Graxos (EPA e DHA) em células Jurkat e Raji

Autores

Rozangela Verlengia
Adrienne Christine Palanch

Apoio Financeiro

Fap

1. Introdução

Os ácidos graxos (AGs) são compostos formados por uma cadeia hidrocarbonada e um grupamento carboxila e podem ser classificados como saturados ou insaturados (quando apresentam pelo menos uma insaturação). Os AGs podem ser obtidos a partir da dieta, pela ação das lipases sobre os triacilgliceróis ou sintetizados pelo próprio organismo através da síntese "de novo" (Pompéia e cols., 2000). Por outro lado, existe um grupo de ácidos graxos, denominados essenciais, que só podem ser obtidos pela dieta (Pompéia e cols., 2000). Dentre os ácidos graxos essenciais estão aqueles da família ω -3, destacando-se os ácidos α -linolênico (C18:3), eicosapentaenóico (C20:5 - EPA) e o docosa-hexaenóico (C22:6 - DHA), que são precursores dos eicosanóides. Os eicosanóides incluem as prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs), leucotrienos (LTs), lipoxinas (LXs), ácidos hidroperoxieicosatetraenóico (HPETEs) e hidroxieicosatetraenóico (HETEs) entre outros; potentes reguladores de funções celulares, podendo ser produzidos por quase todas as células do organismo, apresentando efeitos autócrino e parácrino (Marks e cols., 1996).

Sabe-se atualmente que os lipídios podem regular o metabolismo e a funcionalidade das células, ao contrário do que se pensava no começo do século passado, quando achava-se que os AGs seriam apenas substratos energéticos e componentes estruturais de membranas (Pompéia e cols., 2000).

Os efeitos dos ácidos graxos e dietas lipídicas sobre a função imunitária tem despertado grande interesse da comunidade científica. Os estudos nesta área foram intensificados nos últimos anos pela elucidação das funções dos eicosanóides na modulação das respostas inflamatória e imunitária (Goldyne & Stobo, 1981; Hwang, 1989) e pelo fato de que a via de metabolização do ácido araquidônico para produzir esses mediadores pode ser modulada por AGPIs de cadeia longa ω -3, encontrados em alguns óleos de peixes marinhos (Hwang, 1989; Calder, 1996).

Em ratos alimentados com dietas ricas em ácidos oléico, linoléico e α -linolênico foi verificada inibição da proliferação dos linfócitos do baço quando esses foram estimulados com concanavalina A (con A) (Calder e cols., 1995). Redução de 55% a 64% na proliferação de linfócitos estimulados com Con A, quando tratados "in vitro" com ácidos graxos saturados de cadeia longa, AGs monoinsaturados e AGPIs tem sido reportada. Entretanto, dietas enriquecidas com AGs saturados de cadeia média não afetam a proliferação de linfócitos (Otton e cols., 1998).

Em estudos sobre o efeito da suplementação da dieta de indivíduos saudáveis com AGPIs ω -3 na produção de citocinas em células polimorfonucleares do sangue periférico (PBMC), foi verificado que sob estímulo com LPS, há redução na produção de IL-1a, IL-1b e TNF. Essas alterações retornaram aos valores normais após 20 semanas do término da suplementação em homens. Por outro lado, a suplementação nas mulheres saudáveis causou diminuição na produção de interleucinas (IL)-1b e TNF que foi proporcional ao tempo de administração da dieta em mulheres jovens e idosas, exceto no caso da produção IL-1b, que apresentou diminuição somente em mulheres idosas. O estímulo com Con A também diminuiu gradativamente a produção de IL-6 em função do tempo de tratamento, tanto em mulheres jovens quanto em idosas (Calder, 1998).

Conforme descrito acima, os AGs podem regular o metabolismo e a funcionalidade de leucócitos e este efeito, é em parte, devido à alteração na transcrição gênica. EPA e DHA foram selecionados por apresentarem efeitos marcantes na função de leucócitos, afetando as respostas inflamatória e imunitária. Destacam-se os efeitos benéficos dos AGPI ω -3, tais como EPA e DHA em doenças cardiovasculares, autoimunes, esclerose múltipla e certos tipos de câncer (Kremer, 1990; Chandraesedar, 1994; Calder, 1998; Fernandes & Jolly, 1998). A determinação dos genes estimulados ou inibidos pelos efeitos desses ácidos graxos separadamente e bem como sobre funcionalidade (proliferação e produção de citocinas), certamente contribuirá para explicar o mecanismo de ação desses e identificar os benefícios da suplementação com ácidos graxos sob a função do sistema imune em atletas treinados e bem como em humanos saudáveis, deste modo conduzindo para o desenvolvimento de uma dieta a qual poderá beneficiar os atletas em relação as alterações do sistema imune promovidos pelo exercício. No presente trabalho os aspectos da expressão pleiotrópica dos genes foi avaliada nas células Raji.

2. Objetivos

Avaliar os efeitos dos ácidos EPA e DHA sobre a expressão gênica em células Raji

3. Desenvolvimento

3.1. Células – Linfócitos T (linhagem – Raji)

Raji são células leucêmicas humanas, derivadas do linfoma de Burkitt (Epstein e cols., 1966; Henle & Henle, 1966), e foram adquiridas do Banco de células do Rio de Janeiro.

3.2. Extração do RNA total

O RNA total foi obtido a partir de $0,5-1 \times 10^7$ células Raji utilizando o reagente Trizol (Life Technologies, Rockville, MD), de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado por meio da absorbância a 260nm. A pureza do RNA foi avaliada por meio da relação 260nm vs 280 nm e a separação eletroforética em gel de agarose desnaturante 1% contendo brometo de etídeo.

3.3. Síntese da sonda de cDNA

As sondas de cDNA foram sintetizadas usando o sistema de marcação de RNA total Atlas Kit™ de acordo com as recomendações do fabricante (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA). As sondas marcadas com ³³P foram purificadas a partir dos nucleotídeos não incorporados passando a mistura de reação por uma coluna (NucleoSpin Extraction Spin Column; Clontech Laboratores).

3.4. Hibridação – macroarray

Todas as soluções utilizadas foram obtidas partir da empresa Clontech Laboratories. A membrana foi pré-hibridada por 30 min. A 68° C em Express Hyb contendo 50 m g de DNA de esperma de Salmão desnaturado.

3.5. Análise dos resultados de Macroarray

Alterações na expressão gênica induzida pelo Ácido Graxo foram analisados comparando com as células não tratadas usando o software Array-Pro™, versão 4 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). O ruído de fundo local (*background*) foi subtraído a partir do valor da densidade de cada *spot* para obtenção do valor real. Os *spots* com valores de intensidade média maior do que 1,2 vezes foram mensurados. A Normalização foi feita calculando a razão da intensidade total e usando o gene *housekeeping* (b -actina) presente na membrana.

3.6.

RT-PCR

RT-PCR usando *primers* específicos foram utilizados para confirmar o diferencial de expressão do mRNA detectado pela análise do *macroarray*. A RT-PCR foi realizada utilizando os parâmetros descritos por Innis e Gelfand (1990). O número de ciclos foram selecionados permitindo a comparação quantitativa das amostras de maneira linear. Para análise semi-quantitativa, o gene da (b -actina) foi utilizado.

3.7. Análise do produto d e PCR

A análise do produto de amplificação foram realizados em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo a partir da separação eletroforética por 1 hora a 100 V. O gel foi fotografado usando Sistema de Câmara Digital DC120 ZOOM a partir da Kodak. As imagens foram processadas e analisadas no *software* Kodak Digital Science 1D Image Anlysis (Invitrogen).

4. Resultados

4.1 Expressão de genes pleotrópicos

4.2. Análise de RT-PCR

Para validar o resultado da análise de *macroarray*, 5 genes foram selecionados e confirmados por RT-PCR. Embora a magnitude não foi idêntica, a direção de alteração de induzida pelo FA foi a mesma tanto para o RT-PCR quanto para o *macroarray*. Os genes selecionados para a análise de RT-PCR foram aqueles envolvidos em aspecto importante na função do linfócito-B incluindo a via de transdução de sinal e apoptose. Eles foram alterados pelo tratamento com DHA e EPA como indicado pela análise de *macroarray*. DHA aumentou a expressão de Bcl2. EPA aumentou a expressão da fosfolipase A₂, caspase 3, apoptose regulador bcl-x, e Myc-*proto-oncogene*.

O efeito comparativo do DHA e EPA sob a expressão dos genes do linfócito B relativos a alguns aspectos da função celular incluindo via de sinalizando, defesa celular, reparo, apoptose e produção de citocinas. Dos 83 genes avaliados, 25 genes modificaram sua expressão frente a no mínimo um FA testado. A proporção de genes alterados pelas FA foi 8,4% para o DHA e 25,9% para EPA. O DHA aumento a expressão de 7 genes, considerando que o EPA aumentou a expressão de 20 genes e somente um gene teve sua expressão diminuída.

5. Considerações Finais

O presente estudo promove evidências que EPA e DHA apresentam diferentes efeitos sobre a expressão de genes relacionados a variadas funções (ex. via transdução de sinal).

Referências Bibliográficas

Calder, P.C., Costa-Rosa, L.F., Curi, R. Effects of feeding lipids of different fatty acid compositions upon rat lymphocyte proliferation. **Life Science**. v.56, n.6, p. 455-463, 1995.

Calder, P.C. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 55, p. 737-774, 1996.

Calder, P.C. n-Polyunsaturated fatty acids and mononuclear phagocyte function. In: Kremer, J. **Medicinal fatty acids in inflammation**, Switzerland, Birkhauser Verlag Basel, 1998, p. 1 –27.

Chandraesekar, B & Fernandes, G. Decreased proinflammatory cytokines and increased antioxidant enzyme gene expression by w -3 lipids in murine lupus nephritis. **Biochemical and Biophysical Research Communications Critical Reviews in Immunology Transactions of the New York Academy of Sciences v. 79, p. 674-681, 2004.**, v. 29, p. 71-79, 1966., v. 2, p. 189-223, 1981., v. 200, p. 893-898, 1994.

Epstein, M. A.; Achong, G.; Barr, Y.M.; Zajac, B.; Henle, G.; Henle, W. Morphological and virological investigations on cultured Burkitt tumor lymphoblasts (strain Rajii). **Journal Natational Cancer Institute**, v. 37, p. 547-559, 1966.

Fernandes, G; Chandrasekar, B.; Moun T.Z, J.D.; Zhao, W. Modulation of faz apoptotic gene expression in spleens of b/w mice by the source of dietary lipids with and without calorie restriction. **FASEB Journal**, v. 9, p. a78, 1998.

Goldyne, M.E.; Stobo, J.D. Immunoregulatory role of prostaglandins and related lipids.

Heimli H.; Hollung, K.; Drevon, C.A. Eicosapentaenoic Acid-Induced Apoptosis Depends on Acyl Coa-Synthetase. **Lipids**, v. 38, p. 263-268, 2003.

Henle, G & Henle, W. Studies on cell lines derived from Burkitt's lymphoma.

Hwang, D. Essential fatty acids and the immune response. **FASEB Journal**, v. 3, p. 2052-2061, 1989.

Innis, M.A. and Gelfand, D.H. Optimization of PCRs. *In*: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, San Diego, CA , Academic Press, 1990. p. 3-12.

Kew, S.; Mesa, J.D.; Tricon, S.; Buckley, R.; Minihane, A.M.; Yaqoob, P. Effects of Oils Rich in Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acid on Immune Cell Composition and Function in Healthy Humans. **American Journal of Clinical Nutrition**,

Marks., D.B.; Marks, A.D.; Smith, C.M. **Basic medical biochemistry**, Baltimore: Williams, Wilkins, p. 545-556, 1996.

Otton, R.; Graziola, F.; De Souza, J.A.A., Curi, T.C.P., Hirata, M.H., Curi, R. Effect of dietary fat on lymphocyte proliferation and metabolism. **Cell Biochemistry Function**, v. 16, p. 253-259, 1998.

Pompéia, C., Lopes, L.R., Miyasaka, C.K., Procopio, J.; Sannomiya, P., Curi, R. Effect of fatty acids on leukocyte function . **Brazilian Journal Medicine Biological Research**, v. 33, p. 1-14, 2000.